



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

PERFILES LEUCOCITARIOS DE UNA COMUNIDAD DE REPTILES:
VARIACIÓN ESTACIONAL, SEXUAL E INTERESPECÍFICA

TESIS POR ARTICULOS
ESPECIALIZADOS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. EN C. DANIEL SÁNCHEZ MANJARREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. OSWALDO HERNÁNDEZ GALLEGOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**PERFILES LEUCOCITARIOS DE UNA COMUNIDAD DE
REPTILES: VARIACIÓN ESTACIONAL, SEXUAL E
INTERESPECÍFICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. DANIEL SÁNCHEZ MANJARREZ

TUTOR ACADÉMICO: DR. OSWALDO HERNÁNDEZ GALLEGOS

TUTOR ADJUNTO: DR. JOSÉ FERNANDO MÉNDEZ SÁNCHEZ

TUTOR ADJUNTO: DR. JOSELE RICARDO FLORES SANTÍN



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO 2024

ÍNDICE

Agradecimientos -----	4
Índice de Figuras-----	6
Índice de Cuadros-----	8
Resumen -----	9
Introducción -----	10
Antecedentes -----	12
Justificación -----	15
Hipótesis -----	16
Objetivos -----	17
Metodología y Materiales -----	18
Resultados -----	24
Discusión -----	47
Bibliografía -----	54
White blood cell characterization and leukocyte profile of <i>Sceloporus grammicus</i> (Squamata: Phrynosomatidae) in an agricultural landscape -----	64
Leukocyte profile and leukocyte morphology of <i>Thamnophis melanogaster</i> and <i>Conopsis lineata</i> inhabiting an agroecosystem-----	100
Limb Deformities in <i>Ambystoma rivulare</i> (Caudata: Ambystomatidae), a Microendemic and Threatened Mexican Salamander-----	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Sceloporus grammicus* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

Figura 2. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Sceloporus torquatus* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

Figura 3. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Barisia imbricata* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

Figura 4. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Thamnophis scalaris* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

Figura 5. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

Figura 6. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Thamnophis melanogaster* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

Figura 7. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Conopsis lineata* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

Figura 8. Variación observada en los leucocitos durante un periodo de observación de un año en *Sceloporus grammicus* en la localidad del El Cerrillo, Piedras Bancas, Estado de México, México.

Figura 9. Variación observada en los leucocitos durante un periodo de observación de un año en *Barisia imbricata* en la localidad del El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Figura 10. Variación observada en los leucocitos durante un periodo de observación de un año en *Thamnophis scalaris* en la localidad del El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Figura 11. Gráfica del modelo ajustado de la regresión entre el peso y la abundancia de linfocitos de la especie *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Figura 12. Gráfica del modelo ajustado de la regresión entre el peso y la abundancia de basofilos de la especie *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Figura 13. Variación observada en los leucocitos durante un periodo de observación de un año en *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Figura 14. Análisis de Non-metric Multi Dimensional Scaling utilizando las abundancias de las células leucocitarias, así como los datos de temperatura media mensual y la precipitación media mensual en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Medias del diámetro mayor de cada tipo de célula leucocitaria, así como largo y ancho de los eritrocitos observados en cada especie estudiada. Las células de menor y mayor tamaño se indican en negritas. Los valores están dados en micrómetros (μm). SE (error estándar), n (número de células medidas).

Cuadro 2. Comparaciones de las abundancias de las diferentes células leucocitarias entre sexos de *Sceloporus grammicus* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Cuadro 3. Correlaciones de cada tipo de leucocito con la talla y el peso de *Sceloporus grammicus* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Cuadro 4. Comparaciones de las abundancias de las diferentes células leucocitarias entre sexos de *Barisia imbricata* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Cuadro 5. Correlaciones de cada tipo de leucocito con la talla y el peso de *Barisia imbricata* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Cuadro 6. Comparaciones de las abundancias de las diferentes células leucocitarias entre sexos de *Thamnophis scalaris* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Cuadro 7. Correlaciones de cada tipo de leucocito con la talla y el peso de *Thamnophis scalaris* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Cuadro 8. Comparaciones de las abundancias de las diferentes células leucocitarias entre sexos de *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Cuadro 9. Correlaciones de cada tipo de leucocito con la talla y el peso de *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Cuadro 10. Perfiles leucocitarios y proporciones heterófilos/linfocitos de las especies estudiadas en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México. Los valores de las abundancias que cada tipo de célula están dados en porcentajes (%).

RESUMEN

En los vertebrados, los glóbulos blancos, también conocidos como leucocitos, desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria. La abundancia de cada tipo de leucocito en el torrente sanguíneo es un indicador esencial del estado de salud. Las alteraciones en las abundancias celulares que conforman el perfil leucocitario pueden actuar como indicadores de estrés causado por factores ambientales, lesiones, enfermedades y cambios en el hábitat de los organismos. En este estudio, realizamos el conteo y caracterización morfológica de los glóbulos blancos (linfocitos, monocitos, heterófilos, eosinófilos y basófilos) de una comunidad de saurópsidos no aves ubicada en un ambiente agrícola de la localidad de El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Se realizaron muestreos durante un año, con recorridos semanales para capturar individuos de: *Sceloporus grammicus*, *Sceloporus torquatus*, *Barisia imbricata*, *Conopsis lineata*, *Crotalus triseriatus*, *Thamnophis eques*, *Thamnophis melanogaster* y *Thamnophis scalaris*. Se tomaron muestras sanguíneas de los individuos capturados. Mediante el análisis microscópico se examinaron las muestras sanguíneas con la finalidad de identificar cada tipo de leucocito. Calculamos las abundancias relativas de cada célula leucocitaria y determinamos el perfil leucocitario. Además, calculamos la proporción heterófilos/linfocitos (H/L) para evaluar los niveles de estrés de la población. Con los datos obtenidos se determinaron las variaciones de cada tipo de leucocito a lo largo del año, así como los cambios estacionales en la proporción H/L de cada especie. Con los datos obtenidos se realizaron comparaciones entre temporadas y sexos. Adicionalmente, a través de la observación microscópica, caracterizamos cada tipo de glóbulo blanco y se tomaron microfotografías de cada tipo de célula. Posteriormente, se estableció una escala utilizando una cámara de Neubauer para medir las células. En la mayoría de las especies de saurópsidos no aves estudiadas se observó un valor moderado para la proporción H/L, sin embargo, la prevalencia de estos valores en las proporciones leucocitarias a lo largo del año indicaría un proceso de estrés crónico en las poblaciones. Las especies en las cuales se detectaron mayores niveles de estrés en la comunidad estudiada son *B. imbricata* y *T. melanogaster*, mientras que la especie menos afectada por el estrés fue *S. grammicus*. En *T.*

scalaris y *T. eques* se detectaron niveles intermedios de estrés, mientras que únicamente se logró la captura de un individuo de *S. torquatus*, por lo que no se pudieron determinar las abundancias celulares para esa especie, sin embargo, se logró la caracterización celular del individuo. Este estudio presenta los primeros datos de un seguimiento anual de las abundancias leucocitarias en una comunidad de escamados. Los datos obtenidos nos permiten conocer los niveles de estrés en las poblaciones estudiadas, así como analizar el comportamiento de las proporciones celulares durante el ciclo estacional. Este trabajo podría establecer las bases para identificar y entender las fluctuaciones en las abundancias celulares que ocurren en las poblaciones de manera anual y el efecto que pueden tener la estacionalidad y los periodos reproductores sobre las proporciones leucocitarias.

INTRODUCCIÓN

Los saurópsidos no aves conforman un grupo muy importante dentro de los sistemas naturales, algunos autores los mencionan como indicadores de salud ambiental, además, derivado de las complejas asociaciones que presentan con diversos microhábitats se conoce su utilidad para ilustrar y comprender los procesos evolutivos que conllevan a la especiación (Read, 1998; Raxworthy et al., 2008). Las principales razones del declive en las poblaciones de reptiles a nivel mundial se pueden atribuir a la degradación y pérdida de su hábitat, el comercio e introducción de especies, la contaminación, enfermedades y al cambio climático (Gibbons et al., 2000; Cox y Temple, 2009; Todd et al., 2010).

Se ha observado que la modificación del hábitat afecta de forma negativa la abundancia de poblaciones de saurópsidos no aves. Según Doherty et al. (2020), la abundancia de saurópsidos no aves puede llegar a ser dos tercios menor en ambientes que han sufrido modificaciones. En ese estudio también se observó que el impacto negativo en las poblaciones de escamados se correlacionaba en mayor medida con el tipo de modificación que el hábitat experimentaba, y no mostraba una amplia correlación con las características inherentes de las especies, como podrían ser: la talla, el tamaño de camada/nidada, la distribución o el tipo de reproducción. Observándose que la transformación del hábitat con

la finalidad de prácticas de minería y agricultura son las actividades que mayor impacto tenían en la disminución de la abundancia de estos organismos (Doherty et al., 2020).

También se han documentado los efectos que tiene la pérdida de diversidad de especies en la abundancia de las poblaciones de saurópsidos no aves. En el trabajo de Zipkin et al. (2020), se documentó que tras la aparición del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* se observó la muerte de un gran número de organismos en una población de anfibios. Posterior a la muerte masiva de anfibios, también se observó una clara disminución de la diversidad en la comunidad de serpientes de la zona de estudio, debido posiblemente a que la población de anfibios representaba la principal fuente de alimentación de las serpientes. Demostrando las repercusiones que pueden tener las consecuencias del declive de especies raras o poco estudiadas dentro de las comunidades de anfibios y saurópsidos no aves.

Con 1021 especies, México es el segundo país con mayor diversidad de saurópsidos no aves a nivel mundial, además, se considera como el país con el mayor grado de endemismo para la herpetofauna en Mesoamérica (Wilson et al., 2013). Observándose un 57.2% de endemismo (Wilson y Johnson, 2010).

Estudiar el declive de las poblaciones de saurópsidos no aves es de gran importancia debido a que puede ser un indicador de la disminución en la calidad del hábitat. Además, los factores negativos que pueden ser detectados mediante el estudio del estado de las poblaciones de saurópsidos no aves, podría permitir la toma de acciones que eviten efectos adversos para otros taxa dentro del mismo ambiente. Para lograr la conservación de los diferentes grupos de saurópsidos no aves, se requiere el entendimiento de su ecología, estatus, distribución y de los factores que podrían contribuir a su declive (Todd et al., 2010).

Debido a que en los vertebrados muchas funciones corporales están ligadas con la irrigación sanguínea, tales como el transporte de oxígeno y nutrientes, así como desechos metabólicos (Solis et al., 2007; Álvarez-Mendoza et al., 2011), el análisis de la cantidad y proporciones de glóbulos blancos (leucocitos) o células inmunes en la sangre permite la detección de una respuesta inmunitaria a cambios en las condiciones fisiológicas de los organismos, esta reacción

inmunitaria puede verse provocada por patógenos, pero también por cambios ambientales y ecológicos (Khan y Zafar, 2005; Zhelev et al., 2015), por lo que permite detectar de manera indirecta algún posible deterioro en el hábitat (Davis et al., 2008). El perfil leucocitario se determina a partir del examen microscópico de frotis sanguíneos realizando el conteo de los cinco tipos de glóbulos blancos (Nardini et al., 2013). Además, la proporción de heterófilos/neutrófilos y linfocitos (proporción H/L o N/L), permite conocer los niveles de estrés en los vertebrados (Davis et al., 2008), mediante el cálculo de esta proporción puede conocerse el estado de salud general de una población, por lo que con frecuencia se obtienen los recuentos diferenciales de cada uno de los tipos de glóbulos blancos ya que ofrecen al investigador información sobre el efecto del ambiente y el estado de salud del organismo (Davis et al., 2008).

ANTECEDENTES

En los vertebrados se han observado principalmente cinco tipos de glóbulos blancos: linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. La morfología de los glóbulos blancos se conserva en los diferentes taxa, exceptuando los neutrófilos, ya que en saurópsidos y anfibios los neutrófilos son remplazados por heterófilos, que de acuerdo con diversos estudios cumplen la misma función inmunológica que los neutrófilos (Hawkey y Dennett, 1989; Jain, 1993). Además, en algunos grupos de saurópsidos no aves se ha observado de forma recurrente la existencia de un sexto tipo de células conocidas como azurófilos o monocitos azurófilos, que generalmente se agrupan con los monocitos durante los conteos diferenciales de leucocitos (LeBlanc et al., 2000).

Dentro del sistema inmunitario de los organismos se considera que los neutrófilos/heterófilos son el principal mecanismo fagocítico entre los leucocitos y actúan en respuesta a procesos de inflamación, infección y estrés (Harmon, 1998; Thrall, 2004). Los linfocitos están presentes en diversos procesos inmunitarios como la producción de inmunoglobulina y la modulación de las reacciones inmunes (Campbell, 1996). Los eosinófilos están asociados

con la defensa ante parásitos y juegan un papel importante durante las reacciones inflamatorias (Jain, 1993; Kiesecker, 2002). Los monocitos se han observado como células que actúan como defensa ante infecciones bacterianas por medio de fagocitosis (Davis et al., 2004). Mientras que los basófilos están asociados con procesos inflamatorios (Campbell, 1995).

Debido a la utilidad del recuento leucocitario para determinar el estado inmune en los vertebrados los investigadores utilizan cada vez más esta técnica en estudios de conservación y monitoreo de poblaciones (Shutler y Marcogliese, 2011; Peterson et al., 2013; Das y Mahapatra, 2014), siendo utilizado con frecuencia el perfil leucocitario en estudios herpetológicos que permiten determinar la reacción inmune de diferentes organismos en una variedad de contextos que incluyen manipulación y retención de organismos (Lance y Elsey, 1999), amputación de extremidades (Bennett, 1986), efecto del método de captura (Davis et al., 2011), cautiverio (Davis y Maerz, 2008b), reproducción (Davis y Maerz, 2008a), temperatura (Bennett y Daigle, 1983) y después de la inyección directa de hidrocortisona y corticosteroides en anfibios (Bennett y Harbottle, 1968; Bennett et al., 1972) y reptiles (Saad y Elridi, 1988; Morici et al., 1997).

Uno de los parámetros más importantes para la detección de estrés por medio de hematología es la proporción heterófilos/linfocitos (H/L), la cual se estableció desde la década de los 70's, mediante una serie de experimentos con salamandras en cautiverio, que fueron sometidas a estrés por temperatura, inyección de hidrocortisona y amputación de extremidades, y se observó que los cambios en los glóbulos blancos se presentaban principalmente con un aumento en la proporción de neutrófilos (células equivalentes a los heterófilos presentes en sauropsidos) y una disminución en la proporción de linfocitos (Bennett et al., 1972; Bennett y Daigle, 1983).

El incremento en las abundancias de los linfocitos en la circulación sanguínea se debe a alteraciones inducidas por las hormonas glucocorticoides en la redistribución de los linfocitos presentes en el torrente sanguíneo hacia otras partes del organismo (Dhabhar, 2002). En respuesta a la liberación de glucocorticoides, los linfocitos se adhieren a las células endoteliales presentes en las paredes de los vasos sanguíneos, para posteriormente por medio del

proceso de transmigración (diapédesis) llegar a diferentes tejidos, por ejemplo: los nódulos linfáticos, el bazo, la medula ósea o la piel (Dhabhar, 2002). Esta migración de linfocitos ocasiona una disminución significativa de estas células en la circulación. La liberación de glucocorticoides, además, estimula el flujo de neutrófilos/heterófilos provenientes de la medula ósea hacia el torrente sanguíneo y atenúa el movimiento de estas células hacia otros tejidos (Bishop et al., 1968). Estos cambios en la migración celular que buscan dirigir las células hacia los sitios requeridos durante una respuesta al estrés se traducen en un incremento en las proporciones H:L/N:L (Dhabhar et al., 1996)

La técnica de perfil leucocitario tiene ventajas para lograr la determinación de niveles de estrés en las poblaciones sobre técnicas como la determinación por medio de hormonas, ya que para medir correctamente la corticosterona deben tomarse muestras casi inmediatamente después de la captura para obtener niveles basales de esta hormona (Romero y Romero, 2002). Las respuestas hematológicas permiten observar las respuestas a distintos tipos de estrés a largo plazo en comparación de la corticosterona cuyas mediciones pueden ser considerablemente fluctuantes en cortos periodos de tiempo, además, las respuestas en la producción de corticosterona por estrés dejan de responder a estímulos repetidos, mientras que la respuesta hematológica no lo hace, lo que hace las mediciones por medio del perfil leucocitario más confiables (McFarlane et al., 1989). Además, se han realizado estudios que sugieren que en algunos organismos la producción de hormonas puede comenzar dentro de los 3 minutos posteriores a la captura (Romero y Romero, 2002), mientras que la proliferación de leucocitos opera más lentamente, y un tiempo de manipulación del individuo de hasta una hora no altera la proporción de linfocitos en las muestras (Davis, 2005). En escamados existen diversos estudios hematológicos en donde se analiza el perfil leucocitario, entre los que se incluyen: el conteo diferencial, la determinación y descripción morfológica de las células sanguíneas (Sacchi et al., 2007, 2011), impacto inmunológico de variables eco-fisiológicas (Duran et al., 2019) y el impacto del método de captura en el perfil leucocitario (Davis et al., 2011).

JUSTIFICACIÓN

El cambio de uso de suelo, la fragmentación del hábitat, contaminación, enfermedades y diversas actividades humanas son causas de estrés y otras afecciones en saurópsidos no aves, que pueden modificar la dinámica ecológica e incluso llegar a ocasionar extinciones de las poblaciones (Munguia-Vega et al., 2013). Por lo anterior, se vuelve una importante necesidad desarrollar estrategias de monitoreo de las poblaciones de saurópsidos no aves que permitan evaluar a fondo los posibles efectos negativos que tienen factores como la antropización sobre las poblaciones y comunidades de escamados. El perfil leucocitario puede utilizarse como un indicador para determinar los niveles de estrés ambiental, posicionándose como una herramienta de conservación, que puede detectar afecciones relacionadas con la calidad del hábitat en etapas tempranas. El presente estudio busca emplear el perfil leucocitario para evaluar el estrés al que está sometida una comunidad de escamados presente en un hábitat perturbado por el cambio de uso de suelo, la fragmentación y las prácticas agrícolas. Mediante esta metodología se espera determinar la posible susceptibilidad diferencial entre las especies a las actividades humanas realizadas en el sitio estudiado. Con la adquisición de datos del perfil leucocitario de las especies que conforman la comunidad de escamados estudiada, así como el comportamiento de las fluctuaciones en las abundancias celulares durante las diferentes estaciones anuales, se espera que esta metodología contribuya al entendimiento de la variabilidad y susceptibilidad de los niveles de estrés en las especies y pueda ser empleada en estudios con fines de conservación de diversas especies de escamados.

HIPÓTESIS

Se espera observar diferencias en las abundancias de las células leucocitarias y/o proporciones H/L del perfil leucocitario de las especies que conforman la comunidad de escamados del Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, así como diferencias en las abundancias celulares entre sexos y entre estaciones.

Se espera que los organismos ubicados cerca de asentamientos humanos y áreas utilizadas para la agricultura y pastoreo muestren una proporción H/L que refleje niveles de estrés superiores a aquellos individuos encontrados en zonas relativamente conservadas o con baja actividad antropogénica.

El análisis de perfil leucocitario y su variabilidad en el tiempo permitirá conocer cómo pueden estarse reflejando los efectos de factores ambientales, fisiológicos y de las actividades antropogénicas en las poblaciones del área estudiada, de igual manera se lograrán obtener datos acerca de las abundancias y morfología leucocitarias de las especies de escamados presentes en Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar los perfiles leucocitarios de la comunidad de escamados del Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las proporciones de heterófilos/linfocitos en sangre de la comunidad de escamados del Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México.
- Evaluar el estrés reflejado en el perfil leucocitario de la comunidad de escamados del Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México, mediante la proporción H/L.
- Evaluar las diferencias en el perfil leucocitario y las proporciones H/L entre sexos de la comunidad de escamados del Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México.
- Evaluar las diferencias interespecíficas del perfil leucocitario y las proporciones H/L de la comunidad de escamados del Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México.
- Evaluar el efecto estacional en el perfil leucocitario y las proporciones H/L de la comunidad de escamados del Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México.
- Describir la morfología leucocitaria de la comunidad de escamados del Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El sitio de estudio está ubicado en El Cerrillo Piedras Blancas (19°25' a 19°26' N, 99°39' a 99°40' O), en Toluca, Estado de México, México, a una altitud de 2,593 msnm. En el área de estudio se pueden observar signos evidentes de antropización, como la pérdida de la cobertura arbórea, el uso de grandes extensiones de tierra para fines agrícolas, siembra, uso de agroquímicos (Franco-Martínez et al., 2015), pastoreo de diversas especies de ganado y la construcción de drenajes y canales de concreto. El sitio presenta una temperatura media anual de 8.2°C y una precipitación media anual de 738.6 mm, con variación estacional (Álvarez-Lopezello et al., 2016). La vegetación en el sitio de estudio consiste en pastos y escasa cobertura arbórea (Álvarez-Lopezello et al., 2016). El sitio de estudio presenta clima templado subhúmedo con lluvias en verano (Cwb) (García, 1973).

Especies estudiadas

En El Cerrillo Piedras Blancas se distribuyen 8 especies de escamados; entre ellos se encuentran 3 lacertilios: *Sceloporus grammicus* (Lagarto del Mesquite), *Sceloporus torquatus* (Lagartija Espinosa de Collar), *Barisia imbricata* (Escorpión Transvolcánico), y 5 serpientes: *Conopsis lineata* (Serpiente Toluqueña Rayada), *Crotalus triseriatus* (Viborita de Cascabel), *Thamnophis eques* (Serpiente Jarretera Mexicana), *Thamnophis melanogaster* (Serpiente Jarretera de Vientre Negro Mexicana) y *Thamnophis scalaris* (Serpiente Jarretera Alpina de Cola-larga).

El Lagarto del Mesquite (*Sceloporus grammicus*), es una especie vivípara con una amplia distribución en México (Sites et al., 1992), habitando en una gran variedad de hábitats, como bosques de pino-encino, bosques de pino y áreas xéricas (Leyte-Manrique et al., 2017). Esta especie se reproduce en otoño-invierno con nacimientos en primavera (Guillette y Casas-Andreu, 1980; Hernández-Salinas et al., 2010). De acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, *S. grammicus* es una especie sujeta a protección especial, mientras que en

la Lista Roja de la IUCN tiene un estatus de preocupación menor (Hammerson, et al., 2007a). Esta especie tiene un puntaje de 9 de 20 de acuerdo con el Índice de Vulnerabilidad Ambiental EVS (por sus siglas en inglés, Environmental Vulnerability Score), con lo cual esta especie tiene una baja vulnerabilidad a los cambios y degradación de su hábitat (Wilson et al., 2013).

La Lagartija Escamosa de Collar (*Sceloporus torquatus*), es una especie vivípara endémica de México que se distribuye en el centro y norte del país, desde los 580 a los 2240 msnm (Méndez de la Cruz et al., 2009), habitando zonas de bosque, matorrales, pastizales y terrenos rocosos (Canseco-Márquez et al., 2007a). La actividad reproductora de esta especie inicia durante el verano, ocurriendo la ovulación entre noviembre y diciembre. Los partos suceden a finales de abril e inicios de mayo (Guillette y Méndez-de la Cruz, 1993, Feria-Ortíz et al., 2001). Su dieta se constituye principalmente de insectos, y en menor medida de otros invertebrados terrestres y materia vegetal (Feria-Ortíz et al., 2001). La especie se cataloga con un estatus de preocupación menor según la IUCN (Canseco-Márquez et al., 2007a), mientras que presenta una baja vulnerabilidad a la degradación de su hábitat con 11 puntos de 20 en el EVS (Wilson et al., 2013). Sin embargo, *S. torquatus* no se encuentra listada en la NOM-059-SEMARNAT-2010, por lo que es necesaria más información a fin de determinar su situación de riesgo.

El Escorpión Transvolcánico (*Barisia imbricata*), es una especie endémica vivípara con reproducción en verano y otoño (Guillette y Casas-Andrew, 1987; Martínez-Torres et al., 2006). Presenta una amplia distribución a lo largo de México, sin embargo, recientes estudios han registrado que varios linajes genéticos están inmersos en dos subespecies: *B. imbricata imbricata* y *B. imbricata ciliaris*, por lo que es necesario reevaluar el estatus taxonómico de la especie (Bryson y Riddle, 2012). La especie está sujeta a protección especial según la NOM-059-SEMARNAT-2010, y se encuentra en el estatus de preocupación menor en la Lista Roja de la IUCN (Canseco-Márquez et al., 2007b). Además, esta especie presenta un puntaje de 14 de 20 en el EVS, lo que indica que esta especie tiene un índice alto de vulnerabilidad a la degradación de su hábitat (Wilson et al., 2013).

La Serpiente Jarretera Mexicana (*Thamnophis eques*), es una serpiente vivípara que se distribuye desde Arizona, Estados Unidos, hasta el sur de México (Stebbins, 2003), con hábitos semi-acuáticos (Conant, 2003). Se ha registrado la presencia de crías de esta especie desde primavera hasta mediados de otoño (Manjarrez, 1998). Es una especie amenazada de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, mientras que en la Lista Roja de la IUCN presenta un estatus de preocupación menor (Hammerson et al., 2007b). Por su parte, su puntaje en el EVS es de 8 sobre 20, indicando que *T. eques* tiene una baja vulnerabilidad a la degradación de su hábitat (Wilson et al., 2013).

La Serpiente Jarretera Alpina de Cola-larga (*Thamnophis scalaris*), es una especie endémica vivípara que se distribuye a lo largo del eje volcánico desde Jalisco hasta Veracruz, en elevaciones desde los 2,103 a los 4,273 msnm (Manjarrez et al., 2007), con una distribución fragmentada en la Faja Volcánica Transmexicana, el Altiplano mexicano y la Sierra Madre Occidental (Hidalgo-Licona et al., 2023). Es una especie amenazada de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, y en la Lista Roja de la IUCN se cataloga como una especie de preocupación menor (Canseco-Márquez y Mendoza-Quijano, 2007). Posee un puntaje de 14 sobre 20 en el índice EVS, que indica una alta vulnerabilidad a los cambios de su hábitat (Wilson et al., 2013).

La Serpiente Jarretera de Vientre Negro Mexicana (*Thamnophis melanogaster*), es una serpiente vivípara endémica de México de hábitos semi-acuáticos en áreas templadas entre los 1,158 y los 2,545 msnm (Rossman et al., 1996). De acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, esta especie está amenazada, lo que coincide con su estatus en la Lista Roja de la IUCN (Vasquez-Díaz y Quintero-Díaz, 2007). Por otro lado, presenta un puntaje de 15 sobre 20 en el índice EVS, lo que cataloga a *T. melanogaster* como una especie con una alta vulnerabilidad a la degradación del hábitat (Wilson et al., 2013).

La Serpiente Toluqueña Rayada (*Conopsis lineata*), es una especie vivípara endémica de México cuya distribución se extiende desde el centro al sur de México en bosques de pino, abeto y vegetación xérica en altitudes de 1,750 a 3,100 msnm (Goyenechea y Flores-Villela 2006). Esta especie está catalogada como de preocupación menor en la Lista Roja de la IUCN (Canseco-Márquez et al., 2007c), y según el índice EVS presenta un puntaje de 13 de 20, lo cual la

sitúa en el límite entre una vulnerabilidad media y una vulnerabilidad alta a la degradación de su hábitat (Wilson et al., 2013). Los estudios sobre esta especie son escasos, al punto de que no se encuentra actualmente en la NOM-059-SEMARNAT-2010, lo que resalta la importancia de realizar más estudios en la especie.

Muestreo en campo

Recolectamos los individuos de las especies estudiadas mediante muestreos semanales. Los muestreos fueron realizados durante un año, desde junio de 2021 a junio de 2022. Las búsquedas se realizaron a lo largo de transectos previamente definidos, buscando en: vegetación, rocas, cavidades, troncos de árboles, debajo de plásticos y sobre estructuras de concreto. Capturamos las lagartijas manualmente o mediante un nudo corredizo ajustado a una caña de pesca, utilizamos ganchos y pinzas herpetológicas en el caso de las serpientes. Al momento de la captura, medimos la temperatura corporal de los individuos con un termómetro cloacal de lectura rápida (Miller and Weber®, L-K Industries, Houston, Texas). Inmediatamente después y dentro de los primeros 5 minutos después de la captura, se tomaron muestras de sangre de cada individuo capturado mediante la punción de la vena coccígea ventral, descrita como la mejor opción para recolectar sangre por punción venosa en reptiles (Nardini et al., 2013). Se utilizaron jeringas de 0.3 y 0.5 mL con agujas calibre 31G de 6 y 8 mm para recolectar la sangre. Se utilizó una jeringa y aguja nueva y estéril para cada individuo y la extracción de sangre no superó los 0.02 mL. Con las muestras de sangre obtenidas de cada individuo se realizaron preparaciones sanguíneas (frotis) *in situ*. Posteriormente se obtenían los datos de la longitud hocico-cloaca (LHC), midiendo desde la punta del hocico hasta la región cloacal (con un vernier digital con precisión de 1.0 mm) y el peso, mediante una balanza de 10 o 60 gr. (Pesola© con precisión de 0.1 g). Sexamos los organismos por medio de la observación de la coloración ventral (Argaez, et al., 2018), examen de escamas postcloacales, presencia/ausencia de hemipenes y presencia/ausencia de corona hemipenal. Caracterizamos los organismos como adultos o juveniles de acuerdo con la LHC mínima a la cual se ha registrado actividad sexual en la literatura para cada especie. Para identificar a los individuos colectados, utilizamos un microcauterio (Bovie

Medical Change-A-Tip) para aplicar marcas en las escamas ventrales de las serpientes según Ekner et al. (2011) y marcas en las escamas mental y submandibulares de las lagartijas según Winne et al. (2006). También registramos la fecha y hora de captura, y cada micrositio de captura fue georreferenciado (resolución de 3 m con datos GPS) y caracterizado para asegurar la liberación de los organismos en los lugares exactos donde fueron recolectados. Previamente a su liberación cada organismo del cual se obtuvieron muestras sanguíneas fue mantenido en observación por un lapso aproximado de 5 minutos. Todos los organismos fueron liberados de forma posterior a la toma de datos en el mismo sitio en el cual fueron capturados.

Perfil leucocitario y descripción de glóbulos blancos

En el laboratorio, los frotis sanguíneos se tiñeron con Wright para la observación microscópica siguiendo el procedimiento de recuento manual (Arikan & Çiçek, 2014). Todos los frotis de sangre se observaron con un microscopio óptico OLYMPUS© CX41 con un aumento de 100X (aceite de inmersión). Todas las observaciones fueron realizadas por una sola persona (DS-M) para reducir cualquier sesgo. Los conteos de linfocitos, monocitos, heterófilos, eosinófilos y basófilos se realizaron siguiendo un método de conteo manual conocido como “guardia griega”, en el cual el observador elige un campo al azar y mueve el portaobjetos de arriba a abajo y de izquierda a derecha a lo largo de diferentes campos hasta contar 100 leucocitos o 150 campos (Durán et al., 2019). Los leucocitos se identificaron de acuerdo con descripciones morfológicas previas (Stacy et al., 2011; Nardini et al., 2013; Arikan & Çiçek, 2014) y se caracterizaron como heterófilos, eosinófilos, monocitos, basófilos y linfocitos. Calculamos los perfiles leucocitarios expresados en porcentaje de cada tipo de glóbulo blanco y determinamos la proporción heterófilos/linfocitos (H/L). Además, a través de la observación microscópica, caracterizamos cada tipo de glóbulo blanco y tomamos microfotografías de cada tipo de célula acoplando una cámara mirrorless Canon EOS M50 Mark II y una lente Canon EF-M 15-45 IS STM al ocular del microscopio. Posteriormente, se estableció una escala utilizando una cámara de Neubauer para medir las células.

Análisis estadísticos

De acuerdo con los recuentos celulares y las abundancias observadas, calculamos la proporción de linfocitos, monocitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos y las proporciones H/L. Realizamos regresiones lineales para cada tipo de leucocito, definiendo la talla y el peso de los organismos como las variables independientes y las abundancias de las células leucocitarias y las proporciones H/L como las variables dependientes para determinar si había alguna correlación con el peso o la LHC de los individuos. Se realizaron pruebas de normalidad y bondad de ajuste. Transformamos los datos de las proporciones celulares (transformación de arcoseno) para aproximar a distribuciones normales. Realizamos la prueba t de Student para LHC y cada leucocito entre sexos para determinar diferencias significativas entre machos y hembras en las poblaciones de las especies estudiadas.

Usamos Análisis de Varianza (ANOVA/ANCOVA) para comparar los valores de cada célula leucocitaria y las proporciones H/L entre temporadas (primavera, verano, otoño e invierno). Delimitamos la duración de las estaciones de la siguiente manera: la estación de primavera de marzo a mayo, verano de junio a agosto, otoño de septiembre a noviembre, mientras que la estación invernal se delimitó entre los meses de diciembre a febrero. Posteriormente se utilizó una prueba Post-Hoc (Tukey) para observar cuales eran las estaciones anuales que presentaban diferencias significativas en las proporciones de cada célula leucocitaria. Finalmente, tomando en cuenta los datos de temperatura ambiental media mensual y precipitación media mensual en el sitio de estudio, se realizó un análisis multivariado Non-Metric Multidimensional Scaling (NMMDS) utilizando la distancia de similitud de Bray-Curtis para observar las diferencias en el perfil leucocitario entre las especies a lo largo de las cuatro estaciones y el efecto que tenían la temperatura media mensual y precipitación en el agrupamiento de los datos de las especies estudiadas durante cada estación. Posteriormente se realizó un ANOVA con los valores obtenidos del NMMDS para determinar si existían diferencias significativas entre los diferentes grupos.

Se utilizó el software IBM SPSS 25, Statgraphics Centurion XVIII Y Past 4 con un nivel de confianza de 0.05 para todas las pruebas.

RESULTADOS

Colectas

Se obtuvieron muestras sanguíneas de un total de 201 individuos. El número de individuos capturados y el número de recapturas de cada una de las especies que conforman la comunidad de escamados del Cerrillo Piedras Blancas quedó de la siguiente manera: 54 individuos de *S. grammicus* (tres recapturas), 1 individuo de *S. torquatus* (sin recapturas), 46 individuos de *B. imbricata* (seis recapturas), 52 individuos de *T. scalaris* (dos recapturas), 35 individuos de *T. eques* (tres recapturas), 7 individuos de *T. melanogaster* (sin recapturas) y 6 individuos de *C. lineata* (dos recapturas). Lo anterior representa un tamaño de muestra de 185 individuos colectados y 16 recapturas (n=201) durante los muestreos en campo. De igual manera se obtuvieron un total de 392 preparaciones sanguíneas (frotis).

Sceloporus grammicus

De los individuos capturados, 30 fueron machos y 24 hembras. Se obtuvieron las muestras para realizar los frotis sanguíneos por duplicado de 50 individuos (29 machos y 21 hembras). Tres individuos (dos machos y una hembra) tuvieron LHC inferior al mínimo registrado para alcanzar la madurez sexual en esta especie, 38.9 mm en machos y 44.6 mm en hembras según Hernández-Salinas et al. (2010), por lo tanto, sus proporciones celulares no se incluyeron en los análisis. No se encontraron diferencias significativas en la talla ($t = 0.47$; $gl = 46$, $P = 0.637$) entre machos ($n = 27$, LHC media \pm DE = 58.85 ± 7.96 mm, intervalo 45-70 mm) y hembras ($n = 20$, LHC media \pm DE = 59.90 ± 6.88 mm, intervalo 45–73 mm). Además, no se encontraron diferencias en el peso ($t = 0.64$; $gl = 46$, $P = 0.522$) entre machos ($n = 27$, peso medio \pm DE = 6.75 ± 2.66 g, intervalo 2.7 – 11.5 g) y hembras ($n = 20$, peso medio \pm DE = 7.26 ± 2.67 g, intervalo 2.7 – 13 g) en la población estudiada.

Sceloporus torquatus

Únicamente se logró capturar 1 organismo de la especie *S. torquatus* en el sitio de estudio. El individuo es un macho con una talla de 86 mm, el cual fue capturado durante la estación de otoño. Se lograron obtener muestras sanguíneas del individuo, lo que permitió la caracterización morfológica de los diferentes leucocitos. Sin embargo, no fue posible realizar análisis de abundancia celular ni perfil leucocitario dada la baja abundancia de organismos de esta especie en el sitio de estudio.

Barisia imbricata

Se capturaron 46 individuos de la especie *B. imbricata*. De los organismos capturados, 22 fueron machos y 15 hembras. Además, se capturaron 9 organismos juveniles, de los cuales no fue posible determinar el sexo. No se observaron diferencias en la talla de machos y hembras ($t = -0.08$; $gl = 36$, $P = 0.935$). Se obtuvieron muestras para realizar frotis sanguíneos de 35 individuos adultos (21 machos y 14 hembras). Sin embargo, 5 organismos, (3 machos y 2 hembras) fueron mantenidos en cautiverio por 5 días antes de la toma de muestra sanguínea, por lo tanto, sus abundancias celulares no fueron incluidas en los análisis.

Conopsis lineata

Se capturaron 6 individuos de *C. lineata* en el sitio de estudio. De los organismos capturados, 1 era macho y 5 hembras. Las capturas se lograron durante las estaciones de primavera, verano e invierno. No se encontraron organismos de esta especie en la estación de otoño.

Thamnophis scalaris

Se capturaron 52 individuos de *T. scalaris*, 26 machos y 26 hembras. No se observaron diferencias significativas en la talla de machos y hembras de la especie ($t = -0.25$; $gl = 51$, $P = 0.800$). Se obtuvieron muestras sanguíneas suficientes para realizar los frotis sanguíneos de 43 individuos, sin embargo, no

se incluyeron en los análisis los recuentos leucocitarios de 2 individuos que fueron mantenidos en cautiverio previo a la toma de muestra.

Thamnophis eques

Se capturaron 35 individuos de la especie *T. eques* 12 machos y 23 hembras. Se obtuvieron muestras sanguíneas de 29 individuos. No se incluyeron en los análisis los datos de 9 organismos debido a que presentaron una LHC menor a la mínima descrita para los adultos de la especie, siendo de 360 mm la registrada como talla mínima a la cual se ha observado actividad espermatogénica mediante estudios histológicos en machos de esta especie (Goldberg, 2004) y 395 mm, como la talla mínima a la cual se ha observado una hembra grávida en el sitio de estudio (Manjarrez, 1998). No se observó diferencia significativa en la talla ($t = -0.193$; $gl = 19$, $P = 0.848$) de machos ($n = 5$, LHC media \pm DE = 458.2 ± 129.8 mm, intervalo 370 – 685 mm) y hembras ($n = 15$, LHC media \pm DE = 451.2 ± 385.8 mm, intervalo 390 – 535 mm). Sin embargo, si se observó una diferencia significativa en el peso entre sexos ($t = 2.69$; $gl = 19$, $P = 0.014$), siendo las hembras ($n = 15$, peso medio \pm DE = 58.93 ± 17.09 gr, intervalo 42–102 gr) más pesadas que los machos ($n = 5$, peso medio \pm DE = 36.24 ± 13.23 gr, intervalo 20.2–57 gr).

Thamnophis melanogaster

Se capturaron 7 individuos de la especie *T. melanogaster* en el sitio de estudio 4 machos, 2 hembras y 1 juvenil al cual no fue posible determinar el sexo. Únicamente se lograron capturas de esta especie durante las estaciones de primavera, verano y otoño, y no se lograron avistamientos de la especie durante el invierno.

Morfología de los leucocitos

Observamos al microscopio las laminillas con preparaciones sanguíneas de las especies estudiadas e identificamos y caracterizamos los cinco tipos de leucocitos (linfocitos, monocitos, basófilos, eosinófilos y heterófilos).

Los linfocitos se observaron como células pequeñas (Cuadro 1), ovaladas o redondas, con citoplasma homogéneo y escaso, en donde el núcleo correspondía al 70 - 80% de la célula. La morfología de esta célula fue muy similar en todas las especies estudiadas (Figs. 1A a 7A). La tinción Wright permitió observar el citoplasma de un color gris claro o azul claro y un núcleo magenta. En algunos casos se pudieron observar pseudópodos en la periferia de su citoplasma.

Los monocitos se observaron como células de tamaño variable (Cuadro 1), con forma redonda a esférica, en algunos casos incluso ameboides debido a los pseudópodos de su citoplasma, el núcleo es relativamente grande y de forma curva o arriñonada, ocupando entre el 50% y el 70% del citoplasma celular (Figs. 1B a 7B). Se observaron monocitos con numerosas inclusiones en el citoplasma teñidos de un color que va del gris claro al azul, lo que coincide con las descripciones de monocitos azurófilos en reptiles de diversas especies, sin embargo, estas células azurófilas no fueron observadas en los individuos de *C. lineata* y *T. melanogaster*.

Los basófilos se observaron como pequeñas células redondas (Cuadro 1), con numerosos gránulos citoplasmáticos, en la mayoría de los casos el núcleo no podía distinguirse debido a la naturaleza altamente cromófila de los gránulos; estas células se tiñen de azul oscuro a violeta (Figs. 1C a 7C). Junto con los linfocitos representan las células de menor tamaño entre los leucocitos de las especies estudiadas. Los basófilos de *T. eques* fueron las células de menor tamaño observado.

Los eosinófilos son células de tamaño variable (Cuadro 1), cuyo citoplasma se tiñe de rosa a violeta claro y se observan grandes gránulos citoplasmáticos que se tiñen de color magenta oscuro con un núcleo redondo o alargado y comúnmente excéntrico (Figs. 1D a 7D). Representan las células de mayor tamaño dentro de los leucocitos de las especies estudiadas, observándose los eosinófilos de *B. imbricata* como las células que registraron el mayor tamaño.

Los heterófilos se observaron como células grandes (Cuadro 1), con forma redonda y numerosos gránulos citoplasmáticos fusiformes, se pudieron observar heterófilos trilobulados en las especies de lacertilios estudiadas (i.e., *S. grammicus*, *S. torquatus* y *B. imbricata*) (Figs. 1E a 3E), mientras que en las serpientes se observaron heterófilos con núcleos ovalados y monolobulados

(Figs. 4E a 7E). En todos los casos se observó un núcleo con posicionamiento excéntrico.

Cuadro 1. Medias del diámetro mayor de cada tipo de célula leucocitaria, así como largo y ancho de los eritrocitos observados en cada especie estudiada. Las células de menor y mayor tamaño se indican en negritas. Los valores están dados en micrómetros (μm). SE (error estándar), n (número de células medidas).

	LINFOCITOS			MONOCITOS			BASÓFILOS			EOSINÓFILOS			HETERÓFILOS		
	\bar{X}	$\pm\text{SE}$	n	\bar{X}	$\pm\text{SE}$	n	\bar{X}	$\pm\text{SE}$	n	\bar{X}	$\pm\text{SE}$	n	\bar{X}	$\pm\text{SE}$	n
<i>S. grammicus</i>	8.12	0.26	20	12.9	0.36	20	10	0.17	20	11.26	0.48	20	14.76	0.21	20
<i>S. torquatus</i>	8.91	0.1	12	13.3	0.86	13	9.18	0.19	13	13.36	0.35	13	12.53	0.69	12
<i>B. imbricata</i>	8.99	0.17	25	11.2	0.15	24	7.67	0.17	25	17.28	0.25	24	16.58	0.34	24
<i>T. scalaris</i>	8.79	0.25	25	12.9	0.49	24	9.12	0.20	24	14.51	0.14	24	10.59	0.12	21
<i>T. eques</i>	7.03	0.17	22	13.3	0.33	23	6.86	0.30	23	14	0.15	23	10.1	0.14	23
<i>T. melanogaster</i>	9.04	0.21	20	13.7	0.37	20	10.7	0.25	20	17.04	0.51	30	16.63	0.3	20
<i>C. lineata</i>	7.53	0.3	20	13.4	0.33	20	8.47	0.14	20	15.01	0.53	20	14.67	0.41	20

	ERITROCITOS					
	LARGO			ANCHO		
	\bar{X}	$\pm\text{SE}$	n	\bar{X}	$\pm\text{SE}$	n
<i>S. grammicus</i>	17.7	0.36	30	10.4	0.17	30
<i>S. torquatus</i>	17.4	0.34	20	11.3	0.31	20
<i>B. imbricata</i>	21.9	0.23	30	10.1	0.14	30
<i>T. scalaris</i>	18.1	0.28	31	10.9	0.19	31
<i>T. eques</i>	18	0.39	28	11.6	0.21	28
<i>T. melanogaster</i>	18.8	0.6	30	14.4	0.45	30
<i>C. lineata</i>	17.7	0.34	30	11.1	0.29	30

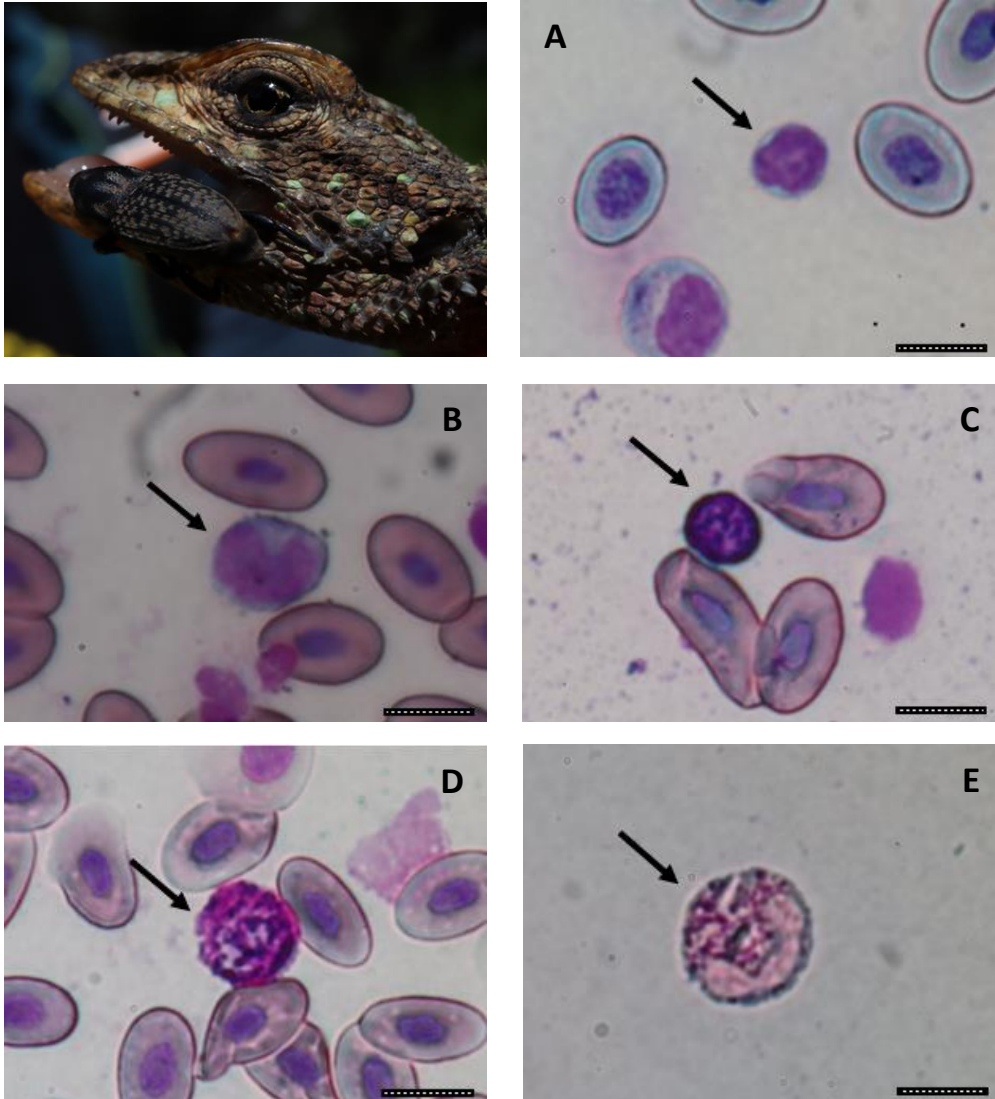


Figura 1. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Sceloporus grammicus* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

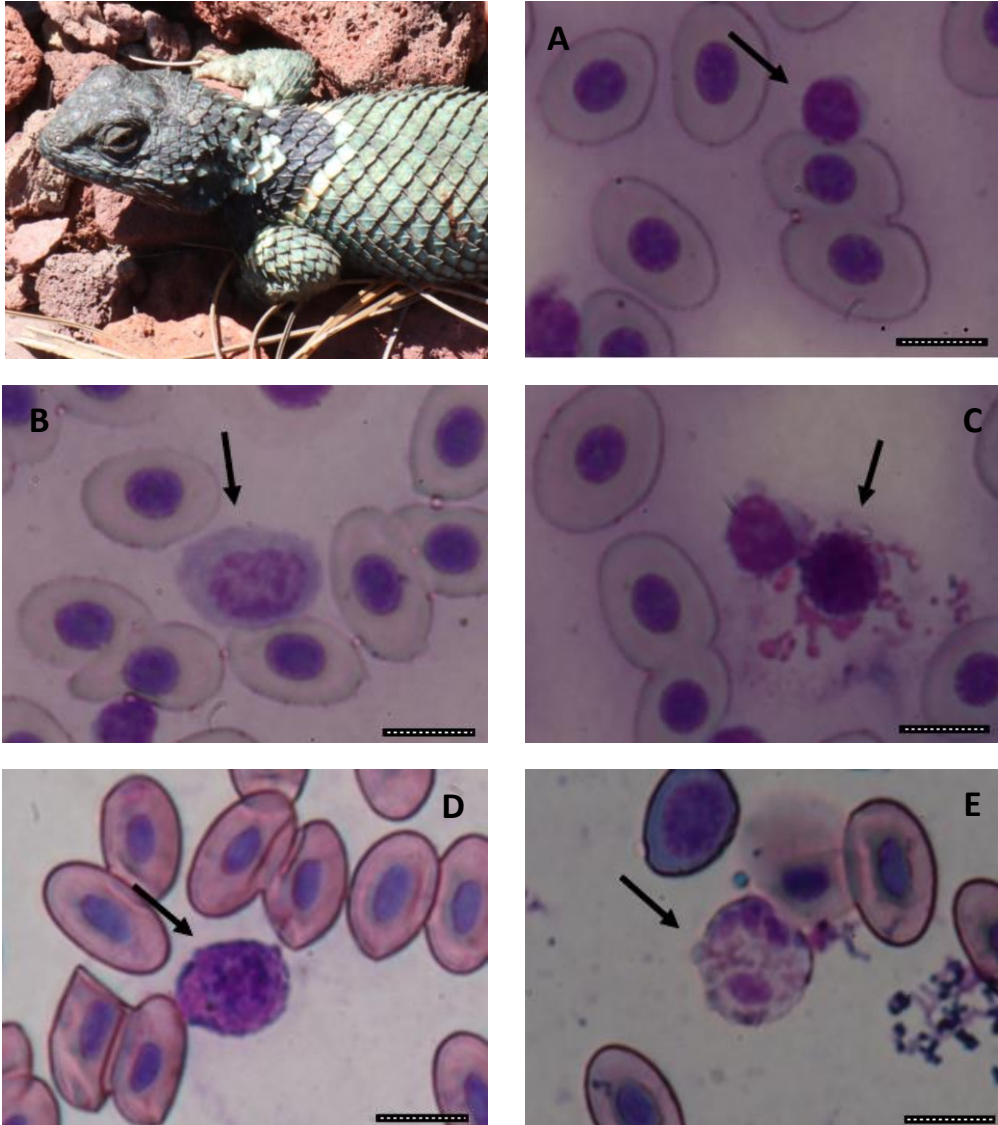


Figura 2. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Sceloporus torquatus* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

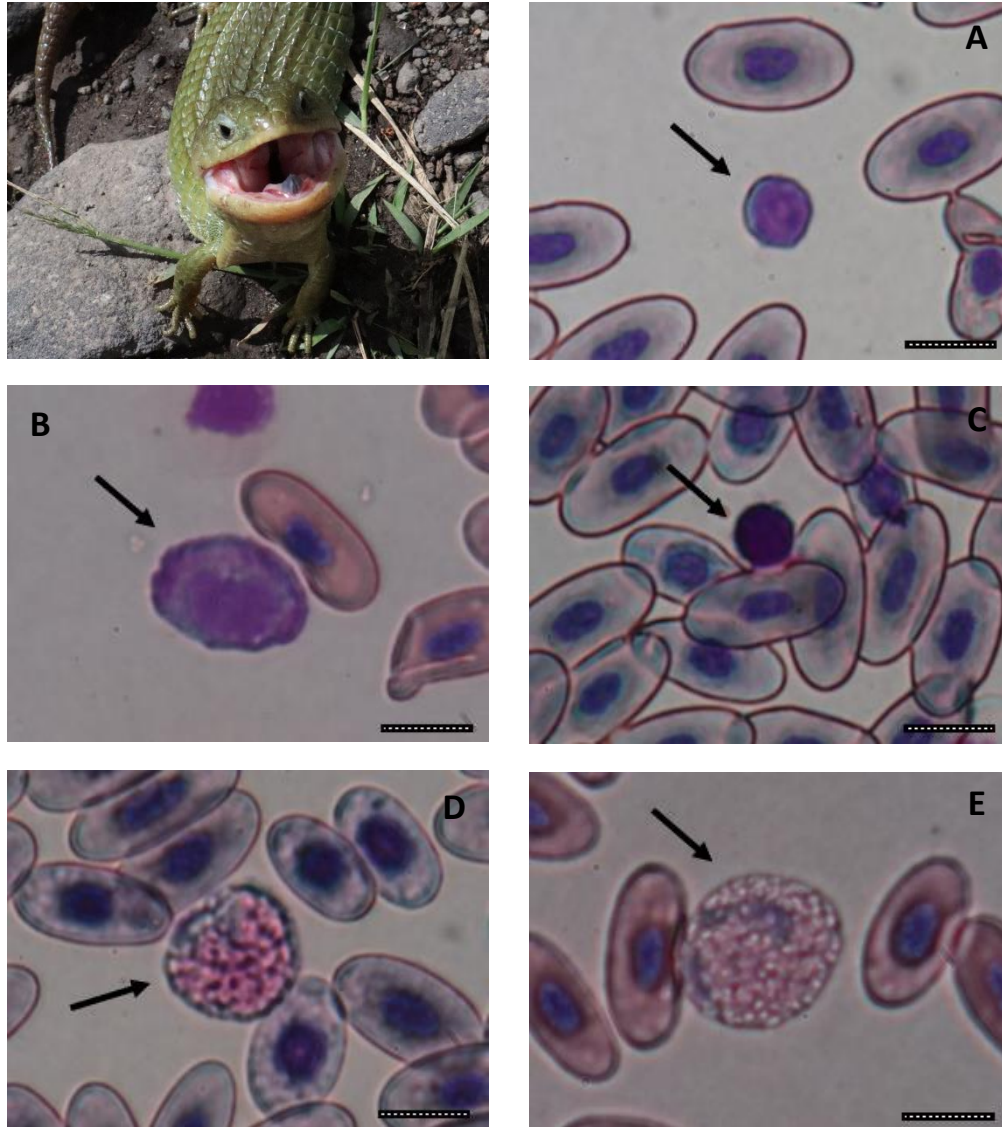


Figura 3. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Barisia imbricata* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

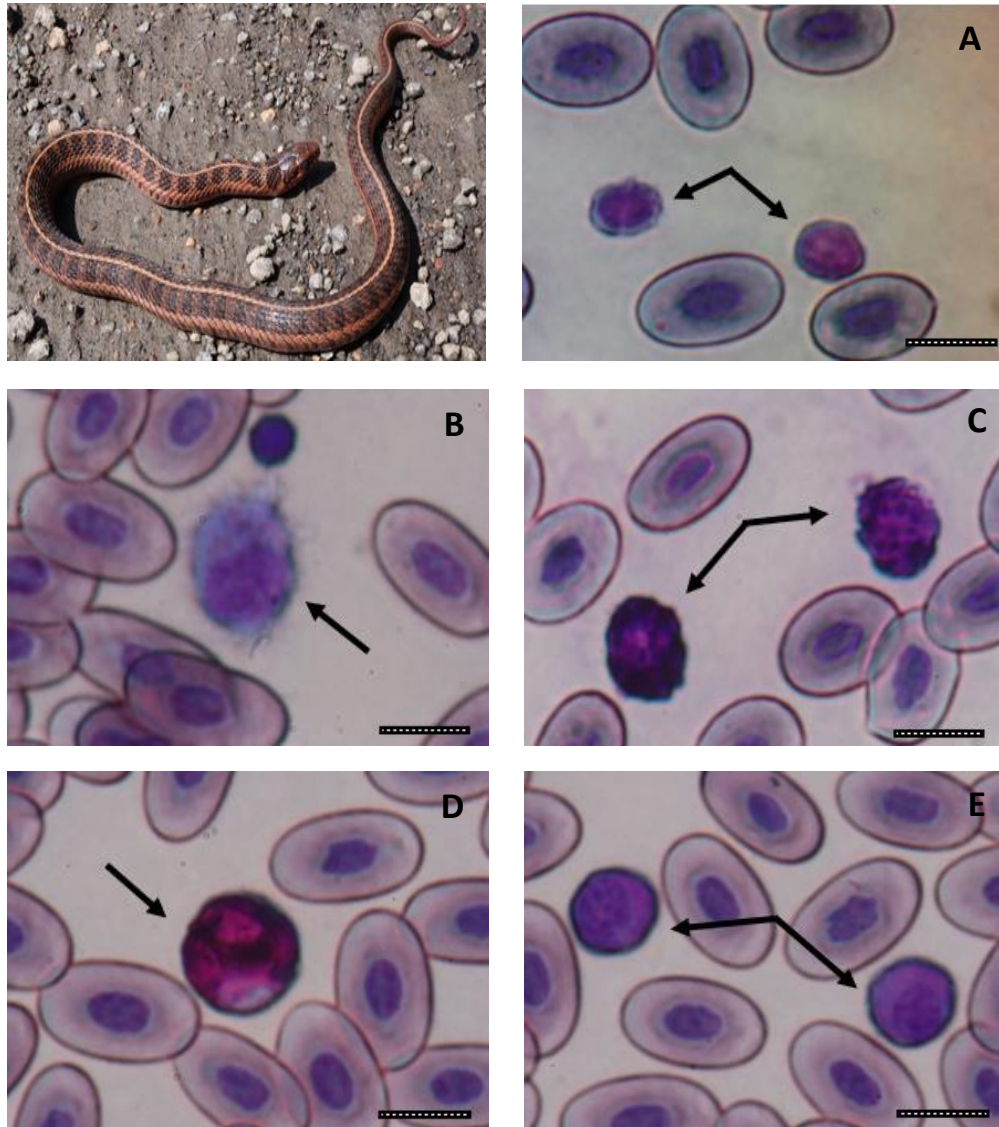


Figura 4. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Thamnophis scalaris* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

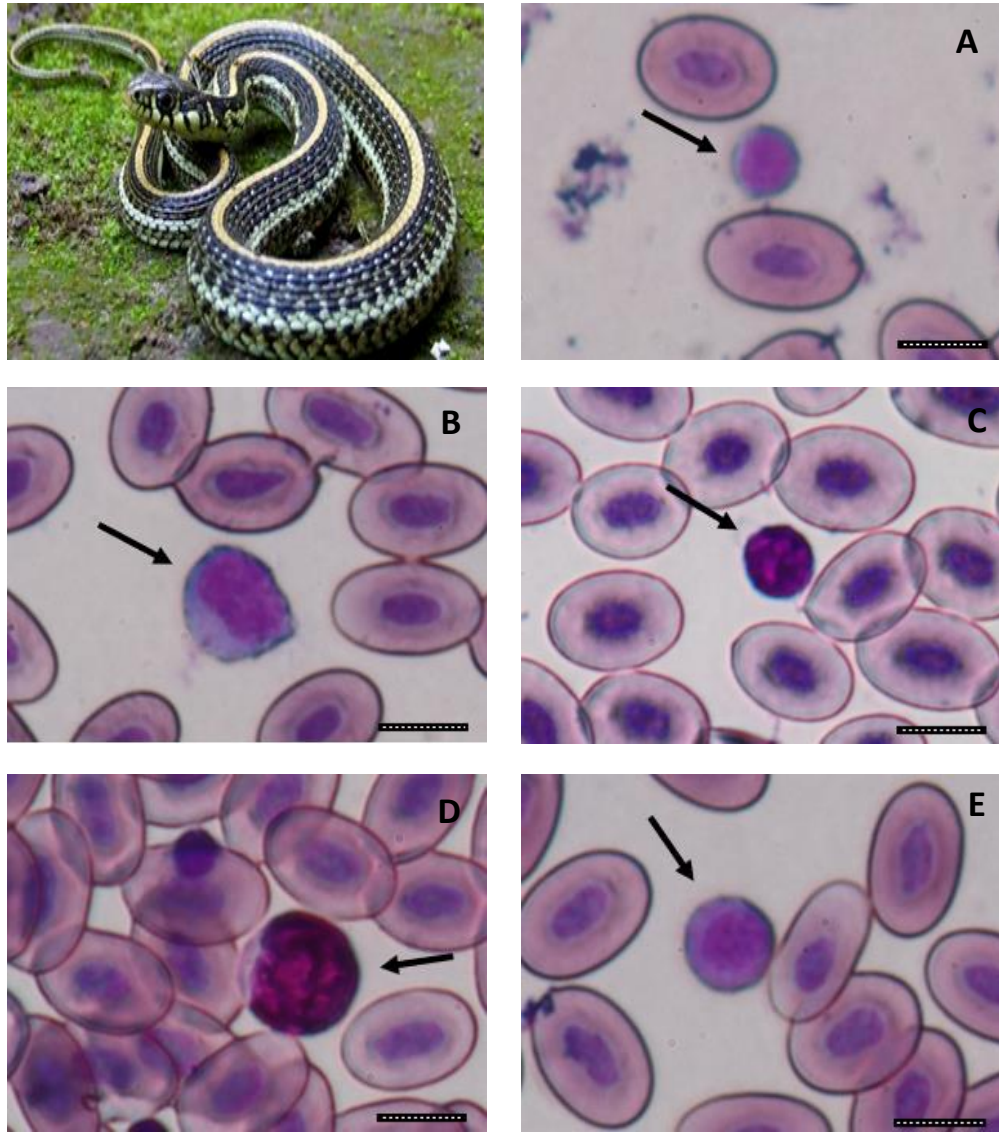


Figura 5. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

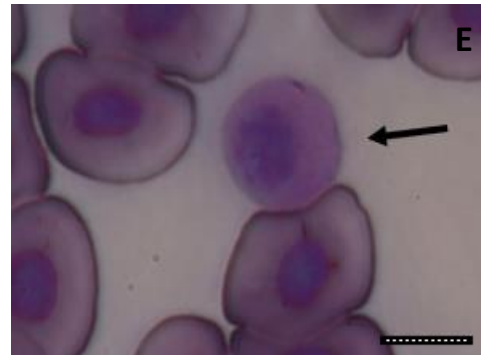
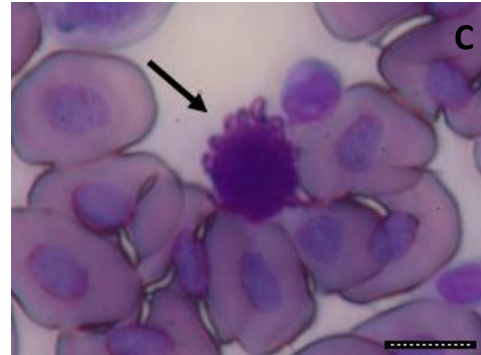
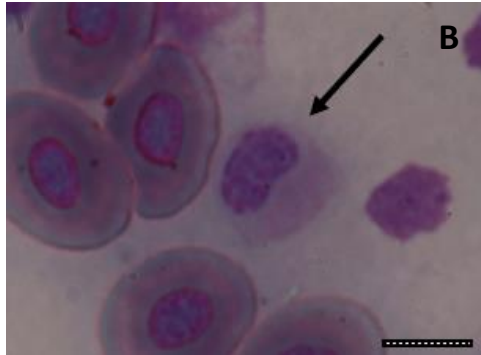
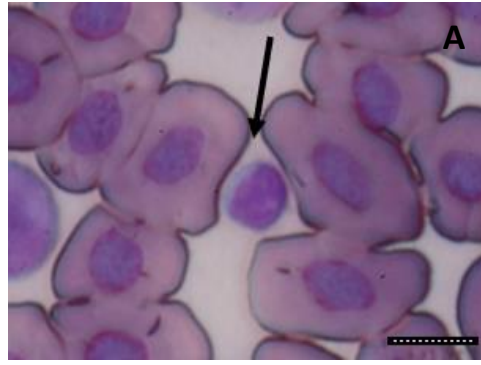


Figura 6. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Thamnophis melanogaster* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

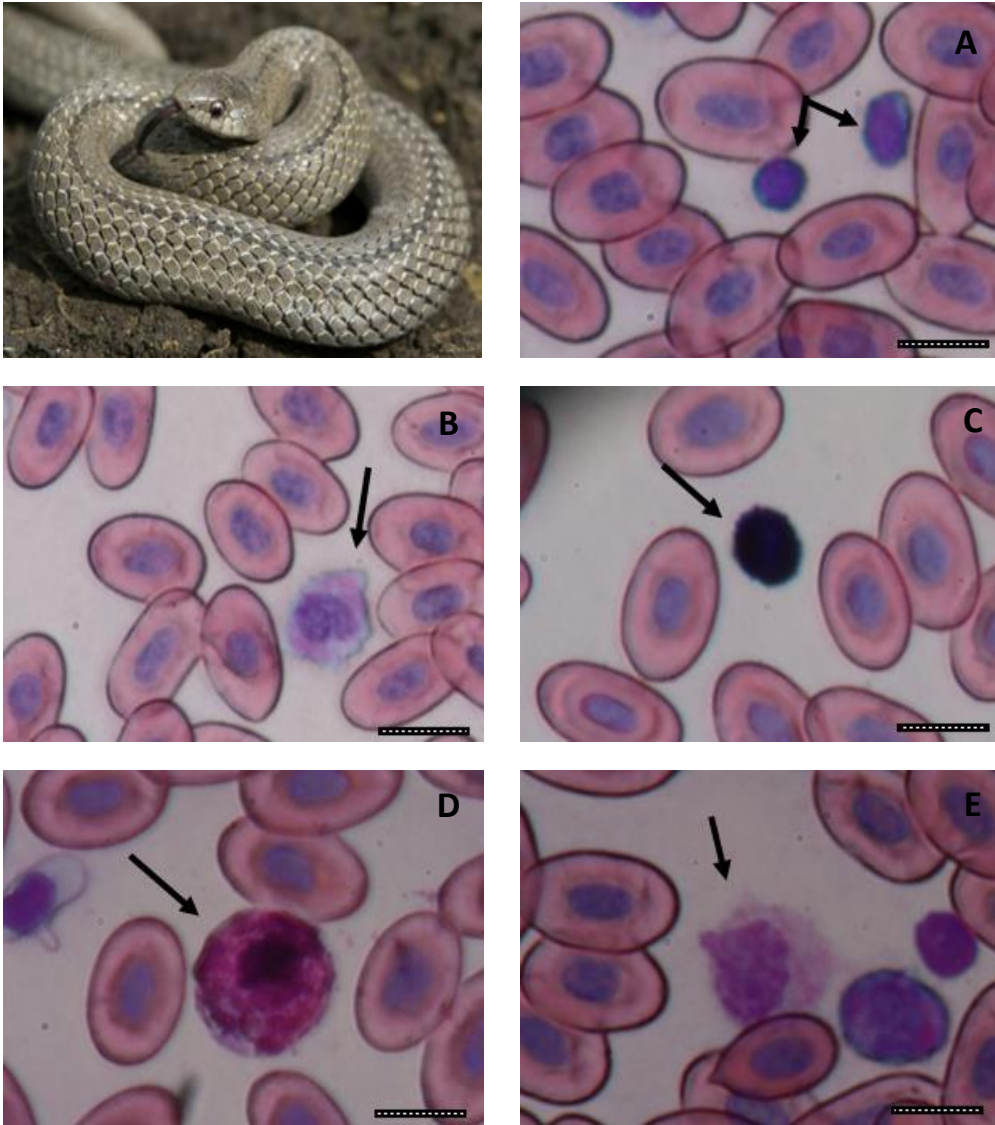


Figura 7. Fotomicrografías de los cinco tipos de leucocitos en *Conopsis lineata* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. La línea inferior corresponde a 10 micrómetros (μm). A) Linfocito, B) Monocito, C) Basófilo, D) Eosinófilo, E) Heterófilo.

Perfil leucocitario y proporciones H/L

Sceloporus grammicus

Las proporciones promedio para cada tipo de célula leucocitaria de adultos de *S. grammicus* de la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México, fueron las siguientes: 57.16% (± 9.58 DE) linfocitos, 9.46% (± 4.27 DE) monocitos, 10.61% (± 7.41 DE) heterófilos, 7.26% (± 5.52 DE) eosinófilos y 15.49% (± 6.24 DE) basófilos. La proporción H/L promedio para esta población fue de 0.20 (± 0.16 DE). No se encontraron diferencias estadísticas en las abundancias leucocitarias entre sexos de la especie (Cuadro 2). Así mismo, no encontramos correlación entre las abundancias de las células leucocitarias y la talla o el peso de los individuos recolectados (Cuadro 3). Encontramos diferencias significativas en el análisis estacional de linfocitos y heterófilos entre las temporadas de primavera y verano (linfocitos: ± 0.039 DE, $P = 0.013$; heterófilos: ± 0.041 DE, $P < 0.001$) y las temporadas de primavera y otoño (linfocitos: ± 0.034 DE), $P = 0.004$; heterófilos: ± 0.037 DE, $P < 0.001$), mientras que la comparación de primavera con invierno no mostró diferencias significativas entre estas estaciones. De acuerdo con las diferencias observadas en los heterófilos y linfocitos, la proporción H/L también presentó diferencias significativas entre las estaciones de primavera - verano (± 0.067 DE, $P < 0.001$), y primavera - otoño (± 0.060 DE, $P < 0.001$).

Cuadro 2. Comparaciones de las abundancias de las diferentes células leucocitarias entre sexos de *Sceloporus grammicus* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

		Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos
M	$\bar{x} \pm \text{DE}$	0.87 \pm 0.09	0.28 \pm 0.06	0.30 \pm 0.10	0.25 \pm 0.09	0.39 \pm 0.09
H	$\bar{x} \pm \text{DE}$	0.83 \pm 0.10	0.32 \pm 0.08	0.32 \pm 0.14	0.25 \pm 0.12	0.39 \pm 0.08
	t	-1.635	1.953	0.629	0.024	-0.262
	P	0.108	0.057	0.532	0.980	0.794

Cuadro 3. Correlaciones de cada tipo de leucocito con la talla y el peso de *Sceloporus grammicus* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

		Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos	H/L
LHC	Pearson	-0.112	0.015	0.099	0.001	0.033	0.092
	n	47	47	47	47	47	47
	P	0.452	0.917	0.506	0.993	0.824	0.535
peso	Pearson	-0.197	0.148	0.212	0.072	-0.143	0.218
	n	47	47	47	47	47	47
	P	0.184	0.317	0.152	0.627	0.336	0.140

El cálculo de las abundancias mensuales de cada célula leucocitaria permitió determinar que existe una disminución en las proporciones de linfocitos al inicio de la temporada de invierno, esta disminución en el recuento de linfocitos continúa y se observa su menor abundancia durante la temporada de primavera. Posteriormente vimos un aumento en las abundancias de los linfocitos durante la temporada de verano el cual continúa hasta el otoño. Durante los mismos meses los heterófilos presentan un aumento en sus proporciones (Fig. 8). Los valores más altos para la proporción H/L también se observaron durante las temporadas de invierno y primavera.

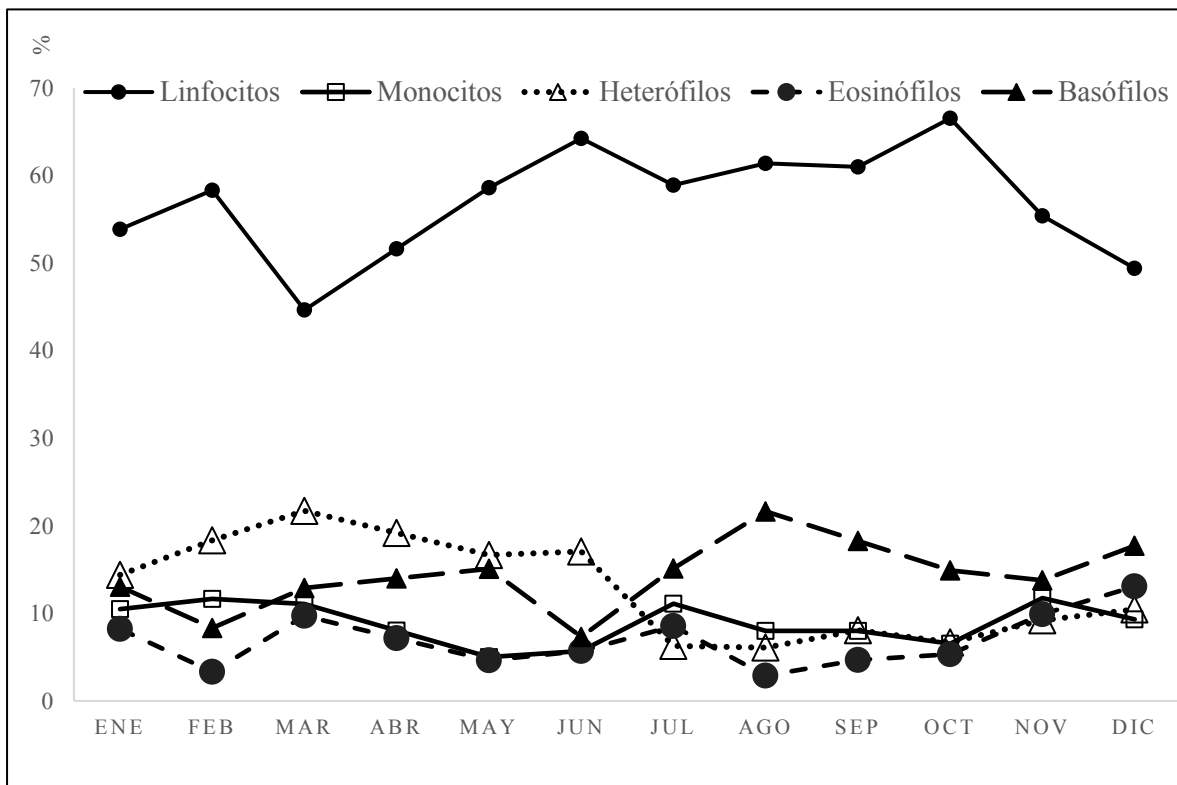


Figura 8. Variación observada en los leucocitos durante un periodo de observación de un año en *Sceloporus grammicus* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Barisia imbricata

Se calcularon las proporciones promedio para cada tipo de célula leucocitaria en adultos de *B. imbricata* de la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México. Las proporciones observadas fueron las siguientes: 42.05% (± 12.8 DE) linfocitos, 8.23% (± 4.20 DE) monocitos, 27.65% (± 14.12 DE) heterófilos, 9.49% (± 5.09 DE) eosinófilos y 12.85% (± 4.84 DE) basófilos. La proporción H/L promedio para esta población fue de 0.81 (± 0.66 DE). No encontramos diferencias estadísticas en las abundancias de los leucocitos entre sexos (Cuadro 4). No se observó correlación entre las abundancias celulares y la talla o el peso de los organismos de esta especie (Cuadro 5). Se observó la existencia de diferencias significativas en el análisis estacional de los monocitos entre las temporadas de primavera y verano (± 0.123 DE, $P = 0.008$), no se encontraron diferencias significativas para el resto de los leucocitos en ninguna estación.

Cuadro 4. Comparaciones de las abundancias de las diferentes células leucocitarias entre sexos de *Barisia imbricata* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

		Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos
M	$\bar{x} \pm DE$	0.69 \pm 0.12	0.28 \pm 0.07	0.54 \pm 0.16	0.33 \pm 0.09	0.36 \pm 0.07
H	$\bar{x} \pm DE$	0.66 \pm 0.14	0.26 \pm 0.07	0.61 \pm 0.21	0.29 \pm 0.10	0.34 \pm 0.05
	t	-0.657	-0.622	1.061	-1.163	-0.600
	P	0.515	0.538	0.296	0.252	0.552

Cuadro 5. Correlaciones de cada tipo de leucocito con la talla y el peso de *Barisia imbricata* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

		Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos	H/L
LHC	Pearson	-0.224	-0.499	0.272	0.148	0.021	0.256
	n	30	30	30	30	30	30
	P	0.195	0.082	0.145	0.395	0.913	0.171
Peso	Pearson	-0.216	-0.427	0.267	0.123	0.054	0.216
	n	30	30	30	30	30	30
	P	0.212	0.279	0.120	0.481	0.756	0.211

El conteo diferencial de los leucocitos en *B. imbricata* permitió observar una importante disminución en la abundancia de linfocitos que inicia a finales del mes de junio (mes en el que los linfocitos muestran su mayor abundancia) y que continua hasta el mes de diciembre, siendo durante el invierno cuando se observan los conteos más bajos en la abundancia de linfocitos. A partir del mes de junio también se observa gradualmente un claro incremento en la abundancia de los heterófilos que llegan a sus mayores abundancias durante la temporada invernal, superando las abundancias de los linfocitos en el mes de diciembre (Fig. 9). No se encontraron diferencias en la proporción H/L entre las estaciones. Los valores más altos de la proporción H/L en *B. imbricata* se observaron durante la temporada invernal, destacando el mes de diciembre, en donde la abundancia de heterófilos fue mayor que la abundancia de linfocitos en la población estudiada.

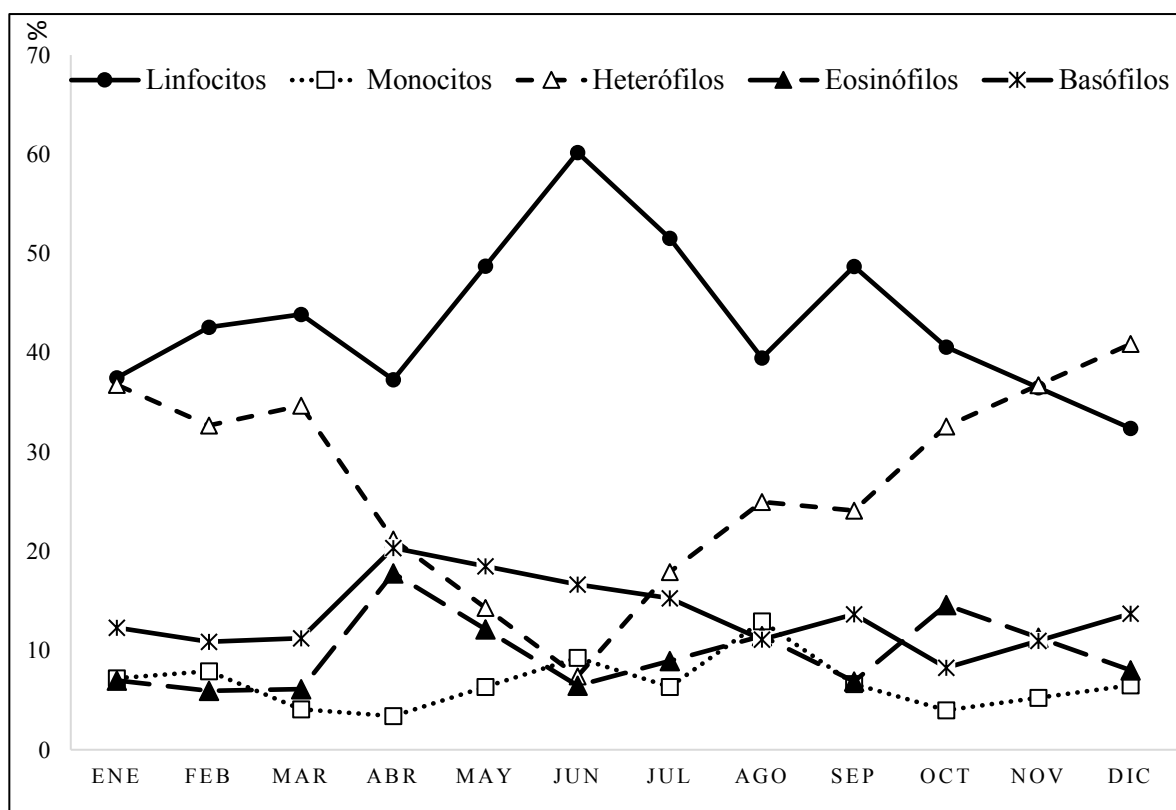


Figura 9. Variación observada en los leucocitos durante un periodo de observación de un año en *Barisia imbricata* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Conopsis lineata

Debido al reducido número de individuos de la especie que pudieron ser avistados y capturados en el sitio de estudio, no se realizaron comparaciones entre sexos, ni análisis de variación estacional de abundancias leucocitarias. Sin embargo, con las muestras sanguíneas que pudimos obtener, fue posible determinar el perfil leucocitario y la proporción H/L de la población estudiada. Las proporciones promedio para cada tipo de célula leucocitaria de adultos de *C. lineata* de la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México, fueron las siguientes: 49.23% (± 14.96 DE) linfocitos, 5.32% (± 1.33 DE) monocitos, 21.88% (± 16.15 DE) heterófilos, 10.06% (± 5.51 DE) eosinófilos y 13.49% (± 5.90 DE) basófilos. La proporción H/L promedio para esta población fue de 0.56 (± 0.50 DE).

Thamnophis scalaris

Las proporciones promedio para cada tipo de célula leucocitaria en adultos de *T. scalaris* de la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México, fueron las siguientes: 47.32% (± 10.62 DE) linfocitos, 7.45% (± 4.49 DE) monocitos, 19.58% (± 12.45 DE) heterófilos, 12.41% (± 6.06 DE) eosinófilos y 13.21% (± 10.37 DE) basófilos. La proporción H/L promedio para esta población fue de 0.46 (± 0.40 DE). Se encontraron diferencias significativas en las abundancias celulares de: monocitos, heterófilos, basófilos y la proporción H/L entre sexos de *T. scalaris* (Cuadro 6). Las abundancias de monocitos y basófilos fueron mayores en las hembras de *T. scalaris*, mientras que la abundancia de heterófilos y los valores de la proporción H/L fueron mayores en los machos de esta especie. No se encontró correlación del peso y la talla de los organismos con ninguno de los grupos celulares estudiados (Cuadro 7).

Cuadro 6. Comparaciones de las abundancias de las diferentes células leucocitarias entre sexos de *Thamnophis scalaris* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

		Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos	H/L
M	$\bar{x} \pm DE$	0.74 \pm 0.11	0.23 \pm 0.05	0.52 \pm 0.17	0.35 \pm 0.09	0.30 \pm 0.11	0.07 \pm 0.03
H	$\bar{x} \pm DE$	0.77 \pm 0.10	0.29 \pm 0.09	0.36 \pm 0.12	0.35 \pm 0.08	0.39 \pm 0.14	0.05 \pm 0.01
	t	0.816	2.292	-3.318	-0.018	2.140	-3.136
	P	0.419	0.027	0.001	0.985	0.038	0.003

Cuadro 7. Correlaciones de cada tipo de leucocito con la talla y el peso de *Thamnophis scalaris* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

		Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos	H/L
LHC	Pearson	-0.119	-0.158	0.212	0.088	-0.176	0.191
	n	41	41	41	41	41	41
	P	0.456	0.321	0.182	0.582	0.268	0.229
Peso	Pearson	-0.104	-0.145	0.291	0.139	-0.277	0.25
	n	41	41	41	41	41	41
	P	0.513	0.363	0.064	0.383	0.079	0.113

Se pudo observar la disminución de las abundancias de linfocitos en *T. scalaris* en tres periodos distintos durante el año. El primero es un descenso gradual y moderado entre los meses de febrero y abril. Posteriormente se pueden observar descensos abruptos entre los meses de julio y agosto, y noviembre y diciembre. También se pudo observar un descenso de las abundancias de los heterófilos que inicia desde enero y continúan descendiendo gradualmente las abundancias de estas células hasta el mes de junio, mes en el cual inicia un incremento gradual hasta llegar a sus máximas abundancias en diciembre (Fig. 10) Los valores más elevados de la proporción H/L en esta población de *T. scalaris* se detectaron durante la estación de invierno.

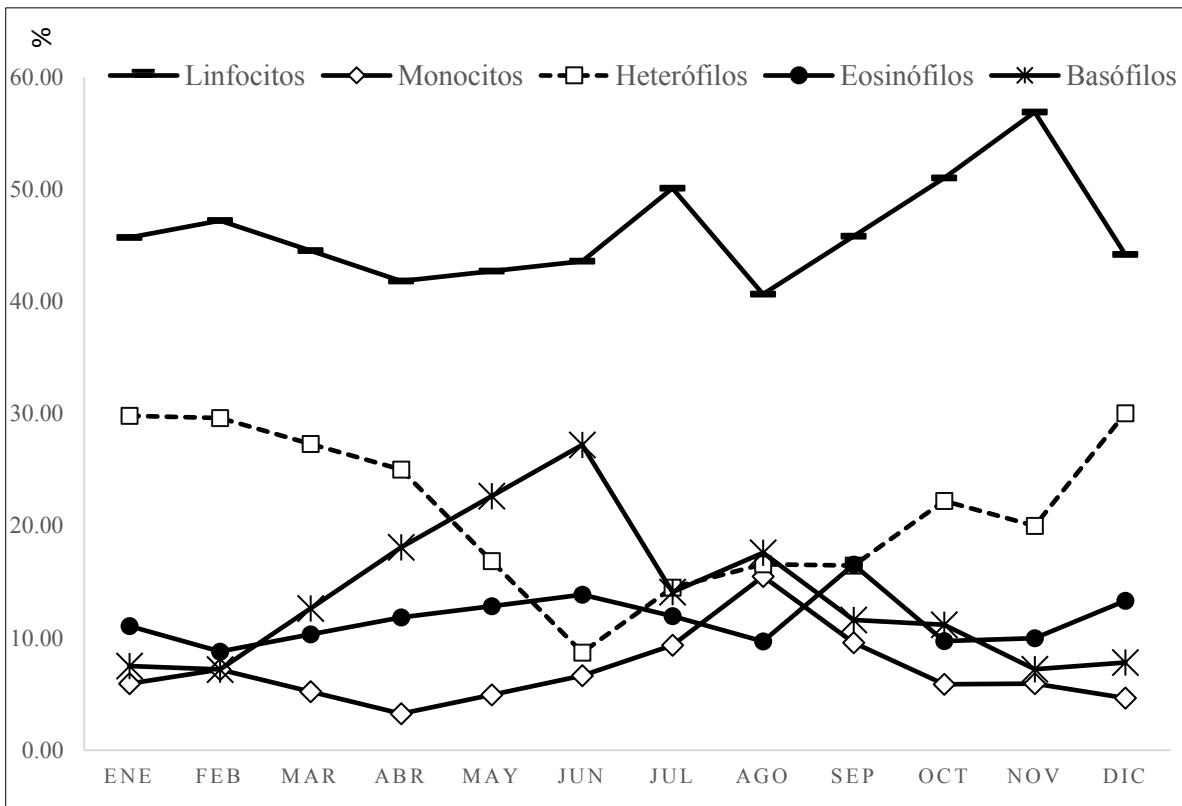


Figura 10. Variación observada en los leucocitos durante un periodo de observación de un año en *Thamnophis scalaris* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Thamnophis eques

Las proporciones promedio para cada tipo de célula leucocitaria en adultos de *T. scalaris* de la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México, fueron las siguientes: 42.5% (± 9.92 DE) linfocitos, 10.22% (± 7.48 DE) monocitos, 17.06% (± 9.29 DE) heterófilos, 12.72% (± 4.06 DE) eosinófilos y 17.25% (± 12.41 DE) basófilos. La proporción H/L promedio para esta población fue de 0.43 (± 0.33 DE). No se encontraron diferencias significativas en las abundancias de las células leucocitarias de machos y hembras de esta serpiente (Cuadro 8). Se encontró la existencia de una correlación positiva entre el peso y la abundancia de linfocitos y una correlación negativa entre el peso y la abundancia de basófilos en la especie (Cuadro 9). Se observó que los organismos más pesados presentaban una mayor abundancia de linfocitos (Fig. 11) y los organismos de menor peso presentaban menores

abundancias de basófilos (Fig. 12). No se observaron correlaciones entre la talla y las abundancias de ninguna célula leucocitaria.

Cuadro 8. Comparaciones de las abundancias de las diferentes células leucocitarias entre sexos de *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

		Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos
M	$\bar{x} \pm DE$	0.70 \pm 0.11	0.23 \pm 0.07	0.35 \pm 0.18	0.38 \pm 0.05	0.48 \pm 0.21
H	$\bar{x} \pm DE$	0.71 \pm 0.10	0.33 \pm 0.11	0.41 \pm 0.128	0.35 \pm 0.06	0.38 \pm 0.12
	t	0.171	1.857	-0.885	-0.914	-1.294
	P	0.865	0.079	0.387	0.372	0.211

Cuadro 9. Correlaciones de cada tipo de leucocito con la talla y el peso de *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

		Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos	H/L
LHC	Pearson	-0.119	-0.272	-0.275	0.008	0.343	-0.263
	n	20	20	20	20	20	20
	P	0.614	0.245	0.239	0.970	0.138	0.261
Peso	Pearson	0.593	0.042	0.175	-0.021	-0.518	-0.007
	n	20	20	20	20	20	20
	P	0.005	0.859	0.458	0.928	0.019	0.973

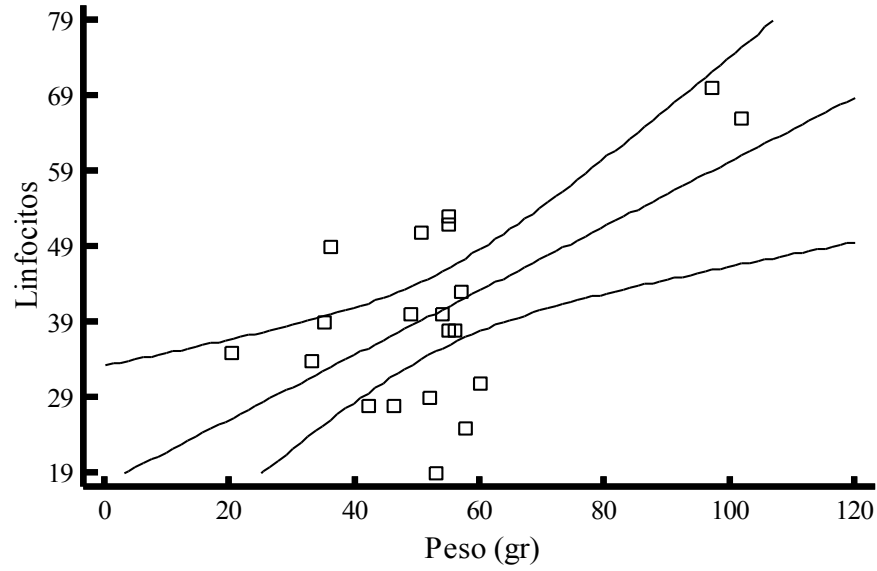


Figura 11. Gráfica del modelo ajustado de la regresión lineal entre el peso y la abundancia de linfocitos de la especie *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

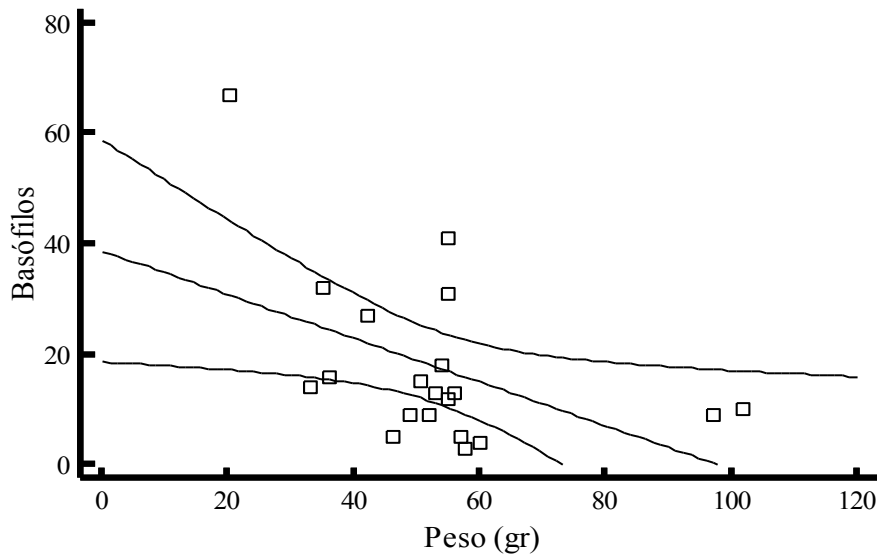


Figura 12. Gráfica del modelo ajustado de la regresión lineal entre el peso y la abundancia de basófilos de la especie *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

El seguimiento anual de las abundancias celulares de *T. eques*, permitió observar 3 periodos de mayor estrés en esta serpiente. El primer periodo se presenta al principio de marzo hasta el mes de junio, periodo en el cual se puede observar un incremento gradual en las abundancias de heterófilos y un descenso en el conteo de linfocitos, presentando estos últimos sus abundancias más bajas en el mes de junio. El segundo periodo comprende los meses de agosto y septiembre. El último periodo se observa a partir del mes octubre y se acentúa la disminución de linfocitos y el incremento de heterófilos en el mes de diciembre (Fig. 13).

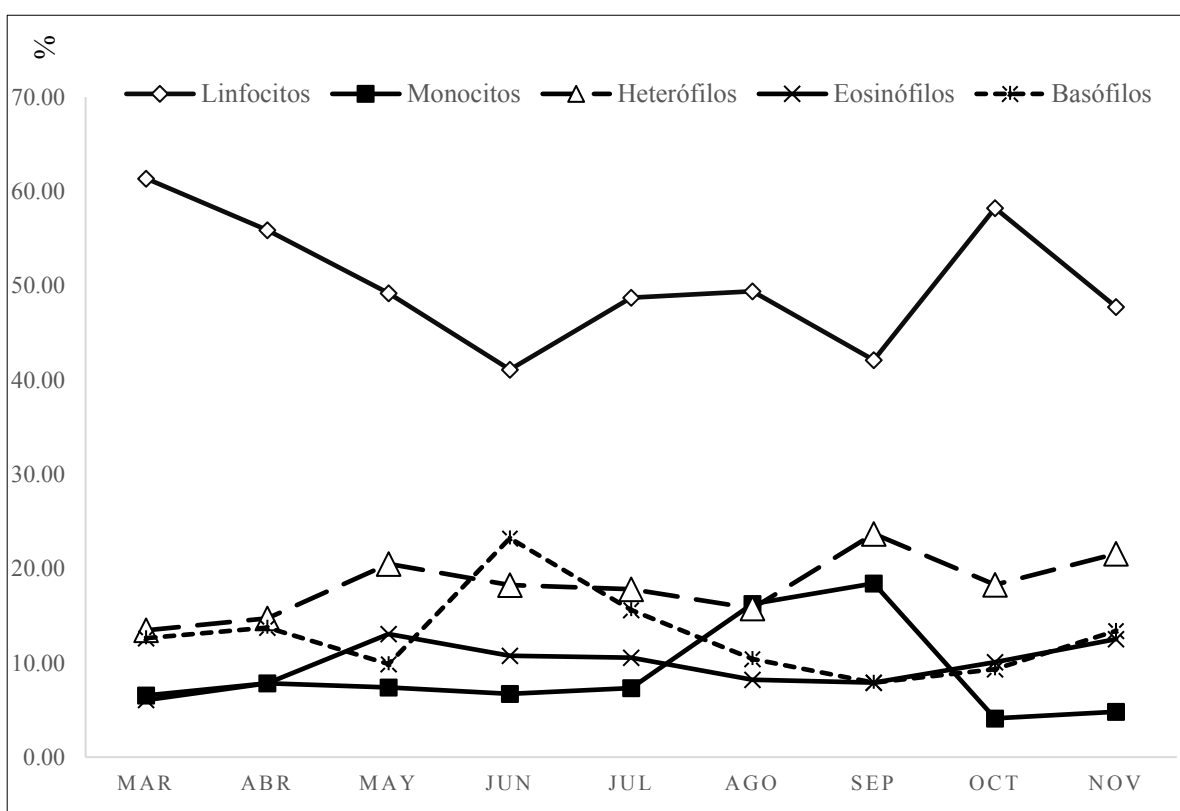


Figura 13. Variación observada en los leucocitos durante un periodo de observación de un año en *Thamnophis eques* en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

Thamnophis melanogaster

Se observó una abundancia baja de individuos de esta especie en el sitio de estudio. Debido a esto, no se realizaron comparaciones entre sexos, ni análisis de variación estacional de abundancias leucocitarias. Mediante la determinación del perfil leucocitario y la proporción H/L de la población estudiada, las proporciones promedio para cada tipo de célula leucocitaria de adultos de *T. melanogaster* de la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México, fueron las siguientes: 36.98% (± 10.69 DE) linfocitos, 6.99% (± 7.21 DE) monocitos, 26.02% (± 8.83 DE) heterófilos, 10.54% (± 3.97 DE) eosinófilos y 19.46% (± 7.07 DE) basófilos. La proporción H/L promedio para esta población fue de 0.82 (± 0.54 DE).

Análisis Multivariado

Debido al número de capturas logradas durante las cuatro estaciones anuales únicamente se utilizaron los datos de dos especies de lacertilios (*S. grammicus* y *B. imbricata*) y dos especies de serpientes (*T. eques* y *T. scalaris*) para el análisis multivariado. Mediante el análisis de los datos por medio del Non-Metric Multidimensional Scaling, se observaron las diferencias en el agrupamiento de los valores de las proporciones leucocitarias entre las especies analizadas. De acuerdo con la dirección y longitud de los vectores que representan la temperatura ambiental y la precipitación, podemos observar que tienen un efecto en el aumento de las abundancias de heterófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos, pero no tiene efecto en el aumento de los linfocitos en las especies analizadas (Fig. 14). En el eje x (NMMDS 1), se observa que los linfocitos y los heterófilos tienen peso en direcciones opuestas, lo cual permite observar los datos pertenecientes a la especie *B. imbricata* agrupados en dirección opuesta a los datos de las especies *S. grammicus* y *T. eques*, lo cual coincide con los valores de las proporciones H/L que indican estrés en las especies, en donde *B. imbricata* mostró ser una de las especies con mayores niveles de estrés, mientras que *S. grammicus* fue la especie con menores valores de proporciones H/L

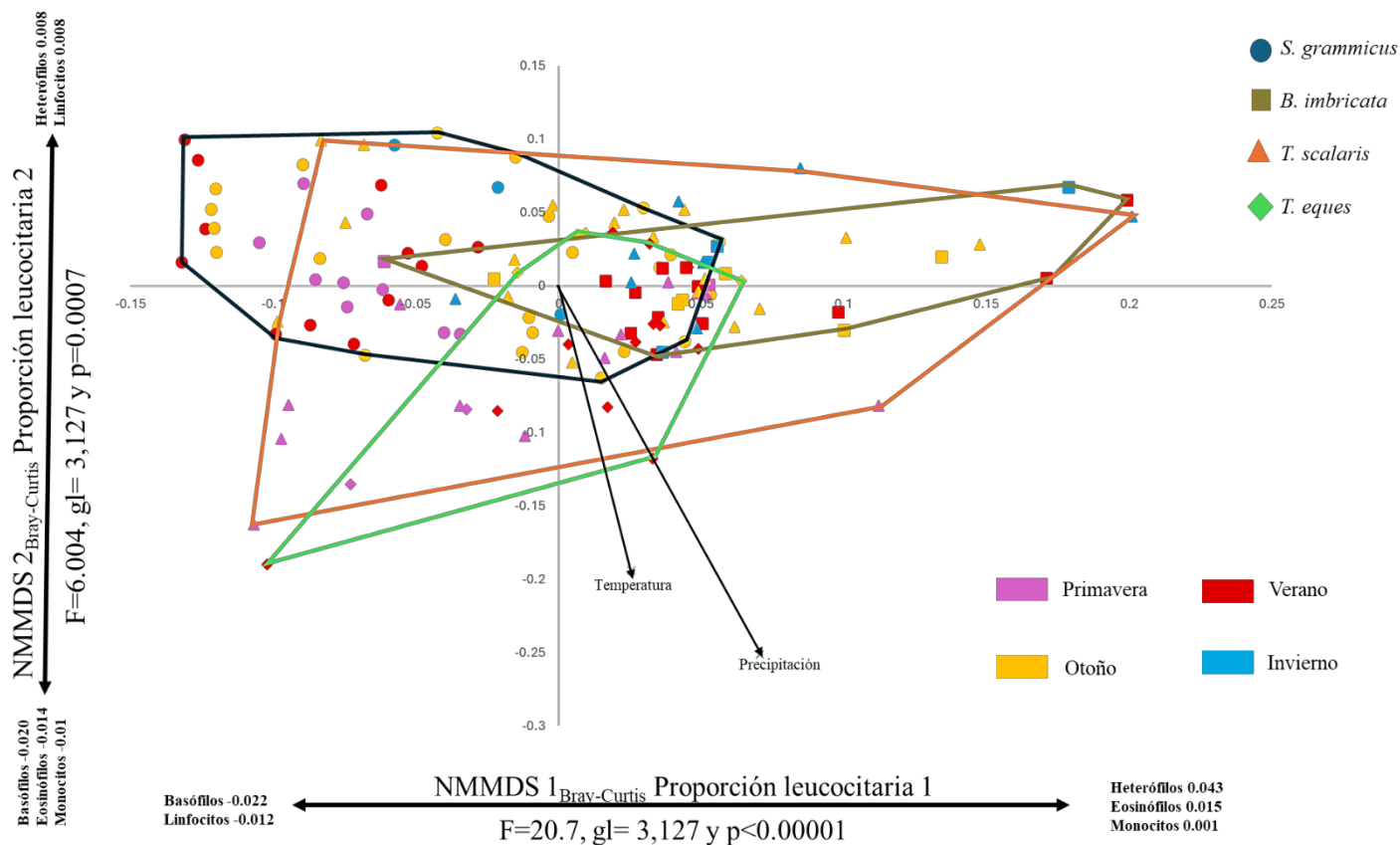


Figura 14. Análisis de Non-metric Multi Dimensional Scaling utilizando las abundancias de las células leucocitarias, así como los datos de temperatura media mensual y la precipitación media mensual en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México.

DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que en todas las especies que conforman la comunidad de saurópsidos no aves del sitio de estudio, la célula más abundante de entre todos los leucocitos, son los linfocitos. La abundancia de linfocitos representó en todos los casos alrededor del 50% del perfil leucocitario (Cuadro 10). Esto coincide con lo observado en otros estudios con saurópsidos no aves, en donde se determinó que los linfocitos eran la célula de mayor abundancia (Davis et al., 2011; Motz et al., 2014). Los heterófilos fueron la segunda célula con mayor abundancia en la mayoría de las especies de la comunidad estudiada, a excepción de la lagartija *S. grammicus* y la serpiente *T. eques*, ya que en estas

especies los basófilos correspondieron a la segunda célula con mayor abundancia (Cuadro 10). Los eosinófilos y monocitos fueron las células con menores abundancias en todas las especies estudiadas. Los eosinófilos se han asociado con la presencia de parásitos en los organismos (Zimmerman et al., 2010; Stacy et al., 2011; Arikan y Çiçek, 2014). Aunque en este estudio no se analizó la presencia de hemoparásitos, las bajas abundancias de eosinófilos, así como la ausencia de signos que pudieran evidenciar alguna infección en leucocitos o eritrocitos sugerirían la ausencia de hemoparásitos. Sin embargo, no se pueden descartar otros tipos de parásitos en la población únicamente mediante estos análisis, por esta razón, se sugiere realizar estudios específicos que evalúen la posibilidad de infecciones parasitarias en las poblaciones de saurópsidos no aves presentes en el sitio de estudio.

La abundancia de heterófilos y linfocitos observada en las poblaciones estudiadas, así como las proporciones H/L, reflejan distintos niveles de estrés fisiológico en las especies que componen la comunidad de saurópsidos no aves de la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas (Cuadro 10). Considerando que, para el cálculo de la proporción H/L, valores cercanos o superiores a 1 reflejan un nivel considerable de estrés en anfibios y saurópsidos no aves (Davis et al., 2011; Davis y Maerz, 2011). La proporción H/L indica un bajo nivel de estrés fisiológico en la población de *S. grammicus*, durante la mayor parte del año, sin embargo, se observan niveles moderados de estrés durante la primavera y el invierno. En estudios de perfil leucocitario previamente realizados en el género *Sceloporus*, Wozniak et al. (1996) observaron mayores proporciones de heterófilos y un menor recuento de linfocitos. Sin embargo, en esos estudios realizados en *S. undulatus* y *S. poinsettii*, se tomaron muestras de sangre repetidamente en intervalos semanales. Los episodios repetidos de estrés pueden provocar cambios en las proporciones de glóbulos blancos en los individuos (Davis et al., 2008), lo que explicaría el alto valor registrado para las proporciones H/L en dichas especies. El bajo nivel de estrés fisiológico observado durante este estudio en *S. grammicus* concuerda con observaciones previas realizadas para esta especie, las cuales indican que presenta una gran diversidad de estrategias para adaptarse a cambios en su hábitat, lo que permite que sus poblaciones se distribuyan en una amplia variedad de ecosistemas, considerándolo como un organismo generalista con una amplia distribución

latitudinal y altitudinal, incluyendo ambientes altamente antropizados (Díaz de la Vega-Pérez et al., 2019). Además, de acuerdo con la clasificación del Environmental Vulnerability Score (EVS) de Wilson et al., 2013, *S. grammicus* muestra una baja vulnerabilidad a la degradación ambiental, debido a aspectos como: intervalo de distribución (la especie tiene una amplia distribución), distribución ecológica (la especie puede habitar una amplia variedad de vegetación dentro de su distribución) y persecución humana (generalmente ignorada por los humanos). Adicionalmente, en un trabajo previo que determinó la asimetría fluctuante mediante morfometría geométrica en la misma comunidad de saurópsidos no aves aquí estudiada, se concluyó que *S. grammicus* no presentaba asimetría fluctuante en la forma de la cabeza, por lo que presentaba una mayor tolerancia al estrés ambiental que la observada en otras especies que habitan el sitio de estudio (Gómez-Benitez, 2023).

El aumento en los niveles de estrés fisiológico durante los meses correspondientes a las temporadas de invierno y primavera observados en la población estudiada de *S. grammicus*, coincide con el descenso de las temperaturas en el sitio de estudio, y con el período de nacimiento de crías de *S. grammicus*, que ocurre en primavera (marzo) (Sánchez-Manjarrez, obs. pers.). Los nacimientos de crías durante los meses de marzo y abril han sido ampliamente observados en diversas poblaciones de *S. grammicus* (Hernández-Salinas et al., 2010). El aumento de los niveles de estrés reflejado durante estas estaciones puede explicarse por los costos energéticos derivados del cortejo y los partos en primavera y las bajas temperaturas y escasez de alimentos que pueden ocurrir en la temporada invernal.

En contraste con lo observado en *S. grammicus*, los valores de la proporción H/L en *Nive* si mostraron niveles importantes de estrés fisiológico. Los niveles más altos de estrés en la especie se observaron durante el otoño y el invierno, observándose durante esta última estación un incremento en la abundancia de heterófilos que superaba en abundancia a los linfocitos de la especie. Esta tendencia en las abundancias de heterófilos y linfocitos es característica de periodos agudos de estrés (Davis et al., 2011). Además, durante el resto del año, los valores de la proporción H/L se mantienen considerablemente más altos que los observados en otras especies de la misma comunidad. Los datos obtenidos nos permiten determinar que *B. imbricata* presenta indicadores fisiológicos que

sugieren niveles importantes de estrés principalmente durante los meses que constituyen las temporadas de otoño e invierno (noviembre a febrero). Se sabe que el periodo de ovulación en las hembras de *B. imbricata* sucede durante los meses de noviembre y diciembre y los nacimientos de las crías suceden durante mayo y junio (Martinez-Torres et al., 2006). Por lo tanto, la tendencia observada en *B. imbricata* podría estar asociada a los costos energéticos directamente ligados a las bajas temperaturas y escasez de alimentos propios de la temporada invernal, aunado a la temporada de preñez para la especie.

La serpiente críptica y de pequeño tamaño *C. lineata*, presentó una baja abundancia en el sitio de estudio, y no existieron avistamientos de la especie durante todo el año. El cálculo de las proporciones celulares, así como la proporción H/L para la especie permitió determinar niveles moderados de estrés muy similares a los observados en otras serpientes que conforman la comunidad de saurópsidos no aves de El Cerrillo, Piedras Blancas.

En *T. scalaris* y *T. eques* se observaron tendencias similares en las fluctuaciones de las abundancias leucocitarias, con un aumento gradual en los valores de la proporción H/L desde finales de otoño hasta el invierno, iniciando este aumento gradual en noviembre en el caso de *T. scalaris* y durante octubre en *T. eques*. Sin embargo, los valores promedio anuales de la proporción H/L indicarían niveles moderados de estrés para ambas especies durante la mayor parte del año, sin observarse episodios agudos de estrés en ninguna temporada del año. En el caso de *T. eques* se puede observar, además, un ligero incremento de los niveles de estrés en un periodo que comprende los meses de mayo, junio y julio. Este periodo coincide con el periodo post-apareamiento y el inicio de la formación y desarrollo de embriones registrado en la especie (Goldberg et al., 2004).

El perfil leucocitario de *T. melanogaster* y las proporciones H/L calculadas para la especie sugieren niveles altos de estrés similares a los observados en la lagartija *B. imbricata*, siendo las 2 especies con niveles altos de estrés en el sitio de estudio. *T. melanogaster* es una especie poco abundante en el sitio de estudio, esto es de gran importancia debido a su dependencia de los cuerpos de agua, ya que, como ha sido descrito con anterioridad, *T. melanogaster* es una serpiente especialista (Rossman et al., 1996), que se alimenta principalmente de peces, caracoles, renacuajos y sanguijuelas dentro de cuerpos de agua. Además, se ha

descrito que se refugia en tierra firme en los alrededores de los cuerpos de agua en los que caza (Drummond, 1983). Las características de esta especie hacen que las temporadas invernales, así como las temporadas de estiaje y sequía puedan representar temporadas especialmente desafiantes para estos organismos y que la desaparición, disminución o contaminación de los cuerpos de agua en el sitio de estudio provoquen la disminución de la abundancia de esta especie. Desafortunadamente la abundancia baja de esta especie en el sitio de estudio no permitió la captura de individuos durante todos los meses. Por lo que fue imposible determinar las temporadas en donde la especie presentaba los valores más altos de estrés. Así mismo, se observó una marcada disminución de los avistamientos de esta especie durante la temporada invernal. La baja abundancia de estos organismos en el sitio de estudio podría sugerir una disminución de la presencia de esta especie en el sitio de acuerdo con observaciones realizadas en el pasado. Por lo anterior se sugiere enfocar estudios al monitoreo de la población en la actualidad.

Cuadro 10. Perfiles leucocitarios y proporciones heterófilos/linfocitos de las especies estudiadas en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México. Los valores de las abundancias que cada tipo de célula están dados en porcentajes (%).

Sp.	Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos	H/L
<i>S. grammicus</i>	57.16	9.46	10.61	7.26	15.49	0.20
<i>B. imbricata</i>	42.05	8.23	27.65	9.49	12.85	0.81
<i>C. lineata</i>	49.23	5.32	21.88	10.06	13.49	0.56
<i>T. scalaris</i>	47.32	7.45	19.58	12.41	13.21	0.46
<i>T. eques</i>	42.50	10.22	17.06	12.72	17.25	0.43
<i>T. melanogaster</i>	36.98	6.99	26.02	10.54	19.46	0.82

En la mayoría de las especies de escamados estudiadas se observó un valor moderado para la proporción H/L, sin embargo, la prevalencia de estos valores en las proporciones leucocitarias a lo largo del año indicaría un proceso de estrés crónico en las poblaciones. Algunos estudios describen los diferentes efectos que la antropización y las prácticas agrícolas pueden tener en las comunidades de reptiles, desde la fragmentación de la distribución de las especies (González-

Fernández et al., 2018), hasta el envenenamiento por pesticidas (Simbula et al., 2021). En el sitio de estudio se aplican agroquímicos en los campos de cultivo adyacentes a las áreas de muestreo (Franco-Martínez et al., 2015). Durante el estudio pudimos observar episodios de persecución humana a varias especies de escamados de la zona por la creencia de que se tratan de especies venenosas, así como múltiples observaciones de organismos muertos dentro de los canales de concreto contruidos para riego de zonas de cultivo. Sugerimos la realización de estudios que permitan estimar los posibles efectos fisiológicos sobre las comunidades de reptiles derivados de las prácticas agrícolas y la transformación de áreas con fines agrícolas en el sitio de estudio.

En este estudio se pudo definir el perfil leucocitario en diferentes especies de saurópsidos no aves y la variabilidad en la proporción celular a lo largo del ciclo estacional anual. De acuerdo con la información obtenida durante este estudio, concluimos que es de gran importancia considerar las variaciones producidas en las proporciones de células leucocitarias por aspectos ambientales y ciclos reproductivos en especies de escamados. Especialmente en estudios que buscan conocer los valores basales de las proporciones celulares. Las estaciones especialmente desafiantes para los organismos ectotermos, como el invierno y los períodos reproductivos, producen marcadas variaciones en las proporciones de leucocitos (Zimmerman et al., 2010; Stacy et al., 2011), como se evidencia en los resultados obtenidos en este estudio. Esto es especialmente importante cuando se diseñan estudios y experimentos que buscan utilizar los valores del perfil leucocitario para determinar si una población está sometida a estrés fisiológico. Asimismo, se deben considerar las características específicas de cada especie, como el tipo de reproducción (vivípara u ovípara), así como los meses en los que se produce el apareamiento y el nacimiento de las crías, debido al estrés fisiológico que estos últimos ejercen de forma diferencial en los sexos de las especies.

La mayoría de los estudios que analizan los perfiles leucocitarios de saurópsidos no aves se han realizado durante un momento específico en el tiempo (e.g., Troiano et al., 1997; Mestre et al., 2017; Boers et al., 2019) o durante un breve lapso temporal, (e.g., Davis et al., 2011; Motz et al., 2014) lo que puede llevar a una subestimación de los valores y no necesariamente obtener información sobre la causalidad de las proporciones en los recuentos de leucocitos. Como

informamos en este estudio, se observan variaciones importantes en el perfil de leucocitos a lo largo del año, y es importante tener en cuenta la estacionalidad al evaluar los valores basales de leucocitos. Además, los estudios realizados en especímenes en cautiverio (e.g., Troiano et al., 1997; Bonadiman et al., 2010; Mestre et al., 2017) generalmente representan un desafío en la interpretación de los datos obtenidos, debido a que las condiciones del cautiverio no necesariamente emulan el hábitat natural.

Nuestro estudio presenta los primeros datos de seguimiento anual de una comunidad de saurópsidos no aves. Los datos obtenidos son de gran importancia debido a que permiten analizar cambios en las proporciones celulares y tener en cuenta las fluctuaciones celulares típicas de los períodos reproductivos o los cambios estacionales en las poblaciones de saurópsidos no aves. Al comparar los perfiles leucocitarios de los diferentes sexos y evaluar las variaciones estacionales, pudimos obtener una comprensión clara de la respuesta de las especies a factores que promueven el estrés. Recomendamos que futuros estudios continúen monitoreando las poblaciones de saurópsidos no aves y utilicen métodos similares a los que se muestran aquí para cuantificar los efectos de las actividades antropogénicas en otras especies.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Lopezello, J., Rivas-Manzano, I.V., Aguilera-Gómez, L.I., González-Ledesma, M., 2016. Diversidad y estructura de un pastizal en El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México. *Rev. Mex. Biodivers.* 87:980-989.

Álvarez-Mendoza, F.J., Tamez-Cantú, E.M., Lazcano, D., Setser, K.W., Mociño-Deloya, E. 2011. Morfología de las células sanguíneas y perfil leucocitario de *Crotalus polystictus* (Cope 1865). *Ciencia UANL* 14:53–59.

Argaez, V., Solano-Zavaleta, I., Zúñiga-Vega, J.J. 2018. Another potential cost of tail autotomy: tail loss may result in high ectoparasite loads in *Sceloporus* lizards. *Amphib.-Reptil.* 39:191-202.

Arikan, H., Çiçek, K., 2010. Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish Herpetofauna. *Acta Herpetol.* 5(2):179-198.

Bennett, M.F. 1986. Stress and changes in the blood of newts, *Notophthalmus viridescens*, during early regeneration. *J. Comp. Physiol. A* 159: 823–826.

Bennett, M.F., Daigle, K.R. 1983. Temperature, stress and the distribution of leukocytes in red-spotted newts, *Notophthalmus viridescens*. *J. Comp. Physiol. A* 153:81–83.

Bennett, M.F., Gaudio, C.A., Johnson, A.O., Spisso, J.H. 1972. Changes in the blood of newts, *Notophthalmus viridescens*, following administration of hydrocortisone. *Comp. Physiol. A* 80:233–237.

Bennett, M.F., Harbottle, J.A. 1968. The effects of hydrocortisone on the blood of tadpoles and frogs, *Rana catesbeiana*. *Biol. Bull.* 135:92–95.

Bishop, C.R., Athens, J.W., Boggs, D.R., Warner, H.R., Cartwright, G., Wintrobe, M.M. 1968. Leukokinetic Studies 13. A non-steady-state kinetic evaluation of mechanism of cortisone-induced granulocytosis. *J. Clin. Invest.* 47, 249

Boers, K.L., Allender, M.C., Novak, L.J., Palmer, J., Adamovicz, L., Deem, S.L. 2019. Assessment of hematologic and corticosterone response in free-living eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*) at capture and after handling. *Zoo Biol.* 2019:1-10. <https://doi.org/10.1002/zoo.21518>.

Bonadiman, S.F., Miranda-Farlen, J.B., Ribeiro-Maria, L.S., Rabelo, G., Lainson, R., Silva, E.O., DaMatta, R.A. 2010. Hematological parameters of

Ameiva ameiva (Reptilia: Teiidae) naturally infected with hemogregarine: confirmation of monocytosis. *Vet. Parasitol.* 171:146–150.

Bryson, R.W., Riddle, B.R. 2012. Tracing the origins of widespread highland species: a case of Neogene diversification across the Mexican sierras in an endemic lizard. *Biol. J. Linn. Soc.* 105, 382–394.

Campbell, T.W. 1995. *Avian Hematology and Cytology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Campbell, T.W. 1996. Clinical pathology. *Reptile Medicine and Surgery* (ed. D.R. Mader). W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA. 248–257 pp.

Canseco-Márquez, L., Mendoza-Quijano, F. 2007a. *Thamnophis scalaris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007. <http://www.iucnredlist.org>.

Canseco-Márquez, L., Mendoza-Quijano, F. 2007b. *Crotalus triseriatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007. <http://www.iucnredlist.org>.

Canseco-Márquez, L., Mendoza-Quijano, F., Flores-Villela, O. 2007c. *Conopsis lineata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007. <http://www.iucnredlist.org>.

Canseco-Márquez, L., Mendoza-Quijano, F., Ponce-Campos, P. 2007a. *Sceloporus torquatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007. <http://www.iucnredlist.org>.

Canseco-Márquez, L., Mendoza-Quijano, F., Ponce-Campos, P., García-Aguayo, A., Vázquez-Díaz, J., Quintero-Díaz, G.E., Santos-Barrera, G., Campbell, J.A. 2007b. *Barisia imbricata*. The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>.

Conant, R. 2003. Observations on garter snakes of the *Thamnophis eques* complex in the lakes of Mexico's transvolcanic belt, with descriptions of new taxa. *Am. Mus. Novit.* 3406:164.

Cox, N.A., Temple, H.J. 2009. *European Red List of Reptiles*. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Das, M., Mahapatra, P.K. 2014. Hematology of wild caught Dubois's Tree Frog *Polypedates teraiensis*, (Dubois, 1986) (Anura: Rhacophoridae). *Sci. World J.* 7- 491-415, 7 p.p.

- Davis, A.K.** 2005. Effects of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. *Journal of Field Ornithology*, 76, 334–338.
- Davis, A.K.**, Cook, K.C., Altizer, S. 2004. Leukocyte profiles of House Finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. *Ecohealth*, 1, 362–373.
- Davis, A.K.**, Maerz, J.C. 2008a. Sex-related differences in hematological stress indices of breeding, paedomorphic Mole Salamanders. *J. Herpetol.* 42:197–201.
- Davis, A.K.**, Maerz, J.C. 2008b. Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic Mole Salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia* 2008:613–617.
- Davis, A.K.**, Maerz, J.C. 2011. Assessing stress levels of captive-reared amphibians with hematological data: implications for conservation initiatives. *J. Herpetol.* 45:40–44.
- Davis, A.K.**, Maney, D.L., Maerz, J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22:760-772.
- Davis, A.K.**, Ruyle, L.E., Maerz, J.C. 2011. Effect of trapping method on leukocyte profiles of black-chested spiny-tailed iguanas (*Ctenosaura melanosterna*): Implications for zoologists in the field. *ISRN. Zool.* 2011:8 pp.
- Dhabhar, F.S.** 2002. A hassle a day may keep the doctor away: stress and the augmentation of immune function. *Integr. Comp. Biol.* 42, 556–564.
- Dhabhar, F.S.**, Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L. 1996. Stress induced changes in blood leukocyte distribution – role of adrenal steroid hormones. *J. Immun.* 157, 1638–1644.
- Díaz de la Vega-Pérez A.H.**, Barrios-Montiel, R., Jiménez-Arcos, V.H., Bautista, A., Bastiaans, E. 2019. High-mountain altitudinal gradient influences thermal ecology of the mesquite lizard *Sceloporus grammicus*. *Can. J. Zool.* 97:659–668.
- Doherty, T.S.**, Balouch, S., Bell, K., Burns, T.J., Feldman, A., Fist, C., Garvey, T.F., Jessop, T.S., Meiri, S., Driscoll, D.A. 2020. Reptile responses to anthropogenic habitat modification: a global meta-analysis. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 29(7), 1265–1279.

Drummond H. 1983. Aquatic foraging in garter snakes: a comparison of specialists and generalists. *Behaviour* 86: 130.

Duran, F., Boretto, J.M., Fernández, J.B., Molina, M.I., Medina, M.S., Ibarguengoytia, N.R. 2019. Impact of immunological state on eco-physiological variables in one of the southernmost lizards in the world. *An. Acad. Bras. Cienc.* 91 (4).

Ekner, A., Sajkowska, Z., Dudek, K., Tryjanowski, P. 2011. Medical cautery units as a permanent and non-invasive method of marking lizards. *Acta Herpetol.* 6:229–236. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-9346.

Feria-Ortiz, M., Nieto-Montes de Oca, A., Slagado-Ugarte, I. 2001. Diet and reproductive biology of the viviparous lizard *Sceloporus torquatus torquatus* (Squamata: Phrynosomatidae). *J. Herpetol.* 35(1): 104-112.

Franco-Martínez, J.R.P., González-Huerta, A., Pérez-López, D.J., González-Ronquillo, M., 2015. Phenotypic characterization of hybrids and varieties of forage maize in High Valley State of Mexico, Mexico. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 8, 1915–1927.

García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. México, D.F: Universidad Autónoma de México.

Gibbons, J.W., Scott, D.E., Ryan, T.J., Buhlmann, K.A., Tuberville, T.D., Metts, B.S., Greene, J.L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S., Winne, C.T. 2000. The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians. *BioSci.* 50(8):653-666.

Gomez-Benitez, A. 2023. Inestabilidad en el desarrollo y canalización de una comunidad de reptiles en un hábitat perturbado. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). 154 p.p.

González-Fernández, A., Manjarrez, J., García-Vázquez, U., D'Addario, M., Sunny, A. 2018. Present and future ecological niche modeling of garter snake species from the Trans-Mexican Volcanic Belt. *PeerJ* 6, e4618 <https://doi.org/10.7717/peerj.4618>.

Goldberg, S.R. 2004. Notes on reproduction of the Mexican garter snake, *Thamnophis eques* (Serpentes: Colubridae), from Mexico. *Trans. Ill. State Acad. Sci.* 97(2): 129–134.

- Goyenechea, I.**, Flores-Villela, O. 2006. Taxonomic summary of *Conopsis*, Günther, 1858 (Serpentes: Colubridae). Zootaxa 1271(1):1–27.
- Guillette, L.J.**, Casas-Andreu, G. 1980. Fall Reproductive activity in the High-Altitude Mexican Lizard, *Sceloporus grammicus microlepidotus*. J. Herpetol. 14(2):143-147.
- Guillette, L.J.**, Casas-Andrew G., 1987. The reproductive biology of the high elevation Mexican lizard, *Barisia imbricata imbricata*, with notes on the other imbricata subspecies. Herpetologica 43:29-38.
- Guillette, L.J.**, Méndez-De La Cruz, F.R. 1993. The reproductive cycle of the viviparous Mexican lizard *Sceloporus torquatus*. J. Herpetol. 27(2): 168-174.
- Hammerson, G.A.**, Vazquez Díaz, J., Quintero-Díaz, G.E. 2007. *Sceloporus grammicus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007. <http://www.iucnredlist.org>.
- Hammerson, G.A.**, Vazquez-Díaz, J., Quintero-Díaz, G.E. 2007b. *Thamnophis eques*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007. <http://www.iucnredlist.org>.
- Harmon, B.G.** 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. Poul. Sci., 77, 972–977.
- Hawkey, C.M.**, Dennett, T.B. 1989. Color atlas of comparative veterinary hematology: normal and abnormal blood cells in mammals, birds, and reptiles. Iowa State University Press, Ames. 187 pp.
- Hernández-Salinas, U.**, Ramírez-Bautista, A., Leyte-Manrique, A., Smith, G.R. 2010. Reproduction and sexual dimorphism in two populations of *Sceloporus grammicus* (Sauria: Phrynosomatidae) from Hidalgo, Mexico. Herpetologica. 66(1):12-22.
- Hidalgo-Licon, L.F.**, Flores-Villela, O.A., Velasco, J.A. 2023. Climatic niche differentiation and paleodistribution of the longtail alpine garter snake complex *Thamnophis scalaris* (Squamata: Colubridae): holocene refugia in the Mexican highlands. Front. Biogeogr. 15.3, e59233.
- Jain, N.C.** 1993. Essentials of Veterinary Hematology. Blackwell Publishing, Philadelphia, PA.

- Khan, T.A.,** Zafar, F. 2005. Haematological study in response to varying doses of estrogen in broiler chicken. *Int. J. Poul. Sci.* 4: 748-751.
- Kiesecker, J.M.** 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian deformities in nature? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9900–9904.
- Lance, V.A.,** Elsey, R.M. 1999. Plasma catecholamines and plasma corticosterone following restraint stress in juvenile alligators. *J. Exp. Zool.* 283, 559–565.
- LeBlanc, C.J.,** Heatley, J.J., Mack, E.B. 2000. A review of the morphology of lizard leukocytes with a discussion of the clinical differentiation of bearded dragon, *Pogona vitticeps*, leukocytes. *J. Herpetol. Med. Surg.* 10, 27–30.
- Leyte-Manrique, A.,** Hernández-Salinas, U., Ramírez-Bautista, A., Mata-Silva, V., Marshall, J.C. 2017. Habitat use in eight populations of *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) from the Mexican Plateau. *Integr. Zool.* 12 (3):198-210.
- Manjarrez, J.** 1998. Ecology of the Mexican Garter Snake (*Thamnophis eques*) in Tluca, México. *J. Herpetol.* 32(3): 464-468.
- Manjarrez, J.,** Venegas-Barrera, C., García-Guadarrama, T. 2007. Ecology of the Mexican Alpine Blotched Garter Snake (*Thamnophis scalaris*). *Southw. Naturalist.* 52(2):258–262.
- Martínez-Torres, M.,** Guzmán-Rodríguez, R., Cárdenas-León, M., Brunner-Reynaldo, N. 2006. Follicular development and ovulation determined by ultrasound imaging in the viviparous lizard *Barisia imbricata* (Reptilia, Anguidae). *Southwest Nat.* 51: 41–46.
- McFarlane, J.M.,** Curtis, S.E., Simon, J., Izquierdo, O.A. 1989. Multiple concurrent stressors in chicks. Effects on hematologic, body composition, and pathologic traits. *Poult. Sci.* 68, 510–521.
- Méndez de la Cruz F.,** Díaz de la Vega P.A.H., Jiménez A.V.H. 2009. Herpetofauna. In: Biodiversidad del Ecosistema del Pedregal del Pedregal de San Ángel. Lot A., Cano-Santana Z. (Eds). Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México. p. 243-260.

- Mestre, A.P.**, Amavet, P.S., Siroski, P.A. 2017. Baseline values of immunologic parameters in the lizard *Salvator merianae* (Teiidae, Squamata). *Open Vet. J.* 7 (2):143–149.
- Morici, L.A.**, Elsey, R.M., Lance, V.A. 1997. Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators, *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Zool.* 279, 156–162.
- Motz, V.L.**, Lewis, W.D., Vardo-Zalik, A.M. 2014. Leukocyte profiles for western fence lizards, *Sceloporus occidentalis*, naturally infected by the malaria parasite *Plasmodium mexicanum*. *J. Parasitol.* 100:592-597.
- Munguia-Vega, A.**, Rodriguez-Estrella, R., Shaw, W.W., Culver, M. 2013. Localized extinction of an arboreal desert lizard caused by habitat fragmentation. *Biol. Conserv.* 157, 11–20.
- Nardini, G.**, Leopardi, S., Bielli, M. 2013. Clinical hematology in reptilian species. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 16:1–30.
- Peterson, J.D.**, Steffen, J.E., Reinert, L.K., Cobine, P.A., Appel, A., Rollins-Smith, L. and Mendonca, M.T. 2013. Host stress response is important for the pathogenesis of the deadly amphibian disease, chytridiomycosis, in *Litoria caerulea*. *PLoS ONE* 8(4): e62146.
- Raxworthy C.J.**, Pearson, R.G., Zimkus, B.M., Reddy, S., Deo, A.J., Nussbaum, R.A., Ingram, C.M. 2008. Continental speciation in the tropics: contrasting biogeographic patterns of divergence in the *Uroplatus* leaf-tailed gecko radiation of Madagascar. *J. Zool.* 275:423-440.
- Read, J.L.** 1998. Are geckos useful bioindicators of air pollution? *Oecologia.* 114:180-187.
- Romero, L.M.**, Romero, R.C. 2002. Corticosterone responses in wild birds: the importance of rapid initial sampling. *Condor*, 104, 129–135.
- Rossman, D.A.**, Ford, N.B., Seigel, R.A. 1996. *The Garter Snakes: Evolution and Ecology*. University of Oklahoma Press, Norman. 336 pp.
- Saad, A.H.**, Elridi, R. 1988. Endogenous corticosteroids mediate seasonal cyclic changes in immunity of lizards. *Immunobiology.* 177, 390–403.

Sacchi, R., Pupin, F., Zuffi, A. L., Scali, S., Boncompagni, E., Binda, A., Galleoti, P., Fasola M. 2007. Blood cell morphology of the Moorish gecko, *Tarentola mauritanica*. *Amphib. - Reptil.* 28, 503–508.

Sacchi, R., Scali, S., Cavarani, V., Pupin, F., Pellitteri-Rosa, D. 2011 Leukocyte differential counts and morphology from twelve European lizards. *Ital. J. Zool.* 78: 418–426.

Shutler, D., Marcogliese, D.J. 2011. Leukocyte profiles of Northern Leopard Frogs, *Lithobates pipiens*, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural wetlands. *Copeia* 2011:301–307.

Simbula, G., Vignoli, L., Carretero, M.A., Kaliontzopoulou, A. 2021. Fluctuating asymmetry as biomarker of pesticides exposure in the Italian wall lizards (*Podarcis siculus*). *Zoology.* 147, 125928. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2021.125928>.

Sites, J.W. Jr., Archie, J.W., Cole, C.J., Flores-Villela, O. 1992. A review of phylogenetic hypotheses for lizards of the genus *Sceloporus* (Phrynosomatidae): implications for ecological and evolutionary studies. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 213:1-110.

Solis, M.E., Bandeff, J.M., Huang, Y.W. 2007. Hematology and serum chemistry of Ozark and Eastern Hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis*). *Herpetologica.* 63:285–292.

Stacy, N.I., Alleman, A.R., Sayler, K.A. 2011. Diagnostic hematology of reptiles. *Clin. Lab. Med.* 31:87–108.

Stebbins, R.C. 2003. *A Field Guide to Western Reptiles and Amphibians*, 3rd Edit., Houghton Mifflin Company, Boston, Massachusetts. 533 pp.

Sunny, A., Gandarilla-Aizpuro, F.J., Monroy-Vilchis, O., Zarco-Gonzalez, M.M. 2019. Potential distribution and habitat connectivity of *Crotalus triseriatus* in Central Mexico. *Herpetozoa.* 32: 139-148.

Thrall, M.A. 2004. *Hematology of amphibians, Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Todd, B.D., Willson, J.D., Gibbon, J.W. 2010. The global status of reptiles and causes of their decline. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., Krest, S.

(Eds.), *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, second ed. CRC Press, Boca Raton, USA.

Troiano, J.C., Vidal, J.C., Gould, J., Gould, E. 1997. Haematological reference intervals of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) in captivity. *Comp. Haematol. Int.* 1:109–112.

Vasquez Díaz, J., Quintero Díaz, G.E. 2007. *Thamnophis melanogaster*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007. <http://www.iucnredlist.org>.

Wilson, L.D., Johnson, J.D. 2010. Distributional patterns of the herpetofauna of Mesoamerica, a biodiversity hotspot. Pp. 30–235 In: *Conservation of Mesoamerican Amphibians and Reptiles*. Editors, Wilson LD, Townsend JH, Johnson JD. Eagle Mountain Publishing, LC, Eagle Mountain, Utah, USA.

Wilson, L.D., Mata-Silva, V., Johnson J.D. 2013. A conservation reassessment of the reptiles of Mexico based on the EVS measure. *Special Mexico Issue. Amphib. reptile conserv.* 7: 1–47.

Winne, C.T., Willson, J.D., Andrews, K.M., Reed, R.N., 2006. Efficacy of marking snakes with disposable medical cautery units. *Herpetological Review* 37, 5254.

Wozniak, E.J., Kazacos, K.R., Telford, S.R., McLaughlin, G.L. 1996. Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian hosts. *Int. J. Parasitol.* 26:141–146.

Zhelev, Z.M., Popgeorgiev, G.S., Mehterov, N.H. 2015. Hematological parameters of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) from the region of the lead and zinc plant “Kardzhali” (south Bulgaria) and their use in the environmental quality assessment. *Acta Zool. Bulg.* 67: 271-282.

Zimmerman, L.M., Vogel, L.A., Bowden, R.M. 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J. Exp. Biol.* 213: 661-671.

Zipkin, E.F., DiRenzo, G.V., Ray, J.M., Rossman, S., Lips, K.R. 2020. Tropical snake diversity collapses after widespread amphibian loss. *Science*. 367(6479):814–6.

CBPA-D-23-00411 - Confirming your submission to Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A <em@editorialmanager.com>

Mar 21/Nov/2023 19:22

Para: Daniel Sánchez Manjarrez <daniel_s_manjarrez@hotmail.com>

This is an automated message.

White blood cell characterization and leukocyte profile of *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) in an agricultural landscape.

Dear Dr Sánchez Manjarrez,

We have received the above referenced manuscript in Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. It has been assigned the following manuscript number: CBPA-D-23-00411.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/cbpa/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder. If you need any assistance or have any questions while we are handling your manuscript, please contact our editorial office at cba@elsevier.com.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office
Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, then you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. For more details see the journal guide for authors.

At Elsevier, we want to help all our authors to stay safe when publishing. Please be aware of fraudulent messages requesting money in return for the publication of your paper. If you are publishing open access with Elsevier, bear in mind that we will never request payment before the paper has been accepted. We have prepared some guidelines (<https://www.elsevier.com/connect/authors-update/seven-top-tips-on-stopping-apc-scams>) that you may find helpful, including a short video on Identifying fake acceptance letters (<https://www.youtube.com/watch?v=o5I8thD9XtE>). Please remember that you can contact Elsevier's Researcher Support team (<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>) at any time if you have questions about your manuscript, and you can log into Editorial Manager to check the status of your manuscript (https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/29155/c/10530/supporthub/publishing/kw/status/).

#AU_CBPA#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

**White blood cell characterization and leukocyte profile of *Sceloporus grammicus*
(Squamata: Phrynosomatidae) in an agricultural landscape.**

Daniel Sánchez-Manjarrez ^a, Laura Elena Hernández-Hernández ^b, José Fernando Méndez-Sánchez ^c, Josele Ricardo Flores-Santín ^c, Oswaldo Hernández-Gallegos ^a.

^aLaboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México C. P. 50000, México.

^bLaboratorio de Morfofisiología de la Reproducción, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México C. P. 50000, México.

^cLaboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México C. P. 50000, México.

Corresponding author.

Oswaldo Hernández-Gallegos

e-mail: ohg@uaemex.com

Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México C. P. 50000, México.

Abstract

White blood cells, also known as leukocytes, play a critical role in the immune response. The abundance of each type of white blood cell in the peripheral bloodstream is an essential indicator of an organism's health status. Alterations in leukocyte profiles can also indicate stress caused by environmental factors, injuries, diseases, and habitat changes. In this study, we counted and characterized the white blood cells (lymphocytes, monocytes, heterophils, eosinophils, and basophils) from a population of the Mezquite Spiny Lizard (*Sceloporus grammicus*) that inhabits an agricultural environment located at Central México. By examining blood samples under a microscope, we identified each type of white blood cell. We calculated the relative abundances of each cell and determined the leukocyte profile. Additionally, we calculated the heterophil/lymphocyte ratio (H:L) to assess the population's stress levels. Using the obtained data, we determined the variations of each type of leukocyte throughout the year, as well as seasonal changes in the H:L ratio. We compared the data obtained between seasons and sexes. We found no significant differences in cell proportions between the sexes. However, we found significant differences between seasons; we observed a gradual decrease in the proportions of lymphocytes and an increase in heterophils during the winter months, moreover, there was a marked increase in H:L ratios during the spring season. This study highlights the importance of considering the annual fluctuations in the leukocyte profile of species when seeking to determine cell proportions.

Key Words.

hematology; stress; lizard; leukocytes; heterophiles; lymphocytes; agroecosystem

Introduction

Extant non-avian Sauropsida play a crucial role in ecosystem dynamics. They perform various functions within natural systems, including gene dispersal, nutrient cycling, and trophic energy flow (de Miranda, 2017). Unfortunately, this group and its habitat are currently under threat from various factors, such as habitat degradation, invasive species, environmental pollution, diseases, parasitism, and climate change (Gibbons et al., 2000). While some species are more vulnerable than others (Whitfield et al., 2007; Wilson et al., 2013), population declines have been reported globally (Gibbons et al., 2000; Whitfield et al., 2007). Several authors have suggested that extant non-avian Sauropsida can serve as bioindicators of ecosystem health (Crain & Guillette, 1998; Read, 1998; dos Santos et al., 2021) and have been used as a model for evolutionary, ecological, and physiological research (Crain & Guillette, 1998; Blackburn, 2006; Raxworthy et al., 2008; de Miranda, 2017; Durán et al., 2019). Collectively, these characteristics highlight the significance of understanding and monitoring the health status of extant non-avian Sauropsida populations worldwide. As indicators of environmental degradation, these populations can provide valuable insights into the effects of habitat loss and degradation, including impacts on immune function and immune responses (Crain & Guillette, 1998; Read, 1998; Zimmerman et al., 2010; dos Santos et al., 2021).

The immune system is a crucial component of survival, as it directly affects an organism's health status and physiological performance (Durán et al., 2019). It is widely used for diagnosing and monitoring animal health (Stacy et al., 2011). The vertebrate immune system is a complex network of circulating cells and molecules, as well as tissues and organs (Zimmerman et al., 2010), and includes white blood cells (leukocytes), antibodies, and lysozymes (Zimmerman et al., 2010; Durán et al., 2019).

In extant non-avian Sauropsids, macrophages and monocytes are phagocytic cells (Dessauer, 1970; Zimmerman et al., 2010) that can contain azurophilic granules (Stacy et al., 2011; Nardini et al., 2013; Arikan & Çiçek, 2014). Monocytes seem to play a significant role in bacterial infections (Canfield, 1998). Heterophils are granulocytes equivalent to neutrophils in mammals (Zimmerman et al., 2010; Stacy et al., 2011; Arikan & Çiçek, 2014) and help suppress microbial invasion (Canfield, 1998; Arikan & Çiçek, 2014). They also act in inflammatory responses (Zimmerman et al., 2010) and antibacterial responses by phagocytosis (Davis et al., 2004, 2010; Arikan & Çiçek, 2014). Basophils act in allergic responses by releasing histamine, as they contain antigen-specific immunoglobulin (Zimmerman et al., 2010; Nardini et al., 2013). Little is known about the function of eosinophils in extant non-avian Sauropsida (Zimmerman et al., 2010; Arikan & Çiçek, 2014), although the presence of abnormally high eosinophil counts has been associated with parasitic infections (Stacy et al., 2011). Lymphocytes are leukocytes that are part of the adaptive immunity (Zimmerman et al., 2010). Cell-mediated immunity involves a type of lymphocyte known as T cells, which regulate antibody production (Zimmerman et al., 2010; Stacy et al., 2011).

The relative proportion of each type of leukocyte in peripheral blood is known as the leukocyte profile (Davis et al., 2004). The leukocyte profile gives relevant information about an organism's immune function (Davis et al., 2004; Davis et al., 2010). Studies of leukocyte profile in non-mammalian vertebrates are relatively new, and knowledge of cell morphology of extant non-avian Sauropsida is not as wide as that of mammals (Zimmerman et al., 2010; Arikan & Çiçek, 2014). Extant non-avian Sauropsida constitute a heterogeneous group among vertebrates in terms of blood cell morphology and present considerable variations between orders, even within the same family (Arikan & Çiçek,

2014). Age, sex, and environmental conditions can affect blood cell counts regarding both cell morphology and concentration in the peripheral blood (Zimmerman et al., 2010; Stacy et al., 2011). Therefore, non-avian Sauropsida become a fundamental group of study to provide important insights into both the evolution of the immune system as well as the function of the immune system in an ecological setting (Zimmerman et al., 2010).

In most organisms, an increase in the concentration of stress hormones, such as corticosterone, can alter the number of leukocytes in circulation, increasing the number of heterophils and decreasing lymphocytes (Davis et al., 2008). As a consequence, leucocyte profile may provide an estimate of stress levels (Davis et al., 2004) by calculating the heterophil: lymphocyte ratio (H:L) as a proxy measure of stress (Davis et al., 2004). Recent studies have reported that the duration of stress episodes affects hormonal concentrations (Davis & Maney, 2018), and in the context of long-term chronic stress, the glucocorticoid response decreases in repeatedly stressed animals or those exposed to chronic environmental stress. This can often, lead to low baseline levels and more typically, an attenuated stress detection, whereas H:L ratios appear to remain high under the same conditions, allowing better chronic environmental stress detection (Davis & Maney, 2018). Another advantage of leukocyte profiles is that it requires small blood samples, which is useful in the study of small organisms (Davis & Maney, 2018).

Leukocyte profile is also used as a measure of the impact of energy usage during trade-offs in the immune function (Norris & Evans, 2000; Kuo et al., 2013; Arguez et al., 2018). Some studies have reported that costs derived from tail autotomy compromise defense against ectoparasites in *Sceloporus grammicus* and *Sceloporus megalepidurus* (Arguez et al., 2018). In the Common Mabuya, *Eutrophis multifasciata*, tail loss compromises inflammatory responses, but not the constitutive innate response (Kuo et al., 2013). On the

other hand, gravid females of *Sceloporus undulatus* with experimental increases of corticosterone had similar immune function to those without injection of the hormone, but lower metabolic rates as a compensatory mechanism to maintain their energy balance (MacLeod et al., 2021). Leukocyte profile is highly sensitive to factors such as temperature (Davis & Maney, 2018), and some studies report that temperature can affect immune activity in reptiles (Zimmerman et al., 2010).

The Mezquite Spiny Lizard, *Sceloporus grammicus*, is a viviparous species with a wide geographical distribution across México (Sites et al., 1992) and lives in a great variety of habitats, like pine-oak forests, pine forests, and xeric scrub (Leyte-Manrique et al., 2017). The species is known to occupy various microhabitats such as logs, trees, and even the walls of buildings and houses in urban areas (Lara-Góngora, 2004). The neonates of this species can also be frequently seen on the ground and under stones (Lemos-Espinal and Ballinger, 1995). Males have ventral patches of blue and black coloration, whereas females have ventral patches of light orange color (Arguez et al., 2018). This species is considered as least concern (LC) by the IUCN Red List (Hammerson et al., 2007); however, it is listed as a species with special protection according to the Mexican law (Diario Oficial de la Federación (DOF), 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio Lista de especies en riesgo. Available from: <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4254/semarnat/semarnat.htm> [accessed 08 September 2023]). Under the Environmental Vulnerability Score (EVS), which is used to estimate a species' vulnerability to environmental change, *S. grammicus* has a score of 9 points out of 20, considering it a species with low vulnerability to environmental changes (Wilson et al., 2013). This species reproduces in fall-winter, with

births in spring (Guillette & Casas-Andreu, 1980; Ortega & Barbault, 1984; Jiménez-Cruz et al., 2005; Hernández-Salinas et al., 2010).

In this study, we characterized and measured each type of white blood cell in a sample obtained from adult individuals of a population of *S. grammicus* that inhabits an agricultural environment located in the State of Mexico, México. Additionally, we determined the relative abundance of each type of white blood cell and the H:L ratio for the population studied. In this way, we determined the leukocyte profile of the species studied and obtained an estimate of the stress levels of the population throughout the sampled period. This will help us understand the annual fluctuations in stress levels associated with seasonal changes. Moreover, we compared the cell ratios and the H:L ratio between sexes and evaluated the seasonal variations of the leukocyte profile and its proportions. This study is one of the few that follows up the population over time to calculate and observe how the values of cell proportions behave and fluctuate over time, unlike other studies where values are only observed at a point in time (Bonadiman et al., 2010; Davis et al., 2011; Davis and Maerz 2011). Approach that could lead to confusion in the interpretation of the cellular abundances of the species, as typical cellular fluctuations during reproductive periods or seasonal changes are not considered.

Materials and Methods

Study site

The study site is located at El Cerrillo, Piedras Blancas (19°25' to 19°26' N, 99°39' to 99°40' W), Toluca, State of Mexico, México, at an altitude of 2,593 masl. We found evident signs of anthropization in the study area, such as, loss of vegetation and tree coverage, the use of big areas of land for agricultural purposes, the use of agrochemicals, grazing of

various species of livestock and the construction of concrete drains and water channels. The site presents an average annual temperature of 8.2°C and an annual precipitation of 738.6 mm with seasonal variation (Álvarez-Lopezello et al., 2016). Vegetation at the study site consists of grasses and scarce tree coverage (Álvarez-Lopezello et al., 2016). The climate is temperate subtropical highland (Cwb) with summer rains (García, 1973).

Captures and blood collection

We collected adult individuals of *Sceloporus grammicus* through weekly captures throughout a whole year from June 2021 to June 2022. We sampled the study area along previously defined transects looking between rocks, cavities, vegetation, tree trunks, under plastics and residues found in the study site and on concrete structures. We caught the lizards by hand or by noosing. Immediately after capture, we registered the body temperature of the individuals with a quick-reading cloacal thermometer (Miller and Weber[®], L-K Industries, Houston, Texas). Immediately after taking the temperature, and within the first 5 minutes after the capture we obtained a blood sample from the ventral coccygeal vein using a 31G x 6mm needle attached to a syringe (Nardini et al., 2013). We prepared a minimum of two blood smears per individual from this blood. A new and clean syringe was used for each individual. Blood collection did not surpass 0.02 mL per individual. We obtained the snout-vent length (SVL: from the tip of the snout to the cloacal region) measured to the nearest 1.0 mm, using a digital caliper and weight to the nearest 0.1g, with a 10 g. spring scale, (Pesola©., Chaltenbodenstrasse, Switzerland) for each individual. We sexed the organisms by ventral coloration (Argaez et al., 2018), and post-cloacal scales examination. Males present ventral patches of blue and black coloration, whereas females have ventral light orange coloration (Argaez et al., 2018). To identify all

individuals, we used a micro-cautery (Bovie Medical Change-A-Tip, Bovie Medical Corporation., Clearwater, Florida, USA.) to apply ventral markings according to Ekner et al. (2011). We also registered date and hour of capture, and every capture micro-site was geo-referenced (GPS data 3 m resolution) and described, to ensure release of the organisms at the exact locations they were collected.

Leukocyte profile and white blood cells description

We stained the blood smears using Wright's stain for microscopic observation following a previously described manual counting procedure (Arikan & Çiçek, 2014). We observed blood smears with an OLYMPUS© CX41 optic microscopy at 100X (immersion oil) magnification. All observations were done by one person (DS-M) to reduce any bias. We made the counts of lymphocytes, monocytes, heterophils, eosinophils, and basophils following a manual counting method known as "greek guard", in which the observer picks a random field and moves the slide from top to bottom and from left to right throughout different field until 100 leukocytes or 150 fields are counted (Durán et al., 2019). We identified leukocytes according to previous morphological descriptions (Stacy et al., 2011; Nardini et al., 2013; Arikan & Çiçek, 2014) and characterized as heterophils, eosinophils, monocytes, basophils, and lymphocytes. We calculated leukocyte profiles expressed as a percentage of each type of white blood cell and we determinate the heterophil/lymphocyte ratio (H:L ratio). Additionally, through microscopic observation, we characterized each type of white blood cell and took photomicrographs of each cell type by coupling a Canon EOS M50 Mark II mirrorless camera with an EF-M 15-45 IS STM Canon lens to the microscope eyepiece. Subsequently, a scale was established using a Neubauer camera and the images obtained were imported to the image processing program ImageJ to determine the size of each cell type.

Statistical analysis

According to cell counts and abundances observed we calculated the proportion of lymphocytes, monocytes, heterophils, eosinophils, basophils, and the H:L ratios. We performed linear regressions for each leukocyte type, as well as the H:L ratio, to determine if there was any correlation between weight and SVL of individuals. We log transformed cell proportions data to approximate normal distributions (Davis et al., 2011; Davis and Maerz, 2011). We performed Student's t-test for SVL, weight and for each leukocyte between sexes to determine significant differences between males and females in the study population. Additionally, we used Man-Whitney's test to determine differences between sexes in the H:L ratio.

We used Analysis of variance (ANOVA) to compare the values of each leukocyte cell and H:L ratios among seasons. We consider four seasons as follows: spring from April to June, summer from July to September, fall from October to December and winter from January to March. We used IBM SPSS 25 and Statgraphics Centurion XVIII software at a confidence level of 0.05 for all tests.

Results

Field surveys

We captured 54 individuals of *S. grammicus*. Of the captured individuals, 30 were males and 24 females. We were able to obtain the samples to carry out the blood smears in duplicate from 50 individuals (29 males and 21 females). Three individuals (two males and one female) had lower SVL than the minimum reported to reach sexual maturity in this species, 38.9 mm in males and 44.6 mm for females according to Hernández-Salinas et al.

(2010), therefore, their cell ratios were not included in the analyses. We found no significant differences in SVL ($t = 0.47$; $df = 46$, $P = 0.637$) between males ($n = 27$, mean $SVL \pm SD = 58.85 \pm 7.96$ mm, range 45–70 mm) and females ($n = 20$, mean $SVL \pm SD = 59.90 \pm 6.88$ mm, range 45–73 mm). In addition, we did not find weight differences ($t = 0.64$; $df = 46$, $P = 0.522$) between males ($n = 27$, mean weight $\pm SD = 6.75 \pm 2.66$ g, range 2.7 – 11.5 g) and females ($n = 20$, mean weight $\pm SD = 7.26 \pm 2.67$ g, range 2.7 – 13 g) in the studied population.

Leukocyte morphology

We observed and characterized the five leukocyte cell types of *S. grammicus* during microscopic analyses (Fig. 1). The lymphocytes were observed as small oval cells and, in some cases, round, with scant and homogeneous cytoplasm. The stain used allowed the cytoplasm to be observed from a light gray to light blue color. In some cases, pseudopodia could be observed in the periphery of their cytoplasm. Lymphocytes were the smallest cell observed in *S. grammicus* (Table 1). Monocytes were observed as cells of variable size with a round or spherical shape, in some cases even ameboid due to the pseudopodia of their cytoplasm, the nucleus is relatively large and curved in shape, being able to occupy between 50% and 70% of the cell cytoplasm; monocytes with numerous inclusions in the cytoplasm stained with a color ranging from light gray to blue were observed, which coincides with the descriptions of azurophilic monocytes in reptiles of various species. Basophils were observed as small round cells with numerous cytoplasmic granules that often covered the nucleus, which in most cases could not be distinguished due to the highly chromophilic nature of the granules, these cells stain dark blue to purple. Eosinophils in this species are cells of variable size whose cytoplasm stains pink to light purple and large

eosinophilic cytoplasmic granules are observed that stain dark magenta with a round or elongated nucleus. While heterophils are observed as large cells, with a round shape and numerous fusiform cytoplasmic granules, they present an eccentric and oval trilobed nucleus and were the largest white blood cells observed in the species (Table 1).

Leukocyte profile and H:L ratios

The average proportions for each type of leukocyte cell of adults *S. grammicus* from the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México, were as follows: 57.16% (± 9.58 SD) lymphocytes, 9.46% (± 4.27 SD) monocytes, 10.61% (± 7.41 SD) heterophils, 7.26% (± 5.52 SD) eosinophils and 15.49% (± 6.24 SD) basophils. The average N/L ratio for this population was 0.20 (± 0.16 SD). We found no correlation between any of the leukocyte cell types or the H:L ratios and the SVL or weight of the individuals collected (Table 2). Similarly, we found no statistical differences for lymphocytes ($t = -1.63$, $df = 46$, $P = 0.108$), monocytes ($t = 1.95$, $df = 46$, $P = 0.057$), heterophils ($t = 0.62$, $df = 46$, $P = 0.532$), eosinophils ($t = 0.02$, $df = 46$, $P = 0.980$), basophils ($t = -0.26$, $df = 46$, $P = 0.794$) and the H:L ratios ($W = 242.5$, $df = 46$, $P = 0.560$) between sexes. We found significant differences in seasonal analysis for lymphocytes and heterophils between the spring and summer seasons (lymphocytes: ± 0.039 SD, $P = 0.013$; heterophils: ± 0.041 SD, $P = <0.001$) and spring and fall seasons (lymphocytes: ± 0.034 SD, $P = 0.004$; heterophils: ± 0.037 SD, $P = <0.001$), while the comparison of spring with winter did not show significant differences between these seasons (Table 3). The results allowed to determine that there is a decrease in the proportions of lymphocytes at the beginning of winter season, this decrease in lymphocyte count continues and reaches its lowest abundance during the spring season, later we saw an increase during the summer season which continues until fall. We did not

find differences in size or weight between sexes in the studied *S. grammicus* population. In the case of the H:L ratio, significant differences were observed in this ratio during the spring season with the rest of the seasons (Table 3).

Through the monthly calculation of the proportions of leukocytes (Fig. 2) and the H:L ratio, it was possible to observe that the lymphocytes show a decrease in their proportions during the winter and spring months (Fig. 3), while during the same months the heterophiles present an increase in their proportions (Fig. 4). The highest values for the H:L ratio, are also observed during the winter and spring seasons (Fig. 5).

Discussion

The data obtained through this study allows us to observe the cellular proportions that determine the leukocyte profile in a *Sceloporus grammicus* population and the annual fluctuations that may be linked to environmental and reproductive processes and stress episodes (Davis et al., 2010; Zimmerman et al., 2010; Stacy et al., 2011). After obtaining the cell proportions to determine the leukocyte profile of *S. grammicus*, we observed that the white blood cell with the highest prevalence in the studied population were lymphocytes, which is common in extant non-avian Sauropsida populations as seen in other studies where it has been observed that lymphocytes represent more than half of the leukocyte cells in these groups (Davis et al., 2011; Motz et al., 2014). The second most prevalent white blood cell was eosinophils, the role of this cell in the immune reaction of amphibians and reptiles is not clear, however, it has been associated with the presence of parasites in organisms (Zimmerman et al., 2010; Stacy et al., 2011; Arikán & Çiçek, 2014). Although the presence of hemoparasites was not analyzed in this study, signs that could

evidence some infection present in leukocytes or erythrocytes was not visible during any microscopic observation in the species. However, other types of parasites cannot be ruled out in the population, for this reason, specific studies evaluating parasitic infections in *S. grammicus* present in the site of study could clarify the observed eosinophil abundance.

The abundance of heterophils observed in the population studied, as well as the H:L ratio (0.20), reflect a low level of physiological stress in *S. grammicus*, during most of the year, still moderate levels of stress are observed during spring. Considering that values close or superior to 1 reflect a considerable level of stress in amphibians and extant non-avian Sauropsids (Davis et al., 2011; Davis and Maerz, 2011). The leukocyte proportions observed in the *S. grammicus* population studied in this work contrast with the values reported by Wozniak et al. (1996), in species such as *S. undulatus* and *S. poinsettii* (Table 4), where the authors observed higher heterophile proportions and a lower lymphocyte count. However, in those studies the blood samples were taken from individuals kept in captivity and additionally, they took blood samples repeatedly in intervals of two weeks. The repeated stress episodes can cause changes in the proportions of white cells in the individuals (Davis et al., 2008), which would explain the high value reported for the H/L proportions in *S. undulatus* and *S. S. poinsettii* (Table 4). On the other hand, the low H:L ratio values observed in *S. grammicus* agrees with observations made for this species, which indicate that it presents a great diversity of strategies to adapt to changes in its habitat, which allows its populations to distribute in a variety of ecosystems, being an ecological generalist with a wide latitudinal and altitudinal range distribution, including highly anthropized environments (Díaz de la Vega-Pérez et al., 2019). Additionally, *S. grammicus* is known to be able to compensate environmental constrains with behavioral

changes in thermoregulation, making use of both, thigmothermy and heliothermy, and according to the thermoregulatory effectiveness index (B-W), *S. grammicus* is a highly efficient thermoregulator (Díaz de la Vega-Pérez et al., 2019). This is also evidenced in the Environmental Vulnerability Score (EVS) classification of Wilson et al., 2013. According to their evaluation, *S. grammicus* shows low vulnerability to environmental degradation, due to aspects such as: range of distribution (the species has a wide distribution in México), ecological distribution (the species can inhabit a wide variety of vegetation formations within its distribution range) and human persecution (generally ignored by humans). In a study that determined fluctuating asymmetry using geometric morphometry in the same population, it was concluded that *S. grammicus* did not present fluctuating asymmetry in the shape of the head therefore presented a higher tolerance to environmental stress than that observed in other species of non-avian Sauropsida that inhabit the study site (Gómez-Benitez, 2023). This coincides with our results regarding the low stress reflected in the leukocyte profile of *S. grammicus*.

No correlations were observed between the abundances of each white blood cell and aspects such as the weight or size of the organisms studied in the population, in addition to not having a significant difference in the cellular proportions between sexes in this population. There are studies that indicate the existence of significant differences in leukocyte counts between male and female lacertilians during the immune response to pathogens and parasites (Motz et al., 2014). These differences have been associated with the immunosuppressive role that testosterone may have in males (Veiga et al., 1998), however, this has not been observed in all species and has been mainly observed in specific cases of parasitism (Motz et al., 2014).

We found significant difference in cell ratios during the annual seasonal cycle. While the proportions of heterophils have an increase in their abundances mainly during the winter, later the highest abundance of heterophils occurs in the middle of the spring season. This variation in the abundances of lymphocytes and heterophils is clearly reflected in the higher values for the H:L ratio during winter and spring in the *S. grammicus* population analyzed in this study.

The increase in the levels of physiological stress during the months that correspond to winter and spring seasons observed in the studied population of *S. grammicus*, coincides with the drop in temperatures in the study site, and with the period of offspring births in *S. grammicus*, that occurs in spring (March) (Sánchez-Manjarrez, pers. obs.). Births in March have already been widely observed in various populations of *S. grammicus*, although they are not exclusive, since in other populations births occur in April (Hernández-Salinas et al., 2010). The increase in stress levels reflected during these seasons may be explained by the energy costs derived from courtship and spring births and the low temperatures and food shortages that can occur in winter season.

In the study made by Fasola et al. (2021), they analyzed the stress levels in different populations of *Podarcis siculus* that inhabited olive groves and vineyards using leukocyte profile and antioxidant enzyme activity analysis. The authors observed greater responses to stress in males than in females. Attributing this to possible tradeoffs during the reproductive season that caused a greater effect of stress in males. Additionally, they observed that the organisms collected in sites with a lower degree of management (human intervention) presented lower stress indicators (Fasola et al., 2021). The degree of habitat disturbance affecting cell proportions has also been observed in other species. *Tiliqua rugosa* showed higher values of H/L ratio in organisms that inhabited sites severely modified by human

activities than organisms that inhabited relatively conserved sites; however, they observed higher abundances in heterophils and other granulocytes in organisms from conserved sites. The authors mention this could suggest responses to greater environmental variability in relatively conserved sites (Smyth et al., 2014).

The results obtained in this study allow us to know the characteristics of the leukocyte profile in *S. grammicus* lizards and the variability in cell proportion throughout the annual seasonal cycle. According to the information obtained during this study, we conclude that it is of great importance to consider the variations produced in the proportions of leukocyte cells by environmental aspects and reproductive cycles in extant non-avian Sauropsid species. Especially in studies that seek to know the basal data of cell proportions.

Especially challenging seasons for ectothermic organisms such as winter and reproductive periods, produce marked variations in leukocyte ratios (Zimmerman et al., 2010; Stacy et al., 2011), as evidenced in the results obtained in this study. This is especially important when designing studies and experiments that seeks to use the leukocyte profile values to determine if a population is subjected to physiological stress. Also, the specific characteristics of each species must be considered, such as the type of reproduction (viviparous or oviparous), as well as the months in which mating and birth of offspring occur, due to the physiological stress that the latter have mainly on female reptiles.

Most studies regarding leukocyte profiles in extant non-avian Sauropsids have been conducted during a specific point in time (e.g., Troiano et al., 1997; Mestre et al., 2017; Boers et al., 2019) or a narrow span of time (e.g., Davis et al., 2011; Motz et al., 2014), which can lead to underestimation of the values and does not necessarily give information about the causality of the proportions in leukocyte counts. As we report in this study, important variations in the leukocyte profile are observable throughout the year, and it is

important to take seasonality into account when assessing leukocyte baseline levels. Also, studies conducted in captive specimens (e.g., Troiano et al., 1997; Bonadiman et al., 2010; Mestre et al., 2017) generally represent a challenge in the interpretation of obtained data, because captivity conditions not necessarily emulate natural habitat conditions regarding climate, food availability, environmental constraints, predator encounters, among others, and does not give information about free-ranging populations, which is important when conducting conservation and ecological research. Besides, several studies of leukocyte profile in extant non-avian Sauropsid have been conducted with few organisms (e.g., Bonadiman et al., 2010; Sacchi et al., 2011; Mestre et al., 2017), this approach can lead to errors because of the low sample numbers, and thus, compromises the power of statistical analysis.

Our study presents the first annual follow-up data of a *S. grammicus* population to quantify the cellular abundances of the species. This is important because it allows us to observe how the values of cell proportions behave and to account for cellular fluctuations typical of reproductive periods or seasonal changes. By comparing the leukocyte profiles of different sexes and evaluating seasonal variations, we were able to gain a more nuanced understanding of the species' response to stressors. We recommend that future studies continue to monitor extant non-avian Sauropsids populations over time and use similar methods to those shown here to quantify the effects of anthropogenic activities on other species.

Acknowledgments

Special thanks to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship granted to DS-M for the realization of the project. Thanks to the students of the Laboratorio de Herpetología de la Facultad de Ciencias, who contributed greatly to the field sampling. We carry out the sampling under the scientific collection permit issued by the Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) SGPA/DGVS/10352/21.

References

- Álvarez-Lopezello, J., Rivas-Manzano, I.V., Aguilera-Gómez, L.I., González-Ledesma, M., 2016. Diversidad y estructura de un pastizal en El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México. *Rev. Mex. Biodivers.* 87:980-989.
- Argaez, V., Solano-Zavaleta, I., Zúñiga-Vega, J.J., 2018. Another potential cost of tail autotomy: tail loss may result in high ectoparasite loads in *Sceloporus* lizards. *Amphib-Reptil.* 39:191-202.
- Arikan, H., Çiçek, K., 2010. Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish Herpetofauna. *Acta Herpetol.* 5(2):179-198.
- Arikan, H., Çiçek, K., 2014. Hematology of amphibians and reptiles: a review. *North-West. J. Zool.* 10(1):190-209.
- Blackburn, D.G. 2006. Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpetol. Monogr.* 20:131-146.
- Boers, K.L., Allender, M.C., Novak, L.J., Palmer, J., Adamovicz, L., Deem, S.L., 2019. Assessment of hematologic and corticosterone response in free-living eastern box turtles

- (*Terrapene carolina carolina*) at capture and after handling. Zoo Biol. 2019:1-10.
<https://doi.org/10.1002/zoo.21518>.
- Bonadiman, S.F., Miranda-Farlen, J.B., Ribeiro-Maria, L.S., Rabelo, G., Lainson, R., Silva, E.O., DaMatta, R.A., 2010. Hematological parameters of *Ameiva ameiva* (Reptilia: Teiidae) naturally infected with hemogregarine: confirmation of monocytosis. Vet. Parasitol. 171:146–150.
- Brenner, D., Lewbart, G., Stebbins, M., Herman, D.W., 2002. Health survey of wild and captive bog turtles (*Clemmys muhlenbergii*) in North Carolina and Virginia. J. Zoo Wildl. Med. 33(4):311–6.
- Canfield, P. 1998. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. Aust. Vet. J. 76(12):793-800.
- Crain, D.A., Guillette, L.J., Jr., 1998. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. Anim. Reprod. Sci. 53:77-86.
- Davis, A.K., Cook, K.C., Altizer, S., 2004. Leukocyte profiles in wild house finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. EcoHealth. 1:362-373.
- Davis, A.K., Maerz, J.C., 2011. Assessing stress levels of captive-reared amphibians with hematological data: implications for conservation initiatives. J. Herpetol. 45:40–44.
- Davis, A.K., Maney, D.L., 2018. The use of glucocorticoid hormones or leucocyte profiles to measure stress in vertebrates: What’s the difference? Methods Ecol. Evol. 9:1556-1568.
- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Funct. Ecol. 22:760-772.

- Davis, A.K., Keel, M.K., Ferreira, A., Maerz, J.C., 2010. Effects of chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Comp. Clin. Pathol.* 19:49-55.
- Davis, A.K., Ruyle, L.E., Maerz, J.C., 2011. Effect of trapping method on leukocyte profiles of black-chested spiny-tailed iguanas (*Ctenosaura melanosterna*): Implications for zoologists in the field. *ISRN. Zool.* 2011:8 pp. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.1302010.5402/2011/384825>.
- Day, R.D., Segars, A.L., Arendt, M.D., Lee, A.M., Peden-Adams, M.M., 2007. Relationship of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Environ. Health Perspect.* 115(10):1421-1428.
- De Miranda, E.P.B. 2017. The plight of reptiles as ecological actors in the tropics. *Front. Ecol. Evol.* 5:159.
- Dessauer, H.C. 1970. Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. In: *Biology of Reptilia* (Vol. 3). Gans, C., Parsons, T.S. (Eds.). Academic Press, London & New York. pp.1-72.
- Díaz de la Vega-Pérez A.H., Barrios-Montiel, R., Jiménez-Arcos, V.H., Bautista, A., Bastiaans, E., 2019. High-mountain altitudinal gradient influences thermal ecology of the mesquite lizard *Sceloporus grammicus*. *Can. J. Zool.* 97:659–668.
- Dos Santos, R. L., De Sousa-Correia, J.M., Dos Santos, E.M., 2021. Freshwater aquatic reptiles (Testudines and Crocodylia) as biomonitor models in assessing environmental contamination by inorganic elements and the main analytical techniques used: a review. *Environ. Monit. Assess.* 193:498. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09212-w>.
- Duguy, R. 1970. Numbers of blood cells and their variation. In: *Biology of Reptilia* (Vol. 3). Gans, C., Parsons, T.S. (Eds.). Academic Press, London & New York. pp. 93-109.

- Durán, F., Boretto, J.M., Fernández, J.B., Ibáñez-Molina, M., Medina, M.S., Ibarzüengoytía, N.R., 2019. Impact of immunological state on eco-physiological variables in one of the southernmost lizards in the world. *An. Acad. Bras. Cienc.* 91(4). <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190055>.
- Ekner, A., Sajkowska, Z., Dudek, K., Tryjanowski, P., 2011. Medical cautery units as a permanent and non-invasive method of marking lizards. *Acta Herpetol.* 6:229–236. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-9346.
- Fasola, E., Biaggini, M., Ortiz-Santaliestra, M.E., Costa, S., Santos, B., Lopes, I., Corti, C., 2021. Assessing Stress Response in Lizards from Agroecosystems with Different Management Practices. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 108(2):196-203.
- Fitch, H.S. 1978. Sexual size differences in the genus *Sceloporus*. *Univ. Kan. Sci. Bull.* 51:441-461.
- García, E., 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. México, D.F: Universidad Autónoma de México. 970-32-1010-4.
- Gibbons, J.W., Scott, D.E., Ryan, T.J., Buhlmann, K.A., Tuberville, T.D., Metts, B.S., Greene, J.L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S., Winne, C.T., 2000. The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians. *BioSci.* 50(8):653-666.
- Gómez-Benitez, A. 2023. Inestabilidad en el desarrollo y canalización de una comunidad de reptiles en un hábitat perturbado. Ph.D. Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Mexico. 155p.
- González-Morales, J.C., Rivera-Rea, J., Moreno-Rueda, G., Bastiaans, E., Díaz de la Vega-Pérez, A.H., Bautista-Ortega, A., Fajardo, V., 2021. To be small and dark is advantageous for gaining heat in mezquite lizards, *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 132:93–103.

- Guillette, L.J., Jr., Casas-Andreu, G., 1980. Fall Reproductive activity in the High-Altitude Mexican Lizard, *Sceloporus grammicus microlepidotus*. J. Herpetol. 14(2):143-147.
- Guillette, L.J., Jr., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R., 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. Environ. Health Perspect. 102(8):680-688.
- Hammerson, G.A., Vazquez Díaz, J., Quintero-Díaz, G.E., 2007. *Sceloporus grammicus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007. <http://www.iucnredlist.org>.
- Hernández-Salinas, U., Ramírez-Bautista, A., Leyte-Manrique, A., Smith, G.R., 2010. Reproduction and sexual dimorphism in two populations of *Sceloporus grammicus* (Sauria: Phrynosomatidae) from Hidalgo, Mexico. Herpetologica. 66(1):12-22.
- Jiménez-Cruz, E., Ramírez-Bautista, A., Marshall, J.C., Lizana-Avia, M., Nieto-Montes de Oca, A., 2005. Reproductive cycle of *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) from Teotihuacán, México. Southwest. Nat. 50(2):178-187.
- Keller, J.M., McClellan-Green, P.D., Kucklick, J.R., Keil, D.E., Peden-Adams, M.M., 2006. Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: comparison of a correlative field study and in vitro exposure experiments. Environ. Health Perspect. 114(1):70-76.
- Kuo, C.C., Yao, C.J., Lin, T.E., Liu, H.C., Hsu, Y.C., Hsieh, M.K., Huang, W.S., 2013. Tail loss compromises immunity in the many-lined skink, *Eutropis multifasciata*. Naturwissenschaften. 100:379-384.
- Lara-Gongora G. 2004. A new species of *Sceloporus* (Reptilia, Sauria: Phrynosomatidae) of the grammicus complex from Chihuahua and Sonora, Mexico. Bull. Md. Herpetol. Soc. 40:1-45.

- Lemos-Espinal, J.A., Ballinger, R.E., 1995. Comparative thermal ecology of the high-altitude lizard *Sceloporus grammicus*. *Can. J. Zool.* 73:2184–2191.
- Lemos-Espinal, J.A., Smith, G.R., Ballinger, R.E., 2002. Body temperature and sexual dimorphism of *Sceloporus aeneus* and *Sceloporus palaciosi* from Mexico. *Amphib. -reptil.* 23:114–119.
- Leyte-Manrique, A., Hernández-Salinas, U., Ramírez-Bautista, A., Mata-Silva, V., Marshall, J.C., 2017. Habitat use in eight populations of *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) from the Mexican Plateau. *Integr. Zool.* 12 (3):198-210.
- MacLeod, K.J., Langkilde, T., Heppner, J.J., Howey, C.A.F., Sprayberry, K., Tylan, C., Sheriff, M.J., 2021. Compensating for a stressful pregnancy? Glucocorticoid treatment during gravidity reduces metabolic rate in female fence lizards post-parturition. *Horm. Behav.* 136:105072. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.105072>.
- Mestre, A.P., Amavet, P.S., Siroski, P.A., 2017. Baseline values of immunologic parameters in the lizard *Salvator merianae* (Teiidae, Squamata). *Open Vet. J.* 7 (2):143–149.
- Motz, V.L., Lewis, W.D., Vardo-Zalik, A.M., 2014. Leukocyte profiles for western fence lizards, *Sceloporus occidentalis*, naturally infected by the malaria parasite *Plasmodium mexicanum*. *J. Parasitol.* 100:592-597.
- Montali, R.J. 1988. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds, and mammals). *J. Comp. Pathol.* 99:1-26. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(88\)90101-6](https://doi.org/10.1016/0021-9975(88)90101-6).
- Morici, L.A., Elsey, R.M., Lance, V.A., 1997. Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators, *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Zool.* 279(2):156–162.

- Nardini, G., Leopardi, S. Bielli, M., 2013. Clinical hematology in reptilian species. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 16:1–30. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2012.09.001>.
- Norris, K., Evans, M.R., 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav. Ecol.* 11:19-26.
- Ortega, A., Barbault, R., 1984. Reproductive Cycles in the Mesquite Lizard *Sceloporus grammicus*. *J. Herpetol.* 18(2):168-175.
- Ramírez-Bautista, A., Sites, J.W., Marshall, J.C., Cruz-Elizalde, R., Díaz-Marín, C.A., Hernández-Salinas, U., García-Rosales, A., 2019. Reproduction and sexual dimorphism in the viviparous lizard *Sceloporus palaciosi* (Squamata: Phrynosomatidae) from the Trans-Mexican Volcanic Belt, Mexico. *Acta Zool.* 1–14. <https://doi.org/10.1111/azo.12315>.
- Raxworthy C.J., Pearson, R.G., Zimkus, B.M., Reddy, S., Deo, A.J., Nussbaum, R.A., Ingram, C.M., 2008. Continental speciation in the tropics: contrasting biogeographic patterns of divergence in the *Uroplatus* leaf-tailed gecko radiation of Madagascar. *J. Zool.* 275:423-440.
- Read, J. L. 1998. Are geckos useful bioindicators of air pollution? *Oecologia.* 114:180-187.
- Saad, A.H., El Ridi, R., 1988. Endogenous corticosteroids mediate seasonal cyclic change in immunity of lizards. *Immunobiol.* 177:390–403.
- Sacchi, R, Scali, S., Cavirani, V., Pupin, F., Pellitteri-Rosa, D., Zuffi, M.A.L., 2011. Leukocyte differential counts and morphology from twelve European lizards. *Ital. J. Zool.* 78:418–426.
- Saint Girons, M.C. 1970. Morphology of the circulating blood cells. In: *Biology of Reptilia* (Vol. 3). Gans, C., Parsons, T.S. (Eds.). Academic Press, London & New York. pp. 73-91.

- Sites, J.W. Jr., Archie, J.W., Cole, C.J., Flores-Villela, O., 1992. A review of phylogenetic hypotheses for lizards of the genus *Sceloporus* (Phrynosomatidae): implications for ecological and evolutionary studies. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 213:1-110.
- Smyth, A.K., Smee, E., Godfrey, S.S., Crowther, M., Phalen, D., 2014. The use of body condition and haematology to detect widespread threatening processes in sleepy lizards (*Tiliqua rugosa*) in two agricultural environments. *R. Soc. Open Sci.* 1(4), 140257. <https://doi.org/10.1098/rsos.140257>.
- Sparkman, A.M., Bronikowski, A.M., Williams, S., Parsai, S., Manhart, W., Palacios, M.G., 2014. Physiological indices of stress in wild and captive garter snakes: Correlations, repeatability, and ecological variation. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 174:11–17.
- Stacy, B.A., Whitaker, N., 2000. Hematology and blood biochemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). *J. Zoo Wildl. Med.* Sep;31(3):339-47.
- Stacy, N.I., Alleman, A.R., Sayler, K.A., 2011. Diagnostic hematology of reptiles. *Clin. Lab. Med.* 31:87–108.
- Troiano, J.C., Vidal, J.C., Gould, J., Gould, E., 1997. Haematological reference intervals of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) in captivity. *Comp. Haematol. Int.* 1:109–112.
- Veiga, J.P., Salvador, A., Merino, S., Puerta, M., 1998. Reproductive effort affects immune response and parasite infection in a lizard: A phenotypic manipulation using testosterone. *Oikos* 82:313-318.
- Whitfield, S.M., Bell, K.E., Philippi, T., Sasa, M., Bolaños, F, Chaves, G., Savage, J.M., Donnelly, M.A., 2007. Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(20):8352-8356.

- Wilson, L.D., Mata-Silva, V., Johnson, J.D., 2013. A conservation reassessment of the reptiles of Mexico based on the EVS measure. *Amphib. Reptile Conserv.* 7(1):1-47.
- Wozniak, E.J., Kazacos, K.R., Telford, S.R., McLaughlin, G.L., 1996. Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian hosts. *Int. J. Parasitol.* 26:141–146.
- Zimmerman, L.M., Vogel, L.A., Bowden, R.M., 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J. Exp. Biol.* 213: 661-671.

Table 1. Means of the size of each type of leukocyte cell, as well as the length and width of the erythrocytes observed in *Sceloporus grammicus* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México. Length values are given in micrometers (μm). SE (standard error), n (number of cells measured).

	lymphocytes			monocytes			heterophils			eosinophils			basophils		
	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n
Cell diameter	8.12	± 0.26	20	12.9	± 0.36	20	14.8	± 0.21	20	11.3	± 0.48	20	10	± 0.17	20
	erythrocytes														
	length			width											
	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n									
Cell diameter	17.7	0.36	30	10.4	± 0.17	30									

Table 2. Correlations of each type of leukocyte cell with the size and weight of *Sceloporus grammicus* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México.

		lymphocytes	monocytes	heterophils	eosinophils	basophils	H/L
SVL	Pearson	-0.106	0.014	0.097	0.006	0.035	0.082
	n	47	47	47	47	47	47
	P	0.480	0.926	0.519	0.968	0.813	0.582
weight	Pearson	-0.193	0.144	0.212	0.090	-0.132	0.209
	n	47	47	47	47	47	47
	P	0.195	0.334	0.154	0.548	0.377	0.159

Table 3. Values obtained by ANOVA comparisons between each leukocyte cell types of *Sceloporus grammicus* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México.

		sum of squares	df	F	P
lymphocytes	between groups	0.119	3	5.195	0.004
	within groups	0.328	43		
	total	0.447	46		
monocytes	between groups	0.004	3	0.192	0.901
	within groups	0.273	43		
	total	0.277	46		
heterophils	between groups	0.29	3	11.14	<0.001
	within groups	0.373	43		
	total	0.663	46		
eosinophils	between groups	0.016	3	0.481	0.697
	within groups	0.485	43		
	total	0.501	46		
basophils	between groups	0.01	3	0.368	0.776
	within groups	0.37	43		
	total	0.38	46		
H:L ratio	between groups	0.986	3	14.27	<0.001
	within groups	0.99	43		
	total	1.976	46		

Table 4. Cellular proportions of the leukocyte profile in the *Sceloporus* genus and other species of lizards. * Proportion calculated using absolute cell counts. *Calculated value using cell ratio data.

	lymphocytes	monocytes	heterophils	eosinophils	basophils	H:L	
<i>S. grammicus</i>							This study
spring	47.75	9.71	20.59	8.58	13.37	0.44	
summer	59.97	9.88	7.14	6.91	16.10	0.12	
fall	60.01	9.06	8.22	6.60	16.12	0.15	
winter	52.39	10.11	13.07	9.83	14.60	0.25	
annual average	57.1	9.4	10.6	7.2	15.4	0.20	
<i>S. undulatus</i>	43.1*	17.9*	25.6*	4.1*	9.2*	0.60*	Wozniak <i>et al.</i> 1996
<i>S. poinsettii</i>	34.4*	17.2*	43.6*	1.2*	3.7*	1.27*	Wozniak <i>et al.</i> 1996
<i>S. occidentalis</i>							
males	79.3	10.3	5.6	3.8	1.0	0.07*	Motz <i>et al.</i> 2014
females	78.1	9.0	7.8	3.9	1.2	0.10*	Motz <i>et al.</i> 2014
<i>E. obsoletus</i>	26.4*	29.1*	23.6*	7.9*	13.0*	0.90*	Wozniak <i>et al.</i> 1996
<i>P. muralis</i>	63.0	0.40	15.5	13.5	7.4	0.25	Sacchi <i>et al.</i> 2011
<i>P. bocagei</i>	63.9	0.70	7.9	12.7	13.6	0.12	Sacchi <i>et al.</i> 2011
<i>P. sicula</i>	66.8	2.1	9.0	9.3	12.3	0.13	Sacchi <i>et al.</i> 2011

Figure captions.

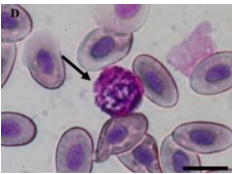
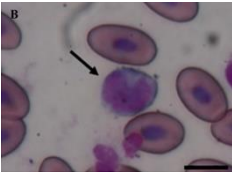
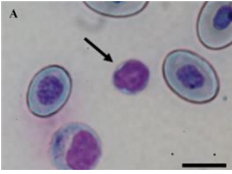
Figure 1. Photomicrographs of the five leukocyte cells of *Sceloporus grammicus* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México. The black line corresponds to 10 micrometers (μm). A) Lymphocyte, B) Monocyte, C) Heterophile, D) Eosinophil, E) Basophile.

Figure 2. Variation observed in leukocyte cells in a period of one year for the population of *Sceloporus grammicus* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México.

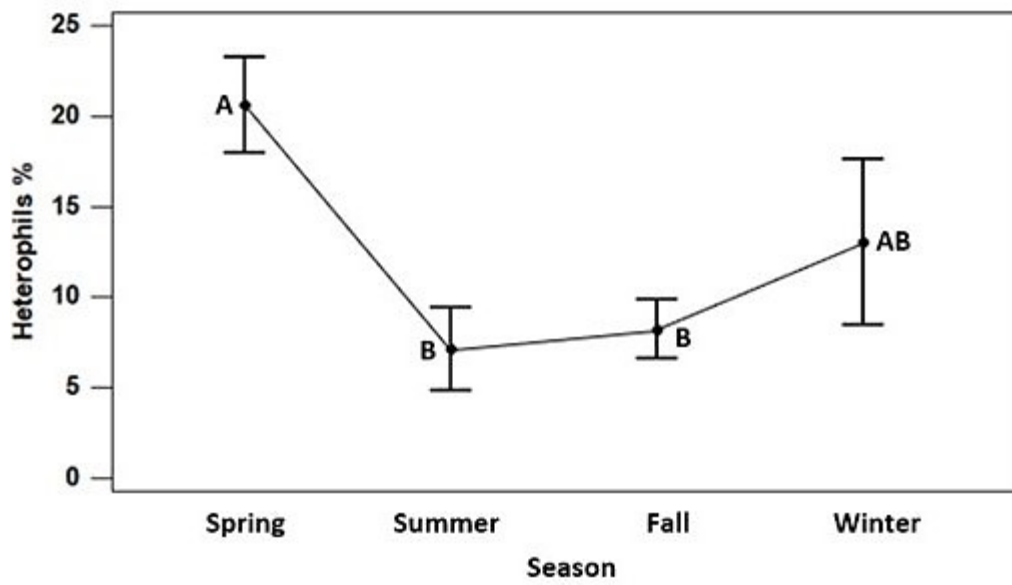
Figure 3. Seasonal variation of lymphocytes in *Sceloporus grammicus* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México. Different letters represent significant differences between seasons.

Figure 4. Seasonal variation of heterophils in *Sceloporus grammicus* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México. Different letters represent significant differences between seasons.

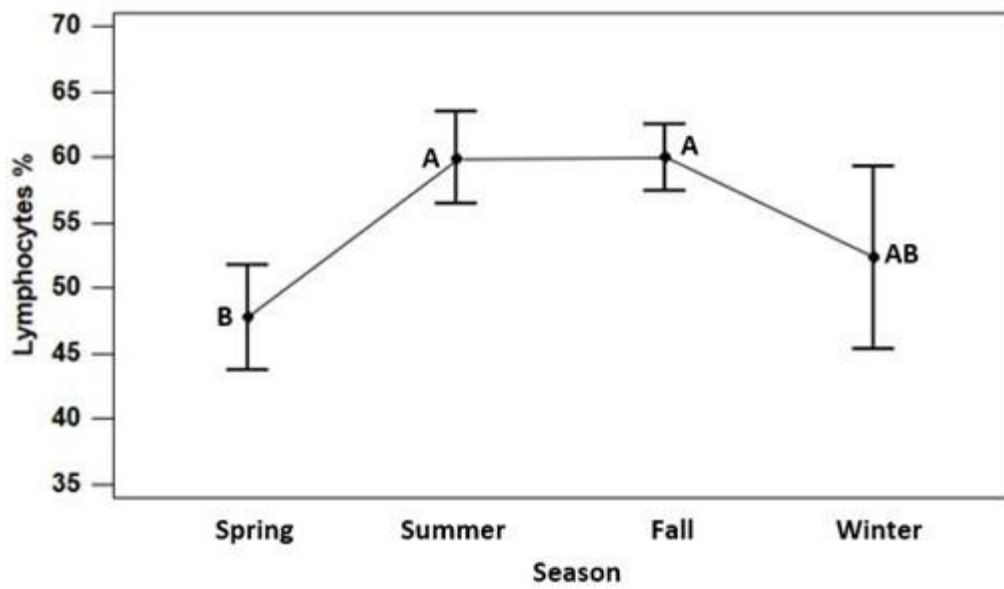
Figure 5. Seasonal variation of the heterophile/lymphocyte ratio in *Sceloporus grammicus* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México. Different letters represent significant differences between seasons.

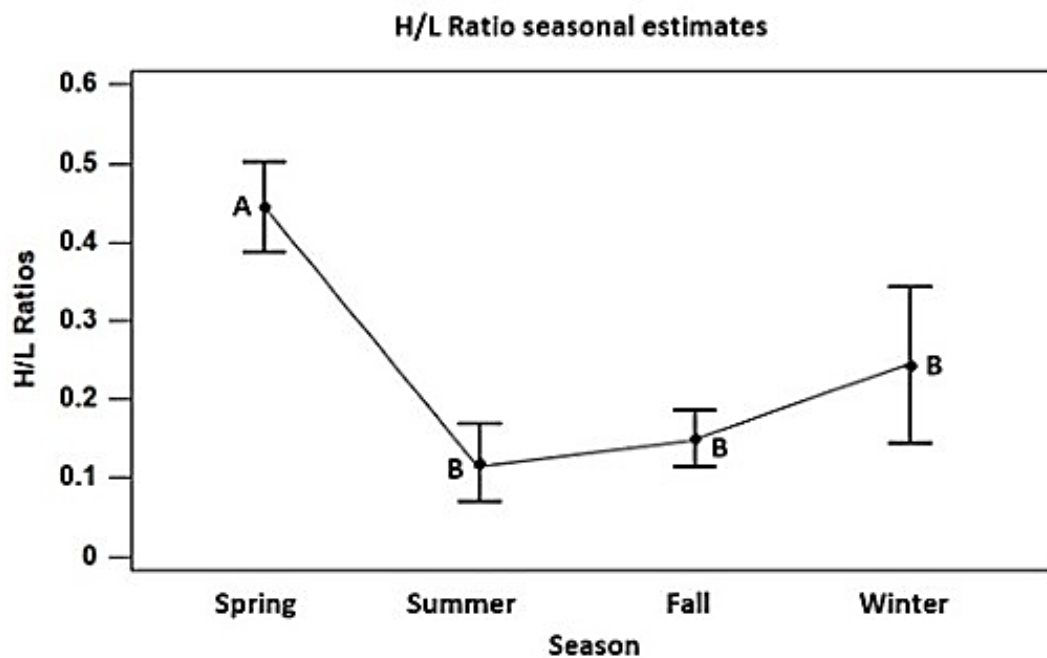
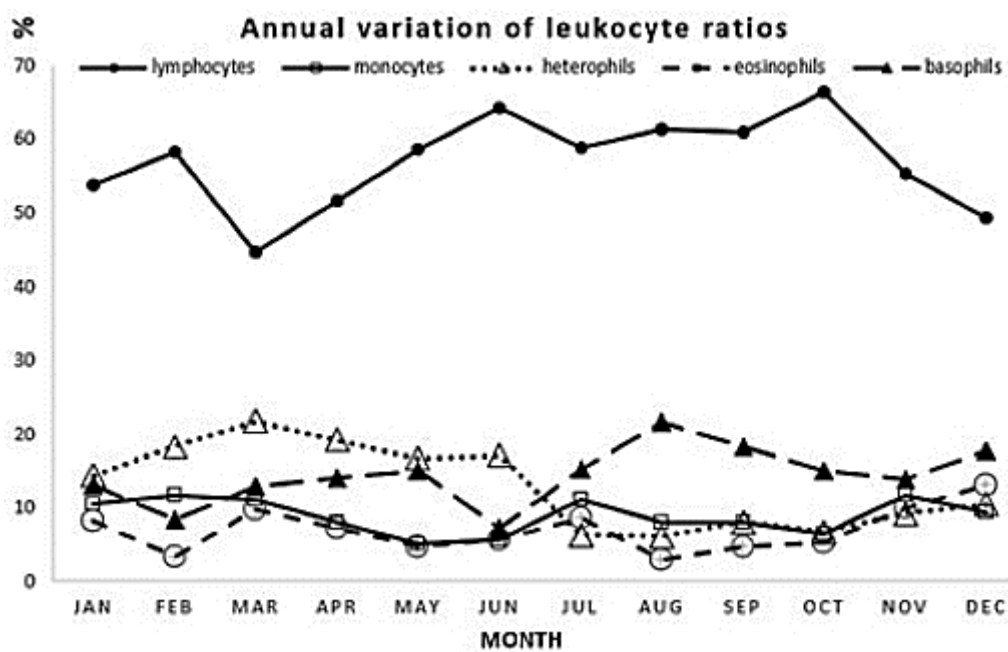


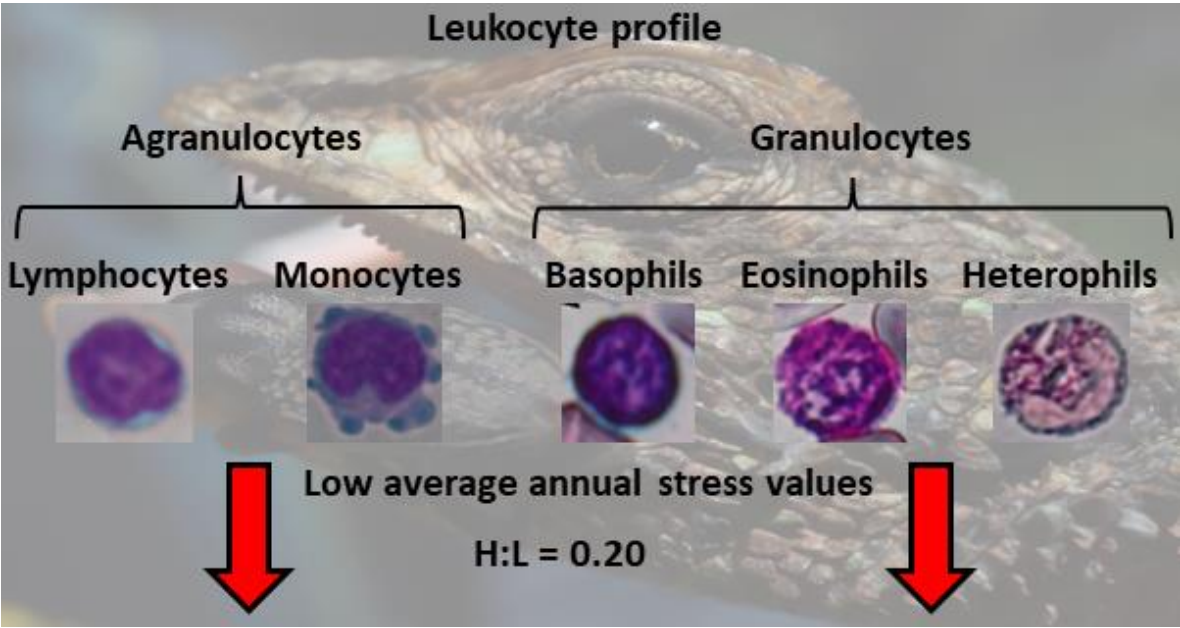
Heterophil seasonal estimates



Lymphocyte seasonal estimates







M. Sc. Daniel Sánchez Manjarrez

Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México C. P. 50000, México.

Telephone: +52 7225035349

e-mail: daniel_s_manjarrez@hotmail.com

Leukocyte profile and leukocyte morphology of *Thamnophis melanogaster* and *Conopsis lineata* inhabiting an agroecosystem.

DANIEL SÁNCHEZ-MANJARREZ 1, LAURA E. HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ 2, JOSÉ F. MÉNDEZ-SÁNCHEZ 3, JOSELE R. FLORES-SANTÍN 3, OSWALDO HERNÁNDEZ-GALLEGOS 1.

1 Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México C. P. 50000, México.

2 Laboratorio de Morfofisiología de la Reproducción, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México C. P. 50000, México.

3 Laboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México C. P. 50000, México.

Leukocyte profile of *T. melanogaster* and *C. lineata*.

Abstract. The proportions of leukocytes in the bloodstream are an important indicator of an organism's health status. Alterations in leukocyte profiles can indicate stress caused by environmental factors, injuries, diseases, and habitat changes. We counted and characterized the lymphocytes, monocytes, heterophils, eosinophils, and basophils from six individuals of The Blackbelly Garter Snake (*Thamnophis melanogaster*) and six individuals of The Lined Toluca Ground Snake (*Conopsis lineata*) that inhabit an agricultural environment located at Central Mexico. We examined blood samples under a microscope and identified each type of white blood cell. We calculated the relative abundances of each cell and determined the leukocyte profile. Additionally, we calculated the heterophil/lymphocyte ratio (H:L) to assess the population's stress levels. The values obtained for the H/L ratio in the studied populations could indicate high levels of stress, especially in *T. melanogaster*.

Keywords. hematology; stress; leukocytes; heterophiles; lymphocytes; snake.

The vertebrate immune system is a complex network of circulating cells and molecules, as well as tissues and organs (Zimmerman et al., 2010), and includes white blood cells (leukocytes), antibodies, and lysozymes (Zimmerman et al., 2010; Durán et al., 2019). The relative proportion of each type of leukocyte in peripheral blood is known as the leukocyte profile (Davis et al., 2004). The leukocyte profile gives relevant information about an organism's immune function (Davis et al., 2004; Davis et al., 2010). Studies of leukocyte profile in non-mammalian vertebrates are relatively new, and even knowledge of cell morphology in extant non-avian Sauropsida is not as wide as that of mammals (Zimmerman et al., 2010; Arikan & Çiçek, 2014). Extant non-avian Sauropsida constitute a heterogeneous group among vertebrates in terms of blood cell morphology and present considerable variations between orders, even within the same family (Arikan & Çiçek, 2014). In most organisms, an increase in the concentration of stress hormones, such as corticosterone, can alter the number of leukocytes in circulation, increasing the number of heterophils and decreasing lymphocytes (Davis et al., 2008). As a consequence, leukocyte profile may provide an estimate of stress levels (Davis et al., 2004) by calculating the heterophil: lymphocyte ratio (H:L) as a proxy measure of stress (Davis et al., 2004). The Blackbelly Garter Snake (*Thamnophis melanogaster*) is endemic to Mexico. It lives in temperate habitats between 1,158 and 2,545 meters above sea level (Rossman et al., 1996). It is a semi-aquatic species, although it can sometimes be found taking refuge in terrestrial areas near water bodies. However, its predilection for aquatic environments is reflected in its diet. It has been observed that this species feeds mainly on fish, leeches, crayfishes and tadpoles (Rossman et al., 1996). This species is considered endangered according to the IUCN Red List (Hammerson et al., 2007) and as threatened according to the Mexican Official NORMA (NOM-059-SEMARNAT-2010), while it is considered a species with high vulnerability to environmental degradation by Wilson et al. (2013), (EVS score of 15). The Lined Toluca Ground Snake (*Conopsis lineata*) is a colubrid endemic to Mexico, distributed in central and southern Mexico in pine, fir, and xeric vegetation forests, at altitudes of 1750 to 3100 meters above sea level (Goyenechea and Flores -Villega 2006). It is a viviparous species with cryptic habits and a burrowing tendency. Considered in the Least Concern category by the IUCN (Hammerson et al., 2007). It is a species with medium vulnerability to environmental degradation (EVS score of 13) (Wilson et al. 2013). In this study, we characterized and measured each type of white blood cell in samples obtained from individuals of *Thamnophis melanogaster* and *Conopsis lineata* that inhabit an agricultural environment located in the State of Mexico, México. Additionally, we determined the relative abundance of each type of white blood cell and the H:L ratio for the populations studied. In this way, we determined the leukocyte profile of the species studied and obtained an estimate of the stress levels of the population throughout the sampled period. This will help us understand the stress levels observed in the studied species during a known period in an anthropized area.

The study site is located at El Cerrillo, Piedras Blancas (19°25' to 19°26' N, 99°39' to 99°40' W), Toluca, State of Mexico, Mexico, at an altitude of 2,593 masl. We found evident

signs of anthropization in the study area, such as, loss of vegetation and tree coverage, use of big areas of land for agricultural purposes, application of agrochemicals, grazing of various species of livestock and the construction of concrete drains and water channels. The site presents an average annual temperature of 8.2°C and an annual precipitation of 738.6 mm with seasonal variation (Álvarez-Lopezello et al., 2016). Vegetation at the study site consists of grasses and scarce tree coverage (Álvarez-Lopezello et al., 2016). The climate is temperate with summer rains (Cwb) (García, 1973). We collected 6 individuals of *Thamnophis melanogaster* (4 males and 2 females) and 6 individuals of *Conopsis lineata* (1 male and 5 females) through weekly captures from June 2021 to June 2022. We sampled the study area along previously defined transects looking between rocks, cavities, vegetation, tree trunks, under plastics and residues found in the study site and on concrete structures. We caught the snakes by hand or using a snake hook. Immediately after capture, we registered the body temperature of the individuals with a quick-reading cloacal thermometer (Miller and Weber[®], L-K Industries, Houston, Texas). Immediately after taking the temperature, and within the first 5 minutes after the capture we obtained a blood sample from the ventral coccygeal vein using a 31G x 6mm needle attached to a syringe (Nardini et al., 2013).

We prepared a minimum of two blood smears per individual from this blood. A new and clean syringe was used for each individual. Blood collection did not surpass 0.02 mL per individual. We obtained the snout-vent length (SVL: from the tip of the snout to the cloacal region) measured to the nearest 1.0 mm, using a measuring tape and weight to the nearest 0.1g, with a 5 kg digital scale for each individual. We sexed the organisms by tail-base breadth examination and eversion of hemipenes. To identify all captured individuals, we used a micro-cautery (Bovie Medical Change-A-Tip, Bovie Medical Corporation., Clearwater, Florida, USA.) to apply ventral markings according to Winne et al. (2006). We also registered date and hour of capture, and every capture micro-site was geo-referenced (GPS data 3 m resolution) and described, to ensure release of the organisms at the exact locations they were collected. We stained the blood smears using Wright's stain for microscopic observation following a previously described manual counting procedure (Arikan & Çiçek, 2014).

We observed blood smears with an OLYMPUS© CX41 optic microscopy at 100X (immersion oil) magnification. All observations were done by one person (DS-M) to reduce any bias. We made the counts of lymphocytes, monocytes, heterophils, eosinophils, and basophils following a manual counting method known as “greek guard”, in which the observer picks a random field and moves the slide from top to bottom and from left to right throughout different field until 100 leukocytes or 150 fields are counted (Durán et al., 2019). We identified leukocytes according to previous morphological descriptions (Stacy et al., 2011; Nardini et al., 2013; Arikan & Çiçek, 2014) and characterized as heterophils, eosinophils, monocytes, basophils, and lymphocytes. We calculated leukocyte profiles expressed as a percentage of each type of white blood cell and we determinate the heterophil/lymphocyte ratio (H:L ratio). Additionally, through microscopic observation, we

characterized each type of white blood cell and took photomicrographs of each cell type by coupling a Canon EOS M50 Mark II mirrorless camera with an EF-M 15-45 IS STM Canon lens to the microscope eyepiece. Subsequently, a scale was established using a Neubauer camera and the images obtained were imported to the image processing program ImageJ to determine the size of each cell type. According to cell counts and abundances observed we calculated the proportion of lymphocytes, monocytes, heterophils, eosinophils, basophils, and the H:L ratios.

With microscopic analyses we characterized the five leukocyte cell types of *T. melanogaster* (Fig. 1) and *C. lineata* (Fig. 2). The lymphocytes were observed as small oval cells and, in some cases, round, with scant and homogeneous cytoplasm. Lymphocytes in *C. lineata* were more elongated and smaller than those observed in *T. melanogaster* samples. The stain used allowed the cytoplasm to be observed from a light gray to light blue color in both species. In some cases, pseudopodia could be observed in the periphery of their cytoplasm. Lymphocytes were the smallest cell observed in both species (Table 1 and 2). Monocytes were observed as cells of variable size with a round or spherical shape, in some cases even amoeboid due to the pseudopodia of their cytoplasm, the nucleus is relatively large and curved in shape, being able to occupy between 50% and 70% of the cell cytoplasm, monocytes with numerous inclusions in the cytoplasm stained with a color ranging from light gray to blue were observed in *T. melanogaster* samples, which coincides with the descriptions of azurophilic monocytes in reptiles of various species. Basophils were observed as small round cells with numerous cytoplasmic granules that often covered the nucleus, which in most cases could not be distinguished due to the highly chromophilic nature of the granules, these cells stain dark blue to purple. Eosinophils in this species are cells of variable size whose cytoplasm stains pink to light purple and large eosinophilic cytoplasmic granules are observed that stain dark magenta with a round or elongated nucleus, while heterophils are observed as large cells, with a round shape and numerous fusiform cytoplasmic granules, they present an eccentric and oval nucleus and were the largest white blood cells observed in the species (Table 1 and 2).

The average proportions for each type of leukocyte cell of adults *T. melanogaster* from the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México, were as follows: 36.98% (± 10.69 SD) lymphocytes, 6.99% (± 7.21 SD) monocytes, 26.02% (± 8.83 SD) heterophils, 10.54% (± 3.97 SD) eosinophils and 19.46% (± 7.07 SD) basophils. The average H/L ratio for this population was 0.82 (± 0.54 SD). Additionally, proportions for each type of leukocyte cell of adults *C. lineata* from the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México, were as follows: 49.23% (± 14.96 SD) lymphocytes, 5.32% (± 1.33 SD) monocytes, 21.88% (± 16.15 SD) heterophils, 10.06% (± 5.51 SD) eosinophils and 13.49% (± 5.90 SD) basophils. The average H/L ratio for this population was 0.56 (± 0.50 SD). The data obtained through this study allows us to observe the cellular proportions that determine the leukocyte profile in *Thamnophis melanogaster* and *Conopsis lineata* populations. After obtaining the cell proportions to determine the

leukocyte profiles, we observed that the white blood cell with the highest prevalence in the studied populations were lymphocytes, which is common in extant non-avian Sauropsid populations as seen in other studies where it has been observed that lymphocytes represent more than half of the leukocyte cells in these groups (Davis et al., 2011; Motz et al., 2014). In studies carried out with other species of the *Thamnophis* genus, it has also been observed that the most abundant white blood cells in the bloodstream are lymphocytes, followed by monocytes or azurophils, as observed in the study made by Wack et al. (2012), with *Thamnophis gigas* and *Thamnophis sirtalis*, however, the authors did not observe the presence of eosinophils in those species. Similar observations have also been recorded in *Thamnophis ordinoides*, where 58.76% of the white blood cells were lymphocytes while the heterophils in that species were registered as the cell with the lowest abundance (5.15%) (Bell and Gregory, 2014).

In *Thamnophis elegans* it has been observed that the H/L ratio of individuals increases during the time they spend in captivity and during pregnancy (Sparkman et al. 2014). A high value is observed for the H/L ratio of *T. melanogaster* in our study site (H/L ratio = 0.82), which could reflect high levels of stress in the studied population. In a previous study that determined the existence of fluctuating asymmetry using geometric morphometry in reptiles inhabiting this study site, it was concluded that *T. eques* and *T. scalaris* presented fluctuating asymmetry in the shape of the head, suggesting a potential adverse effect of environmental conditions in these species (Gómez-Benitez, 2023). This is consistent with the high levels of stress reflected in the leukocyte profile of *T. melanogaster* observed in this study.

In *C. lineata*, a moderate value is observed for the H/L ratio (H/L ratio = 0.56), however in both cases the prevalence of these values in the leukocyte proportions throughout the year would indicate a chronic stress process in the studied populations. Some studies describe the different effects that anthropization and agricultural landscapes can have on reptile communities, from the fragmentation of the distribution of species (González-Fernández et al., 2018), to pesticide poisoning (Simbula et al., 2021). It is known that in the study site agrochemicals are applied in the crop fields adjacent to the sampling areas. During the study we were able to observe episodes of human persecution on various species of non-avian sauropsids in the area due to the belief that they were venomous species, as well as multiple observations of dead non-avian sauripsids inside the concrete channels built for irrigation of crop areas. We suggest studies that allow to estimate the possible physiological effects on reptile communities derived from agricultural practices and the transformation of areas for agricultural purposes in the study site. Although the presence of hemoparasites was not analyzed in this study, signs that could evidence some infection present in leukocytes or erythrocytes were not visible during the microscopic observations in the species.

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship granted to DS-M for the realization of the project. Thanks also to the students of the Laboratorio de Herpetología de la Facultad de Ciencias, who contributed greatly to the field sampling. We carry out the sampling under the scientific collection permit issued by the Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) SGPA/DGVS/10352/21.

REFERENCES

- Álvarez-Lopezello, J., Rivas-Manzano, I.V., Aguilera-Gómez, L.I., González-Ledesma, M. (2016). Diversidad y estructura de un pastizal en El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México. *Rev. Mex. Biodivers.* 87:980-989.
- Arikan, H., Çiçek, K. (2014). Hematology of amphibians and reptiles: a review. *North-West. J. Zool.* 10(1):190-209.
- Bell, K.A.H. and Gregory, P.T. (2014). White blood cells in Northwestern Gartersnakes (*Thamnophis ordinoides*). *Herpetol. Not.* 7, 535-541.
- Davis, A.K., Cook, K.C., Altizer S. (2004). Leukocyte profiles in wild house finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. *Ecohealth.* 1:362-373.
- Davis, A.K., Maerz, J.C. (2011). Assessing stress levels of captive-reared amphibians with hematological data: implications for conservation initiatives. *J. Herpetol.* 45:40–44.
- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22:760-772.
- Davis, A.K., Keel, M.K., Ferreira, A., Maerz, J.C. (2010). Effects of chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Comp Clin Pathol.* 19:49-55.
- Durán, F., Boretto, J.M, Fernández, J.B, Ibáñez-Molina, M., Medina, M.S., Ibargüengoytía, N.R. (2019). Impact of immunological state on eco-physiological variables in one of the southernmost lizards in the world. *An. Acad. Bras. Cienc.* 91(4).
- García, E. (1973). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. México, D.F: Universidad Autónoma de México. 970-32-1010-4.
- Gómez-Benitez, A. 2023. Inestabilidad en el desarrollo y canalización de una comunidad de reptiles en un hábitat perturbado. Ph.D. Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Mexico. 155p.
- González-Fernández, A., Manjarrez, J., García-Vázquez, U., D’Addario, M., Sunny, A., 2018. Present and future ecological niche modeling of garter snake species from the Trans-Mexican Volcanic Belt. *PeerJ* 6, e4618 <https://doi.org/10.7717/peerj.4618>.
- Goyenechea, I., Flores-Villela, O. (2006). Taxonomic summary of *Conopsis*, Günther, 1858 (Serpentes: Colubridae). *Zootaxa* 1271(1):1–27.

- Hammerson, G.A., Vazquez Díaz, J., Quintero-Díaz, G.E. (2007). *Sceloporus grammicus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007. <http://www.iucnredlist.org>.
- Motz, V.L., Lewis, W.D., Vardo-Zalik, A.M. (2014). Leukocyte profiles for western fence lizards, *Sceloporus occidentalis*, naturally infected by the malaria parasite *Plasmodium mexicanum*. *J. Parasitol.* 100:592-597.
- Nardini, G., Leopardi, S., Bielli, M. (2013). Clinical hematology in reptilian species. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 16:1–30.
- Rossman, D. A., Ford, N. B., Seigel, R. A. (1996). *The Garter Snakes: Evolution and Ecology*. University of Oklahoma Press, Norman. 336 pp.
- Simbula, G., Vignoli, L., Carretero, M.A., Kaliontzopoulou, A., 2021. Fluctuating asymmetry as biomarker of pesticides exposure in the Italian wall lizards (*Podarcis siculus*). *Zoology*. 147, 125928. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2021.125928>.
- Sparkman, A. M., Bronikowski, A. M., Williams, S., Parsai, S., Manhart, W., & Palacios, M. G. (2014). Physiological indices of stress in wild and captive garter snakes: Correlations, repeatability, and ecological variation. *Comp. Biochem. Physiol. - Part A: Mol. Amp. Integr. Physiol.* 174, 11–17.
- Stacy, N.I., Alleman, A.R., Saylor, K.A. (2011). Diagnostic hematology of reptiles. *Clin. Lab. Med.* 31:87–108.
- Wack, R.F., Hansen, E., Small, M., Poppenga, R., Bunn, D., Johnson, C.K. (2012). Hematology and plasma biochemistry values for the giant garter snake (*Thamnophis gigas*) and valley garter snake (*Thamnophis sirtalis fitchi*) in the Central Valley of California. *J. Wildl. Dis.* 2012, 48, 307–313.
- Wilson, L.D., Mata-Silva, V, Johnson, J.D. (2013). A conservation reassessment of the reptiles of Mexico based on the EVS measure. *Amphib. Reptile. Conserv.* 7(1):1-47.
- Winne, C.T., Willson, J.D., Andrews, K.M., Reed, R.N. (2006). Efficacy of marking snakes with disposable medical cautery units. *Herpetol. Rev.* 37, 5254.
- Zimmerman, L.M., Vogel, L.A., Bowden, R.M. (2010). Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J. Exp. Biol.* 213: 661-671.

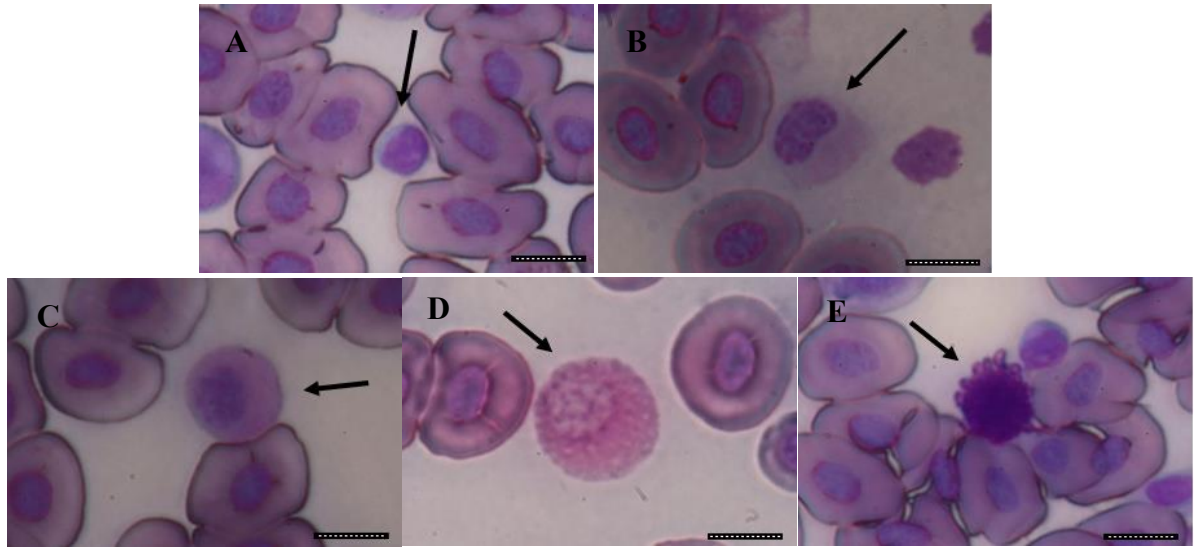


Figure 1. Photomicrographs of the five leukocyte cells of *Thamnophis melanogaster* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México. The black line corresponds to 10 micrometers (μm). A) Lymphocyte, B) Monocyte, C) Heterophile, D) Eosinophil, and E) Basophile.

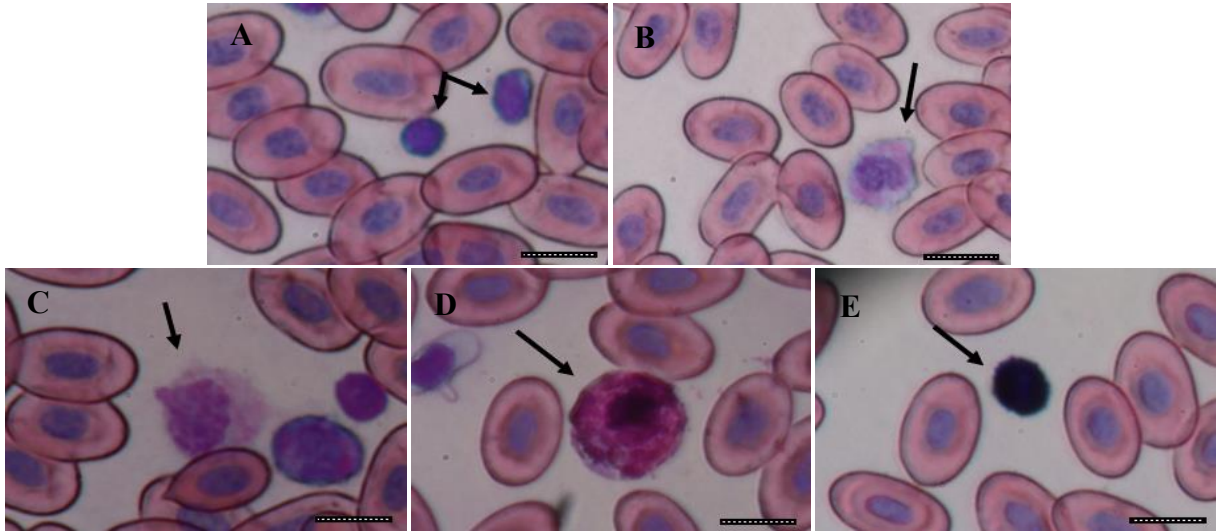


Figure 2. Photomicrographs of the five leukocyte cells of *Conopsis lineata* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México. The black line corresponds to 10 micrometers (μm). A) Lymphocyte, B) Monocyte, C) Heterophile, D) Eosinophil, and E) Basophile.

Table 1. Means of the size of each type of leukocyte cell, as well as the length and width of the erythrocytes observed in *Thamnophis melanogaster* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, Mexico. Length values are given in micrometers (μm). SE (standard error), n (number of cells measured).

	lymphocytes			monocytes			heterophils			eosinophils			basophils		
	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n
Cell diameter	9.04	± 0.21	20	13.66	± 0.37	20	16.63	± 0.30	20	17.04	± 0.51	20	10.70	± 0.25	20
Cell diameter	erythrocytes														
	length							width							
	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n
	18.84	± 0.60	30	14.35	± 0.45	30									

Table 2. Means of the size of each type of leukocyte cell, as well as the length and width of the erythrocytes observed in *Conopsis lineata* in the locality of El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico, México. Length values are given in micrometers (μm). SE (standard error), n (number of cells measured).

	lymphocytes			monocytes			heterophils			eosinophils			basophils		
	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n
Cell diameter	7.53	± 0.30	20	13.36	± 0.33	20	14.67	± 0.41	20	15.01	± 0.53	20	8.47	± 0.14	20
Cell diameter	erythrocytes														
	length							width							
	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n	\bar{x} (μm)	SE	n
	17.69	± 0.34	30	11.07	± 0.29	30									

**LIMB DEFORMITIES IN *AMBYSTOMA RIVULARE*
(CAUDATA: AMBYSTOMATIDAE), A MICROENDEMIC AND
THREATENED MEXICAN SALAMANDER**

**DANIEL SÁNCHEZ-MANJARREZ^{1,4}, JOSÉ FERNANDO MÉNDEZ-SÁNCHEZ², JOSELE RICARDO
FLORES-SANTÍN², JUSTIN LLOYD RHEUBERT³, AND OSWALDO HERNÁNDEZ-GALLEGOS¹**

¹Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México,
Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México C. P. 50000, México

²Laboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México,
Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México C. P. 50000, México

³Department of Biology, University of Findlay, 1000 North Main Street, Findlay, Ohio 45840, USA

⁴Corresponding author; e-mail: daniel_s_manjarrez@hotmail.com

Abstract.—Recent global declines and disappearances of amphibian populations have increased the need for information concerning the adversities affecting amphibian populations worldwide. Some of the most alarming cases include the appearance of high incidences of deformities in amphibian populations. Although data about what causes body deformities are inconclusive and information about the frequency of deformities in natural populations is scarce, studying the incidence and characteristics of deformities in salamander populations could serve as an early indicator of environmental disturbance. In this study, we report limb deformities in a population of Toluca Axolotl (*Ambystoma rivulare*), from the municipality of Amanalco de Becerra, Estado de México, México. We sampled 144 individuals and found cases of ectrodactyly, syndactyly, polydactyly, brachydactyly, hypoplasia, and polymyelia. The percentage of deformed individuals (21.5%) far exceeded expectations for healthy populations. This information is vital for health assessments of amphibian populations and the increasing reports of amphibian diseases and habitat degradation.

Key Words.—amphibian; brachydactyly; ectrodactyly; limbs; malformations; México; salamander

INTRODUCTION

Amphibians are useful indicators of habitat quality, including environmental alterations and the presence of some pollutants (Blaustein 1994; Blaustein and Wake 1995). Morpho-physiological features, such as highly permeable skin, shell-less eggs, and both aquatic and terrestrial life stages make them extremely susceptible to environmental changes, including fluctuations in temperature, precipitation, ultraviolet radiation, chemical disturbances, and anthropogenic wastes (Blaustein and Johnson 2003a,b), which can lead to deformities. Deformities in amphibians have worried specialists since detection and reports of limb abnormalities increased in the 1990s (Helgen 1997). Although deformities are not the result of a single cause and potentially are the result of a combination of environmental and anthropogenic factors, studies have associated deformities with predatory attempts by native and introduced species (Bohl 1997; Ballengée and Sessions 2009; Bowerman et al. 2010), parasitic infections (Sessions and Ruth 1990; Johnson et al. 2001a; Sessions et al. 1999), chemical contamination derived from anthropogenic practices (Bonin et al.

1997; Burkhart et al. 1998; Bridges 2000; Taylor et al. 2005; Gurushankara et al. 2007), exposure to ultraviolet radiation (Blaustein et al. 1997; Broomhall et al. 2000; Anzalone et al. 1998; Ankley et al. 2000, 2002), and cannibalism (Crump et al. 1992).

Incidence of deformities is suggested to be < 5% in a healthy population (Meyer-Rochow and Asashima 1988; Read and Tyler 1994; Tyler 1998) but reports of amphibians with deformities have increased significantly during the last three decades, and it has become increasingly common to observe large numbers of deformed organisms within a population (Ouellet 2000; Lannoo 2008; Johnson et al. 2010). In diverse studies, an increase in the number and severity of deformities in amphibian populations has been observed compared to past decades (Helgen et al. 2000; Hoppe 2000). In some populations, > 80% of individuals have deformities, including abnormal limb morphologies (including digit abnormalities), extra limbs, and reduced limbs (Alford and Richards 1999; Houlahan et al. 2000; Johnson et al. 2002).

Some deformities that occur during embryonic development might induce low hatching success and egg mortality (Blaustein et al. 1997; Robles-Mendoza

et al. 2009; Frías-Alvarez et al. 2010). The reported abnormalities include head (Hopkins et al. 2013; Guerra and Araóz 2016), tail (Henle et al. 2012; Hopkins et al. 2013; Romano et al. 2017), and numerous cases of malformed limbs in anuran and caudate species (Helgen et al. 2000; Williams et al. 2008; Ballengée and Sessions 2009; Hopkins et al. 2013; Romano et al. 2017). The most commonly observed deformities in salamanders are ectrodactyly (lost digits), brachydactyly (partial digits), and polydactyly (extra digits), all of which have been reported worldwide in numerous studies and affecting many species (e.g., Worthington 1974; Johnson et al. 2001b, 2006; Williams et al. 2008; Romano et al. 2017). Deformed organisms potentially have a lower rate of success capturing prey, avoiding predators, and mating (Blaustein et al. 1997; Johnson et al. 2006). Ultimately, deformities can lead to decreased survival; consequently, there is a need to determine the prevalence of deformities in amphibian populations and the potential impact on population declines (Sparling et al. 2003; Johnson et al. 2010).

México has a large diversity of amphibians and is ranked fifth among all nations for overall amphibian diversity, and second for diversity of species of salamanders (158 species of salamanders in its territory; <http://amphibiaweb.org/> [Accessed 10 February 2020]): 18 species of the genus *Ambystoma*, 16 of which are endemic (Parra-Olea et al. 2014), and 12 currently listed in the Red List of the International Union for Conservation of Nature (IUCN 2021). In México, relatively few studies report deformities in salamanders of the genus *Ambystoma*, especially the species distributed in the central states where habitat is increasingly threatened by anthropogenic activities, such as agriculture and clandestine logging (Frías-Álvarez et al. 2010). Cruz-Pérez et al. (2009) describe Tiger Salamanders (*A. tigrinum*) in the state of Querétaro, México, with polydactyly and either brachydactyly or ectrodactyly, and they suggest the use of agrochemicals, and possibly trematode infections, as possible causes for observed deformities. Soto-Rojas et al. (2017) observed Michoacan Stream Salamanders (*A. ordinarium*) with ectrodactyly, polydactyly, brachydactyly, and gill lesions. Furthermore, they reported that the probability of *A. ordinarium* presenting some morphological abnormality is inversely proportional to the quality of the habitat in which the organism develops (Soto-Rojas et al. 2017).

Barriga-Vallejo et al. (2015) analyzed the leukocyte profile (white blood cell count) of adult Toluca Axolotl (*A. rivulare*) at Amanalco de Becerra, Estado de México, México (the same population studied in this work). They reported that the population was in optimal health because the leukocyte profile was similar to those reported for other species within the genus.

Additionally, the authors indicated that they did not observe deformities in the population while the study was conducted; however, during a subsequent sexual dimorphism study in the same population, numerous cases of limb deformities were observed (Sánchez-Manjarrez 2017). In this study, we analyzed an *A. rivulare* population at Amanalco de Becerra, Estado de México, México, to evaluate the incidence of limb deformities, and further compared deformity rates between sexes. In addition, we compared our results to known incidences and types of deformities reported in other Ambystomatid salamander species.

MATERIALS AND METHODS

Site description.—The population studied is located in the municipality of Amanalco de Becerra, situated west of the Estado de México, México. The locality presents a temperate sub-humid climate with an average annual temperature of 14.5° C and an annual precipitation of 1140 mm (Comisión Nacional del Agua 2010). We sampled in the stream known as Los Hoyos, which is part of the Corral de Piedra micro basin and is adjacent to a trout (*Salmo* sp.) farm.

Study species.—*Ambystoma rivulare* is a Mexican microendemic species distributed in Michoacán, Estado de México and Guerrero at elevations above 2,800 m. The species is listed as Threatened by the Mexican Secretary of Environment and Natural Resources (http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010) and is categorized as Endangered by the IUCN (IUCN 2021). Additionally, it is considered a species with medium (13 points) vulnerability to environmental degradation according to the Environmental Vulnerability Score (EVS; Wilson et al. 2013). *Ambystoma rivulare* inhabits lotic water bodies and is present in Pine, Pine-oak, and Fir forests (Huacuz 2001; Casas-Andreu et al. 2004). Its restricted distribution is aggravated by the growth of human settlements and habitat disappearance (Woolrich-Piña et al. 2017), and populations are further impacted by emerging infectious diseases, such as that caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* (Frías-Álvarez et al. 2008).

Sampling methods.—We sampled twice a year, once during the rainy season (February–April) and again during the drought season (June–September) across four consecutive years (2015–2019). We visually located individuals along the river and searched the hollows on the riverbanks and captured salamanders with an aquatic dip net. Although sampling was intended to be unbiased, our sampling methods may have resulted in higher capture rates of deformed individuals with

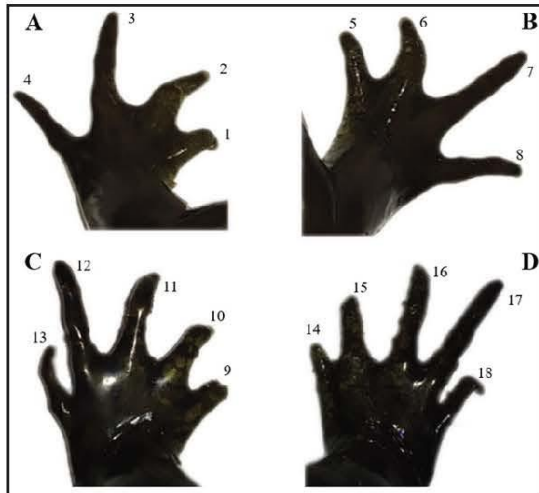


FIGURE 1. Numbers assigned to each digit of Toluca Axolotls (*Ambystoma rivulare*) limbs. (A) Left Forelimb, (B) Right Forelimb, (C) Left Hindlimb, (D) Right Hindlimb.

reduced mobility. We placed salamanders in 20-L plastic containers, previously filled with water from the stream, and then we recorded the following data for every individual: time of capture, sex, weight, snout-vent length (SVL), cloacal length (CLL), and cloacal width (CLW). We recorded all visible deformities of the organisms checking the dorsal, ventral, head, tail, and limb areas. We recorded specific limb deformity by assigning a number to each digit following an ascending order starting with the forelimbs (left to right) and then the hind limbs (left to right). We considered the digit closest to the body of the left forelimb (dorsal view) as digit number one and the digit furthest from the body of the right hindlimb as digit number 18 (Fig. 1). We classified deformities according to the studies carried out by Meteyer et al. (2000), Johnson et al. (2001b), and Thomson et al. (2014). Subsequently, we photographed dorsal, lateral, and ventral portions of all captured salamanders.

We used APHIS photo identification software to create a photographic database of the individuals collected based on the dorsal pigmentation to avoid repeated sampling (Moya et al. 2015; Romano et al. 2017). When we could not classify deformities by external observation, we transported the salamanders with inconclusive diagnoses to the laboratory where we x-rayed them to scrutinize the underlying bones to correctly classify the deformity. With data obtained from the deformity registry, we calculated the incidence of deformities in the population by the percentage of cases found. We also determined which limbs presented the greatest number of deformities and which were the most commonly affected digits. We calculated deformities per limb; if a salamander presented two

deformed limbs, we recorded two abnormalities, one for each affected limb.

Statistical analyses.—Prior to the statistical comparisons, we tested the homogeneity of variances with Levene’s test, as well as normality (Shapiro-Wilk) and goodness-of-fit (Kolmogorov-Smirnov). Because data were normally distributed and variances did not differ from equality, we used the Student’s *t*-test to determine if there were significant size differences between males and females, and between organisms affected by deformities and organisms that did not show deformities. We tested the interaction between sex and the presence of deformities using Chi-square with fourfold table. We performed the statistical analyses with the Statgraphics Centurion XVI software, and the software for scientific data analysis Past 3 (version 3.26). We used $\alpha = 0.05$ for all statistical tests.

RESULTS

We captured 144 adult *Ambystoma rivulare* from Amanalco de Becerra locality, 81 males and 63 females. We found significant differences in SVL ($t = 3.85$; $df = 143$, $P < 0.001$) between males ($n = 81$, mean SVL \pm standard deviation = 95.43 ± 6.31 mm; range, 80–114 mm) and females ($n = 63$, mean SVL = 99.42 ± 6.02 mm; range, 84–115 mm) with females being larger on average. We only observed deformities in the limbs and not in the head, tail, or the ventral and dorsal areas of the sampled individuals. We observed limb deformities in 31 individuals (21.5%), including 18 males (12.6%) and 13 females (8.9%); deformities were documented in 33 limbs belonging to 31 adult individuals, including two females with more than one limb affected (Table 1). The limb deformities identified included brachydactyly, ectrodactyly, polydactyly, hypoplasia, syndactyly, and polymelia (Figs. 2 and 3). The most commonly found deformities in this population were brachydactyly (41.9%) and ectrodactyly (29%; percentages of deformities found among the affected organisms). Brachydactyly was the most frequent deformity in males (44.4%) and females (38.5%). In males, the second most-commonly observed deformity was ectrodactyly (33.3%); however, in females, ectrodactyly, polydactyly, and hypoplasia were found in the same proportion (23.1%; Table 1). Additionally, 21 (14.5%) of the sampled individuals presented scars on the tail.

The SVL of males did not differ significantly between those with or without deformities ($t = 1.61$; $df = 80$, $P = 0.112$), or for females ($t = -1.48$; $df = 62$, $P = 0.146$) with and without deformities. The incidence of deformities between males and females also did not differ significantly ($X^2 = 0.07$, $df = 1$, $P = 0.781$). The

TABLE 1. Proportion of organisms with deformations and differential incidences of each type of deformity found in the population of Toluca Axolotls (*Ambystoma rivulare*) located in the municipality of Amanalco de Becerra, Estado de Mexico. Proportion of organisms with normal limbs and proportions of organisms with one and two affected limbs in the population of *A. rivulare* located in the municipality of Amanalco de Becerra, State of Mexico. Proportion of deformities found in each limb in the population of *A. rivulare* located in the municipality of Amanalco de Becerra. The abbreviation N/A = not affected.

	Males		Females		Total	
	n	%	n	%	n	%
Deformities						
Brachydactyly (partial digits)	8	44.4	5	38.5	13	41.9
Ectrodactyly (lost digits)	6	33.3	3	23.1	9	29
Polydactyly (extra digits)	2	11.1	3	23.1	5	16.1
Hypoplasia (reduced digits)	1	5.6	3	23.1	4	12.9
Syndactyly (merged digits)	2	11.1	0	0	2	6.5
Polymelia (extra limb)	0	0	1	7.7	1	3.2
Total Affected (Malformed)	18	22.2	13	20.6	31	21.5
Without Deformities	63	77.8	50	79.4	113	78.5
Total	81		63		144	
Number of Affected Limbs						
Normal Limbs	63	77.8	50	79.4	113	78.5
One Affected Limb	18	22.2	11	17.5	29	20.1
Two Affected Limbs	0	0	2	3.2	2	1.4
Total	81		63		144	
Affected Limbs						
Right Forelimb	6	33.3	3	23.1	7	22.6
Left Forelimb	1	5.6	3	23.1	4	12.9
Right Hindlimb	11	61.1	7	53.8	17	54.8
Left Hindlimb	N/A	N/A	1	7.7	1	3.2
Total	18		13		31	

right hind limb was most prone to deformities; more than half (54.8%) of the affected salamanders had some deformity of this limb (Table 1). Digit 16 was absent, presented a deformity, or loss of one or more phalanges in most cases (24.3%).



FIGURE 2. Deformities found in the extremities of Toluca Axolotls (*Ambystoma rivulare*) in the population of Amanalco de Becerra, México. (A) Brachydactyly (partial digits), (B) Ectrodactyly (lost digits), (C) Polydactyly (extra digits), (D) Hypoplasia (reduced digits), (E) Syndactyly (merged digits), (F) Polymelia (extra limb).

DISCUSSION

The prevalence of deformities in *A. rivulare* inhabiting the Los Hoyos stream in the municipality of Amanalco de Becerra, Estado de México, México, is more than four times higher than the expected 5% for a healthy population (Meyer-Rochow and Asashima 1988; Read and Tyler 1994). High prevalence of deformities also occurred in populations of *A. ordinarium* inhabiting the central portion of the Trans-Mexican Volcanic Belt in México (Soto-Rojas et al. 2017). In this region, 224 salamanders (44.6% of the sample) from 29 streams exhibited at least one abnormality, including partial gills (26%), ectrodactyly (23%), and shortened limbs (8.9%; Soto-Rojas et al. 2017). In comparison, deformities, including missing digits on the hind limbs (n = 2) and extra digits on the right hind limb (n = 1) were observed in only three of 60 (5%) Tiger Salamanders (*Ambystoma tigrinum*) examined from the state of Querétaro, México (Cruz-Pérez et al. 2009).

The most common limb deformities we found in *A. rivulare* were brachydactyly and ectrodactyly. Previous studies suggest that total or partial loss of digits can be caused by either predation attempts (Johnson et al. 2006; Ballengée and Sessions 2009) or cannibalism (Johnson



FIGURE 3. Radiograph showing the bone structures of the Polymelia case observed on the extremities of Toluca Axolotls (*Ambystoma rivulare*) in the population of Amanalco de Becerra, México. (Photographed by Daniel Sánchez-Manjarrez).

et al. 2006). The frequency of cannibalism can increase if a large number of young larvae coexist and feed in a small area (Thomson et al. 2014), either because of loss of suitable habitat or because of population isolation. High adult deformity rates (approximately 50%) also occur in the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) cultured in ex-situ breeding facilities where grouping individuals during the early stages of development favors cannibalism and biting episodes (Thompson et al. 2014). Also, limb injuries do not successfully regenerate in these conditions, which can mimic the appearance of deformities (Thompson et al. 2014). Potential predators of salamander larvae (e.g., odonata nymphs, belostomatids, and fish from the adjacent trout farm) are frequently observed in our study area. Additionally, *A. rivulare* is a microendemic species with a restricted distribution (Woolrich-Piña et al. 2017), increasing the likelihood of cannibalism in isolated populations with high larval densities, a notion supported by past reports of larger individuals consuming smaller ones (Lemos-Espinal et al. 1999). Observations of non-lethal cannibalistic episodes and bite lesions during feeding in various species of *Ambystoma* (Lemos-Espinal et al. 1999; Johnson et al. 2006; Thomson et al. 2014) suggest that population density in early stages of development play an important role in the prevalence of deformities in adult organisms among populations.

Polydactyly and polymyelia are deformities commonly associated with parasitosis in populations, mainly by trematodes of the genus *Riberoia* (Johnson et al. 2006). The incidence of these types of deformities in our study population is low, however, with only one case of polymyelia observed (Fig. 3). Thus, we doubt that parasitic infection is a major cause of the deformities in *A. rivulare* in Amanalco de Becerra, although studies examining the incidence of parasitic infection in the population are necessary to substantiate our claim.

Although organisms with limb deformities may

experience loss of mobility that impacts prey capture, dietary analyses of *A. rivulare* at this site reveal that salamanders with and without deformities do not differ in type of prey consumed (Sánchez-Manjarrez 2020). Additionally, the relative volume and the relative abundance of prey consumed does not differ between individuals with limb deformities compared to those without deformities (Sánchez-Manjarrez 2020). Thus, we suggest that the ability to capture prey is not negatively affected by the presence of deformities in our study population.

Water quality is a factor correlated with the presence of deformities in aquatic and semi-aquatic organisms (Soto-Rojas et al. 2017). We doubt, however, that the high prevalence of deformities in *A. rivulare* is the result of poor water quality. The Los Hoyos supports populations of Amphipoda, Trichoptera, and Ephemeroptera, which are bioindicators used to evaluate and monitor water quality because they require clean water (Stephenson and Mackie 1986; Dohet 2002; Pereira et al. 2012). We did not analyze water chemistry, however, and the presence of contaminants in the stream cannot be discounted, especially because of a trout farm near our study population. Pipes from the trout farm drain towards the stream and could be releasing contaminants that negatively affect water quality on-site and negatively impact embryonic development of *A. rivulare*. Thus, analyses of water quality in the Los Hoyos stream are warranted to determine if the high incidence of deformities in the population is, indeed, associated with chemical contamination. Future investigations could also address the potential for predation by fish that manage to escape from the farm. Introduction of trout in rivers inhabited by salamanders can reduce their growth rate by up to 85% and can reduce the proportion of organisms that complete metamorphosis by up to 65% (Kenison et al. 2016). Additionally, the introduction of trout can increase the natural concentrations of nitrogen in rivers, and this may have a negative correlation

with the number of salamanders present at the sites, a situation also linked to the predation of salamander larvae by fish (Tyler et al. 1998).

The possibility that organisms with deformities are easier to detect or observe, given their potentially reduced mobility (and associated restrictions to flight or concealment behaviors) is worth noting. Deformities leading to abnormal behavior can result in higher capture probabilities for deformed individuals and, thus, unusually high incidences of these abnormal salamanders in our samples. Most of the salamanders captured during our study, however, were found within cavities or vegetation on the riverbanks, where the observation of each organism before capture was not possible.

Further studies on other *A. rivulare* populations may be needed to understand if the percentage of limb deformities we detected is common in this species (i.e., the natural baseline rate) or if our findings are specific to the population and time studied. Also, comparative studies regarding *Ambystoma* deformity rates and water quality rates at the study site are necessary to understand the real impact that water quality can have on the appearance of deformities. This research represents one of the few studies conducted in México concerning the presence of deformities in salamander populations. Data obtained during this study can be used as a baseline for comparison for future studies concerning the types of deformities as well as the incidence of each deformity in salamanders of the genus *Ambystoma* in México. Also, this information may serve as an indication of declining environmental quality in the region. Our findings will further contribute information on what leads to increases in the incidence of deformities in endemic amphibian populations.

Acknowledgments.—Special thanks to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship granted to Daniel Sánchez Manjarrez for the realization of the project. Thanks also to students of the Laboratorio de Herpetología de la Facultad de Ciencias, who contributed greatly to the field sampling and to Los Encinos trout farm staff for allowing access to the facilities during the sampling. We carry out the sampling under the scientific collection permit issued by the Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) SGPA/DGVVS/10352/21.

LITERATURE CITED

- Alford, R.A., and S.J. Richards. 1999. Global amphibian declines: a problem applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:133–165.
- Ankley, G.T., S.A. Diamond, J.E. Tietge, G.W. Holcombe, K.M. Jensen, D.L. DeFoe, and R. Peterson. 2002. Assessment of the risk of solar ultraviolet radiation to amphibians. I. Dose-dependent induction of hindlimb malformation in the Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*). *Environmental Science and Technology* 36:2853–2858.
- Ankley, G.T., J.E. Tietge, G.W. Holcombe, D.L. DeFoe, S.A. Diamond, K.M. Jensen, and S.J. Degitz. 2000. Effects of laboratory ultraviolet radiation and natural sunlight on survival and development of *Rana pipiens*. *Canadian Journal of Zoology* 78:1092–1100.
- Anzalone, C. R., L.B. Kats, and M.S. Gordon. 1998. Effects of solar UV-B radiation on embryonic development in three species of lower latitude and lower elevation amphibians. *Conservation Biology* 12:646–653.
- Ballengée, B., and S.K. Sessions. 2009. Explanation for missing limbs in deformed amphibians. *Journal of Experimental Zoology* 312 B:770–779.
- Barriga-Vallejo, C., O. Hernández-Gallegos, I.H. Von-Herbing, A.E. López-Moreno, M.L. Ruiz-Gómez, G. Granados-González, M.V. Garduño-Paz, J.F. Méndez-Sánchez, J. Banda-Leal, and A.K. Davis. 2015. Assessing population health of the Toluca Axolotl *Ambystoma rivulare* (Taylor, 1940) from México using leukocyte profiles. *Herpetological Conservation and Biology* 10:592–601.
- Blaustein, A.R. 1994. Chicken Little or Nero's Fiddle? A perspective on declining amphibian populations. *Herpetologica* 50:85–97.
- Blaustein, A.R., and D.B. Wake. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American* 272:52–57.
- Blaustein, A.R., and P.T. Johnson. 2003a. The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1:87–94.
- Blaustein, A.R., and P.T. Johnson. 2003b. Explaining frog deformities. *Scientific American* 288:60–65.
- Blaustein, A.R., J.M. Kiesecker, D.P. Chivers, and R.G. Anthony. 1997. Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:13735–13737.
- Bohl, E. 1997. Limb deformities of amphibian larvae in Aufsess (Upper Franconia): attempt to determine causes. *Munich Contributions to Wastewater Fishery and River Biology* 50:160–189.
- Bonin, J., M. Ouellet, J. Rodrigue, J.L. Desgranges, F. Gagne, T.F. Sharbel, and L.A. Lowcock. 1997. Measuring the health of frogs in agricultural habitats subjected to pesticides. Pp. 258–270 *In* *Amphibians in Decline: Canadian Studies of a Global Problem*. Green, D.M. (Ed.). Society for the Study of Amphibians and Reptiles, St. Louis, Missouri, USA.
- Bowerman, J., P.T.J. Johnson, and T. Bowerman. 2010. Sublethal predators and their injured prey: linking aquatic predators and severe limb abnormalities in

- amphibians. *Ecology* 91:242–251.
- Bridges, C.M. 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the Southern Leopard Frog (*Rana sphenoccephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39:91–96.
- Broomhall, S.D., W.S. Osborne, and R.B. Cunningham. 2000. Comparative effects of ambient ultraviolet-B radiation on two sympatric species of Australian frogs. *Conservation Biology* 14:420–427.
- Burkhart, J.G., J.C. Helgen, D.J. Fort, K. Gallagher, D. Bowers, T.L. Propst, M. Gemes, J. Magner, M.D. Shelby, and G. Lucier. 1998. Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities. *Environmental Health Perspectives* 106:841–848.
- Casas-Andreu, G., R. Cruz-Aviña, and X. Aguilar-Miguel. 2004. Un regalo poco conocido de México al mundo: el ajolote o axolotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia). Con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones. *Ciencia Ergo Sum* 10:304–308.
- Crump, M.L., F.R. Hensley, and K.L. Clark. 1992. Apparent decline of the Golden Toad: underground or extinct? *Copeia* 1992:413–420.
- Cruz-Pérez, M.S., J.A. Rangel-Hernández, O. Roldan-Padron, G.A. Soto-Alonso, U. Padilla-García, and U.O. García-Vázquez. 2009. Presencia de malformaciones en *Ambystoma tigrinum* en Alameda del Rincón, Querétaro, México. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana* 17:92–96.
- Comisión Nacional del Agua. 2010. Normales climatológicas del Estado de México. Periodos 1981–2010. Comisión Nacional del Agua, Ciudad de México, México.
- Dohet, A. 2002. Are caddisflies an ideal group for the biological assessment of water quality in streams? *Nova Supplementa Entomologica* 15:507–520.
- Frías-Álvarez, P., V.T. Vredenburg, M. Familiar-López, J.E. Longcore, E. González-Bernal, G. Santos-Barrera, L. Zambrano, and G. Parra-Olea. 2008. Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians. *EcoHealth* 5:18–26.
- Frías-Álvarez, P., J.J. Zúñiga-Vega, and O. Flores-Villela. 2010. A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. *Biodiversity and Conservation* 19:3699–3742.
- Guerra, C., and E. Aráoz. 2016. Amphibian malformations and body condition across an agricultural landscape of northwest Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 121:105–116.
- Gurushankara, H.P., S.V. Krishnamurthy, and V. Vasudev. 2007. Morphological abnormalities in natural populations of common frogs inhabiting agroecosystems of central Western Ghats. *Applied Herpetology* 4:39–45.
- Helgen, J.C. 1997. The frogs of Granite Falls: frogs as biological indicators. Pp. 55–57 *In* Minnesota's Amphibians and Reptiles: Their Conservation and Status, Proceedings of a Symposium. Moriarty, J.J., and D. Jones (Eds.). Serpent's Tale Press, Excelsior, Minnesota, USA.
- Helgen, J.C., M.C. Gemes, S.M. Kersten, J.W. Chirhart, J.T. Canfield, D. Bowers, J. Haferman, R.G. McKinnel, and D.M. Hoppe. 2000. Field investigations of malformed frogs in Minnesota 1993–97. *Journal of the Iowa Academy of Science* 107:96–112.
- Henle, K., B. Mester, S. Lengyel, and M. Puky. 2012. A review of a rare type of anomaly in amphibians, tail duplication and bifurcation, with description of three new cases in European species (*Triturus dobrogicus*, *Triturus carnifex*, and *Hyla arborea*). *Journal of Herpetology* 46:451–455.
- Hopkins, G.R., S.S. French, and E.D. Brodie, Jr. 2013. Increased frequency and severity of developmental deformities in Rough-skinned Newt (*Taricha granulosa*) embryos exposed to road deicing salts (NaCl & MgCl₂). *Environmental Pollution* 173:264–269.
- Hoppe, D.M. 2000. History of Minnesota frog abnormalities: do recent findings represent a new phenomenon? *Journal of the Iowa Academy of Science* 107: 86–89.
- Houlahan, J.E., C.S. Findlay, B.R. Schmidt, A.H. Meyer, and S.L. Kuzmin. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404:752–755.
- Huacuz, E.D. 2001. Estado de Conservación del género *Ambystoma* en el estado de Michoacán, México. Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- International Union for the Conservation of Nature (IUCN). 2021. IUCN Red List of Threatened Species, 2021. <http://www.iucnredlist.org>.
- Johnson, P.T.J., K.B. Lunde, R.W. Haight, J. Bowerman, and A.R. Blaustein. 2001a. *Ribeiroia ondatrae* (Trematoda: Digenea) infection induces severe limb malformations in Western Toads (*Bufo boreas*). *Canadian Journal of Zoology* 79:370–379.
- Johnson, P.T.J., K.B. Lunde, E.G. Ritchie, J.K. Reaser, and A.E. Launer. 2001b. Morphological abnormality patterns in a California amphibian community. *Herpetologica* 57:336–352.
- Johnson, P.T.J., K.B. Lunde, E.M. Thurman, E.G. Ritchie, S.N. Wray, D.R. Sutherland, J.M. Kapfer, T.J. Frest, J. Bowerman, and A.R. Blaustein. 2002. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to

- amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs* 72:151–168.
- Johnson, P.T.J., E.R. Preu, D.R. Sutherland, J. Romansic, B. Han, and A.R. Blaustein. 2006. Adding infection to injury: synergistic effects of predation and parasitism on salamander limb malformations. *Ecology* 87:2227–2235.
- Johnson, P.T.J., M.K. Reeves, S. Krest, and A.E. Pinkney. 2010. A decade of deformities: advances in our understanding of amphibian malformations and their implications. Pp. 515–540 *In* *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. 2nd Edition. Sparling, D.W., G. Linder, C.A. Bishop, and S. Krest (Eds.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Press, Pensacola, Florida, USA.
- Kenison, E.K., A.R. Litt, D.S. Pilliod, and T.E. McMahon. 2016. Role of habitat complexity in predator-prey dynamics between an introduced fish and larval Long-toed Salamanders (*Ambystoma macrodactylum*). *Canadian Journal of Zoology* 243–249.
- Lannoo, M.J. 2008. *Malformed Frogs: The Collapse of Aquatic Ecosystems*. University of California Press, Berkeley, California, USA.
- Lemos-Espinal, J.A., R.E. Ballinger, and G.R. Smith. 1999. *Ambystoma rivulare* (Michoacan Stream Sirenon). Cannibalism. *Herpetological Review* 30:159.
- Meteyer, C.U., I.K. Loeffler, J.F. Fallon, K.A. Converse, E. Green, J.C. Helgen, S. Kersten, R. Levey, L. Eaton-Poole, and J.G. Burkhart. 2000. Hind limb malformations in free-living Northern Leopard Frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies. *Teratology* 62:151–171.
- Meyer-Rochow, V., and M. Asahima. 1988. Naturally occurring morphological abnormalities in wild populations of the Japanese Newt, *Cynops pyrrhogaster* (Salamandridae; Urodela; Amphibia). *Zoologischer Anzeiger* 221:7–80.
- Moya, O., P.L. Mansilla, S. Madrazo, J.M. Igual, A. Rotger, A. Romano, and G. Tavecchia. 2015. APHIS: a new software for photo-matching in ecological studies. *Ecological Informatics* 27:64–70.
- Ouellet, M. 2000. Amphibian deformities: current state of knowledge. Pp. 617–661 *In* *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. Sparling, D.W., G. Linder, and C.A. Bishop (Eds.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, Florida, USA.
- Parra-Olea, G., O. Flores-Villela, and C. Mendoza-Almeralla. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Suplemento 85:S460–S466.
- Pereira L.R., H.S.R. Cabette, and L. Juen. 2012. Trichoptera as bioindicators of habitat integrity in the Pindaiba River Basin, Mato Grosso (Central Brazil). *Annales de Limnologie*. 48:295–302.
- Read, J.L., and M.J. Tyler. 1994. Natural levels of abnormalities in the Trilling Frog (*Neobatrachus centralis*) at the Olympic Dam mine. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 53:25–31.
- Robles-Mendoza, C., C. García-Basilio, S. Cram-Heydrich, M. Hernández-Quiroz, and C. Vanegas-Pérez. 2009. Organophosphorus pesticides effect on early stages of the Axolotl *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Caudata). *Chemosphere* 74:703–710.
- Romano, A., D. Scinti Roger, and I. Avella. 2017. Body malformations in a forest-dwelling salamander, *Salamandrina perspicillata* (Savi, 1821). *Herpetological Conservation and Biology* 12:16–23.
- Sánchez-Manjarrez, D. 2017. Dimorfismo sexual en *Ambystoma rivulare* (Caudata: Ambystomatidae). B.Sc. Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. 43 p.
- Sánchez-Manjarrez, D. 2020. Variación en la dieta e incidencia de deformidades de *Ambystoma rivulare* (Caudata: Ambystomatidae), una especie microendémica y amenazada en México. M.Sc. Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. 69 p.
- Sessions, S.K., and S.B. Ruth. 1990. Explanation for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians. *Journal of Experimental Zoology* 254:38–47.
- Sessions, S.K., R.A. Franssen, and V.L. Horner. 1999. Morphological clues from multilegged frogs: are retinoids to blame? *Science* 284:800–802.
- Soto-Rojas, C., I. Suazo-Ortuño, J.A. Montoya-Laos, and J. Alvarado-Díaz. 2017. Habitat quality affects the incidence of morphological abnormalities in the endangered salamander *Ambystoma ordinarium*. *PLoS ONE* 12(8): e0183573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183573>.
- Sparling, D.W., S.K. Krest, and G. Linder. 2003. Multiple stressors and declining amphibian populations: an integrated analysis cause effect to support adaptive resource management. Pp. 1–7 *In* *Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressor Effects*. Linder, G., S.K. Krest, and D.W. Sparling (Eds.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry Press, Pensacola, Florida, USA.
- Stephenson, M., and G.L. Mackie. 1986. Lake acidification as a limiting factor in the distribution of the freshwater amphipod *Hyaella azteca*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43:288–292.
- Taylor, B., D. Skelly, L.K. Demarchis, M.D. Slade, D. Galusha, and P.M. Rabinowitz. 2005. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. *Environmental Health Perspectives* 113:1497–1501.

- Thomson, S., L. Muzinic, C. Muzinic, M.L. Niemiller, and S.R. Voss. 2014. Probability of regenerating a normal limb after bite injury in the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Regeneration* 1:27–32.
- Tyler, M.J. 1998. *Australian Frogs, a Natural History*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.
- Tyler, T., W.J. Liss, L.M. Gano, G.L. Larson, R. Hoffman, E. Deimling, and G. Lomnický. 1998. Interaction between introduced trout and larval salamanders (*Ambystoma macrodactylum*) in high-elevation lakes. *Conservation Biology* 12:94–105.
- Williams, R., D. Bos, D. Gopurenko, and A. DeWoody. 2008. Amphibian malformations and inbreeding. *Biology Letters* 4:549–552.
- Wilson, L.D., J.D. Johnson, and V. Mata-Silva. 2013. A conservation reassessment of the amphibians of Mexico based on the EVS measure. *Contribution to Special Mexico Issue. Amphibian & Reptile Conservation* 7:97–127.
- Woolrich-Piña, G., G.R. Smith, J.A. Lemos-Espinal, A.B. Zamora, and R. Montoya. 2017. Observed localities for three endangered, endemic Mexican ambystomatids (*Ambystoma altamirani*, *A. leorae*, and *A. rivulare*) from central Mexico. *Herpetological Bulletin* 139:12–15.
- Worthington, R. D. 1974. High incidence of anomalies in a natural population of Spotted Salamanders, *Ambystoma maculatum*. *Herpetologica* 30:216–220.



DANIEL SÁNCHEZ-MANJARREZ is a Ph.D. student at the Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca City, Mexico. He earned the B.S. and M.S. Biology degrees focused on herpetology from the same institution. His research interests involve ecology, conservation, and life-history analysis of reptiles and amphibians. His recent research is focused on hematological analysis, leukocyte profiles, and leukocyte characterization of reptile populations in anthropized areas. (Photographed by Laura Elena Hernández-Hernández).



JOSE FERNANDO MÉNDEZ-SÁNCHEZ is a Professor at the Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca City, Mexico, and he earned his Ph.D. at the University of North Texas, Denton, USA. He has been working with high altitude fish, amphibian, and reptile ecology and conservation since 1996. His recent research is focused on ecophysiology of vertebrates inhabiting extreme habitat, mainly on hypoxia and temperature effect over cardiorespiratory metabolism. (Photographed by José Fernando Méndez-Sánchez).



JOSELE FLORES-SANTÍN is Associate Professor at the Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca City, Mexico. He earned his Ph.D. at the University of North Texas, Denton, USA. He is interested in organismal physiology of birds, amphibians, and reptiles. His recent focus is on altitudinal adaptations and stress physiology in the valley of Toluca. (Photographed by Josele Flores-Santín).



JUSTIN RHEUBERT is an Assistant Professor of Teaching and Director of the Honors Program at the University of Findlay, Ohio, USA. His passion for comparative anatomy and herpetology developed under the tutelage of his previous mentors, Kevin Gribbins and David Sever. Justin focuses his attention towards enhanced teaching practices and mentoring undergraduate students in research endeavors. (Photographed by Dr. Abby Kalkstein).



OSWALDO HERNÁNDEZ-GALLEGOS is a Professor at the Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca City, Mexico, and he earned his Ph.D. at the Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City. His research since 1995 has focused on the ecology and evolution of parthenogenesis and reproductive cycles of lizards. Recently, he has been interested in the ecology and conservation of threatened amphibians and reptiles in México. (Photographed by Kevin M. Gribbins).