



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINAMICA CELULAR
Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular

Estacionalidad de la quitridiomycosis en poblaciones de
Ambystoma altamirani en la Sierra de las Cruces

TESIS

QUE PRESENTA:

Sara Lucia Anaya Morales

Para obtener el Grado de
LICENCIADA EN CIENCIAS

Directora de la Tesis:

Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo
Instituto de Ciencias Genómicas
Universidad Nacional Autónoma de México

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE 2020

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN.....	8
La quitridiomycosis y sus efectos en anfibios a nivel mundial	8
Biología del hongo patógeno <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (<i>Bd</i>).....	11
Métodos de detección y muestreo de <i>Bd</i>	16
Dinámica estacional en la incidencia de la quitridiomycosis causada por <i>Bd</i>	18
ANTECEDENTES	26
La quitridiomycosis en México	26
Diversidad del género <i>Ambystoma</i> en México.....	28
Quitridiomycosis en el género <i>Ambystoma</i>	30
<i>Ambystoma altamirani</i> : características biológicas, ecológicas y sus amenazas ..	31
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS	35
PREDICCIONES	35
OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
Muestreo de <i>A. altamirani</i>	37
Trabajo de laboratorio.....	38
Extracción de DNA	38
PCR en tiempo real (qPCR).....	38
a) Preparación de los Gblocks y construcción de la curva estándar	38
b) Oligonucleótidos y sonda utilizados en el qPCR	39
c) Condiciones del qPCR	40
d) Análisis estadísticos	41
RESULTADOS	44
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	59
PERSPECTIVAS.....	65
REFERENCIAS	66

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por permitirme llevar a cabo mi desarrollo profesional y estudiar esta maravillosa carrera.

Al Centro de Investigación en Dinámica Celular por todos los momentos que viví en sus pasillos, sus aulas y sus laboratorios.

Al Centro de Ciencias Genómicas por abrirme sus puertas para adquirir experiencia en sus laboratorios y para llevar a cabo este proyecto.

Al PAPIIT por el financiamiento otorgado que permitió la realización de este proyecto por medio del apoyo otorgado a la Dra. Eria Rebollar (IA201419).

A la doctora Eria Rebollar por abrirme las puertas en su laboratorio desde el principio, por su apoyo, tiempo, y principalmente por su accesibilidad y disposición para enseñarme siempre con paciencia y dedicación. Gracias por ser la mejor tutora que pude haber pedido y mostrarme una cara amable de la academia. Por último, gracias por abrirme más de una puerta en el mundo académico.

A la doctora Tanya González y al doctor Víctor Ávila por su apoyo en la realización del proyecto, por sus enseñanzas, por su amabilidad, por abrir las puertas de su casa y por toda la labor que realizan para volver de este país un lugar mejor.

A la doctora Angelica Santana por todas sus enseñanzas en la carrera, por ser una de las mejores maestras que he tenido, por transmitir su pasión por la ciencia y por el tiempo dedicado a este proceso.

Al doctor Ramon Batista por todo lo que me permitió aprender, por su tiempo y sus comentarios.

A la doctora Gabriela Parra por tomarse el tiempo de escuchar el proyecto, por sus comentarios y su gentileza.

A Dalia Zavala, Montserrat Vázquez, Paola Palacios, Juan Pablo Pérez, Honoria Rueda-González, Inés Rosas-Chávez, Luis Zárate y a Bienes Comunales de Santiago de Tlazala por su apoyo para y durante la realización del trabajo de campo.

DEDICATORIA

A mi mamá, la Dra. Sara Morales, por esforzarte toda la vida para darnos las mejores oportunidades y la vida más bonita. Gracias por ser el mástil de este barco y nunca permitir que ni la más dura tempestad lo hundiera. Gracias por cada comida, por cada vez que me tapaste a las 4 de la mañana mientras estudiaba, por ser mi más emocionada porrista, por ser psicóloga, enfermera y maestra 24/7. Gracias por siempre hacer de mis sueños los tuyos y hacer todo dentro de tu poder para que pueda conseguirlos. Gracias por todo el amor y el cuidado, te amo.

A mi hermana, la Mtra. Alejandrina Rodríguez, por ser mi más fiel compañera de vida. Gracias por darme ánimos y amor en cada proceso que he vivido. Gracias por toda tu sabiduría, por tu sonrisa y tus abrazos. Gracias por escucharme siempre y enseñarme con tus propios pasos el camino. Gracias por hacerme sentir tan importante y amada aún a la distancia, por presumirme siempre y por hacerme saber que no importa lo que yo haga siempre estarás ahí, orgullosa de mí. Te amo.

A mi tía, la Dra. Sonia Morales, por siempre hacerme sentir comprendida. Gracias por todas y cada una de las conversaciones sobre ciencia que hemos tenido desde que tengo memoria. Gracias por siempre escucharme y cultivar mi interés científico. Gracias por todos los viajes y ratos de diversión. Gracias por todas las horas que con tanto amor invertiste a guiarme en este proyecto.

A mis abuelos, Raúl Anaya y Raquel Núñez, por su apoyo incondicional, reconocimiento e inmenso amor a lo largo de mi vida. Gracias por siempre hacerme sentir importante y amada. Gracias por toda la cercanía, por todos los viajes en carretera y las caminatas en el bosque.

A Jorge Luis Ponce, por la compañía de toda la vida, porque quizás si me preguntan cómo se ve un padre, diría que como tú. Gracias por preocuparte siempre por mí en todos los aspectos, por cada viaje que planeaste solo para subirme el ánimo, por apoyarme y consentirme tanto siempre.

A Mariana, por enseñarme el verdadero amor incondicional. Gracias por los 15 años que pasaste al lado de mí viéndome crecer y acompañándome en cada paso. Gracias por todas las noches que dormías al lado de mí mientras yo hacía la tarea, por cada besito, por cada momento.

A Kiyoshi Ortega por ser el mejor amigo que pude haberle pedido a la vida. Gracias por estar incondicionalmente para escucharme y entenderme incluso cuando ni yo me entiendo. Gracias por hacerme saber que no importa el día o la hora, puedo contar contigo siempre.

A Cris Campos, por ser la mejor amiga que la vida pudo poner en mi camino. Porque juntas crecimos y caminamos estos años de la carrera muertas de risa,

comunicándonos con miradas, apoyándonos, aprendiendo la una de la otra y abrazándonos en algún momento.

A Daniela Cárdenas y Fernanda Vélez, por recordarme el lado divertido y desenfadado de la vida. Gracias por cada vez que me sacaron de mi zona de confort y me llevaron a vivir de los momentos más lindos y divertidos. Gracias por su amor y apoyo incondicional, gracias por las risas y por las lágrimas.

A mis amigxs, Erick Vázquez, Félix Klein y Andrea Rangel, por cada conversación y ratos de diversión. Gracias por todas las reuniones divertidas, por todos los juegos de mesa, los regalos, las aventuras y las risas.

A mi familia de hermosas mujeres por ser la red de apoyo más increíble que hay. Gracias por enseñarme de valor, de crecimiento, fortaleza, resiliencia y sororidad. Las amo.

A Raúl Anaya, por darme siempre las mejores oportunidades. Gracias por permitirme crecer y llegar hasta donde estoy en las mejores condiciones.

“Le rôle de l’infiniment petit dans la
nature est infiniment grand”

Louis Pasteur

RESUMEN

La quitridiomycosis, enfermedad ocasionada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) es actualmente uno de los principales factores de amenaza para los anfibios a nivel mundial. En México se ha detectado la presencia de *Bd* en al menos 78 especies de las 376 que existen en México. En esta investigación se documentó por primera vez la prevalencia e intensidad de infección de *Bd* en cuatro poblaciones del ajolote *Ambystoma altamirani*. Se realizaron cuatro muestreos a lo largo de un año, uno por cada estación, y se muestrearon ajolotes en tres etapas distintas de desarrollo (huevos, individuos con branquias e individuos sin branquias). A partir de las muestras recolectadas, se realizaron reacciones de qPCR para obtener los datos de prevalencia e intensidad de la infección por el patógeno. En cuanto a la prevalencia de la infección se observó una mayor prevalencia en las estaciones de primavera e invierno, comparada con la prevalencia observada en verano. En el caso de la prevalencia por sitio se encontró que ésta fue menor en Laguna Seca en comparación con los otros tres sitios. Respecto a los análisis de la intensidad de la infección se encontró que la estacionalidad no influencia de forma significativa la intensidad de la infección, aunque se observa cierto patrón estacional. En cuanto al sitio se encontró que éste sí influencia de forma significativa la intensidad de la infección siendo Tecpan el sitio con mayor intensidad y Laguna Seca el sitio con menor intensidad. Para el caso del estadio de desarrollo se observa que existieron diferencias significativas entre los huevos y las otras dos etapas de desarrollo. En cuanto a las correlaciones entre la intensidad de la infección y las variables fisicoquímicas del agua se encontró que los cambios en la intensidad de la infección no tienen una relación significativa con las variaciones del pH, el oxígeno disuelto, la conductividad, pero sí con la temperatura del agua. A pesar de que la infección se encuentra de manera persistente en los individuos muestreados, en los últimos dos años no se han registrado declives poblaciones en esta especie, lo cual sugiere que estas poblaciones coexisten con la infección.

INTRODUCCIÓN

La quitridiomycosis y sus efectos en anfibios a nivel mundial

A partir de la década de 1970 se comenzaron a registrar extinciones masivas y declives poblacionales de anfibios en numerosos países (Fisher and Garner, 2020). Posteriormente en 1998, Lee Berger y colaboradores describieron al patógeno causante: un hongo quitridio llamado *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Posteriormente, en el año 2013 se descubrió otro hongo patógeno perteneciente al mismo género llamado *B. salamandrivorans* (*Bsal*) (Martel *et al.*, 2013). Ambos patógenos (*Bd* y *Bsal*) han sido reportados como los únicos hongos pertenecientes al filo *Chytridiomycota* capaces de infectar vertebrados. Mientras que *Bd* se encuentra distribuido en todo el mundo (Scheele *et al.*, 2019), *Bsal* hasta ahora se ha reportado sólo en Asia y Europa. Hay evidencias filogenéticas de que ambos hongos son originarios de Asia, y que a pesar de estar diseminados por el continente no se han observado declives poblacionales preocupantes, sugiriendo que hay cierto grado de endemismo en el continente Asiático (O'Hanlon *et al.*, 2018) (Fisher and Garner, 2020).

El patógeno *Bd* ha afectado a los tres órdenes de anfibios existentes: Anura, Caudata y Gymnophiona demostrando una amplia y hasta ahora inigualable gama de organismos hospedadores. Por su parte, *Bsal* ha afectado principalmente al orden Caudata y en el caso del orden Anura se han observado solamente bajas intensidades en la infección pero sin desarrollar signos clínicos, es decir, que persisten con la infección pero tienen la carga suficiente para fungir como reservorios para las especies susceptibles (Stegen *et al.*, 2017) (Fisher and Garner, 2020).

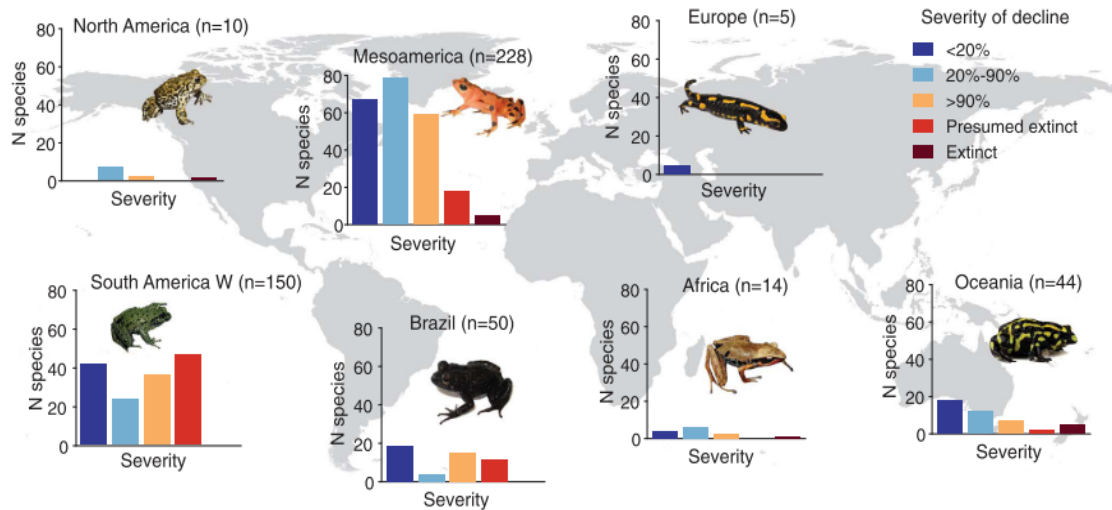


Figura 1. Distribución global de los declives poblacionales de anfibios asociados a quitridiomycosis (tomada de Scheele *et al.*, 2019).

A causa de la quitridiomycosis se han reportado disminuciones poblacionales en 501 especies de anfibios de las 8235 especies reportadas en el mundo, de las cuales 90 han sido declaradas extintas o presuntamente extintas en vida silvestre y otras 124 han experimentado una pérdida aproximada del 90% de su abundancia. La disminución de todas estas especies excepto una (*Salamandra salamandra*), que fue afectada por *Bsal*, se ha atribuido a la quitridiomycosis causada por *Bd*. En particular en el continente americano se han reportado disminuciones en alrededor de 438 especies, en el caso particular de la región de Mesoamérica 228 especies se han visto afectadas en diferentes grados (ver Figura 1) (Scheele *et al.*, 2019). Hasta ahora *Bd* ha ocasionado la mayor pérdida de biodiversidad que no se atribuye a factores antropogénicos.

Se considera que la dispersión de estos hongos a otros continentes se debe a la importación de anfibios para colecciones (Pessier *et al.*, 1999), al tráfico de especies (Mutschmann *et al.*, 2000), al mercado alimentario (Mazzoni *et al.*, 2003) y al transporte de animales de laboratorio (Parker *et al.*, 2002).

Hasta el momento existen seis regiones en las que se ha encontrado la presencia de *Bd*: el este de Australia, la península de Mesoamérica, América del Sur, Estados Unidos, África y Europa. En estos sitios se han identificado cinco linajes

distintos de *Bd*: *Bd*CAPE, *Bd*Asia1, *Bd*Asia2/Brasil y *Bd*Asia3, que se han encontrado en localidades restringidas en todo el mundo. Además de los linajes anteriores, se encuentra el linaje panzoótico global (*Bd* GPL) que es el responsable de los declives de anfibios relacionados con *Bd*. Se ha encontrado que el linaje *Bd*-GPL incluye dos grupos genéticos: *Bd*-GPL-1, que se encuentra habitualmente en América del Norte y Europa, y *Bd*-GPL-2, que está distribuido mundialmente (Figura 2) (O’Hanlon *et al.*, 2018)(Fisher and Garner, 2020).

Existen dos hipótesis sobre la dispersión global de *Bd*: la “hipótesis del patógeno nuevo” (NPH, por sus siglas en inglés), que sugiere que la quitridiomycosis surgió de forma local después de haber sido diseminada en hábitats prístinos por medio de las rutas de comercio intercontinentales (Fisher and Garner, 2020). Por otra parte, la “hipótesis del patógeno endémico” (EPH, por sus siglas en inglés) propone que *Bd* era un hongo comensal diseminado entre los anfibios y que debido al cambio climático se volvió más virulento y ocasionó desbalances en las dinámicas de infección (Skerratt *et al.*, 2007). Actualmente la hipótesis más aceptada es la del NPH debido a que la identificación de diferentes linajes de *Bd* permitió observar a partir de la filogenia del linaje panzoótico global (*Bd*-GPL) que este se distribuye en los cuatro continentes, su diversidad genética es limitada, tiene alta virulencia, y que su origen se remonta a principios del siglo XX época que coincide con el incremento del tráfico de especies a lo largo del mundo (Fisher and Garner, 2020). Posteriormente con la aparición de *Bsal* en Europa, se observó que este hongo sólo podía ser encontrado en el sudeste de Asia, lo cual apoya la NPH sugiriendo que el origen de estos hongos sí es en Asia.

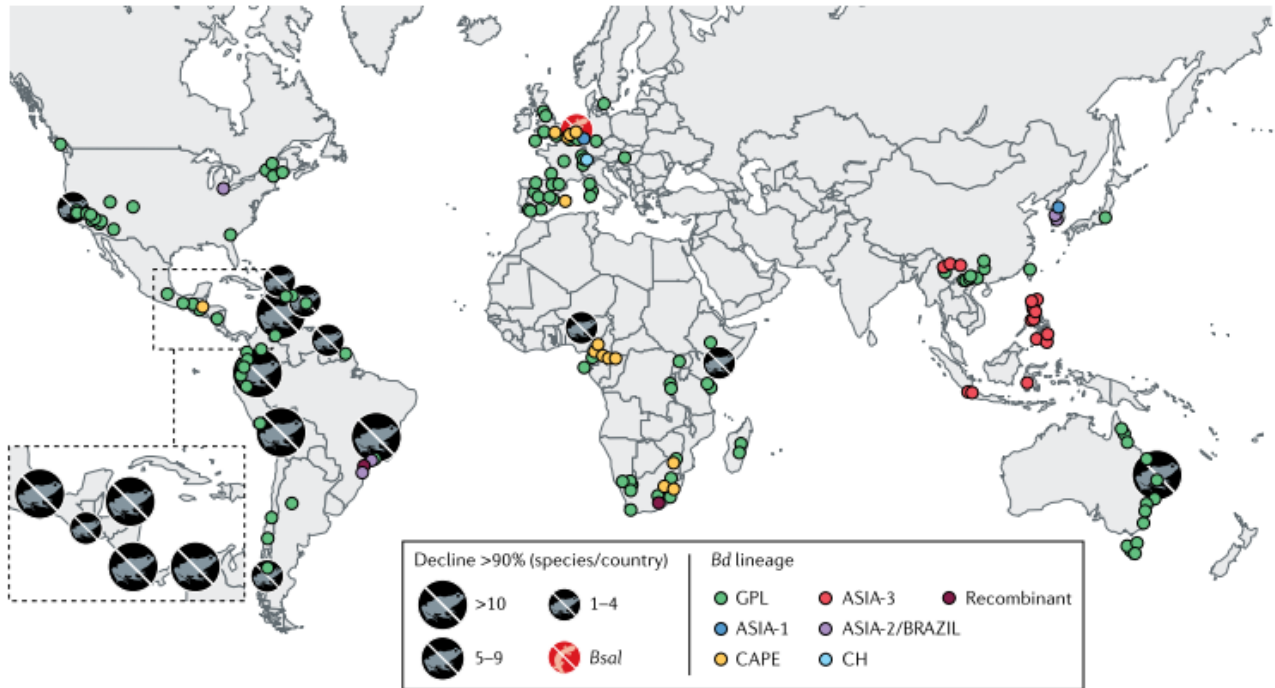


Figura 2. Distribución global de *Bd* y sus linajes (tomado de Fisher and Garner, 2020).

Biología del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*)

Bd tiene dos etapas de vida conocidas que son típicas de los quitridios: una sésil, que consta de un talo reproductivo con un solo zoosporangio y una móvil, compuesta por zoosporas uniflageladas que son liberadas del zoosporangio y pueden nadar hasta 24 h cubriendo una distancia de 2 cm en medios inmóviles (Figura 1A) (Rosenblum *et al.*, 2010) (Berger *et al.*, 2005) (Collins, 2010). El ciclo de vida de *Bd* inicia cuando las zoosporas del hongo se enquistan en la piel del anfibio y se desarrollan formando el talo, posteriormente el hongo madura y forma el esporangio, después de tres a cuatro días éste libera las zoosporas maduras que pueden continuar infectando al mismo anfibio o a otros (Figura 3A).

Como resultado de la infección por *Bd*, se observan úlceras y enrojecimiento en la piel de los anfibios en las zonas ventral, dactilar y en las patas (Figura 3B). En cortes histológicos de individuos infectados se observan anomalías

específicamente en los estratos córneo y granuloso de la piel (Figura 3C), ya que es ahí donde se ubican y maduran los esporangios del hongo (Berger *et al.*, 1998).

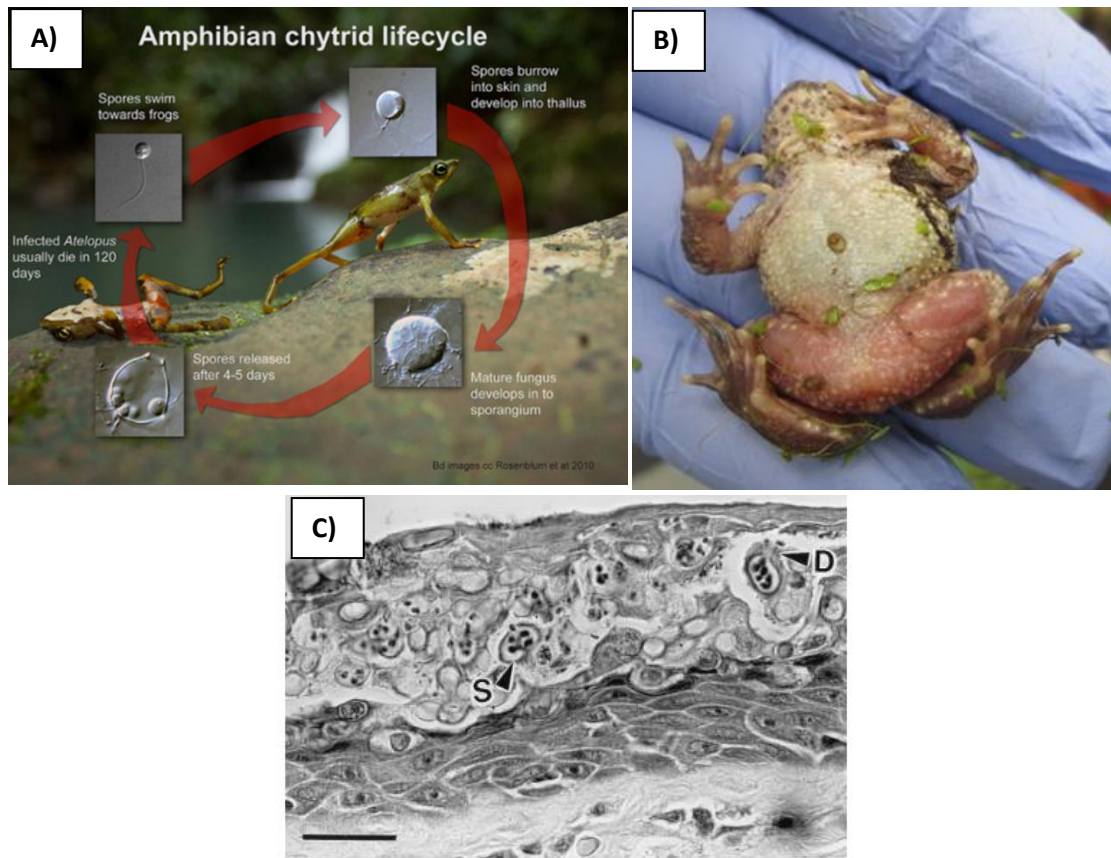


Figura 3. A) Ciclo de vida de *Bd* (tomado de Rosenblum *et al.*, 2010); **B)** Anfibio afectado por quitridiomycosis causada por *Bd* (tomado de Consorci del Ter/Proyecto Life Potamo Fauna); **C)** Histología de la quitridiomycosis causada por *Bd* donde se observa a los esporangios y zoosporas en la piel de la rana *Litoria caerulea* (tomado de Berger *et al.* 1998).

Dado que *Bd* ocasionó tantos declives poblacionales en diversas especies de anfibios surgió la necesidad de observar el mecanismo de infección, así como sus efectos en la salud de los individuos tanto a nivel microscópico como la manifestación de signos clínicos, para lo cual se han realizado varias investigaciones (Daszak *et al.*, 1999) (Briggs *et al.*, 2005). En este sentido, en una serie de tres experimentos durante marzo-octubre de 1998, dos especies de ranas venenosas criadas en cautiverio (*Dendrobates tinctorius* y *D. auratus*) fueron expuestas a zoosporas de *Bd*.

Todas las ranas expuestas al hongo desarrollaron signos clínicos de la infección en la piel y todas murieron, mientras que ninguna de las ranas de control desarrolló lesiones en la piel. El signo clínico más consistente en las ranas expuestas a *Bd* era el desprendimiento excesivo de la piel. El examen microscópico de las piezas de piel desprendidas y/o de las huellas cutáneas demostró la presencia de quitridios y se utilizó para la confirmación ante mortem y post mortem de la infección por *Bd*. Histológicamente, hubo hiperqueratosis epidérmica, hiperplasia e hipertrofia asociada con un número bajo a moderado de quitridios en las capas queratinizadas. El hongo aislado utilizado en estos estudios fue cultivado originalmente de una rana azul venenosa en cautiverio que murió con una enfermedad de la piel en la que se encontraron varios talos (Longcore, Pessier and Nichols, 1999). Este aislado se mantuvo en cultivo puro y luego utilizado para reproducir experimentalmente la infección en *D. tinctorius*. El mismo quitridio se recuperó en cultivo puro de las tres ranas afectadas a partir de las cuales se hicieron cultivos. Por lo tanto, estos experimentos cumplieron con los postulados de Koch (Samuelson and Von Lichtenberg, 1994) demostrando concluyentemente que *Bd* puede causar esta enfermedad de la piel en al menos tres especies de ranas dendrobátidas. No se conoce el mecanismo por el cual las infecciones cutáneas ocasionadas por *Bd* causaron la muerte de las ranas infectadas. Otros órganos no contenían lesiones, lo que indica que la enfermedad de la piel fue directamente responsable de las muertes. Las funciones normales de la piel de los anfibios incluyen el mantenimiento de la hidratación, la osmorregulación, la termorregulación y, en diversos grados entre diferentes especies, la respiración (Duellman and Trueb, 1986). Los cambios cutáneos inducidos por *Bd* pueden haber interferido con una o más de estas funciones de la piel, resultando en anomalías metabólicas fatales (Nichols *et al.*, 2001).

Gracias a que *Bd* se ha podido aislar y mantener en cultivo, se han podido explorar múltiples aspectos de su fisiología y observar las condiciones preferentes de su crecimiento *in vitro* (Voyles, Rosenblum and Berger, 2011). En uno de los primeros estudios se cultivaron diferentes aislados obtenidos de distintas especies de ranas, sapos y salamandras, así como de diferentes sitios a lo largo de Estados

Unidos. Estos aislados fueron sometidos a diferentes condiciones de temperatura y pH, se encontró que las condiciones óptimas para su crecimiento *in vitro* eran a una temperatura de 17 a 25 °C y un pH de 6 a 7 (Piotrowski, Annis and Longcore, 2004). También se observó que al someter los cultivos a 30°C después de 8 días al menos la mitad de las células en el cultivo estaban muertas. *Bd* produce proteasas extracelulares no específicas que fueron capaces de degradar caseína y gelatina, pero no queratina. A pesar de que el hongo tiene una preferencia por los epitelios queratinizados, éste no demostró tener alguna actividad medible en cultivos con queratina; lo anterior puede deberse a los diferentes tipos de queratina (Rosenblum *et al.*, 2008) y el utilizado puede ser más resistente a las proteasas de *Bd*, otro factor destacado es que no se ha asegurado que el hongo degrade la queratina de los epitelios donde se aloja (Rosenblum *et al.*, 2012). Las observaciones del movimiento de las zoosporas *in vitro* demostraron que éstas lograban moverse menos de 2 cm antes de enquistarse, lo cual sugiere que tienen una reducida capacidad de movimiento. En la piel de los anfibios infectados los talos se encuentran en cúmulos de células infectadas y no suelen distribuirse a lo largo de toda la piel, se propone que esto se debe a que varias zoosporas se enquistan e infectan células en el área inmediata de donde son liberadas (Pessier *et al.*, 1999). Cabe destacar que, aunque se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento, también se observó que por debajo o por encima de éstas el hongo continúa con vida, aunque sin crecer o con una baja tasa de crecimiento. Lo anterior les permite continuar su actividad y crecimiento en caso de llegar a un nicho óptimo. De lo anterior se concluye que este patógeno tiene la capacidad de sobrevivir en diferentes ambientes y condiciones.

Estudios evaluando el efecto de la infección de *Bd* sobre los anfibios han encontrado que éste es capaz de inhibir la respuesta inmune de los anfibios que infecta (Rollins-Smith *et al.*, 2011) (Maniero and Carey, 1997). En una investigación, se utilizaron leucocitos peritoneales y esplenocitos de *Xenopus laevis* estimulados con activadores específicos de linfocitos T o con bacterias atenuadas con calor para estimular linfocitos B, para observar su respuesta ante la exposición a zoosporas de *Bd*. Se observó que *Bd* puede evitar la activación de los linfocitos e interferir con

la proliferación una vez que ya se indujo la activación, así como inducirlos a apoptosis, lo anterior se atribuyó a factores solubles liberados por el hongo (Fites *et al.*, 2013). Después de tratamiento con calor, ácido y con proteinasa K para hacer la caracterización bioquímica de los factores inhibidores de linfocitos liberados por *Bd*, la capacidad inhibitoria se mantuvo, de lo cual se dedujo que los factores inhibitorios no eran proteínas. Considerando lo anterior se propuso que estos factores eran componentes de la pared celular, lo cual es consistente con la falla de las zoosporas de inhibir la proliferación *in vitro*, ya que estas aún no tienen pared celular. Posteriormente se llevó a cabo un estudio donde se aislaron y se caracterizaron estos factores inhibitorios de la respuesta inmune de los anfibios: tres metabolitos producidos por *Bd* con actividad inmunomoduladora (Rollins-Smith *et al.*, 2015). Los tres metabolitos encontrados fueron la metiltioadenosina (MTA), el triptófano, así como un producto de la oxidación del triptófano llamado kinurenina (Kyn). Consecuente con los resultados en que las zoosporas son incapaces de inhibir linfocitos, se encontró por medio de HPLC que éstas mostraban ausencia de picos de MTA y triptófano. Se observó un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación de linfocitos T al añadir cierta concentración de MTA a la Kyn. Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual la MTA inhibe a los linfocitos, se observó que esta es capaz de inhibir tanto a los linfocitos T como a los B en sistemas modelo de mamíferos. Por esto, se infirió que, si la MTA se produce abundantemente y se libera por *Bd* dentro de la piel, podría contribuir a la supresión inmune local, permitiendo que los zoosporangios maduren y liberen más zoosporas sobre la superficie de la piel para promover una mayor colonización. También mencionan que *Bd* puede convertir activamente el triptófano a Kyn y liberarlo en el ambiente local de la piel lo cual podría inhibir la inflamación, posiblemente explicando la falta de reclutamiento de leucocitos durante la quitridiomycosis, así como crear una barrera a la inmunidad efectiva de las células T. Cabe destacar que este estudio se probó solamente en células de *X. laevis*, se propone que estos son los factores inhibitorios producidos por *Bd* cuando infecta a cualquier anfibio, sin embargo, deben considerarse las diferentes características de la respuesta inmune de las diferentes especies de anfibios.

Métodos de detección y muestreo de *Bd*

Considerando la gran amenaza que *Bd* representa para la diversidad de anfibios, se han desarrollado diferentes métodos de detección, tales como la histopatología, histoquímica, microscopía electrónica y PCR en tiempo real.

La histología y la inmunohistoquímica tienen menos sensibilidad que el PCR ya que la probabilidad de que el hongo esté presente en el tejido examinado está relacionada con la etapa de la infección (Olsen *et al.*, 2004). Además, estos métodos son invasivos ya que requieren del análisis de varias zonas de la piel del anfibio infectado. El PCR en tiempo real a partir de hisopados es un método no invasivo que permite detectar la infección antes de que se observen signos clínicos, en comparación con la histología con la que se puede detectar la presencia de *Bd* hasta pasados aproximadamente diez días post-infección (A. D. Hyatt *et al.*, 2007).

En un principio también se desarrollaron métodos invasivos de muestreo como el corte de dedos en el caso de individuos sin branquias o la escisión de discos orales en el caso de los renacuajos. En cuanto a la técnica de corte de dedos, a pesar de que ha demostrado ser un alternativa útil para detectar zoosporas de *Bd*, las muestras obtenidas suelen ser más útiles para procesarse por histopatología o histoquímica, que por PCR. Este método no ha probado ser superior a otros métodos de muestreo ya que es sumamente invasivo (May, 2004)(Mccarthy and Parris, 2004). El método de muestreo más aceptado actualmente es el frotis o hisopado, esto se debe a que es un método no invasivo que puede llevarse a cabo en laboratorios y en muestreos en campo tanto en individuos sin branquias como en renacuajos. La manera en la que se toman las muestras es importante ya que deben frotarse las zonas queratinizadas, en el caso de los individuos sin branquias se frota en la zona ventral, las patas y la zona dactilar; para los renacuajos es necesario frotar la zona de la boca. Además de lo anterior, las muestras tomadas permanecen viables por periodos de hasta un año si se almacenan de forma óptima. El hisopado también proporciona una mejor recuperación de DNA y garantiza un riesgo mínimo de contaminación de la muestra (A. Hyatt *et al.*, 2007).

Como se mencionó, los primeros métodos para detectar la infección por *Bd*, eran métodos invasivos principalmente de histopatología. Lo anterior tenía consecuencias ya que la mayoría de las veces era negativo para el individuo infectado. En un estudio publicado en 2004 se estableció el primer protocolo de PCR en tiempo real para detectar la infección por *Bd* de una manera no invasiva (Boyle et al., 2004). Como parte de los nuevos métodos de detección, en el año 2013 se diseñó un nuevo dúplex de PCR en tiempo real con el fin de detectar simultáneamente a *Bd* y a *Bsal*. Lo anterior se logra por medio de la construcción de fragmentos sintéticos (GBlocks) que contienen un fragmento de los genes del espaciador transcrito intergénico 1 (ITS1) y del 5.8 ribosomal de *Bd* y *Bsal* respectivamente. Estos GBlocks sirven como control positivo y permiten la cuantificación precisa del número de copias de los genes patógenos (Standish et al., 2018). También permiten generar una curva estándar de concentración para comparar con los datos obtenidos de las muestras (Bloo et al., 2013).

El actual protocolo de PCR en tiempo real para detectar el hongo a partir de hisopos de piel de anfibios se dirige a la región del ITS1 utilizando una sonda fluorescente TaqMan específica para *Bd* (Boyle et al., 2004). Un aspecto para considerar cuando se realiza este tipo de ensayo son las consecuencias de las diferencias genómicas en la cuantificación de ITS1 (Rebollar et al., 2017), esto se debe a la existencia de cepas divergentes que pueden portar polimorfismos en los sitios de unión de la sonda, o variaciones en el número de copias del ITS1 presentes en las distintas cepas del hongo (Bletz, Rebollar and Harris, 2015). Por lo anterior, la eficiencia y sensibilidad del qPCR entre las cepas también pueden variar, lo cual reduce la comparabilidad de las estimaciones de la intensidad de infección entre distintos sitios.

En 2013 se llevó a cabo un estudio para cuantificar y caracterizar regiones ITS1 en múltiples cepas de *Bd* para evaluar los efectos del número de copias y la variación de la secuencia en la eficiencia qPCR y la cuantificación de zoosporas entre cepas (Longo et al., 2013). Encontraron que, al tomar el mismo número de zoosporas de diferentes cepas, estas tenían diferentes concentraciones de DNA,

de lo cual infieren que las diferencias en el tamaño del genoma de *Bd* ocasionan los sesgos en la cuantificación del DNA entre las cepas. Sus resultados demostraron que el uso de recuentos de zoosporas para establecer curvas estándar qPCR puede ser problemático porque las cepas de *Bd* varían en su número de copias del ITS1. Recomiendan que para estimar la carga absoluta de zoosporas de *Bd* de los anfibios o el medio ambiente se tendría que incorporar una medida independiente para estimar el número de copia ITS1 de la cepa utilizada como estándar. La variación del número de copias de ITS1 entre linajes de *Bd* tiene importantes implicaciones para estudios comparativos de la dinámica de la enfermedad en poblaciones de anfibios aisladas espacialmente. Por lo anterior, mencionan que para poder comparar los resultados más fácilmente es importante reportar el número de copias del ITS1 por zoospora de la cepa utilizada para qPCR, o el número de copia de ITS por muestra, además de los equivalentes genómicos de *Bd*.

Dinámica estacional en la incidencia de la quitridiomicosis causada por *Bd*

Como parte de los estudios que se han realizado para comprender la biología de *Bd* y la dinámica ecológica de la quitridiomicosis se han observado patrones estacionales asociados a esta enfermedad, dichos patrones incluyen factores e interacciones de distintos tipos (ver Tabla 1).

Artículo	Especie(s)	Año y sitio	Patrones observados	Tipo de clima
(Ruggeri et al., 2015)	<i>Hylodes asper</i> <i>H. phyllodes</i> <i>Cycloramphus boraceiensis</i>	2007 – 2011 Brasil	Variación en el número de ranas se correlaciona con variables climáticas, que aumentan la probabilidad de infección por <i>Bd</i> . La	Tropical

			<p>actividad nocturna puede facilitar la transmisión de <i>Bd</i> o aumentar la susceptibilidad de los hospederos.</p>	
(Longo, Burrowes and Joglar, 2009)	<p><i>Eleutherodactylus coqui</i> <i>E. portoricensis</i></p>	<p>2005 – 2007 Puerto Rico</p>	<p>Los niveles de infección fueron significativamente más altos durante la temporada seca y húmeda en ambas especies.</p> <p><i>Bd</i> puede persistir en comunidades de ranas tropicales sin diezmar la población, pero durante las épocas secas pueden darse declives poblacionales por la conjugación de diferentes factores.</p>	<p>Sub - tropical</p>
(Hudson <i>et al.</i> , 2019)	<p><i>Eleutherodactylus spp.</i></p>	<p>2011 -2014 Dominica y Montserrat</p>	<p>Variaciones de la intensidad de la infección con la temperatura y entre los sitios.</p> <p>Disminución tanto de la prevalencia como de la intensidad en los meses más cálidos y húmedos.</p>	<p>Tropical</p>

(Nava-González et al., 2020)	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Ambystoma rivulare</i> -<i>Craugastor hobartsmithi</i> -<i>C. occidentalis</i> -<i>Dryophytes plicatus</i> -<i>Plectrohyla bistincta</i> -<i>Lithobates montezumae</i> -<i>L. spectabilis</i>, -<i>L. neovolcanica</i> -<i>Isthmura bellii</i> -<i>Pseudoeurycea leprosa</i> -<i>P. longicauda</i> 	2016 - 2017 México	<p>8 de las 11 especies estaban infectadas por <i>Bd</i>. Relación negativa entre la prevalencia de <i>Bd</i>, la temperatura y las precipitaciones.</p> <p>La intensidad de la infección fue más alta a temperaturas por encima de los 10° C y mayores niveles de humedad (100mm de precipitación).</p>	Templado
(Longo and Zamudio, 2017)	<i>Eleutherodactylus coqui</i>	2012 Puerto Rico	Las fluctuaciones ambientales estacionales podrían generar oportunidades para el recambio de la microbiota cutánea, potencialmente atenuando la transmisión de <i>Bd</i> , contribuyendo así a la persistencia del hospedero, <i>E. coqui</i> .	Tropical
Tabla 1. Estudios sobre estacionalidad en la infección por <i>Bd</i> y principales resultados.				

Según los artículos mencionados en la Tabla 1. los cambios observados a través de las estaciones se deben a múltiples factores como son cambios en las

variables ambientales, cambios en la efectividad del sistema inmune, cambios en la estructura y función de la microbiota y cambios en la conducta. A continuación, se explicarán brevemente dichos factores.

En estudios longitudinales evaluando la prevalencia e intensidad de la infección por *Bd* en poblaciones de anfibios se ha reportado que ésta puede persistir a lo largo de distintas estaciones, sin embargo, se ha observado que la incidencia de la infección aumenta en las estaciones con temperaturas inferiores a los 25°C y tiende a disminuir en las temporadas con temperaturas por debajo de los 17°C o por encima de los 25°C, aunque esto varía según las zona geográfica (Pounds *et al.*, 2006). De lo anterior se deduce que el riesgo de infección varía de acuerdo con las estaciones y que esto puede deberse principalmente a las variaciones en las condiciones ambientales (temperatura, humedad, entre otras).

En un estudio sobre la fisiología de *Bd*, se encontró que *in vitro* éste tiene un rango óptimo de temperatura para su crecimiento que va de los 17 a los 25°C (Piotrowski *et al.*, 2004), por lo que se sugiere que en el ambiente éste tendrá un mejor crecimiento en climas fríos o templados, mientras que es sensible a las altas temperaturas y a la desecación (Johnson *et al.*, 2003). En este sentido, el cambio climático y la perturbación de los hábitats podrían incrementar la probabilidad en la tasa de infección: Pounds *et al.* (2006) afirmaron que en sitios de clima templado, el cambio climático es un factor clave en los declives poblacionales de anfibios, ya que ocasiona un aumento en la temperatura de entre 1 y 3°C promoviendo así un gradiente termal cercano al intervalo de temperatura óptima de crecimiento del hongo (Piotrowski, Annis and Longcore, 2004).

Considerando los efectos que la temperatura puede tener en el crecimiento del hongo, es relevante mencionar los efectos que los cambios en la temperatura pueden tener sobre los hospederos, es decir, los anfibios. Estudios previos han demostrado que bajas temperaturas pueden ocasionar inmunosupresión en vertebrados ectotérmicos, ya que al disminuir la temperatura corporal disminuye también el número de linfocitos, así como la síntesis y actividad de los anticuerpos (Wright and Cooper, 1981). En un estudio llevado a cabo en *Rana pipiens* que es

una especie nativa de Norte América y se distribuye en un amplio rango de altitudes, se observaron cambios en diferentes aspectos del sistema inmune en función de los cambios en la temperatura. Particularmente se observó que algunas células del sistema inmune como los eosinófilos y el complemento presentan una disminución en su actividad cuando son sometidas a bajas temperaturas (Maniero and Carey, 1997).

En algunos casos, se ha observado que cuando se somete a los anfibios a temperaturas por debajo de su nicho óptimo, estos pueden presentar una serie de cambios que los hacen más susceptibles a la quitridiomycosis, por ejemplo: descenso en la producción de secreciones antimicrobianas y mucosas, cambios más lentos de las células epidermales y posiblemente disminución en la capacidad de metabolizar toxinas producidas por el hongo (Berger *et al.*, 2004). Para el caso del género *Ambystoma* no se tiene un conocimiento preciso sobre cómo reacciona el sistema inmune ante las altas o bajas temperaturas, sin embargo, es evidente que todos aquellos anfibios que son sometidos a condiciones por encima o por debajo de su nicho óptimo de vida pueden comprometer su respuesta inmune.

Se ha comprobado que la actividad antimicrobiana de la microbiota de la piel de igual forma, es dependiente de la temperatura y otros factores abióticos, ya que puede haber variaciones en la composición y función de estos microorganismos como se observa en la Figura 6 (Rebollar *et al.*, 2016). Algunas bacterias de la piel de los anfibios producen metabolitos secundarios así como compuestos volátiles que contribuyen a la protección del anfibio y en algunos casos tiene actividades contra *Bd* (Woodhams *et al.*, 2018) (Varga, et al., 2019). Sin embargo, la actividad de las bacterias antifúngicas puede depender de las condiciones del medio ambiente como el pH, la temperatura o la humedad, entre otras (Muletz-Wolz *et al.*, 2017). En algunos sitios con temperaturas por debajo del óptimo de crecimiento de *Bd*, se han detectado declives poblacionales ocasionados por éste, es posible que estas disminuciones se produjeran debido a la disminución de la actividad anti-*Bd* de los simbiontes bacterianos al estar sometidos a bajas temperaturas (Daskin *et al.*, 2014).

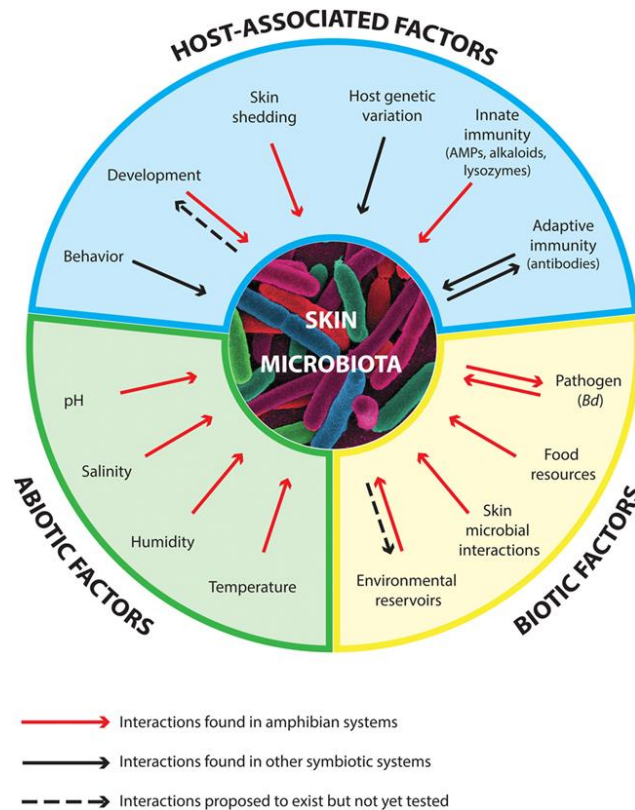


Figura 4. Factores que influyen en la microbiota de la piel de anfibios. (Tomado de Rebollar et al. 2016)

En una revisión sobre artículos basados en el campo publicados entre 1999 y 2020, se evaluaron 102 artículos sobre la ocurrencia de *Bd* y variables que influyen la infección (Sasso, McCallum and Grogan, 2021). De acuerdo con ésta, se observa que se deben tomar en cuenta otras variables adicionales a la temperatura, ya que esta suele ser considerada como el factor ambiental más importante. Estas variables que se toman en cuenta en pocos estudios pueden ser: la variación intraespecífica de la respuesta genética al patógeno, la presencia de especies invasoras u otros taxones, la salinidad e incluso la presencia de predadores de *Bd*. Al igual que con todos los sistemas hospedero-patógeno, los patrones de la infección *Bd* entre las especies y dentro de ellas están formadas por un conjunto de variables complejas relacionadas con el patógeno, los rasgos del hospedero y las condiciones ambientales, así como sus interacciones (Scholthof, 2006)(Rowley and Alford, 2009; James *et al.*, 2015). Tomando en cuenta la gran amenaza que la quitridiomycosis representa para la diversidad de anfibios, se menciona que la

mayoría de los sitios estudiados en los artículos revisados, no corresponden con los sitios de principal importancia en cuanto a especies en categorías de riesgo. Lo anterior puede significar falta de representación de ciertas especies o países y un sesgo en la información actual que se tiene sobre la distribución de *Bd* y las afectaciones que este ha causado (IUCN, 2020). Otro tema mencionado es el de las mediciones que se utilizan para evaluar la infección por *Bd*, siendo la prevalencia y la intensidad de la infección los más utilizados, sin embargo, existen otras mediciones que podrían aportar más datos, pero se desconoce su sensibilidad y especificidad para este patógeno en particular (Keesing, Holt and Ostfeld, 2006). Finalmente destacan la importancia de estudiar las zonas geográficas poco representadas, así como la de tomar en cuenta al llevar a cabo el trabajo de campo y los análisis de la infección por *Bd* tomando en cuenta la genética y los factores abióticos.

Muletz-Wolz y colaboradores (2017) llevaron a cabo un estudio para cuantificar las propiedades inhibitorias de algunas cepas bacterianas anti-*Bd* contra *Bd* y *Bsal*, así como la influencia en la inhibición que puede tener la temperatura, la relación entre el genotipo de *Batrachochytrium* y la interacción con la fuerza de la inhibición bacteriana. También se buscó determinar si el parentesco entre linajes fúngicos es un predictor de la fuerza de la inhibición bacteriana. Para esto llevaron a cabo ensayos de inhibición en placas a dos diferentes temperaturas con diferentes especies y cepas bacterianas contra diferentes aislados de *Bd* y contra *Bsal*. Sus principales hallazgos fueron que el grado de inhibición bacteriana es ve afectado tanto por el genotipo de *Batrachochytrium* como por la temperatura. Los autores destacan que es importante considerar el contexto ambiental en las interacciones hospedero-patógeno, ya que observaron que el efecto de la temperatura en la inhibición de patógeno se debía a la interacción del genotipo de *Batrachochytrium* y las cepas bacteriana. Sugieren que los cambios en la fuerza de inhibición se deben a los metabolitos secundarios, cuya actividad puede variar con la temperatura. También mencionan que entre aislados de *Batrachochytrium* hay variaciones fenotípicas que dependen de la temperatura y que pueden afectar su susceptibilidad a compuestos inhibitorios. El estudio concuerda con la hipótesis de que la similitud

entre genomas fúngicos puede ser un predictor de la fuerza de inhibición bacteriana, mientras que no encontraron una relación entre el parentesco bacteriano y los patrones de inhibición (Muletz-Wolz *et al.*, 2017).

Los cambios en la conducta de los anfibios en respuesta a cambios ambientales también ha sido un factor influyente en la dinámica de la infección (Richards-Zawacki, 2010)(Rowley and Alford, 2007). Algunas especies tienden a congregarse cuando las temperaturas son bajas, otras a agruparse en sitios húmedos cuando aumenta la temperatura (Roznik and Alford, 2015), en grietas cuando hay descensos de esta o cuando están en época de reproducción (Hudson *et al.*, 2019). Dichos cambios en la conducta pueden ocasionar un aumento en la tasa de contacto entre individuos lo cual incrementa la tasa de transmisión, así como la prevalencia (Berger *et al.*, 2004). Además de los cambios de conducta, algo importante de considerar son las interacciones naturales entre especies simpátricas. Las diferentes especies de anfibios responden de manera diferente a la quitridiomycosis, existen especies altamente susceptibles mientras que hay otras que no lo son y a pesar de estar infectadas no desarrollan la patología fungiendo como reservorios. En algunos casos se han observado interacciones entre especies reservorio y especies susceptibles lo cual ocasiona un mayor y más negativo impacto para las especies susceptibles (Hudson *et al.*, 2019).

En este estudio se pretende determinar la prevalencia y la intensidad de la infección por *Bd* en cuatro poblaciones de la especie de salamandra/ajolote perteneciente al orden Caudata, *Ambystoma altamirani*, así como sus variaciones según los cambios fisicoquímicos en el ambiente a lo largo de las cuatro estaciones del año. Aunque no hay estudios que describan a profundidad la quitridiomycosis en esta especie, estudios previos han registrado individuos infectados (Frías-Alvarez *et al.*, 2008), por lo cual se espera encontrar la presencia de *Bd*. Al ser éste un estudio longitudinal, se espera que los valores de la prevalencia y de la incidencia, varíen de acuerdo con los cambios ambientales relacionados con el cambio estacional.

ANTECEDENTES

La quitridiomicosis en México

En México los primeros datos de la presencia de *Bd*, se obtuvieron de ejemplares de colección en la década de 1970 (Lips, 2011). Actualmente se ha registrado la presencia de *Bd* en 74 especies de anfibios pertenecientes a los órdenes Anura y Caudata que se distribuyen, principalmente en las regiones montañosas del centro y sur del país (Mendoza-Almeralla et al., 2015)(Frías-Alvarez et al., 2008)(García Feria, Brousset and Cervantes Olivares, 2019).

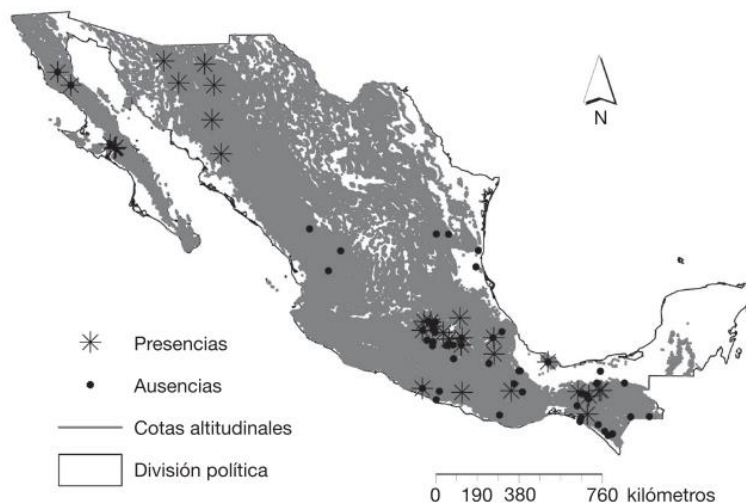


Figura 5.

Mapa de la distribución de *Bd* en México. Los asteriscos señalan sitios donde se ha detectado la infección. Los círculos señalan sitios muestreados donde no se ha registrado la infección. (Tomado de Mendoza-Almeralla et al., 2015)

A pesar de que los primeros datos de la presencia de *Bd* son de 1970, en una investigación reciente sobre los patrones de distribución actuales e históricos de *Bd* en México se encontraron especímenes *Bd*-positivos en ejemplares de colección que datan de finales de los 1800s (Basanta et al., 2021). Lo anterior demuestra la presencia de *Bd* incluso antes de los primeros registros y declives poblacionales. Basanta y colaboradores muestrearon poblaciones silvestres de anfibios, así como

individuos en colecciones y realizaron un ensayo de genotipificación para evaluar la presencia, prevalencia y diversidad genética de *Bd* a lo largo del tiempo en México. Una vez obtenidos los genotipos a partir de las muestras tomadas se observó una dominancia en la presencia del linaje panzoótico global (GPL) en México y se reportaron cuatro sub-poblaciones genéticas, así como el potencial de estas poblaciones de mezclarse entre sí. También se encontró que el clado *Bd*-GPL-1 se encuentra distribuido a lo largo del país en comparación con el *Bd*-GPL-2 que se encontró solamente en dos estados. La co-ocurrencia de *Bd*-GPL-1 y *Bd*-GPL-2 puede sugerir interacciones complejas entre estos genotipos de *Bd* y sus hospederos. Se menciona que en investigaciones sobre la dinámica de coinfección de diferentes genotipos de *Bd* en el laboratorio, se ha encontrado que la competencia entre genotipos puede resultar en cambios en la diversidad de patógenos, ya que pueden alterar la virulencia (Jenkinson *et al.*, 2018). Por lo anterior, las interacciones entre los genotipos de *Bd* pueden tener el potencial de alterar los resultados de la enfermedad a escalas regionales, lo que plantea nuevas amenazas a los anfibios nativos en México. Por último, se menciona que la diversidad genética de la población de *Bd* no muestra un patrón geográfico, y los diferentes clusters genéticos y patrones de mezcla sugieren propagación y recombinación en varias zonas (Basanta *et al.*, 2021).

La presencia de *Bsal* aún no ha sido reportada en el continente americano, sin embargo, se predice que llegará y que esto causará severas afectaciones particularmente a las especies pertenecientes al orden Caudata considerando que *Bsal* tiene una mayor afinidad por éstas (Martel *et al.*, 2013)(Lips, 2016)(O'Hanlon *et al.*, 2018). En un estudio reciente se llevó a cabo un análisis sobre el riesgo potencial de la llegada de *Bsal* a México (Basanta, Rebollar and Parra-Olea, 2019). Para esto realizaron una evaluación de las zonas más adecuadas para el establecimiento de *Bsal* mediante modelos de predicción de nicho combinada con el análisis de la diversidad de especies de salamandras, lo anterior con el fin de generar y aplicar medidas de bioseguridad y proteger la biodiversidad en lugares con una gran diversidad de salamandras. El centro y sur de México se identificaron como zonas de alto riesgo (Sierra Madre Oriental, Eje Neovolcánico Transversal, Sierra Madre

del Sur, Golfo Mexicano y Península de Yucatán) (Figura 3), con 13 puntos de interés donde se encuentra la mayor riqueza de salamandras y el mayor número de especies endémicas y amenazadas. Uno de sus hallazgos fue que el 51% de las especies de salamandras de México están presentes en áreas que son adecuadas para *Bsal* (Basanta et al., 2019). Estudios de co-infecciones de *Bd* y *Bsal*, han identificado que el efecto de la infección por dos patógenos es más severa que la infección por solo uno de éstos ya que ocasionan una desregulación del sistema inmune, por lo anterior aquellas especies ya afectadas por *Bd* podrían sufrir efectos negativos si se diera una coinfección (McDonald et al., 2020).

Diversidad del género *Ambystoma* en México

México es el segundo país con mayor diversidad de salamandras (orden Caudata) en el mundo con un total de 137 especies, después de Estados Unidos que cuenta con un total de 189 especies. A nivel mundial hay 10 familias pertenecientes al orden Caudata, de las cuales cuatro están presentes en México (Ambystomatidae, Salamandridae, Plethodontidae, Sirenidae). Además de la gran diversidad en anfibios presente en México, también hay un alto grado de endemismo. En el caso de la familia Ambystomatidae hay 18 especies de las cuales 16 son endémicas de México. En la Figura 5 se puede observar su distribución a lo largo del país (Parra-Olea, Flores-Villela and Mendoza-Almeralla, 2014). De estas 16 especies endémicas, 15 se encuentran dentro de la NOM-059 Semarnat-2010 en alguna categoría de riesgo; tres están clasificadas como amenazadas (A) y las doce restantes como sujetas a protección especial (Pr). En la Lista Roja de la Unión Internacional (IUCN- Red List) se enlistan doce en alguna categoría de amenaza: nueve como en Peligro Crítico de Extinción (CR) y dos En Peligro de Extinción (EN). Fuera de las categorías de amenaza, tres especies se ubican como Preocupación Menor (LC) y tres más como Datos Insuficientes (DD) (SEMARNAT, 2018).

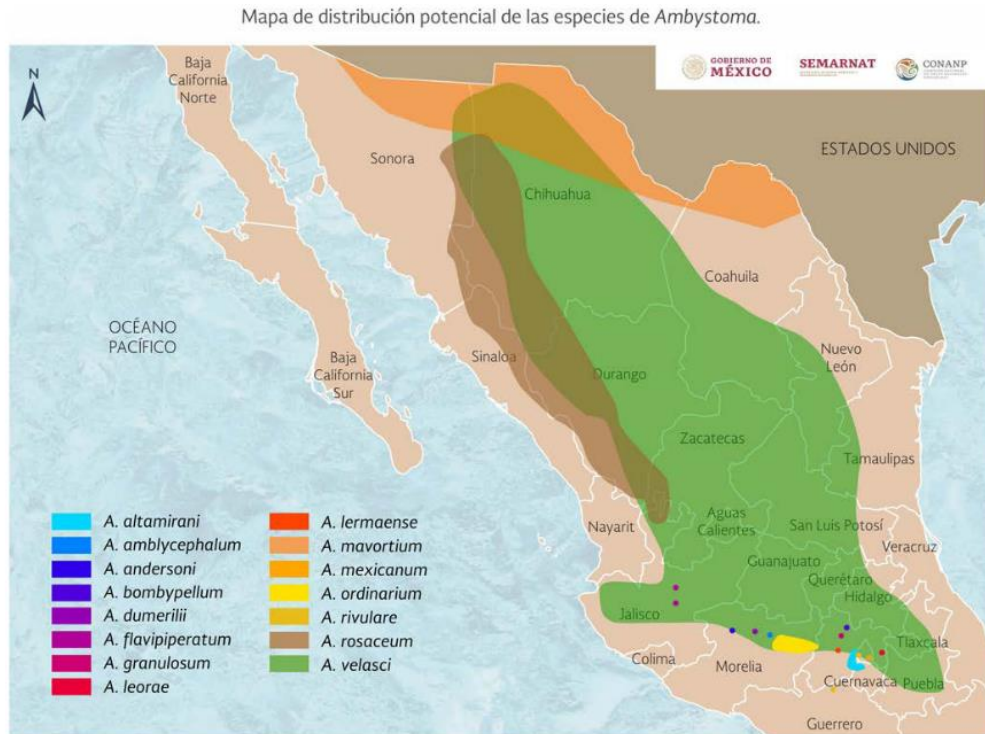


Figura 6. Mapa de distribución potencial de las especies de *Ambystoma*. (Tomado de SEMARNAT, 2018)

Los hábitats de las especies que pertenecen al género *Ambystoma* suelen ser lagos y arroyos cada uno con características particulares, lo cual ha propiciado que se adapten a condiciones específicas y tengan distribuciones muy restringidas. Lo anterior los hace más vulnerables a la perturbación de los hábitats causada por factores antropogénicos como la contaminación, deforestación o introducción de especies exóticas invasoras (SEMARNAT, 2018).

En algunas especies de *Ambystoma* los adultos son pedomórficos, es decir, el individuo adulto retiene características juveniles o larvares, por ejemplo, la retención de branquias y la permanencia de su forma acuática. En algunos casos se han encontrado individuos adultos de la misma especie tanto metamórficos, es decir, que han perdido las características larvares como pedomórficos, es decir, que alcanzan la madurez sin perder las características larvares. Tal es el caso de las especies *A. altamirani*, *A. flavipiperatum*, *A. granulatum*, *A. leorae*, *A. lermaense*, *A.*

mavortium, *A. ordinarium*, *A. velasci*, *A. rosaceum*, *A. silvense*, *A. taylori* (SEMARNAT, 2018).

Quitridiomicosis en el género *Ambystoma*

De las 18 especies registradas en México pertenecientes al género *Ambystoma*, en casi el 30% se ha detectado la presencia de *Bd*, lo anterior no significa que se hayan observado signos clínicos de la enfermedad (Frías-Alvarez *et al.*, 2008) (Mendoza-Almeralla, Burrowes and Parra-Olea, 2015).

Frías-Alvarez *et al.* (2008) muestrearon un total de 360 individuos, de los cuales 111 de 14 diferentes especies estaban infectados con *Bd*. Para el género *Ambystoma* encontraron que las especies *A. altamirani*, *A. granulorum*, *A. mexicanum*, *A. rivulare* y *A. velasci* estaban infectadas con *Bd*. A pesar de tener algunos datos sobre la afectación de estas especies por la quitridiomicosis, en México se han realizado pocos estudios poblacionales en los que se documente la incidencia y prevalencia de la quitridiomicosis (Frías-Alvarez *et al.*, 2008)(Mendoza-Almeralla, Burrowes and Parra-Olea, 2015).

De igual forma, existen un número limitado de estudios longitudinales que tomen en cuenta los efectos de la estacionalidad y las variables fisicoquímicas ambientales sobre la infección de *Bd*, (Nava-González *et al.*, 2020)(López-Velázquez, 2014)(García Fera, Brousset and Cervantes Olivares, 2019).

En un estudio reciente desarrollado en la Reserva de la Biósfera de las Mariposas Monarca, se documentaron los patrones de infección de *Bd* en 11 especies de la comunidad de anfibios riparios (como los que se han llevado a cabo con *Pseudoeurycea leprosa*, *Ambystoma rivulare*, *Craugastor hobartsmithi*, *C. occidentalis*, *Dryophytes plicatus*, *Plectrohyla bistincta*, *Lithobates montezumae*, *L. spectabilis*, *L. neovolcanica*, *Isthmura bellii* y *Pseudoeurycea longicauda*), así como las diferencias en las tasas de infección según los cambios en las variables ambientales a lo largo de las estaciones durante un año (Nava-González *et al.*,

2020). En total 8 de las 11 especies analizadas estaban infectadas por *Bd*. Encontraron una relación negativa entre la prevalencia de *Bd*, la temperatura y las precipitaciones para ambos grupos. Esta relación fue evidente durante el invierno, a temperaturas inferiores a 7° C y 50 mm de precipitaciones mensuales, la infección disminuía. En contraste, encontraron que las cargas de *Bd* eran más altas a temperaturas por encima de los 10° C y mayores niveles de humedad (100mm de precipitación). Destacan que los bajos niveles de patogenicidad probablemente estaban relacionados con las bajas temperaturas ambientales predominantes de este hábitat de alta altitud que impide el crecimiento óptimo de *Bd*, particularmente durante el invierno. Dentro de las 11 especies analizadas, se encuentra *Ambystoma rivulare* para la cual enfatizan que la prevalencia de infección se mantuvo constante y con valores altos a lo largo de todo el estudio lo cual se debe a que las especies acuáticas tienen una mayor probabilidad de infección considerando que las zoosporas de *Bd* pueden sobrevivir en el agua y mantener su virulencia hasta por 24 horas. Sin embargo, mencionan que, a pesar de lo anterior, la intensidad de la infección disminuyó aproximadamente en un 97% durante la temporada con temperaturas más bajas y menos humedad (Nava-González *et al.*, 2020).

***Ambystoma altamirani*: características biológicas, ecológicas y sus amenazas**

Los individuos de *A. altamirani* son de forma alargada. Pueden medir entre 100 y 115 mm y pesar de 25 a 32g. El tamaño medio del cuerpo es de 70.4 ±3.2 mm, longitud de la cola 70.9 ±5.3mm, altura de la cola 13.0± largo de la cabeza 17.4±2.4, ancho de la cabeza 17.4±0.62. La cabeza es grande de forma ovalada, con dientes mandibulares prevomerianos, presenta orificios nasales pequeños. La forma del cuerpo es aplanada dorsoventralmente; presenta 10 surcos laterales entre las extremidades. El color del cuerpo es oscuro con manchas pardo amarillo claro (Ramírez-Bautista *et al.*, 2009). Los individuos de esta especie son pedomórficos facultativos, lo que significa que algunos mantienen las branquias y un estilo de vida acuático siendo, mientras que otros sufren una metamorfosis completa que les permite llevar un estilo de vida terrestre (Lejeune *et al.*, 2018).

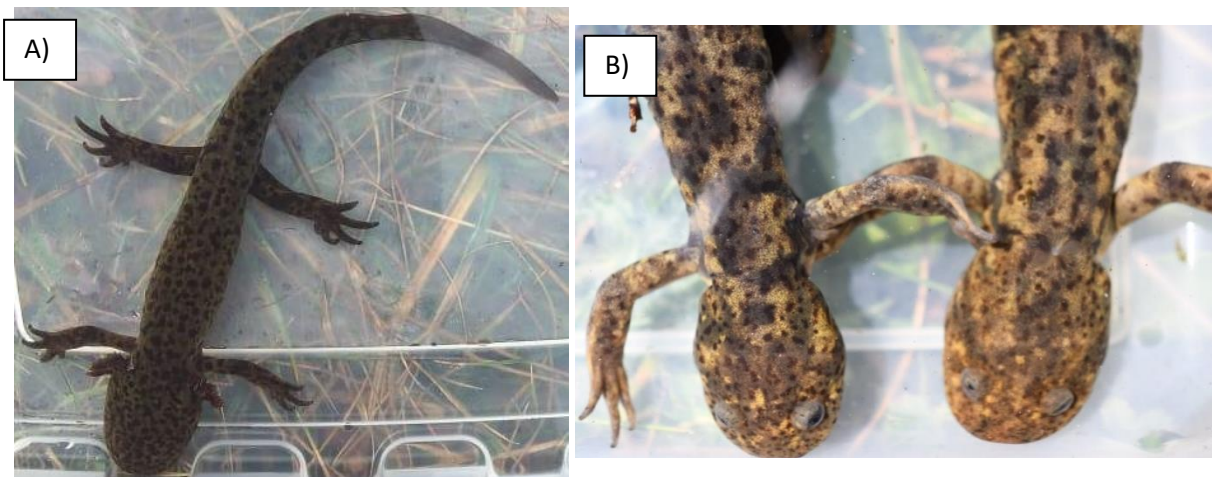


Figura 7. A) Individuo juvenil (con branquias) de *Ambystoma altamirani*. **B)** Individuos adultos (individuos sin branquias) de *A. altamirani* (imágenes tomadas por la autora durante el muestreo de invierno, enero de 2020).

Esta especie (*A. altamirani*) se encuentra en la categoría de Amenazada (A) en la NOM-059-Semarnat-2010 y de acuerdo con la Lista Roja de la IUCN está en la categoría de En peligro (En) (IUCN, 2020)(Shaffer *et al.*, 2008). Las principales amenazas de esta especie son la pérdida del hábitat, el entubamiento de los arroyos donde habitan, la introducción de peces exóticos, principalmente la trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*) (Zamora *et al.*, 2018) (SEMARNAT, 2018).

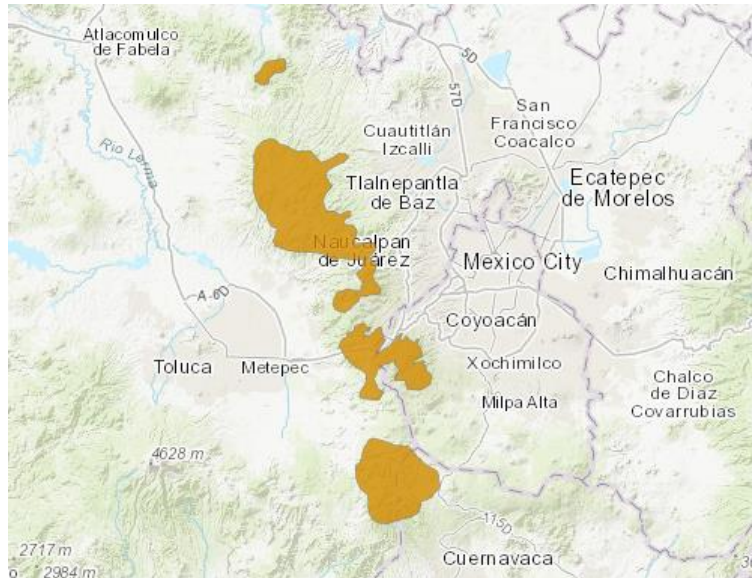


Figura 8. Mapa de distribución de la especie *Ambystoma altamirani* (captura de pantalla tomada de (IUCN SSC Amphibian Specialist, 2021)).

La distribución de *A. altamirani* se limita al oeste y sur del Valle de México en la Sierra de Las Cruces en los estados de Morelos, Estado de México y la Ciudad de México perteneciente al eje Neovolcánico Transversal (Ver Figura 8). Por lo anterior, esta especie es llamada comúnmente ajolote arroyero de la Sierra de las Cruces. Esta especie habita pequeños arroyos que corren en bosques de pino, oyamel y pastizales de montaña (Lemos-Espinal *et al.*, 2016).

JUSTIFICACIÓN

Al ser *A. altamirani* una especie endémica amenazada por distintos factores como la pérdida de hábitat y la introducción de especies exóticas, es importante analizar si la quitridiomycosis es también un factor que amenaza a esta especie.

Un estudio previo (Frías-Alvarez *et al.*, 2008) identificó dos individuos de *A. altamirani* con quitridiomycosis. Sin embargo, no existen estudios que reporten a detalle el estado de afectación de las poblaciones de *A. altamirani* por parte de la quitridiomycosis. Por lo anterior, en este proyecto se propone describir por primera vez la prevalencia e intensidad de infección por *Bd* en poblaciones de *A. altamirani*. Este trabajo sentará un primer precedente sobre la presencia de *Bd* y el grado de afectación causado por este patógeno. El estudio estacional permitirá conocer el aumento en la incidencia y prevalencia de la enfermedad lo cual será útil para la futura implementación de estrategias de conservación.

Además, cabe destacar que no existen estudios longitudinales previos que analicen las variaciones en la prevalencia y la intensidad de la quitridiomycosis en *A. altamirani* en función de los cambios fisicoquímicos en el ambiente o las estaciones del año. A la fecha, la mayoría de los estudios longitudinales publicados se han llevado a cabo en áreas y especies tropicales, esto puede deberse a que en ellas se han dado las mayores afectaciones por la quitridiomycosis (Ruggeri *et al.*, 2015)(Longo, Burrowes and Joglar, 2009). Además de lo anterior, son pocos los estudios en los que se han registrado variables específicas. En el caso de México, sólo un estudio ha evaluado la incidencia de *Bd* en un contexto longitudinal a lo largo de las estaciones y tomando en cuenta variables fisicoquímicas (Nava-González *et al.*, 2020).

HIPÓTESIS

De confirmarse la presencia de *Bd* en las poblaciones de *A. altamirani*, se espera que la prevalencia y la intensidad de la infección por el patógeno varíen de acuerdo con el cambio en las variables fisicoquímicas del ambiente a lo largo de las estaciones. Habrá también cambios asociados a las condiciones fisicoquímicas y de altitud de cada localidad.

PREDICCIONES

1. La prevalencia e intensidad de la infección de *Bd* serán mayores durante la primavera, cuando la temperatura ambiental está más cerca del rango de crecimiento óptimo de *Bd* (17-25°C). Contrariamente durante el invierno, al disminuir las temperaturas tanto la prevalencia como la intensidad de la infección, disminuirán.
2. Habrá una variación de la infección entre sitios, debido a la posible diferencia en las condiciones fisicoquímicas del agua entre sitios.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar por primera vez la presencia de *Bd* en poblaciones de *A. altamirani*, para así determinar la prevalencia e intensidad de la infección del patógeno en esta especie y determinar el efecto de la estacionalidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la prevalencia e intensidad de la infección de *Bd* en cuatro poblaciones de *A. altamirani* a lo largo de un año.
2. Evaluar si existen diferencias en la prevalencia e intensidad de infección de *Bd* entre poblaciones y entre estaciones.

3. Evaluar si existen diferencias en la prevalencia e intensidad de la infección entre distintos estadios de desarrollo.
4. Determinar las correlaciones entre la intensidad de la infección de *Bd* y las variables ambientales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de *A. altamirani*

Como parte de esta tesis y de la tesis del estudiante de doctorado Emanuel Martínez Ugalde, se llevaron a cabo cuatro muestreos correspondientes a las cuatro estaciones del año (verano, otoño, invierno, primavera) desde julio de 2019 hasta abril del 2020. Los sitios de estudio donde se realizaron los muestreos se localizan en la región norte de la Sierra de las Cruces, en afluentes próximos a la localidad de Tlazala, perteneciente al municipio de Isidro Fabela, Estado de México. Específicamente, se tomaron las muestras en cuatro arroyos ubicados en los parajes Laguna Seca (3400 m s. n. m.), Organillos (3360 m s. n. m.), Sehuayán (3210 m s. n. m.) y Tecpan (3087 m s. n. m.), en los que se habían detectado poblaciones de *A. altamirani* en estudios previos de ecología de poblaciones llevados a cabo por el Dr. Víctor Ávila Ackerberg (Vázquez Trejo, 2020).

En cada uno de los arroyos y en cada temporada (cuatro estaciones), se tomaron entre 5 y 27 muestras de la piel de individuos de *A. altamirani* (Ver Tabla 6).

Para recolectar a los ajolotes del agua se utilizaron redes estériles de plástico, cada individuo fue manipulado con guantes de nitrilo nuevos. De cada ajolote se registró el peso, tamaño, presencia de branquias y su estado de salud. Previo a tomar la muestra, cada ajolote fue bañado con agua destilada estéril para remover aquellos microorganismos transitorios (Rebollar *et al.*, 2014). De acuerdo con estudios previos, para tomar la muestra, se utilizaron hisopos estériles para cada individuo, los cuales se frotaron en la piel del ajolote en la región ventral del cuello a la cloaca, en el interior de los muslos y los costados desde la axila hasta el inicio de la cola (A. D. Hyatt *et al.*, 2007). Cada hisopo fue almacenado en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL en 170 μ L de DNA-RNA Shield de la marca Zymo para ser criopreservados a -80°C hasta su posterior procesamiento en el laboratorio.

Para la caracterización fisicoquímica del hábitat, se utilizó en cada sitio durante cada colecta una sonda especializada para medir parámetros fisicoquímicos en el agua, se tomaron datos de la temperatura, conductividad, pH y O₂ disuelto

usando un multiparámetro (HANNA instruments, Limena, Italia). Para esto cada sitio fue dividido en tres segmentos y se obtuvieron mediciones en cada uno de ellos.

Es importante destacar que los muestreos fueron llevados a cabo por algunos integrantes y colaboradores del grupo de investigación. En especial por Emanuel Martínez Ugalde, Montserrat Vázquez Trejo y Dalia Zavala Hernández. Mi colaboración fue en el tercer muestreo (invierno, enero de 2020).

La metodología de muestreo, el procesamiento de las muestras y los métodos moleculares, han sido realizados previamente por nuestro grupo de investigación y por otros grupos en otras especies de anfibios (Rebollar *et al.*, 2014)(Vázquez Trejo, 2021) .

Trabajo de laboratorio

Extracción de DNA

La extracción del DNA de cada una de las muestras se llevó a cabo con el kit DNeasy Blood and Tissue Kit for Swab and Bacteria (QIAGEN) incluyendo un tratamiento previo con lisozima (Rebollar *et al.*, 2019).

PCR en tiempo real (qPCR)

a) Preparación de los Gblocks y construcción de la curva estándar

Para la construcción de la curva estándar de intensidad de la infección se utilizaron fragmentos sintéticos de DNA (Gblocks) que incluyen un fragmento único del ITS de *Bd* y de *Bsal*. Estos Gblocks permiten generar la curva estándar de concentración para comparar con los datos obtenidos de las muestras durante el PCR en tiempo real (qPCR) (Bloo *et al.*, 2013).

Una vez que los Gblocks fueron recibidos, se realizó una cuantificación calculando el número de copias y la concentración. Para hacer lo anterior se accedió

a la página <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>, se introdujo la cantidad de ng (250 ng) y la longitud del templado (146 bp).

de copias por μL = 1.59×10^{12} copias of ITS Hap001 / 700 μL

= 2×10^9 copias / μL

Para rehidratarlos se utilizó agua estéril, la concentración inicial era de 2×10^9 copias / μL , por lo cual se realizaron diluciones en serie para la construcción de la curva estándar.

# de estándar	Dilución	# de copias / μL
1	2×10^5	200000
2	2×10^4	20000
3	2×10^3	2000
4	2×10^2	200
5	2×10^1	20
6	2×10^0	2

Tabla 2. Diluciones de Gblocks

b) Oligonucleótidos y sonda utilizados en el qPCR

Para llevar a cabo el qPCR se rehidrataron los primers (Forward y Reverse) quedando a una concentración de 100 μM y se diluyó la sonda teniendo una concentración final de 10 μM .

Sondas y primers de Applied Biosystems

Secuencias de los cebadores/oligos

ITS1-3 CHYTR 29 bases	5' – CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC -3'
5.8S CHYTR 22 bases	5' – AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA 3'

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el qPCR.

Sonda

<i>Bd</i> Probe	15 bases	5' – 6FAM – CGAGTCGAACAAAAT – MGBNFQ – 3'
Tabla 4. Secuencia de la sonda utilizada en el qPCR.		

c) Condiciones del qPCR

Las muestras fueron analizadas con el protocolo TaqMan PCR en tiempo real usando un equipo CFX96 Real-Time System de BIO RAD y el programa BIO RAD CFX MAESTRO. Las cantidades y concentraciones de reactivos, así como las condiciones de amplificación se realizaron según (Boyle *et al.*, 2004) (A. D. Hyatt *et al.*, 2007) quienes han detallado las propiedades de la prueba, incluyendo sensibilidad, especificidad, limitaciones, así como las comparaciones con otros métodos (López-Velázquez, 2014). En cada una de las placas (96 pozos) se incluyeron 6 estándares por duplicado y un control negativo en los primeros dos carriles de la placa y en los 82 pozos restantes las muestras, cada muestra se corrió por duplicado.

A cada reacción se le añadieron los siguientes volúmenes de reactivos:

REACTIVO	POR MUESTRA (1rxn)
Sonda (10 µM)	0.36 µL
Primer R (10 µM)	1.38 µL
Primer F (10 µM)	1.38 µL
Klearkall 2X	7.5 µL
Agua	1.88 µL
DNA/ Estándar	2.5 µL
Volumen final 15 µL x rxn	
Tabla 5. Reactivos utilizados en el qPCR y volumen por reacción.	

Las condiciones de amplificación utilizadas para *Bd* son: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguido por 15 segundos a 95°C (desnaturalización) y 1 minuto a 60°C (alineamiento y extensión), esto por 50 ciclos. (Boyle *et al.*, 2004) (López-Velázquez, 2014).

d) Análisis estadísticos

Como primer paso se realizó una base de datos que incluía el número de individuo muestreado, la intensidad de la infección (número de copias del ITS de *Bd*), sitio, estadio de desarrollo y estación; asociados a los datos anteriores se incluyeron la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y la conductividad del agua.

Cabe mencionar que todas las pruebas estadísticas salvo la prevalencia e intervalos de confianza fueron realizadas en el programa R versión 4.1.

Prevalencia de ajolotes *A. altamirani* infectados por *Bd*

Con la base de datos inicial se realizó una tabla de la prevalencia de la quitridiomycosis en los individuos de *A. altamirani* por cada estación (verano, otoño, invierno y primavera) (Tabla 5). También se realizó una tabla de la prevalencia por sitio (Laguna Seca, Organillos, Sehuayán y Tecpan) (Ver Tabla 5). La prevalencia es definida como la proporción de individuos que padecen una enfermedad en un periodo de tiempo determinado. Se estimó de la siguiente manera: $\text{prevalencia} = \frac{\# \text{ de individuos con } Bd}{\text{total de individuos muestreados por estación}}$. La prevalencia se expresó en porcentajes.

Para analizar si los valores de la prevalencia dependían de la estación o el sitio se realizó la prueba de chi cuadrada.

Se obtuvieron los intervalos de confianza de la prevalencia del 95% por medio de la función "intervalo de confianza" en Excel, estos datos se incluyeron a cada tabla de prevalencias.

Estacionalidad de la infección por *Bd* en *A. altamirani*

Los datos de intensidad de la infección fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si cumplían con una distribución normal (Tabla 10).

Según el comportamiento de las muestras que no tenían una distribución normal y la bibliografía consultada (Hudson *et al.*, 2019)(López-Velázquez, 2014) para determinar si la influencia de la estacionalidad en la intensidad de la infección era significativa, se seleccionó la Prueba de Kruskal-Wallis. Se utilizó esta misma prueba para determinar la influencia del sitio y el estadio de desarrollo en la intensidad de la infección. El análisis por Kruskal-Wallis es una prueba no paramétrica que permite conocer si hay diferencias en las distribuciones de la variable en estudio en las poblaciones. (Gómez, Danglot-Banck and Vega-Franco, 2003).

Adicional al análisis de Kruskal-Wallis se realizaron comparaciones pareadas con la prueba de Dunn para observar claramente dónde se encontraban las diferencias significativas.

Considerando la acumulación del error en las pruebas estadísticas anteriores se realizó la prueba Benjamini-Hochberg para determinar y ajustar el error por comparaciones múltiples.

Relación entre la intensidad de la infección por *Bd* en *A. altamirani* y factores fisicoquímicos como: temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad del agua.

Se hizo el análisis de coeficiente de correlación de rangos de Kendall o coeficiente T de Kendall para determinar el nivel de la asociación entre la intensidad de infección y las variables fisicoquímicas: temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad del agua. Considerando las variaciones en la intensidad en las diferentes estaciones, probar la relación existente entre las variables fisicoquímicas y la intensidad revelará si alguna variable condiciona el nivel de infección. El análisis de Kendall permite hacer correlaciones entre dos variables y determinar la dirección

de la relación, es decir, si es positiva o negativa. El valor del coeficiente de correlación varía entre +1 y -1. Mientras el coeficiente de correlación se acerca a 0, la relación entre las dos variables es más débil. La dirección de la relación se indica por el signo en el coeficiente; un signo + indica una relación positiva, mientras que un signo - indica una relación negativa. Es importante mencionar que para esta prueba se utilizaron solamente los valores de aquellos individuos con valores positivos para *Bd*.

RESULTADOS

Resultados del muestreo

Una vez que se realizaron todos los muestreos se obtuvo un total de 279 muestras de individuos de *A. altamirani* durante el periodo de julio de 2019 y abril de 2020, de los cuales se colectaron 66 en verano, 57 en otoño, 75 en invierno y 81 en primavera (Tabla 5).

En algunos sitios se encontraron puestas de huevos de *A. altamirani*, las cuales fueron muestreadas de la misma manera que los individuos sin branquias o individuos con branquias, obteniendo un total de 10 muestras de huevos.

	Laguna Seca	Sehuayán	Organillos	Tecpan	TOTAL
Verano (julio 2019)	16	9	27	14	66
Otoño (octubre 2020)	21	6	25	5	57
Invierno (enero 2020)	17	13	22	23	75
Primavera (abril 2020)	18	16	27	20	81
TOTAL	72	44	101	62	279

Tabla 6. Número de individuos muestreados por temporada por sitio

Resultados de PCR en tiempo real

En total se corrieron 8 placas de qPCR en el termociclador CFX96 Real-Time System de BIO RAD para tener la cantidad de copias de *Bd* presentes en las muestras. Para aquellas muestras cuyo valor de la primera y la segunda reacción difería de manera significativa, o uno era positivo y el otro negativo, se realizó una tercera reacción para confirmar los datos. Una vez analizadas las muestras se obtuvo que, del total de 279 muestras de piel de individuos de *A. altamirani*, 70 fueron negativas y 209 positivas para *Bd*. De las 10 muestras tomadas a huevos, 6 dieron negativas y 4 positivas, pero en concentraciones muy bajas.

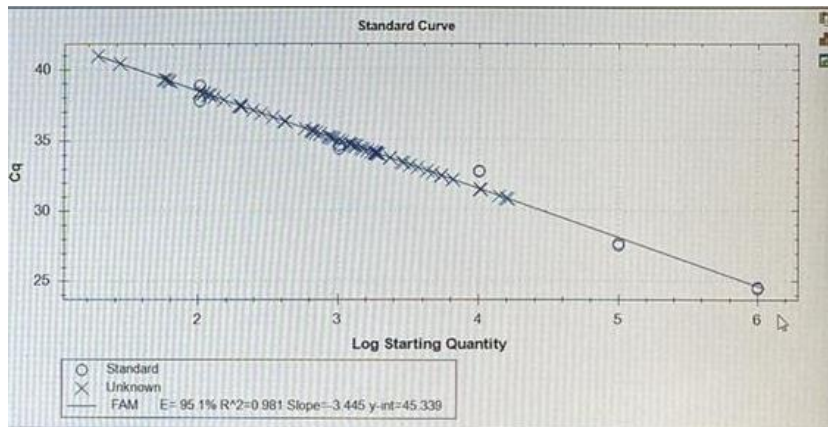


Figura 9. Resultados de qPCR de diluciones de estándares GBlocks, curva estándar generada. Gráfica del valor de Ct contra la concentración de DNA; los círculos representan los estándares y las x los valores estimados de las muestras desconocidas.

Resultados de prevalencia de *Bd* en poblaciones de *A. altamirani*

Se observó una mayor prevalencia de la infección por *Bd* en las estaciones de primavera (76.54%, IC 95%: 65.81 – 85.24) e invierno (72.94%, IC 95%: 62.21 – 82.01), comparada con la prevalencia observada en verano (56.06%, IC 95%: 43.29 – 68.26) y otoño (66.66%, IC 95%: 52.93 – 78.59) (Ver Figura 10). Las diferencias observadas en la prevalencia de la infección a lo largo de las estaciones fueron estadísticamente significativas ($p=0.045$). (Ver tabla 7 y 8).

Estación	<i>Bd</i> positivos	<i>Bd</i> negativos	Total de muestra	Prevalencia (%)	IC (Intervalos de confianza)
Primavera	62	19	81	76.54	65.81 – 85.24
Verano	37	29	66	56.06	43.29 – 68.26
Otoño	38	19	57	66.66	52.93 – 78.59
Invierno	62	23	85	72.94	62.21 – 82.01

Tabla 7. Prevalencia de la quitridiomycosis para cada estación climática

Prueba de chi-cuadrada		
	Valor	Grados de libertad
Chi-cuadrada de Pearson	P = 0.045	3

Tabla 8. Análisis de Chi-cuadrada. Muestra la significancia y los grados de libertad

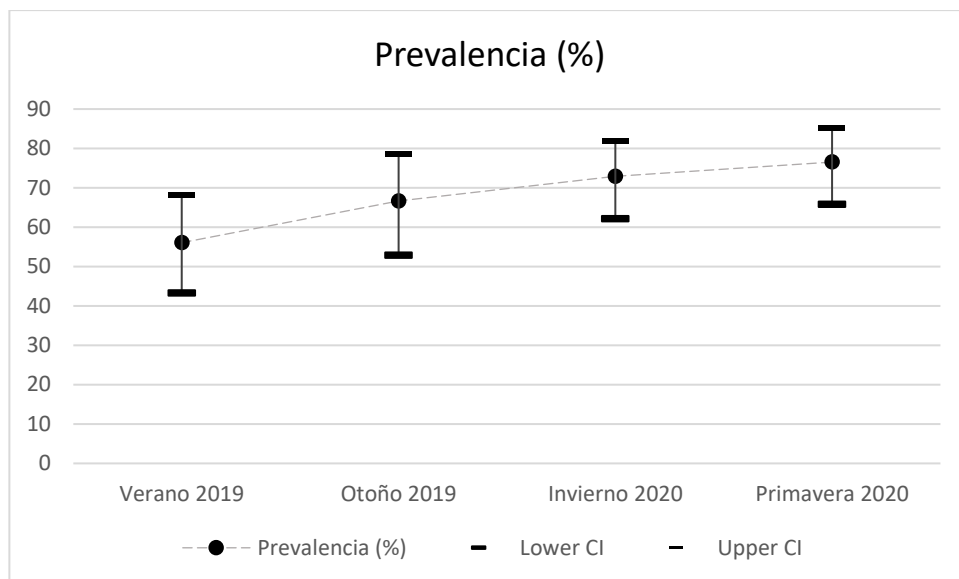


Figura 10. Prevalencia de la infección por *Bd*, e intervalos de confianza ($p = 0.05$) mostrados en porcentaje para cada estación del año (julio 2019 a abril 2020).

En cuanto a la relación entre la prevalencia y el sitio de muestreo se observó que esta es menor en Laguna Seca (51.39%, IC: 39.31 – 63.34) y el mayor valor observado fue en Tecpan (80.65 %, IC: 68.63 – 89.57). En el caso de Organillos (72.64%, IC: 63.12 – 80.85) y Sehuayán (56.73%, IC: 56.73 – 83.41), estos tuvieron valores intermedios y cercanos entre sí (ver Figura 11). Las diferencias observadas en la prevalencia de la infección entre las localidades fueron estadísticamente significativas ($p= 0.002$). (Ver tabla 9 y 10).

Sitio	<i>Bd</i> positivos	<i>Bd</i> negativos	Total de muestra	Prevalencia (%)	IC (Intervalos de confianza)
Laguna Seca	37	35	72	51.39	39.31 – 63.34
Organillos	77	29	106	72.64	63.12 – 80.85
Sehuayán	35	14	49	71.43	56.73 – 83.41
Tecpan	50	12	62	80.65	68.63 – 89.57

Tabla 9. Prevalencia de la quitridiomycosis para cada sitio

Prueba de chi-cuadrada		
	Valor	Grados de libertad
Chi-cuadrada de Pearson	P = 0.002	3
# positivos	213	

Tabla 10. Análisis de Chi-cuadrada. Muestra la significancia y los grados de libertad

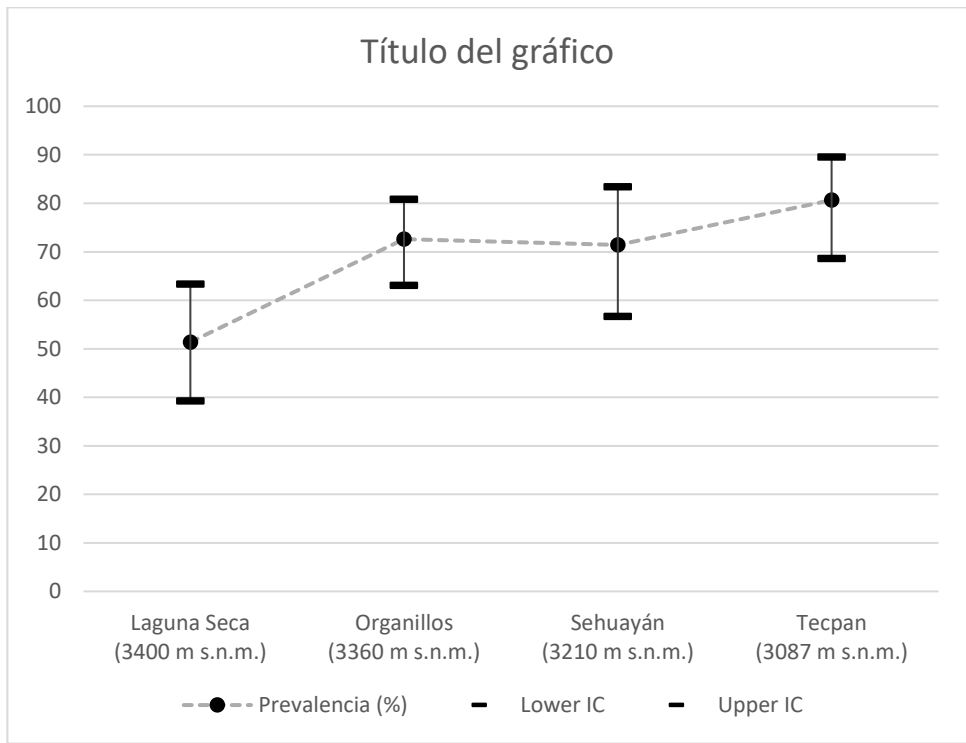


Figura 11. Prevalencia de la infección por *Bd*, e intervalos de confianza ($p = 0.05$) mostrados en porcentaje para cada sitio, los sitios se encuentran acomodados de mayor a menor altitud geográfica.

Resultados de intensidad de infección de *Bd* a lo largo de las estaciones, estadio de desarrollo y localidad.

Según los resultados obtenidos en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Tabla 10), el valor de p ($p < 2.2e-16$) es menor al valor alfa, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula lo cual significa que los datos no tienen una distribución normal.

W	Valor p
0.047792	$p < 2.2e-16$
Tabla 11. Resultados estadísticos de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.	

Los datos de intensidad de la infección no tienen una distribución normal ya que se observa que la mayoría de los datos se encuentran distribuidos hacia el extremo de concentración positiva del hongo (ver Figura 12).

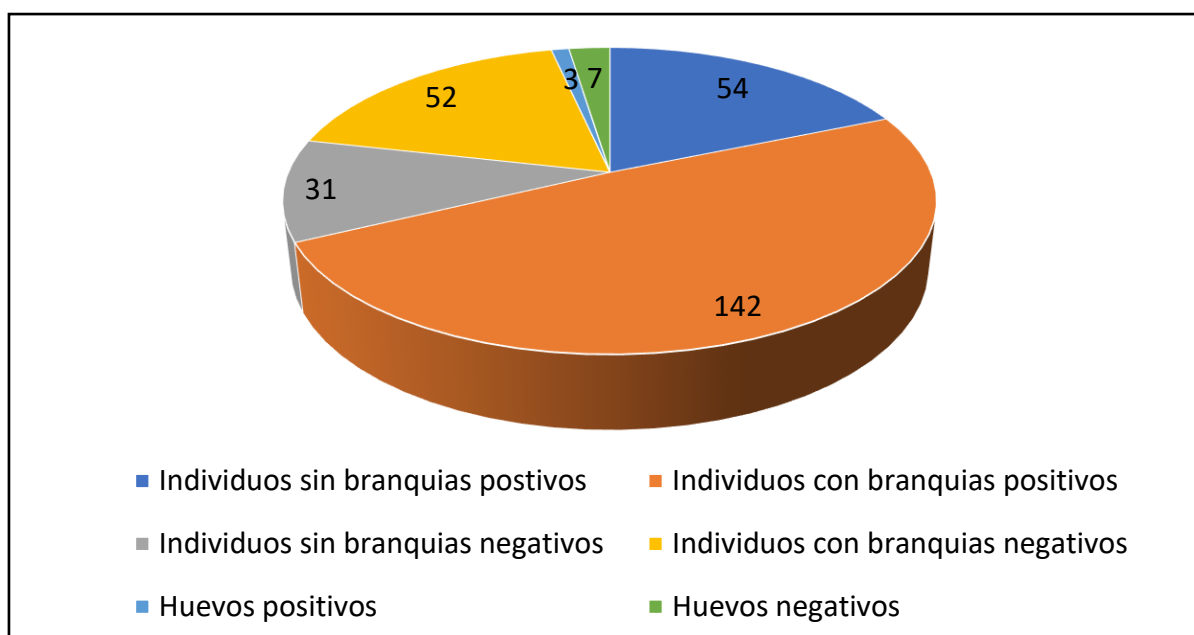


Figura 12. Gráfica de pastel con la proporción de individuos con branquias, sin branquias y huevos positivos y negativos para *Bd*.

Considerando la comparación de las medianas de los grupos estacionales, se encontró que la estacionalidad no influencia de forma estadísticamente significativa la intensidad de la infección ($p=0.08$) (Ver Tabla 12).

Kruskal-Wallis	df	p-value
chi-squared		

6.6999	3	0.08
Tabla 12. Resultados estadísticos de prueba de rango de Kruskal-Wallis para la intensidad y las estaciones.		

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones pareadas entre estaciones (ver tabla 13 y Figura 13).

Comparación	Estadística z	Valor p
Au - Sp	-1.042296	0.2973
Au - Su	-1.026233	0.2286
Sp - Su	-0.107268	0.4573
Au - Wi	0.931541	0.2109
Sp - Wi	2.264148	0.0707
Su - Wi	2.064774	0.0584

Tabla 13. Comparaciones pareadas por prueba de Dunn de intensidad por estación. Su (verano), Au (otoño), Wi (invierno), Sp (primavera).

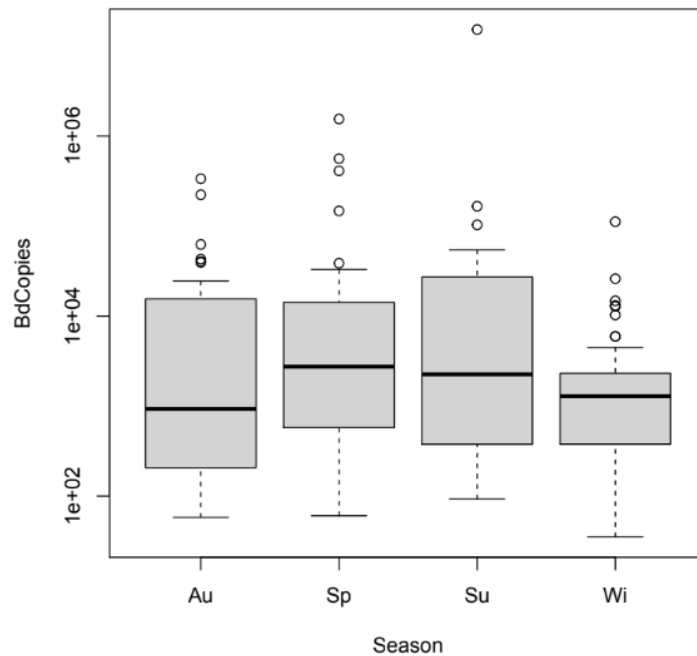


Figura 13. Gráfica de concentración de copias de *Bd* para cada estación. Se encuentra la concentración de copias de *Bd* en escala logarítmica contra las estaciones: Su (verano), Au (otoño), Wi (invierno), Sp (primavera). Se puede observar la media de los datos obtenidos por cada estación, así como la amplitud de la muestra y la dispersión.

Considerando la comparación de las medianas entre las cuatro localidades estudiadas, se encontró que la intensidad de la infección es significativamente distinta entre los sitios ($p=0$) (Ver Tabla 14).

Kruskal-Wallis chi-squared	df	p-value
30.0446	3	0

Tabla 14. Resultados estadísticos de prueba de rango de Kruskal-Wallis para la intensidad y los sitios.

Los resultados mostraron diferencias significativas entre las comparaciones de Laguna Seca – Organillos (Prueba de Dunn $p=0.0001$), Laguna Seca – Tecpan (Prueba de Dunn $p=0$), Organillos – Sehuayán (Prueba de Dunn $p=0.0058$) y Sehuayán – Tecpan (Prueba de Dunn $p=0.0003$) (Ver Tabla 15 y figura 14).

Comparación	Estadística z	Valor p
LS - O	-3.944903	0.0001*
LS - S	-1.045242	0.1480
O - S	2.661929	0.0058*
LS - T	-4.788895	0.0000*
O - T	-1.373101	0.1018
S - T	-3.593846	0.0003*

Tabla 15. Comparaciones pareadas por prueba de Dunn de intensidad por sitio. LS (Laguna Seca), O (Organillos), S (Sehuayán), T (Tecpan).

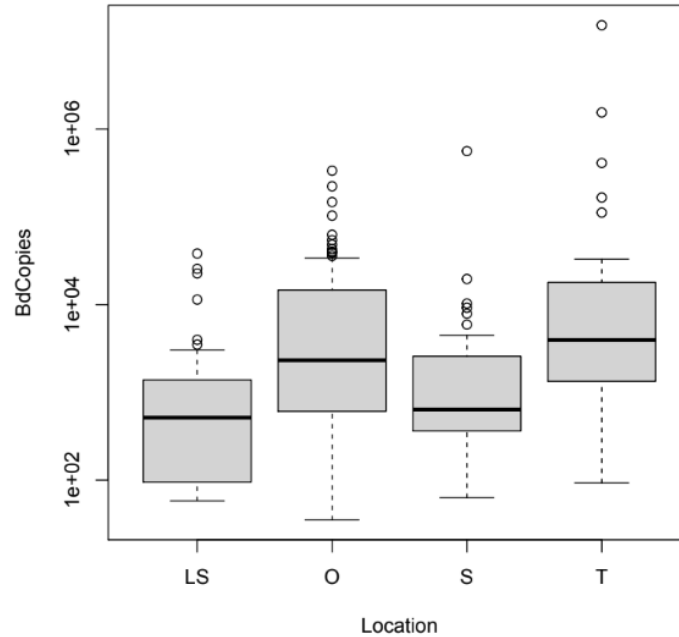


Figura 14. Gráfica de concentración de copias de *Bd* según el sitio. Se encuentra la concentración de copias de *Bd* en escala logarítmica contra los cuatro sitios muestreados: LS (Laguna Seca), O (Organillos), S (Sehuayán), T (Tecpan). Se puede observar la media de los datos obtenidos por sitio, así como la amplitud de la muestra y la dispersión.

Considerando la comparación de las medianas del estadio de desarrollo de los individuos, se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre las distintas etapas de desarrollo ($p=0.02$) (Ver Tabla 16).

Kruskal-Wallis chi-squared	df	p-value
7.72735	2	0.02

Tabla 16. Resultados estadísticos de prueba de rango de Kruskal-Wallis para la intensidad y el estadio de desarrollo.

Los resultados de la prueba de Dunn mostraron que las diferencias significativas se observan entre las comparaciones de individuos sin branquias –

huevos (Prueba de Dunn $p= 0.0067$) e individuos con branquias – huevos (Prueba de Dunn $p= 0.0084$) (Ver Tabla 17 y figura 15).

Comparación	Estadística z	Valor p
A - E	2.612355	0.0067*
A - J	-0.421798	0.3366
E - J	-2.771618	0.0084*

Tabla 17. Comparaciones pareadas por prueba de Dunn de intensidad por estadio de desarrollo. A (individuos sin branquias), J (individuos con branquias), E (huevo).

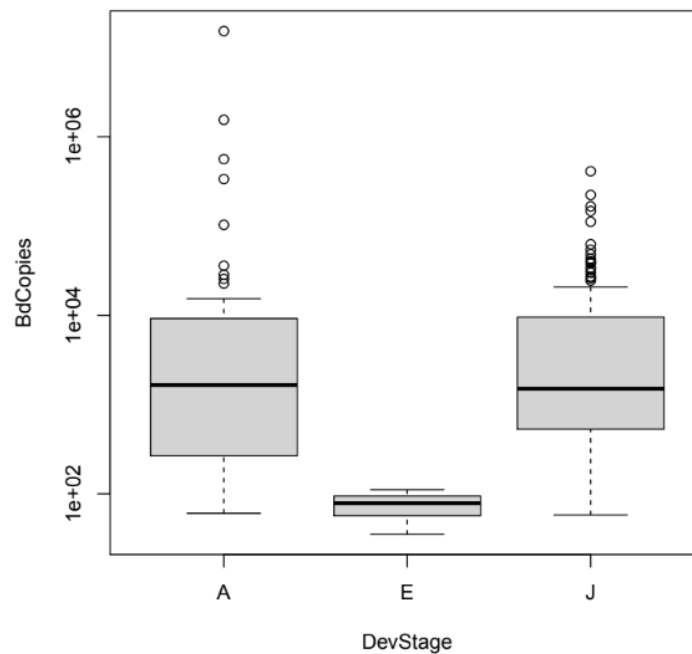


Figura 15. Gráfica de concentración de copias de *Bd* según el estadio de Desarrollo. Se observa la concentración de copias de *Bd* en escala logarítmica contra los estadios de desarrollo: A (adulto), J (juvenil), E (huevo). Se puede observar la media de los datos obtenidos por cada estadio de desarrollo, así como la amplitud de la muestra y la dispersión.

Relación de la intensidad de infección de *Bd* con variables fisicoquímicas del agua

Los resultados de la correlación de rangos de Kendall para la intensidad y el pH mostraron que éste último no tiene una relación estadísticamente significativa con la intensidad de la infección por *Bd* ($p=0.5056$) (Tabla 18), a pesar de que el valor de Tau (Tau=-0.03285133) es negativo este es cercano a 0, lo cual indica que una variable no se relaciona con la otra (ver figura 16).

Estadística z	Valor p	Tau (T)
-0.6657	0.5056	-0.03285133

Tabla 18. Resultados estadísticos de prueba de correlación de Rangos de Kendall para la intensidad y el pH del agua. Se muestran los valores de la estadística z, el valor de p y el valor de Tau.

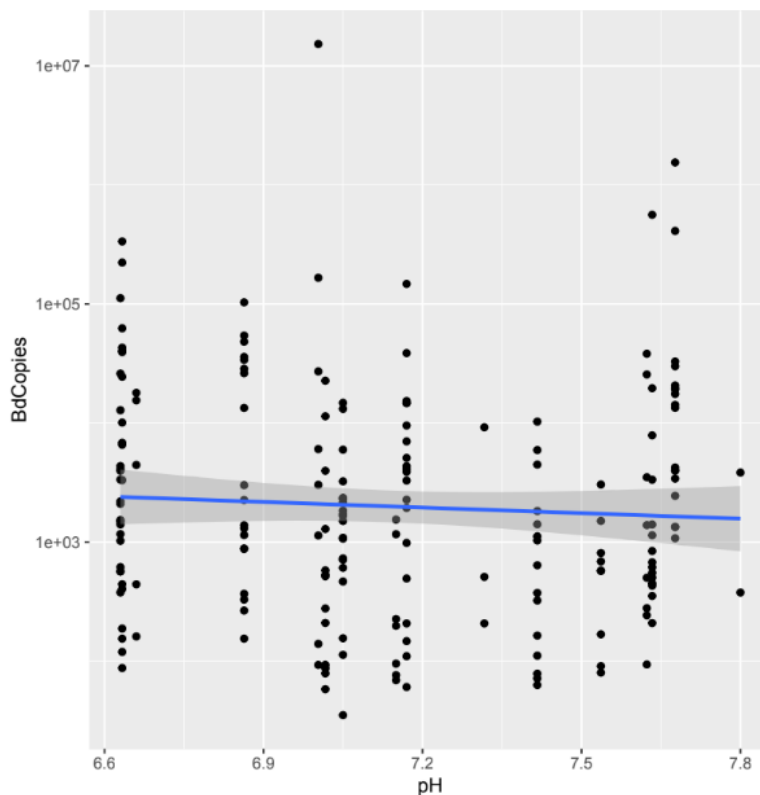


Figura 16. Gráfica de correlación intensidad de la infección por *Bd* y el pH del agua por prueba de rangos de Kendall. Se observa la distribución de los valores de intensidad de la infección de acuerdo con los valores del pH del agua, así como la línea de tendencia. Cada punto representa un individuo positivo para *Bd*.

Los resultados de la correlación de rangos de Kendall para la intensidad y el oxígeno disuelto en el agua mostraron que éste último no tiene una relación estadísticamente significativa con la intensidad de la infección por *Bd* ($p=0.4707$) (Tabla 19), a pesar de que el valor de Tau es negativo (Tau=-0.03559334) este es cercano a 0, lo cual sugiere que una variable no se relaciona con la otra (ver figura 17).

Estadística z	Valor p	Tau (T)
-0.72126	0.4707	-0.03559334

Tabla 19. Resultados estadísticos de prueba de correlación de Rangos de Kendall para la intensidad y el oxígeno disuelto del agua. Se muestran los valores de la estadística z, el valor de p y el valor de Tau.

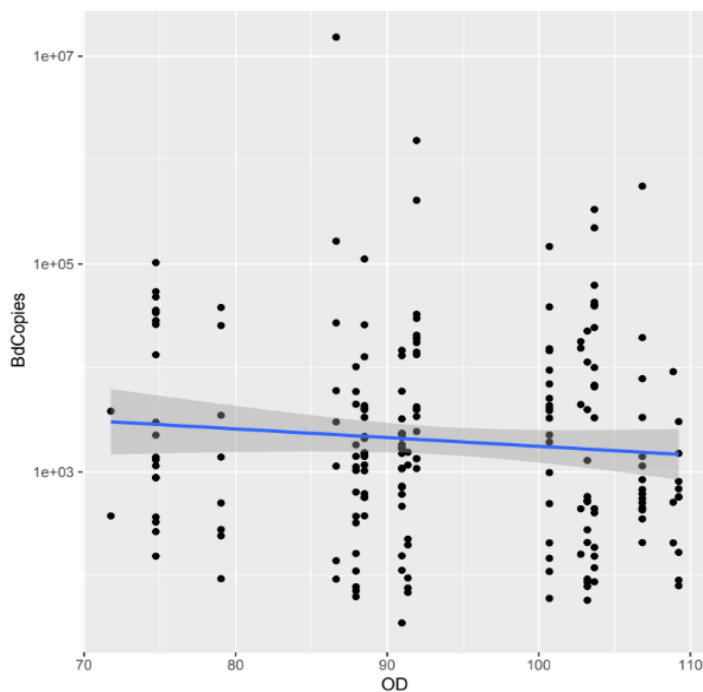


Figura 17. Gráfica de correlación intensidad de la infección por *Bd* y el oxígeno disuelto en el agua por prueba de rangos de Kendall. Se observa la distribución de los valores de intensidad de la infección de acuerdo con los valores del oxígeno disuelto del agua, así como la línea de tendencia. Cada punto representa un individuo positivo para *Bd*.

Los resultados de la correlación de rangos de Kendall para la intensidad y la conductividad del agua mostraron ésta última no tiene una relación estadísticamente significativa con la intensidad de la infección por *Bd*, a pesar de que el valor de Tau (Tau=-0.07756711, p=0.116) (Ver tabla 20) es negativo este es cercano a 0, lo cual sugiere que las dos variables no se relacionan (ver figura 18).

Estadística z	Valor p	Tau (T)
-1.5718	0.116	-0.07756711

Tabla 20. Resultados estadísticos de prueba de correlación de Rangos de Kendall para la intensidad y la conductividad del agua. Se muestran los valores de la estadística z, el valor de p y el valor de Tau.

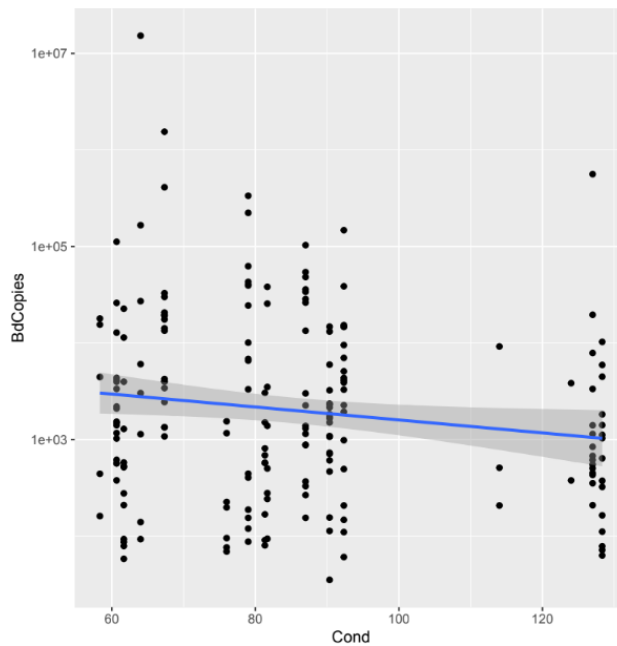


Figura 18. Gráfica de correlación por prueba de rangos de Kendall para intensidad de la infección por *Bd* y conductividad del agua. Se observa la distribución de los

valores de la intensidad de infección de acuerdo con los valores de la conductividad del agua, así como la línea de tendencia. Cada punto representa un individuo positivo para *Bd*.

Los resultados de la Correlación de rangos de Kendall para la intensidad y la temperatura del agua mostraron que ésta última si tiene una relación estadísticamente significativa con la intensidad de la infección por *Bd* (Tau=0.1469609, p=0.002901) (Ver tabla 21), se observa una relación positiva entre ambas variables (ver figura 19).

Estadística z	Valor p	Tau (T)
2.978	0.002901	0.1469609

Tabla 21. Resultados estadísticos de prueba de correlación de Rangos de Kendall para la intensidad y la temperatura del agua. Se muestran los valores de la estadística z, el valor de p y el valor de Tau.

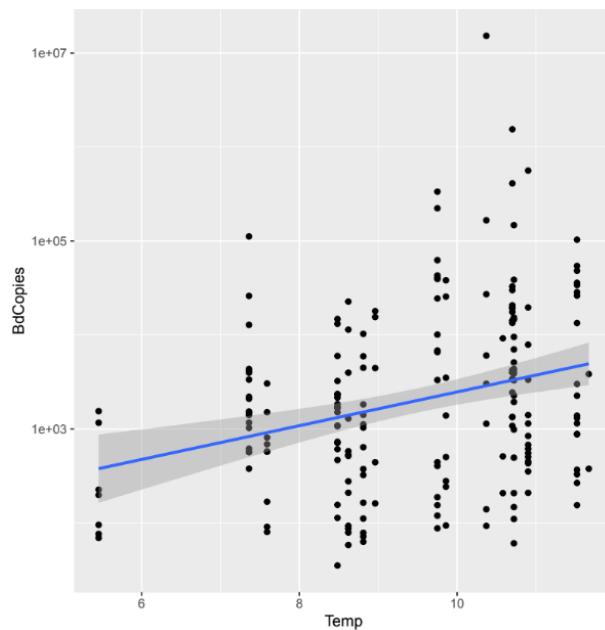


Figura 19. Gráfica de correlación intensidad de la infección por *Bd* y temperatura del agua por prueba de rangos de Kendall. Se observa la distribución de los valores

de la intensidad de la infección de acuerdo con los valores de la temperatura del agua, así como la línea de tendencia. Cada punto representa un individuo positivo para *Bd*.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

México es el quinto país con mayor diversidad de especies de anfibios, muchas de estas especies también son endémicas del país. En las últimas décadas se han registrado declives poblacionales e incluso extinciones de algunas especies debido a factores como la pérdida de hábitat o enfermedades emergentes como la quitridiomycosis.

Los resultados del presente estudio arrojaron que la infección por *Bd* está presente en la especie de ajolote *Ambystoma altamirani* en las cuatro poblaciones muestreadas en la Sierra de las Cruces, Estado de México. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Frías Álvarez y colaboradores en 2008 y contribuyen al conocimiento de la presencia y distribución de este patógeno en el país.

a) Prevalencia de la infección por *Bd*

Los resultados de prevalencia de la infección por *Bd* demuestran que ésta se encuentra de manera persistente en la especie *A. altamirani* en las cuatro poblaciones muestreadas en la Sierra de las Cruces, Estado de México.

En cuanto a las diferencias estacionales, la prevalencia se mantuvo constante a lo largo de las estaciones, siendo más alta en primavera e invierno en comparación con verano y otoño. En el caso de los altos niveles de prevalencia observados en la primavera, si se considera que el sitio de muestreo es una zona de clima templada, lo anterior podría deberse al aumento en las temperaturas que podría favorecer el crecimiento de *Bd*. En el caso de la alta prevalencia observada en el invierno, podría deberse que esta época del año (al igual que en primavera) es la época de sequía, lo cual fomenta la congregación de los individuos aumentando la tasa de contacto y por lo tanto la de infección. Los resultados anteriores concuerdan con lo propuesto en la hipótesis, ya que se esperaban variaciones de acuerdo con el patrón estacional. Cabe mencionar que la persistencia de niveles constantes de prevalencia puede deberse al tipo de vida de esta especie, ya que

aquellas especies con estilos de vida totalmente acuáticos tienen más probabilidad de infectarse considerando que las zoosporas de *Bd* se mueven por el agua (Lips, Green and Papendick, 2003)(Rachowicz and Briggs, 2007)(Greenspan *et al.*, 2012)(Longo *et al.*, 2015).

En lo que respecta a los cuatro sitios muestreados, la menor prevalencia encontrada fue en Laguna Seca y la mayor fue en Tecpan, en comparación con Organillos y Sehuayán los cuales tuvieron valores intermedios y cercanos entre sí. Se observó que la prevalencia de la infección entre los sitios varía de forma significativa.

Se observó que hay cierta relación entre la prevalencia de la infección con la altitud geográfica de los sitios muestreados, lo cual es concordante con la hipótesis planteada, ya que el lugar con la menor altitud fue Tecpan (3087 m s. n. m.), en el que se encontró la mayor prevalencia de la infección, así como una menor prevalencia de la infección en Laguna Seca (3400 m s. n. m.), lugar de mayor altitud. Esto concuerda con otros estudios que encontraron que el hongo tiene un mejor crecimiento a menores altitudes (Woodhams *et al.*, 2003), esto puede deberse a la relación entre la temperatura y la altitud: a menor altitud mayor temperatura.

b) Estacionalidad de la intensidad de infección por *Bd*

Nuestros resultados indican que existe un patrón estacional de la intensidad de infección por *Bd*, ya que los valores de intensidad son más altos en primavera y verano, en comparación con otoño e invierno.

Reportes previos de la infección por *Bd* en *Mixophyes fasciolatus* encontraron, de manera similar a los presentes hallazgos, que las condiciones prevalentes como temperaturas templadas y condiciones húmedas durante las estaciones de verano y primavera, eran más adecuadas para el crecimiento del hongo (Berger *et al.*, 2004).

De acuerdo con los resultados anteriores, se confirmó la hipótesis del presente estudio, ya que se esperaba una mayor intensidad de la infección durante el verano y de manera contrastante una menor intensidad durante el invierno, lo cual

fue concordante con las diferencias documentadas entre estaciones, aunque estas no fueran significativas.

Un factor importante para considerar en estas variaciones según el sitio es la altitud geográfica, al comparar igual que en la prevalencia el lugar con la menor altitud, Técpan (3087 m s. n. m.) y el lugar con la mayor altitud, Laguna Seca (3400 m s. n. m.) se observa que entre estos dos sitios la diferencia es significativa. Al obtener el promedio de los valores de la intensidad obtenidos por sitio, se obtuvo un promedio de 287532.1 copias de *Bd* para Tecpan, mientras que, para Laguna Seca, se obtuvieron 1700.401174 copias de *Bd*, estos valores son el más alto y el más bajo respectivamente de los cuatro sitios.

c) Intensidad de la infección y estadio de desarrollo

Referente a las variaciones en la intensidad y el estadio de desarrollo, se encontró que ésta varía de forma significativa entre los huevos y las otras dos etapas de desarrollo. Es de suma importancia mencionar que no se tienen documentados reportes previos de la presencia de *Bd* en huevos y que las pocas copias encontradas en estos podrían deberse a niveles basales de *Bd* presentes en el agua. Entre individuos con branquias e individuos sin branquias no se encuentran diferencias significativas en los niveles de intensidad. A pesar de lo anterior se encontraron más del doble de individuos con branquias positivos para *Bd* en comparación con los individuos sin branquias, lo anterior puede deberse a que el desarrollo en el sistema inmune es un proceso gradual que depende de la edad y que puede variar con la metamorfosis (Rollins-Smith *et al.*, 2011).

Cabe destacar que a pesar de encontrarse valores elevados de copias de *Bd* (valor más alto encontrado= 4.1498×10^{14} copias de *Bd*), en los individuos muestreados, en los últimos dos años no se han registrado declives poblaciones en esta especie, lo cual sugiere que estas poblaciones coexisten con la infección.

d) Relación entre el grado de infección por *Bd* y factores fisicoquímicos del agua

Se encontró una relación entre la intensidad de la infección y la temperatura, dicha relación es de carácter positivo, durante las estaciones con temperaturas más bajas, la intensidad de la infección tendía a disminuir, contrario a esto, en las estaciones donde la temperatura aumenta la intensidad de la infección también tendía a aumentar. Esta tendencia podría corresponder con la relación observada entre la estacionalidad y la intensidad de la infección, ya que existe una relación entre las estaciones y la temperatura. En el estudio llevado a cabo por Nava y colaboradores (2020) encontraron que por encima de los 10°C las cargas de *Bd* eran más altas, mientras que por debajo de los 7°C la infección disminuía. En concordancia con los resultados de este estudio, Nava y colaboradores relacionan los bajos niveles de patogenicidad con las bajas temperaturas ambientales de los hábitats templados que podrían impedir el crecimiento óptimo de *Bd* y particularmente durante el invierno. De igual manera que en *A. altamirani*, la prevalencia de la infección en *A. rivulare* se mantuvo constante y con valores altos a lo largo del estudio. Contrario a sus resultados la intensidad de la infección en *A. altamirani* no tuvo ninguna disminución dramática incluso en las estaciones con temperaturas más bajas y menos húmedas.

De manera contraria a la temperatura, no se encontró una relación entre la intensidad de la infección y las variables fisicoquímicas restantes, sin embargo, se puede observar cierta tendencia de la intensidad con el cambio de dichas variables. En el caso de las tres variables (el pH, la conductividad del agua y el oxígeno disuelto) se observó que a medida que estos aumentan, la intensidad de la infección disminuye.

Al confirmarse la presencia de *Bd* en las cuatro poblaciones de *A. altamirani*, es importante tomar en cuenta la posible llegada de *Bsal* a América, por el riesgo que esta representa para las poblaciones estudiadas, ya que los efectos combinados de *Bd* y *Bsal* juntos en las poblaciones de anfibios podrían afectar dramáticamente a las poblaciones de anfibios que ya están amenazadas por la pérdida de hábitat o por *Bd*, como es el caso de *A. altamirani* (Basanta, Rebollar

and Parra-Olea, 2019). Estudios de co-infecciones de *Bd* y *Bsal*, han identificado que el efecto de la infección por dos patógenos es más severa que la infección por solo uno de éstos ya que ocasionan una desregulación del sistema inmune (McDonald *et al.*, 2020). Por lo anterior, si las poblaciones de *A. altamirani* están infectadas por *Bd*, la llegada de *Bsal* las impactaría negativamente de forma severa.

El presente estudio documentó tanto la existencia como la dinámica de la quitridiomycosis como un factor que puede amenazar a *A. altamirani* y por tanto sus resultados serán útiles para la futura implementación de estrategias de conservación de dicha especie.

CONCLUSIONES

Este trabajo documenta por primera vez la dinámica de la infección por *Bd* en *A. altamirani* y la descripción de su relación con la estacionalidad. En términos generales, *A. altamirani* presenta altas prevalencias e intensidades de infección por este hongo. La mayor intensidad encontrada en verano es congruente con lo descrito sobre el aumento en el crecimiento del hongo en las estaciones cálidas en sitios de clima templado.

Hallazgos previos a este estudio sobre la fisiología del hongo *in vitro* han demostrado que algunos factores fisicoquímicos influyen en el crecimiento de *Bd*. El presente estudio encontró que la temperatura tiene una influencia significativa sobre la intensidad de la infección por *Bd*.

Dentro de lo encontrado, se observó cierta influencia de la altitud geográfica sobre la prevalencia y sobre la intensidad de la infección, ya que se documentó que a mayor altitud geográfica la intensidad de la infección y la prevalencia fueron menores.

PERSPECTIVAS

En lo que respecta a las dificultades en la posibilidad de capturar a los individuos durante las estaciones lluviosas en algunos arroyos por el aumento de su cauce, específicamente en los muestreos de verano y otoño de 2019, se capturaron una gran proporción de individuos con branquias y un escaso número de individuos sin branquias. Para estudios futuros se recomienda ampliar el esfuerzo de captura, es decir, ampliar las horas de muestreo con el fin de obtener números similares de ambos grupos.

Otra limitación reside en el conocimiento del número preciso de zoosporas, como se mencionó, se utilizan fragmentos sintéticos del ITS para la detección de *Bd* y el número de estos varía entre linajes y cepas. Conocer la intensidad por medio del número de copias de ITS puede ser impreciso para determinar si las cargas de infección son altas o bajas. Por lo anterior, el aislamiento y caracterización de la cepa de *Bd* presente en estas cuatro poblaciones de *A. altamirani* son cruciales para lograr la determinación del número de copias del ITS1 presentes en cada zoospora. Conocer el linaje y la cepa podría ayudar a tener más información sobre la dispersión de *Bd* en México.

A manera de recomendación, será crucial continuar con monitoreos continuos en estas poblaciones de *A. altamirani*, para documentar los factores de amenaza de la especie, así como realizar muestreos continuos para dar seguimiento a la infección por *Bd*. Dado que se prevé que *Bsal* llegará eventualmente al continente americano los datos de la infección de *Bsal* en *A. altamirani* deben ser procesados para determinar si este está presente. Lo anterior permitiría sentar un precedente en caso de que las poblaciones de *A. altamirani* se vieran afectadas por este patógeno.

Realizar qPCR de las muestras de agua tomadas en los sitios muestreados en este estudio para cuantificar si hay concentraciones basales de *Bd*.

REFERENCIAS

- Basanta, M. D. *et al.* (2021) 'Early presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexico with a contemporary dominance of the global panzootic lineage', *Molecular Ecology*. Blackwell Publishing Ltd, 30(2), pp. 424–437. doi: 10.1111/mec.15733.
- Basanta, M. D., Rebollar, E. A. and Parra-Olea, G. (2019) 'Potential risk of *Batrachochytrium salamandrivorans* in Mexico', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 14(2). doi: 10.1371/journal.pone.0211960.
- Berger, L. *et al.* (1998) 'Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 95(15), pp. 9031–9036. doi: 10.1073/pnas.95.15.9031.
- Berger, L. *et al.* (2004) 'Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis', *Australian Veterinary Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 82(7), pp. 434–439. doi: 10.1111/j.1751-0813.2004.tb11137.x.
- Berger, L. *et al.* (2005) 'Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*', *Diseases of Aquatic Organisms*. Inter-Research, pp. 51–63. doi: 10.3354/dao068051.
- Bletz, M., Rebollar, E. and Harris, R. (2015) 'Differential efficiency among DNA extraction methods influences detection of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*', *Diseases of aquatic organisms*. Dis Aquat Organ, 113(1), pp. 1–8. doi: 10.3354/DAO02822.
- Blooi, M. *et al.* (2013) 'Duplex real-Time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples', *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), pp. 4173–4177. doi: 10.1128/JCM.02313-13.
- Boyle, DG *et al.* (2004) 'Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay', *Diseases of Aquatic Organisms*. Inter-Research, 60(2), pp. 141–148. doi: 10.3354/dao060141.
- Briggs, C. J. *et al.* (2005) 'Investigating the population-level effects of chytridiomycosis: An emerging infectious disease of amphibians', *Ecology*, 86(12), pp. 3149–3159. doi: 10.1890/04-1428.
- Collins, J. P. (2010) 'Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn', *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(2–3), pp. 93–99. doi: 10.3354/dao02307.
- Daskin, J. H. *et al.* (2014) 'Cool temperatures reduce antifungal activity of symbiotic bacteria of threatened amphibians - Implications for disease management and patterns of decline', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 9(6).

doi: 10.1371/journal.pone.0100378.

Daszak, P. *et al.* (1999) 'Emerging infectious diseases and amphibian population declines', *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 5(6), pp. 735–748. doi: 10.3201/eid0506.990601.

Duellman, W. E. and Trueb, L. (1986) 'Biology of Amphibians.', *Amphibia-Reptilia*. McGraw Hill, 9(3), pp. 319–321. doi: 10.1163/156853888x00459.

Dugès, A. (1895) *Ambystoma altamirani Dugès, 1895, Amphibian Species of the World*. Available at: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/Amphibia/Caudata/Ambystomatidae/Ambystoma/Ambystoma-altamirani> (Accessed: 21 July 2020).

Fisher, M. C. and Garner, T. W. J. (2020) 'Chytrid fungi and global amphibian declines', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research, pp. 332–343. doi: 10.1038/s41579-020-0335-x.

Fites, J. S. *et al.* (2013) 'The invasive chytrid fungus of amphibians paralyzes lymphocyte responses', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 342(6156), pp. 366–369. doi: 10.1126/science.1243316.

Frías-Alvarez, P. *et al.* (2008) 'Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians', *EcoHealth*. Springer, 5(1), pp. 18–26. doi: 10.1007/s10393-008-0155-3.

García Fera, L. M., Brousset, D. M. and Cervantes Olivares, R. A. (2019) 'Factores abióticos y bióticos determinantes para la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios mexicanos', *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (N.S.)*. Instituto de Ecología, A.C., 35, pp. 1–18. doi: 10.21829/azm.2019.3502066.

Gómez, M. G.-, Danglot-Banck, C. and Vega-Franco, L. (2003) *Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuando usarlas.*, *Revista Mexicana de Pediatría*. Medigraphic.

Greenspan, S. E. *et al.* (2012) 'TRANSMISSION OF BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS TO WOOD FROGS (*LITHOBATES SYLVATICUS*) VIA A BULLFROG (*L. CATESBEIANUS*) VECTOR', <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.3.575>. *Wildlife Disease Association*, 48(3), pp. 575–582. doi: 10.7589/0090-3558-48.3.575.

Hudson, M. A. *et al.* (2019) 'Reservoir frogs: Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in robber frogs in Dominica and Montserrat', *PeerJ*. PeerJ Inc., 2019(6), p. e7021. doi: 10.7717/peerj.7021.

Hyatt, A. *et al.* (2007) 'Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*', *Diseases of Aquatic Organisms*, 73, pp. 175–192. doi: 10.3354/dao073175.

Hyatt, A. D. *et al.* (2007) 'Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*', *Diseases of Aquatic Organisms*. Inter-Research, pp. 175–192. doi: 10.3354/dao073175.

- IUCN (2020) *IUCN Red List of Threatened Species*. Available at: <https://www.iucnredlist.org/> (Accessed: 25 September 2021).
- IUCN SSC Amphibian Specialist, G. (2021) *Ambystoma altamirani* (*Mountain Stream Siredon*), *The IUCN Red List*. Available at: <https://www.iucnredlist.org/species/59049/53973139> (Accessed: 7 July 2021).
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group (2020) *Ambystoma altamirani* (*Mountain Stream Siredon*), *The IUCN Red List*. Available at: <https://www.iucnredlist.org/species/59049/53973139> (Accessed: 21 January 2021).
- James, T. Y. *et al.* (2015) 'Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: Lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research', *Ecology and Evolution*. John Wiley and Sons Ltd, 5(18), pp. 4079–4097. doi: 10.1002/ece3.1672.
- Jenkinson, T. S. *et al.* (2018) 'Globally invasive genotypes of the amphibian chytrid outcompete an enzootic lineage in coinfections', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society Publishing, 285(1893). doi: 10.1098/rspb.2018.1894.
- Johnson, M. L. *et al.* (2003) 'Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*', *Diseases of Aquatic Organisms*. Inter-Research, 57(3), pp. 255–260. doi: 10.3354/dao057255.
- Keesing, F., Holt, R. D. and Ostfeld, R. S. (2006) 'Effects of species diversity on disease risk', *Ecology Letters*, 9(4), pp. 485–498. doi: 10.1111/J.1461-0248.2006.00885.X.
- Lejeune, B. *et al.* (2018) 'Facultative paedomorphosis as a mechanism promoting intraspecific niche differentiation', *Oikos*. John Wiley & Sons, Ltd, 127(3), pp. 427–439. doi: 10.1111/OIK.04714.
- Lemos-Espinal, J. A. *et al.* (2016) 'Stream use and population characteristics of the endangered salamander, *Ambystoma altamirani*, from the Arroyo Los Axolotes, State of Mexico, Mexico', *The Southwestern Naturalist*. Southwestern Association of Naturalists, 61(1), pp. 28–32. doi: 10.1894/0038-4909-61.1.28.
- Lips, K. R. (2011) 'Museum collections: Mining the past to manage the future', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, pp. 9323–9324. doi: 10.1073/pnas.1107246108.
- Lips, K. R. (2016) 'Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. Royal Society of London, 371(1709). doi: 10.1098/rstb.2015.0465.
- Lips, K. R., Green, D. E. and Papendick, R. (2003) 'Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica', *Journal of Herpetology*, 37(1), pp. 215–218. doi: 10.1670/0022-1511(2003)037[0215:CIWFFS]2.0.CO;2.
- Longcore, J. E., Pessier, A. P. and Nichols, D. K. (1999) '*Batrachochytrium*

- dendrobatidis gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians', *Mycologia*. New York Botanical Garden Press, 91(2), pp. 219–227. doi: 10.2307/3761366.
- Longo, A., Burrowes, P. and Joglar, R. (2009) 'Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence', *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(3), pp. 253–260. doi: 10.3354/dao02054.
- Longo, A. V. *et al.* (2013) 'ITS1 Copy Number Varies among *Batrachochytrium dendrobatidis* Strains: Implications for qPCR Estimates of Infection Intensity from Field-Collected Amphibian Skin Swabs', *PLoS ONE*. Public Library of Science (PLoS), 8(10), p. 59499. doi: 10.1371/annotation/e4c527e6-4b6f-4c12-970c-a9e2e6ed8f79.
- Longo, A. V. *et al.* (2015) 'Seasonal and ontogenetic variation of skin microbial communities and relationships to natural disease dynamics in declining amphibians', *Royal Society Open Science*. Royal Society Publishing, 2(7). doi: 10.1098/rsos.140377.
- Longo, A. V. and Zamudio, K. R. (2017) 'Temperature variation, bacterial diversity and fungal infection dynamics in the amphibian skin', *Molecular Ecology*. Blackwell Publishing Ltd, 26(18), pp. 4787–4797. doi: 10.1111/MEC.14220.
- López-Velázquez, A. (2014) *Dinámica Estacional de la Infección por el Hongo Quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* en una Población de Salamandras de la Especie *Pseudoeurycea leprosa* (Cope, 1869) en el Parque Nacional "La Malinche"*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Maniero, G. D. and Carey, C. (1997) 'Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold', *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. Springer, 167(4), pp. 256–263. doi: 10.1007/s003600050072.
- Martel, A. *et al.* (2013) '*Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 110(38), pp. 15325–15329. doi: 10.1073/pnas.1307356110.
- May, R. (2004) 'Ethics and amphibians', *Nature*. Available at: <https://www.nature.com/articles/431403a> (Accessed: 7 July 2021).
- Mazzoni, R. *et al.* (2003) 'Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade', *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 9(8), pp. 995–998. doi: 10.3201/eid0908.030030.
- Mccarthy, M. A. and Parris, K. M. (2004) 'Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics', *Journal of Applied Ecology*, 41(4), pp. 780–786. doi: 10.1111/J.0021-8901.2004.00919.X.
- McDonald, C. A. *et al.* (2020) 'Incapacitating effects of fungal coinfection in a novel

pathogen system', *Molecular Ecology*. Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1111/mec.15452.

Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P. and Parra-Olea, G. (2015) 'La quitridiomycosis en los anfibios de México: Una revisión', *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Universidad Nacional Autónoma de México, 86(1), pp. 238–248. doi: 10.7550/rmb.42588.

Muletz-Wolz, C. R. *et al.* (2017) 'Inhibition of fungal pathogens across genotypes and temperatures by amphibian skin bacteria', *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 8(AUG). doi: 10.3389/fmicb.2017.01551.

Mutschmann, F. *et al.* (2000) '[Chytridiomycosis in amphibians--first report in Europe].', *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 113(10), pp. 380–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11084755> (Accessed: 25 February 2020).

Nava-González, B. A. *et al.* (2020) 'Batrachochytrium dendrobatidis infection in amphibians from a high elevation habitat in the trans-Mexican volcanic belt', *Aquatic Ecology*. Springer, 54(1), pp. 75–87. doi: 10.1007/s10452-019-09727-y.

Nichols, D. K. *et al.* (2001) 'Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs', *Journal of Wildlife Diseases*. Wildlife Disease Association, Inc., 37(1), pp. 1–11. doi: 10.7589/0090-3558-37.1.1.

O'Hanlon, S. J. *et al.* (2018) 'Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 360(6389), pp. 621–627. doi: 10.1126/science.aar1965.

Olsen, V. *et al.* (2004) 'Co-localisation of Batrachochytrium dendrobatidis and keratin for enhanced diagnosis of chytridiomycosis in frogs', *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, 61, pp. 85–88. Available at: <https://www.int-res.com/abstracts/dao/v61/n1-2/p85-88/> (Accessed: 7 July 2021).

Parker, J. M. *et al.* (2002) 'Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*).', *Comparative medicine*, 52(3), pp. 265–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12102573> (Accessed: 25 February 2020).

Parra-Olea, G., Flores-Villela, O. and Mendoza-Almeralla, C. (2014) 'Biodiversidad de anfibios en México', *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.). doi: 10.7550/rmb.32027.

Pessier, A. P. *et al.* (1999) 'Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*).', *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* American Assoc. of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 11(2), pp. 194–9. doi: 10.1177/104063879901100219.

Piotrowski, J. S., Annis, S. L. and Longcore, J. E. (2004) 'Physiology of Batrachochytrium dendrobatidis, a Chytrid Pathogen of Amphibians', *Mycologia*.

JSTOR, 96(1), p. 9. doi: 10.2307/3761981.

Pounds, J. A. *et al.* (2006) 'Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming', *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 161–167. doi: 10.1038/nature04246.

Rachowicz, L. J. and Briggs, C. J. (2007) 'Quantifying the disease transmission function: effects of density on *Batrachochytrium dendrobatidis* transmission in the mountain yellow-legged frog *Rana muscosa*', *Journal of Animal Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd, 76(4), pp. 711–721. doi: 10.1111/J.1365-2656.2007.01256.X.

Rebollar, E. *et al.* (2016) 'Using "Omics" and Integrated Multi-Omics Approaches to Guide Probiotic Selection to Mitigate Chytridiomycosis and Other Emerging Infectious Diseases', *Frontiers in Microbiology*, 7(68).

Rebollar, E. A. *et al.* (2014) 'The lethal fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is present in lowland tropical forests of Far Eastern Panamá', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 9(4). doi: 10.1371/journal.pone.0095484.

Rebollar, E. A. *et al.* (2017) 'Prevalence and pathogen load estimates for the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* are impacted by ITS DNA copy number variation', *Diseases of Aquatic Organisms*. Inter-Research, 123(3), pp. 213–226. doi: 10.3354/DAO03097.

Richards-Zawacki, C. L. (2010) 'Thermoregulatory behaviour affects prevalence of chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, 277(1681), pp. 519–528. doi: 10.1098/rspb.2009.1656.

Rollins-Smith, L. A. *et al.* (2011) 'Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: Impacts of changing environments', in *Integrative and Comparative Biology*. Integr Comp Biol, pp. 552–562. doi: 10.1093/icb/icr095.

Rollins-Smith, L. A. *et al.* (2015) 'Immunomodulatory metabolites released by the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology, 83(12), pp. 4565–4570. doi: 10.1128/IAI.00877-15.

Rosenblum, E. B. *et al.* (2008) 'Global gene expression profiles for life stages of the deadly amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 105(44), pp. 17034–17039. doi: 10.1073/PNAS.0804173105.

Rosenblum, E. B. *et al.* (2010) 'The deadly chytrid fungus: A story of an emerging pathogen', *PLoS Pathogens*. PLoS Pathog. doi: 10.1371/journal.ppat.1000550.

Rosenblum, E. B. *et al.* (2012) 'Substrate-Specific Gene Expression in *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Chytrid Pathogen of Amphibians', *PLoS ONE*, 7(11). doi: 10.1371/journal.pone.0049924.

Rowley, J. and Alford, R. (2009) 'Factors affecting interspecific variation in susceptibility to disease in amphibians', *Amphibian Biology*, pp. 3053–3066.

Rowley, J. J. L. and Alford, R. A. (2007) 'Behaviour of Australian rainforest stream frogs may affect the transmission of chytridiomycosis', *Diseases of Aquatic Organisms*, 77(1), pp. 1–9. doi: 10.3354/dao01830.

Roznik, E. A. and Alford, R. A. (2015) 'Seasonal ecology and behavior of an endangered rainforest frog (*Litoria rheocola*) threatened by disease', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(5). doi: 10.1371/journal.pone.0127851.

Ruggeri, J. *et al.* (2015) 'Seasonal variation in population abundance and chytrid infection in stream-dwelling frogs of the Brazilian Atlantic Forest', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(7). doi: 10.1371/journal.pone.0130554.

Samuelson, J. and Von Lichtenberg, F. (1994) 'Infectious diseases.', in Cotran, I. R. S., Kumar, V., and Robbins, S. L. (eds) *Pathologic basis of disease*. 5th edn. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Co, pp. 305–306.

Sasso, T., McCallum, H. and Grogan, L. (2021) 'Occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between species: A review of influential variables as identified from field studies', *Biological Conservation*, 262, p. 109300. doi: 10.1016/J.BIOCON.2021.109300.

Scheele, B. C. *et al.* (2019) 'Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 363(6434), pp. 1459–1463. doi: 10.1126/science.aav0379.

Scholthof, K.-B. G. (2006) 'The disease triangle: pathogens, the environment and society', *Nature Reviews Microbiology* 2007 5:2. Nature Publishing Group, 5(2), pp. 152–156. doi: 10.1038/nrmicro1596.

SEMARNAT (2018) *Programa de Acción para la Conservación de la Especie (PACE): Ambystoma (Ambystoma spp.)*. Available at: <https://www.gob.mx/conanp/documentos/programa-de-accion-para-la-conservacion-de-especies-pace-ambystoma-ambystoma-spp?state=published> (Accessed: 26 February 2020).

Shaffer, H. B. *et al.* (2008) *Ambystoma altamirani*, *The IUCN Red List of Threatened Species*. Available at: https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Shaffer%2C+H.B.%2C+Parra-Olea%2C+G.%2C+Wake%2C+D.+%26+Flores-Villela%2C+O.+2008.+Ambystoma+altamirani+.+The+IUCN+Red+List+of+Threatened+Species+2008%3A+e.T59049A11875320&btnG= (Accessed: 23 January 2021).

Skerratt, L. F. *et al.* (2007) 'Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs', *EcoHealth*, pp. 125–134. doi: 10.1007/s10393-007-0093-5.

Standish, I. *et al.* (2018) 'Optimizing, validating, and field testing a multiplex qPCR for the detection of amphibian pathogens', *Diseases of Aquatic Organisms*. Inter-Research, 129(1), pp. 1–13. doi: 10.3354/dao03230.

Stegen, G. *et al.* (2017) 'Drivers of salamander extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*', *Nature*. Nature Publishing Group, 544(7650), pp. 353–356. doi: 10.1038/nature22059.

Varga, J. F. A., Bui-Marinós, M. P. and Katzenback, B. A. (2019) 'Frog skin innate immune defences: Sensing and surviving pathogens', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 3128. doi: 10.3389/fimmu.2018.03128.

Vázquez Trejo, M. (2020) *Ecología y conocimiento tradicional del ajolote de montaña (Ambystoma altamirani) en Isidro Fabela, Estado de México, México*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Vázquez Trejo, M. (2021) *Ecología y conocimiento tradicional del ajolote de montaña (Ambystoma altamirani) en Isidro Fabela, Estado de México, México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Available at: <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/110035> (Accessed: 23 August 2021).

Voyles, J., Rosenblum, E. B. and Berger, L. (2011) 'Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson, 13(1), pp. 25–32. doi: 10.1016/J.MICINF.2010.09.015.

Woodhams, D. C. *et al.* (2018) 'Prodigiosin, Violacein, and Volatile Organic Compounds Produced by Widespread Cutaneous Bacteria of Amphibians Can Inhibit Two *Batrachochytrium* Fungal Pathogens', *Microbial Ecology*. Springer New York LLC, 75(4), pp. 1049–1062. doi: 10.1007/s00248-017-1095-7.

Wright, R. K. and Cooper, E. L. (1981) 'Temperature effects on ectotherm immune responses', *Developmental and Comparative Immunology*. Pergamon, 5(SUPPL. 1), pp. 117–122. doi: 10.1016/0145-305X(81)90016-1.

Zamora, A. B. E. *et al.* (2018) 'Effects of nonnative Rainbow Trout on two species of endemic Mexican amphibians', *Freshwater Science*. University of Chicago Press, 37(2), pp. 389–396. doi: 10.1086/697700.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **ANAYA MORALES SARA LUCIA** con número de matrícula **20164000534** cuyo título es:

“Estacionalidad de la quitridiomycosis en poblaciones de *Ambystoma altamirani* en la Sierra de las Cruces.”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 26 de enero del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DR. RAMON ALBERTO BATISTA GARCÍA
DRA. MARIA ANGELICA SANTANA CALDERÓN
DRA. ERIA ALAIDE REBOLLAR CAUDILLO
M. EN C. TANYA MARCELA GONZÁLEZ MARTÍNEZ
DRA. GABRIELA PARRA OLEA

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE (no participa)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2022-01-26 14:37:05 | Firmante

qTPQO1hVeTPvXOpTNN5vBEKH680pkzQ8duaabY2ecjcGJZTaz76PIPOc9dGrXMvZMd6K047LkzoLMzygAveYX/XeWvYGIgKm63VI6UetrJgL9lcDkhWx2Yc83DsiDFVvPNo1GRWLbtB+X/dalXEnXECd8InTgRKj32+chJu6M0y6Q3UMelWEYZf9NzamKOVPrXqxlgf9xVJ87smyhEN3s2KBOWDN8yIpbq1YsloJURzeulvRcmT/G+4X8Sx3soopAXMJ8oBJ9UTSWyKTU7PTWK5CE3zFbb63Gp90xaM4huJ1/h8/gBJKyblvyOuTYCnLMYd4ybeX2ZCJ9t8NvSbQ==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2022-01-26 15:38:10 | Firmante

Y0esPYMPkUdCuqnMzvRaS1R8L30pTe6HNuFN6WajCmGfYtLQEF0aLD7caVwmK8G4M7Zy28YDFgw4PxpMN4Jn1woO1W5X9e0ja/PPDhGH3UhJgmEsl6o5P+iKFOdAf24wEa/5lWyp95Bo9XdVBybnuRWlqOGAXwk8ctOdVXaPlnn/P/J3ko/CL2CajeiO6vIG9fU5s2GPjFoKhdmW5U6xC2qh0Gtw8+BYc1KY9hquwF/INJ6e5jqCsrIEPos+HLoVHDG0YvGIN14I3L3myMICFIP0jv5Yig7Gk0rcMNWUYkWq1fCftqhs0CiFgwkbnWGsgYgDmV1e87XpYPAW8vQ==

ERIA REBOLLAR CAUDILLO | Fecha:2022-01-26 16:06:20 | Firmante

bDaqnD0R14KBNLfvWw9CkrAV5bfcmoimrGNeUwe+kxVG4qIENaMcNFI2E9jLnWgGcwS5IxaFG6KOhFmEW0ReiBD1KwC3eDQnVNbxxQVPdliTeow54Q/Qs3NZ1qsLb75WUxmiAsueHNqEQ6/6V6dabPNT5/eSdZhsq+dNYQojo9YRzCqulc3G3l+0RNQqryrYBouP20l+ap000BUUxeGRELGrkgj25o3Jiz525VYtqTzuSuK6YctNDiUI6/MXOJA+MqE5v3WOXhbz0kEgo7b+wCXNvtj/h4GdC6VIXBXNPLlvh5luZxmsusCysRhVazXcr8Qy56YCXtr9x6fEVDw==

TANYA MARCELA GONZÁLEZ MARTÍNEZ | Fecha:2022-03-23 12:38:41 | Firmante

CbrursLQUlthMVjXPNVJ8A43SQO8jLGligsTpTxggh0LL8wUDiNbjKGZ+CMQq/ZcTAbRqL/Cn5BshFPAk6etdbVnq+nHtN1ISO0hUhfCggdLSVB0TD57I89r0x8xnddqio3UOO/wQmzq63FhNjpdnaoB3g5WPRwLbTrGL3vIHyesyVRAyIWmiY1tiACyWmzMiy5uswTJ0w7KerrYx3hDXtrSXzHG5AGSSpzsF7TyChz7uGuVhQfDBgeu90xG0eS7vp9z1yi+km3aiZ/XiueANE+XawpVubFQ2oM1Nz6/6E7FS8WIkxFTxIVu+nP/cQAsqm1kk1K/89aqW4yseeYw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



5KqSnaTyp

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mlUIGZkXjQV96qnDvxIJn80FrZnUBwqU>

