



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Incidencia dunha enfermidade emerxente de anfibios en Galicia: a infección por dermocistidios no limpafontes palmado (*Lissotriton helveticus*)

Incidencia de una enfermedad emergente de anfibios en Galicia: la infección por dermocistidios en el tritón palmeado (*Lissotriton helveticus*)

Incidence of an emerging disease of amphibians in Galicia: infection by dermocystidia in the palmate newt (*Lissotriton helveticus*)



David Dopereiro Domínguez

Junio, 2019

Director Académico: Pedro Galán Regalado



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

D. Pedro Galán Regalado, Doctor en Biología y Profesor Titular de Universidad del Área de Zooloxía del Departamento de Bioloxía de la Facultade de Ciencias,

INFORMA:

Que el presente Trabajo Fin de Grado titulado “Incidencia de una enfermedad emergente de anfibios en Galicia: la infección por dermocistidios en el tritón palmeado (*Lissotriton helveticus*)” que presenta el alumno David Dopereiro Domínguez, ha sido elaborado bajo mi supervisión y, considerándolo finalizado, doy mi visto bueno para su presentación y defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, 13 de junio de 2019

Fdo. Pedro Galán Regalado

Agradecimientos

Al Dr. Pedro Galán por todas esas horas conversando sobre herpetología, gracias por transmitirme tu pasión y conocimiento sobre estos animales. Al Dr. Julián Yáñez y a Rosa García Díaz por ayudarme con la obtención de las imágenes histológicas, las cuales aportan un enorme valor a este trabajo.

RESUMEN

Recientemente, una serie de enfermedades infecciosas en la piel de los anfibios se han atribuido a un grupo de organismos poco conocido, los dermocistidios (orden Dermocystida, clase Mesomycetozoea). En el año 2017, estos parásitos fueron detectados en una población de tritón palmeado (*Lissotriton helveticus*) en A Limia (Ourense, Galicia). Desde entonces, se han efectuado anualmente prospecciones en esa localidad para estudiar la incidencia del patógeno y conocer la dinámica de la enfermedad. Asimismo, en este trabajo se realizaron análisis patológicos e histológicos de individuos infectados para caracterizar al parásito, y se estudió la evolución de la enfermedad en la transición de la fase acuática a la fase terrestre de tritones enfermos. Las lesiones observadas mostraron una gran similitud con las descritas en otras poblaciones infectadas de tritón palmeado en Escocia y Francia, por lo que es probable que el organismo patógeno se trate de la misma especie, *Amphibiothecum meredithae*. De la misma manera, los tritones infectados parecen resolver la enfermedad al cambiar de fase de su ciclo biológico. En conclusión, la infección por dermocistidios puede llegar a presentar una elevada morbilidad, pero no es letal en la mayoría de las ocasiones. En la población infectada de A Limia, estos parásitos permanecen actualmente restringidos a un pequeño grupo de charcas.

Palabras clave: Dermocystida, Mesomycetozoea, *Amphibiothecum*, enfermedades emergentes, infección, piel, tritón palmeado, anfibios.

RESUMO

Recentemente, unha serie de enfermidades infecciosas na pel dos anfibios atribuíronse a un grupo de organismos pouco coñecido, os dermocistidios (orde Dermocystida, clase Mesomycetozoea). No ano 2017, estes parasitos foron detectados nunha poboación de limpafontes palmado (*Lissotriton helveticus*) na Limia (Ourense, Galicia). Dende entón, fixéronse mostraxes nesa localidade para estudar a incidencia do patóxeno e coñecer a dinámica da enfermidade. Así mesmo, neste traballo realizáronse análises patolóxicas e histolóxicas de individuos infectados para caracterizar ao parasito, e estudouse a evolución da enfermidade na transición da fase acuática á fase terrestre dos limpafontes enfermos. As lesións contempladas mostraron unha gran similitude coas descritas noutras poboacións infectadas de limpafontes palmado en Escocia e Francia, polo que é probable

que o organismo patógeno sexa da mesma especie, *Amphibiothecum meredithae*. Do mesmo xeito, os limpafontes infectados semellan resolver a enfermidade ao cambiar de fase do seu ciclo biolóxico. Para rematar, a infección por dermocistidios pode presentar unha elevada morbilidade pero non é letal na maioría das ocasións. Na poboación infectada da Limia, estes parasitos mantéñense actualmente restrinxidos a un pequeno grupo de charcas.

Palabras clave: Dermocystida, Mesomycetozoa, *Amphibiothecum*, enfermidades emerxentes, infección, pel, limpafontes palmado, anfibios.

ABSTRACT

Recently, a series of amphibian infectious skin diseases have been attributed to a poorly known group of organisms, the dermocystid (order Dermocystida, class Mesomycetozoa). In 2017, these parasites were found in a population of palmate newt (*Lissotriton helveticus*) in A Limia (Ourense, Galicia). Since then, surveys have been carried out annually in that locality to study the incidence of the pathogen and to understand the disease dynamics. Furthermore, pathological and histological analysis of infected newts were performed to characterize the parasite, and the development of the disease during the transition from the aquatic phase to the terrestrial phase was also studied. The observed lesions showed a high similarity to those described in other infected populations of palmate newt in France and Scotland, so it is likely that the pathogenic organism belongs to the same species, *Amphibiothecum meredithae*. Similarly, infected newts seem to resolve the disease by changing the phase of their biological cycle. In conclusion, the dermocystid infection may have a high morbidity, but it is not lethal in most cases. In the infected population of A Limia, these parasites are currently restricted to a small group of ponds.

Key words: Dermocystida, Mesomycetozoa, *Amphibiothecum*, emerging diseases, infection, skin, palmate newt, amphibians.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS	3
3.1. Zona de estudio	3
3.2. Especie estudiada.....	4
3.3. Metodología de muestreo.....	5
3.4. Análisis estadístico	7
3.5. Análisis histológico.....	7
3.6. Análisis de la enfermedad entre las fases acuática y terrestre	8
4. RESULTADOS	9
4.1. Muestras y análisis de datos.....	9
4.2. Autopsia y análisis histopatológico	13
4.3. Evolución de la enfermedad entre las fases acuática y terrestre.....	14
5. DISCUSIÓN.....	16
6. a. CONCLUSIONES	21
6. b. CONCLUSIÓN.....	21
6. c. CONCLUSIONS	22
7. BIBLIOGRAFÍA	23
Anexo I.....	27
Anexo II.....	28
Anexo III	31

1. INTRODUCCIÓN

Los anfibios constituyen un grupo de vertebrados formado por más de 8000 especies divididas en tres órdenes: Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras) y Gymnophiona (cecilias). El origen de los anfibios se remonta a hace más de 300 millones de años, pero en las últimas décadas han experimentado un descenso global de sus poblaciones (AmphibiaWeb, 2019).

Los primeros indicios de este declive se revelaron en el *First World Congress of Herpetology* en el año 1989, donde la comunidad científica advirtió que esta pérdida estaba ocurriendo de forma simultánea en diferentes partes del mundo. En años posteriores se realizaron evaluaciones de las poblaciones de anfibios, observándose que aproximadamente un tercio de las especies estaban amenazadas y que un 43% estaban experimentando alguna forma de disminución poblacional (Stuart *et al.*, 2004).

El tamaño de las poblaciones de los anfibios puede fluctuar de forma natural (Pechmann & Wilbur, 1994). Sin embargo, estos eventos estocásticos naturales no pueden explicar la rapidez ni la extensión de los declives (Blaustein & Wake, 1990; Stuart *et al.*, 2004). Existen numerosos factores que contribuyen al declive global de los anfibios, entre los que destacan la destrucción, alteración y fragmentación del hábitat (Cushman, 2006), los contaminantes químicos (Blaustein *et al.*, 2003; Relyea & Diecks, 2008), las especies invasoras (Adams, 2000; Vredenburg, 2004) y la sobreexplotación (Jennings & Hayes, 1985; Jensen & Camp, 2003). Estas circunstancias afectan tanto a anfibios como a otros grupos de organismos. No obstante, existen otros factores a los que los anfibios son más susceptibles e incluso pueden perjudicar a aquellos que ocupan hábitats inalterados. Estos elementos son el cambio climático (Pounds *et al.*, 2006), el incremento de la radiación ultravioleta-B (Blaustein *et al.*, 2003) y las enfermedades emergentes (Berger *et al.*, 1998; Daszak *et al.*, 2000; Cunningham *et al.*, 2008). Muchos de estos factores pueden establecer interacciones sinérgicas entre ellos, agravando los efectos que provocan sobre la supervivencia de los anfibios (Kiesecker & Blaustein, 1995; Pounds *et al.*, 2006).

Entre las enfermedades emergentes, la quitridiomycosis, producida por el patógeno fúngico *Batrachochytrium dendrobatidis*, y los ranavirus de la clase Iridoviridae, son los principales responsables de los eventos de mortalidad masiva en anfibios, que han llevado a la extinción a algunas especies (Duffus & Cunningham, 2010). Además, otros agentes como bacterias, trematodos y oomycetes patógenos (como *Saprolegnia ferax*), se han

relacionado con la mortalidad y la disminución de las poblaciones de anfibios (Carey, 1993; Johnson *et al.*, 2002; Kiesecker *et al.*, 2001).

En los últimos años, un número creciente de enfermedades infecciosas en la piel de los anfibios han sido atribuidas a un grupo de organismos poco conocido, los dermocistidios. Estos organismos pertenecientes a la clase Mesomycetozoa (orden Dermocystida) infectan a mamíferos, aves, peces y anfibios. En este último grupo, los géneros *Amphibiocystidium* y *Amphibiothecum* han sido identificados como los agentes infecciosos (Pascolini *et al.*, 2003; Feldman *et al.*, 2005).

En anfibios, las infecciones por dermocistidios se manifiestan por la presencia de lesiones cutáneas en forma de quistes o nódulos multifocales. Estos quistes, rellenos de endosporas, pueden estar acompañados de hemorragias subcutáneas extensas (González-Hernández *et al.*, 2010). Según Densmore & Green (2007), las infecciones por dermocistidios raramente causan mortalidad en sus hospedadores. No obstante, la información existente acerca de estos organismos y de su ciclo biológico es muy escasa.

En Europa, se han reportado infecciones por dermocistidios en poblaciones de anfibios de Italia (Pascolini *et al.*, 2003), Francia (González-Hernández *et al.*, 2010; Courtois *et al.*, 2013), Suiza (Guyénot & Naville, 1922), Checoslovaquia (Broz & Privora, 1952), Escocia (Fiegna *et al.*, 2017) y España (Galán & Dopereiro, 2017; Martínez-Silvestre *et al.*, 2017; Diego-Rasilla, 2017). Es de señalar que los primeros datos sobre la presencia de dermocistidios en anfibios ibéricos son muy recientes (año 2017).

En el presente trabajo se estudia cómo afecta esta enfermedad a una población natural de tritón palmeado (*Lissotriton helveticus*). La finalidad de este estudio es contribuir al conocimiento sobre esta afección y realizar un seguimiento de la incidencia de los dermocistidios en dicha población.

2. OBJETIVOS

1. Recopilar la información disponible de esta enfermedad que afecta a anfibios, sobre la que se poseen muy pocos datos en la actualidad.
2. Estudiar la incidencia de la enfermedad en una población natural de *Lissotriton helveticus*.
3. Detallar las lesiones originadas por estos parásitos, tanto a nivel macroscópico como histológico, y compararlas con las de otras poblaciones infectadas por dermocistidios.
4. Describir la evolución de la enfermedad entre las fases acuática y terrestre en individuos infectados.
5. Prospeccionar la zona como sistema de alerta temprana ante una posible expansión de la enfermedad.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Zona de estudio

El área de estudio se encuentra en la comarca de A Limia, cerca de la localidad de Saínza de Abaixo (ayuntamiento de Rairiz de Veiga, provincia de Ourense). Esta comarca está formada por la depresión morfotectónica semiendorreica de la antigua laguna de Antela y su periferia montañosa. El entorno presenta una morfología mayoritariamente de llanura, con baja capacidad de drenaje, experimentando inundaciones recurrentes en las estaciones lluviosas (Villarino *et al.*, 2017).

Por su situación geográfica y altitud, esta zona se clasifica en la región fitoclimática mediterránea subhúmeda de tendencia atlántica (clasificación de Allué). Presenta una fuerte tendencia continental que se manifiesta en una gran amplitud térmica, con medias de temperaturas mínimas absolutas de -6 °C y medias de las máximas absolutas superiores a los 30 °C (Villarino *et al.*, 2017).

En cuanto a la flora, la comarca de A Limia se encuentra en el límite entre las regiones Eurosiberiana y Mediterránea, por lo que exhibe influencia de ambas regiones biogeográficas. La vegetación clímax de este entorno está representada por la alianza Quercion Occidentale, orden Quercetalia Robori-Petraea, clase Quercetea Robori-Petraea (Bellot, 1966) y por la alianza Quercion Robori-Pyrenaicae, orden Quercetalia Robori-Petraea, clase Querco-Fagetea (Rivas-Martínez, 1987). Esta vegetación se encuentra en

regresión como consecuencia de los procesos de concentración parcelaria (Villarino *et al.*, 2017).

El área estudiada está conformada por una agrupación de charcas estacionales situadas en un herbazal delimitado por formaciones boscosas y una pista asfaltada (UTM 1x1 km: 29T NG 9657; 613 msnm). La cobertura vegetal es principalmente herbácea, mientras que la comunidad de matorral es dispersa y está integrada fundamentalmente por *Ulex europaeus*, *U. galli*, *Rubus* spp., *Calluna vulgaris* y *Erica* spp. Respecto a la vegetación arbolada de la zona, predominan *Betula pubescens*, *Quercus robur*, *Corylus avellana*, *Castanea sativa*, *Salix atrocinerea* y *Alnus glutinosa*.

Las charcas, originadas por depresiones naturales en el terreno, son de carácter estacional y presentan una buena cobertura vegetal. Se ha detectado *Potamogeton* spp. y *Baldellia ranunculoides* como vegetación acuática dominante. El espacio próximo al grupo de charcas es utilizado como pasto para el ganado, empleando como abrevaderos otras masas de agua.

3.2. Especie estudiada

La especie objeto de este estudio es el tritón palmeado (*Lissotriton helveticus*). En la península ibérica este urodelo ocupa fundamentalmente la franja norte, utilizando una gran variedad de medios acuáticos como marismas, charcas, arroyos y abrevaderos. Muestra preferencia por masas de agua con vegetación sumergida, pero no es muy exigente con la calidad de las aguas que ocupa (ver revisión bibliográfica en Diego-Rasilla, 2011). Se trata de una especie de carácter eurosiberiano, ocupando en Ourense una zona de transición bioclimática, por lo que su presencia en esta provincia es relativamente escasa.

La actividad de esta especie varía en función de la climatología, siendo habitual que presente un periodo de actividad acuática entre diciembre y junio y un periodo de actividad terrestre el resto del año (Galán & Fernández-Arias, 1993). La reproducción tiene lugar durante la fase acuática, ocurriendo en la zona de estudio entre los meses de febrero y marzo (datos propios). Entre la fase acuática y la fase terrestre los tritones experimentan una serie de cambios fisiológicos y morfológicos, entre los que resulta interesante destacar cambios estructurales en la piel.

Estos cambios no han sido descritos detalladamente en *Lissotriton helveticus*, pero sí en otras especies del género *Lissotriton* (Czopek, 1959). Se ha observado que la piel de los tritones en fase acuática es más lisa, delgada y con poco estrato córneo, mientras que los tritones en fase terrestre presentan una piel más gruesa y queratinizada, con numerosas verrugas diminutas en la superficie de la epidermis. Esta piel en fase terrestre impermeabiliza al animal en mucha mayor medida que la piel en fase acuática, que favorece procesos de intercambio gaseoso.

3.3. Metodología de muestreo

Desde el descubrimiento de esta población de *Lissotriton helveticus* afectada por dermatocistidios en el año 2017 (Galán & Dopereiro, 2017), se realizaron prospecciones en búsqueda de tritones infectados en los meses de febrero y marzo de los años 2018 y 2019. Para la realización de los muestreos se siguió la siguiente metodología:

1. Registro de la fecha, hora de inicio y fin del muestreo. Se describió la climatología durante la prospección, además de georreferenciar las zonas con un dispositivo GPS Garmin eTrex Legend.
2. Registro de datos del medio acuático según la bibliografía descrita en Galán (2017). Se tomaron los siguientes datos: (i) tipo de medio acuático, (ii) longitud y anchura, (iii) profundidad máxima, (iv) porcentaje de superficie cubierta por vegetación acuática y por vegetación terrestre sumergida, (v) movimiento del agua, (vi) permanencia de la charca y (vii) naturalidad.
3. Determinación de los valores de pH en los diferentes medios acuáticos de la zona de estudio. Se realizaron cuatro medidas en cada una de las masas de agua, para ello se utilizó un medidor WaterPro WK056. Debido a la falta de disponibilidad de un medidor de pH desde el comienzo del estudio, estos datos solo pudieron ser recogidos en una de las sesiones de muestreo.
4. Inspección visual del medio acuático y del medio terrestre adyacente en busca de anfibios.
5. Búsqueda de anfibios utilizando una red de mano (40 cm de diámetro). Se tuvo en cuenta el número de pasadas de red para estandarizar el esfuerzo de muestro y se

contabilizaron el número de ejemplares capturados de *Lissotriton helveticus* para tener una estima de la abundancia relativa de la especie.

6. Comprobación macroscópica de la presencia de lesiones cutáneas y registro de los ejemplares sanos y enfermos en función del sexo. Se describió la localización de las lesiones en el cuerpo de los animales infectados.

7. Categorización de las lesiones dérmicas en base a las manifestaciones clínicas observadas, tomando como referencia el trabajo de Clarke (2017), en el que se clasifican las lesiones originadas por dermocistidios en cuatro tipos:

- **Quistes:** lesiones discretas y de pequeño tamaño (~1mm) que no muestran inflamación.
- **Lesiones nodulares:** lesiones formadas por un quiste de mayor tamaño (2-5mm) o varios quistes pequeños agrupados.
- **Edemas:** inflamación originada por la acumulación de líquido que puede manifestarse de manera localizada o generalizada.
- **Úlceras:** roturas en la piel originadas por el desarrollo de los quistes.

8. Realización de fotografías de los ejemplares infectados y sanos de tritón palmeado, además de las otras especies encontradas. Para ello se empleó una cámara Nikon D3300 y un objetivo AF-S DX Micro NIKKOR 40mm f/2.8G.

Todas estas medidas se realizaron *in situ*, llevando a cabo las acciones necesarias para minimizar el estrés de los animales y con los permisos pertinentes expedidos por la Xunta de Galicia, Consellería de Medio Ambiente e Ordenación do Territorio (número de expediente: EB-003/2018).

Puesto que inicialmente los tritones infectados solo fueron encontrados en una charca y la zona de estudio abarca también varios medios acuáticos circundantes, se tomaron precauciones para evitar una posible contaminación. Estas medidas de prevención consistieron en comenzar los muestreos desde los medios acuáticos más alejados a la charca infectada e ir acercándose progresivamente, además de la utilización de un segundo par de botas de goma y otra red de mano en la charca infectada.

Una vez finalizados los muestreos, todo el material utilizado fue desinfectado utilizando desinfectante Virkon®S.

3.4. Análisis estadístico

La recopilación de datos se realizó en varias jornadas de muestreo entre los años 2018 y 2019. En la jornada del 30/03/2019 el tamaño de muestra obtenido fue notablemente mayor que en el resto, por lo que se realizaron los análisis estadísticos únicamente a partir de los datos extraídos de esta sesión. De esta manera se evitó la pseudoreplicación de los datos por recapturas de individuos.

Se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de la enfermedad entre charcas, para ello se construyeron tablas de contingencia y se realizó una prueba χ^2 aplicando la corrección de Yates. Posteriormente, se analizaron los residuos de la prueba para determinar si las frecuencias observadas eran más altas o más bajas que las esperadas. En ningún caso las frecuencias esperadas fueron <5 .

Para comprobar si los machos y las hembras infectados tenían el mismo número medio de lesiones o no, se realizó la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon aplicando la corrección por continuidad. Previamente se comprobó la condición de normalidad mediante el test Shapiro. Para todos los análisis, el nivel de significación estadística utilizado fue de 0,05.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el entorno R 3.6.0 (R Core Team, 2019).

3.5. Análisis histológico

Una hembra adulta de *Lissotriton helveticus* que mostraba numerosas lesiones cutáneas por todo el cuerpo fue eutanasiada con la intención de realizar cortes histológicos de los quistes para su observación al microscopio óptico (expediente de permiso: EB-072/2018). Para realizar este procedimiento el tritón fue anestesiado sumergiéndole en una solución de metanosulfonato de triclaína (MS-222). A continuación, fue sacrificada y se realizó una autopsia del ejemplar con el propósito de buscar quistes internos, dado que en ciertas ocasiones se han localizado quistes en el hígado de tritones infectados (Pascolini *et al.*, 2003; Feldman *et al.*, 2005; Raffel *et al.*, 2008; González- Hernández *et al.*, 2010; Fiegna *et al.*, 2017).

Las muestras de los quistes fueron preservadas en fijador Bouin para su procesado. Se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente (80%, 96% y 100%) y se aclararon

con xileno para su posterior inclusión en parafina. Los tejidos fueron seccionados con un grosor de 12 μm y preparados para una tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Para realizar la tinción se siguieron los protocolos estandarizados descritos en Feldman & Wolfe (2014).

Las imágenes microscópicas fueron realizadas con un microscopio Nikon Eclipse 90i y una cámara Olympus DP71.

3.6. Análisis de la enfermedad entre las fases acuática y terrestre

Con el objetivo de recopilar información acerca de cómo evoluciona la sintomatología de la enfermedad entre las fases acuática y terrestre, se capturó un macho de *L. helveticus* y se observó la transición entre fases en cautividad.

El ejemplar fue retenido en un terrario a temperatura ambiente y en condiciones de humedad. El espacio que ocupaba estaba dividido en dos zonas, una zona acuática y una zona terrestre cubierta por musgo. Los cambios de agua se realizaron cada 5 días y las aguas residuales fueron desinfectadas con Virkon®S de manera previa a su eliminación. El alimento proporcionado consistió en lombrices vivas, las cuales eran suministradas cada dos días.

Se efectuaron reconocimientos diarios para observar el estado del tritón en los que se realizaron fotografías para registrar la evolución del mismo. Finalizada la transición a fase terrestre el animal fue sacrificado siguiendo las recomendaciones descritas por la Comisión Europea para la eutanasia de animales utilizados en experimentación (Close *et al.*, 1996). Expediente de permiso para su eutanasia: EB-072/2018, Xunta de Galicia.

4. RESULTADOS

4.1. Muestreos y análisis de datos

Inicialmente, sólo se detectaron tritones infectados en uno de los medios acuáticos examinados. Esta masa de agua (charca 1) se clasifica en el tipo <<charcas estacionales en herbazales húmedos no higroturbosos>> descrito en Galán (2017). La charca presenta una superficie de 20 m² con una profundidad máxima de 60 cm. La cobertura vegetal es abundante, estando representada en un 60% por vegetación acuática y en un 40% por vegetación terrestre sumergida. Estas dimensiones pueden experimentar cambios en función de las precipitaciones. Se trata de un medio acuático natural, con corriente nula y de carácter estacional.

Como se ha descrito con anterioridad, la zona de estudio está constituida por un grupo de charcas situadas en un herbazal. En todos los muestreos realizados en los últimos tres años, sólo se encontraron tritones infectados en la charca 1, pero en la última sesión de muestreo del año 2019 (30 de marzo) se observaron ejemplares infectados en varios medios acuáticos circundantes. Estas masas de agua muestran características similares a la charca dónde inicialmente se descubrieron, con variaciones en su superficie, profundidad máxima, y proporción de vegetación acuática y vegetación terrestre sumergida (ver Anexo I y Anexo II).

En lo referente a los valores de pH, se obtuvieron medidas similares en todos los medios acuáticos de la zona de estudio. Los datos se registraron el día 30/03/2019 y el pH resultó ser ligeramente ácido, con valores que oscilaron entre 6,1 y 6,6.

En todas las sesiones de muestreo se detectaron tritones infectados por dermocistidios. Estos tritones mostraron lesiones cutáneas con diferentes niveles de afección, desde unos pocos quistes hasta nódulos multifocales con hemorragias subcutáneas extensas (Figura 1a). Los quistes presentaban una forma esférica con un color blanquecino-grisáceo que, en función de su ubicación y abundancia, otorgaban al animal un aspecto deformado. En algunas ocasiones, se observaron ejemplares que acompañaban estas lesiones quísticas con edemas severos por todo el cuerpo (Figura 1b).



Figura 1: a) Macho de *Lissotriton helveticus* infectado por dermatocistidios. Se aprecian quistes dérmicos extendidos por todo el cuerpo junto con hemorragias locales. b) Hembra de la misma especie que presenta un edema severo generalizado además de los quistes. Fotos: David Dopenreiro.

La prevalencia de estas lesiones en la charca 1 muestra una gran variación entre las diferentes jornadas, oscilando entre un 5,3% y un 100% (Tabla 1). La abundancia relativa de la especie en la misma charca también muestra una gran fluctuación, capturándose desde 4 individuos en 35 pasadas de red hasta 151 individuos con el mismo número de pasadas de red (Tabla 1).

Jornada de muestreo	Hembras capturadas	Machos capturados	Total capturados	Hembras infectadas	Machos infectados	Total infectados
24/02/2018	2	2	4	2 (100%)	2 (100%)	4 (100%)
17/03/2018	5	3	8	4 (80%)	3 (100%)	7 (87,5%)
02/02/2019	14	5	19	1 (7,1%)	0 (0%)	1 (5,3%)
24/02/2019	23	13	36	4 (17,4%)	7 (53,8%)	11 (30,5%)
30/03/2019	78	73	151	52 (66,7%)	49 (67,1%)	101 (66,9%)

Tabla 1: Datos obtenidos en la charca 1. Número de ejemplares de *Lissotriton helveticus* capturados, clasificados en función del sexo y de la presencia de la infección, durante las diferentes sesiones. Entre paréntesis se indica la prevalencia de las lesiones.

En la jornada de muestreo del día 30 de marzo de 2019 se localizaron ejemplares infectados en las charcas circundantes. Este día, la prevalencia de la enfermedad en los medios acuáticos adyacentes fue de un 50%, en comparación con la charca 1 que fue de un 66,9% (Tabla 2).

Charca	Hembras capturadas	Machos capturados	Total capturados	Hembras infectadas	Machos infectados	Total infectados
1	78	73	151	52 (66,7%)	49 (67,1%)	101 (66,9%)
Circundantes	28	30	58	14 (50%)	15(50%)	29 (50%)
TOTAL	106	103	209	66 (64,7%)	64 (59,8%)	130 (62,2%)

Tabla 2: Datos obtenidos del muestreo del 30/03/19. Número de ejemplares de *Lissotriton helveticus* capturados, clasificados en función del sexo y de la presencia de la infección. Entre paréntesis se indica la prevalencia de las lesiones.

Al realizar los análisis estadísticos observamos que las diferencias de prevalencia entre la charca 1 y el conjunto de charcas circundantes, son estadísticamente significativas ($\chi^2=4,39$; p-valor=0,036). Al comparar los valores residuales podemos observar que las frecuencias observadas fueron más altas que las esperadas para los individuos enfermos de la charca 1 y para los ejemplares sanos de las charcas circundantes (Tabla 3).

Charcas \ Tritones	Enfermos	Sanos
1	0,73	-0,937
Circundantes	-1,178	1,511

Tabla 3: Valores residuales de la prueba χ^2 .

Las lesiones de los tritones se localizaron en mayor proporción en la región dorsolateral del cuerpo, seguidas de la cola y, en menor medida, las otras regiones del cuerpo (Figura 2). Dentro de las lesiones observadas, los quistes fueron registrados en mayor número, representando el 94% de todas las lesiones descritas. El promedio de las lesiones por individuo fue menor en machos (3,4 lesiones/individuo) que en hembras (3,9 lesiones/individuo).

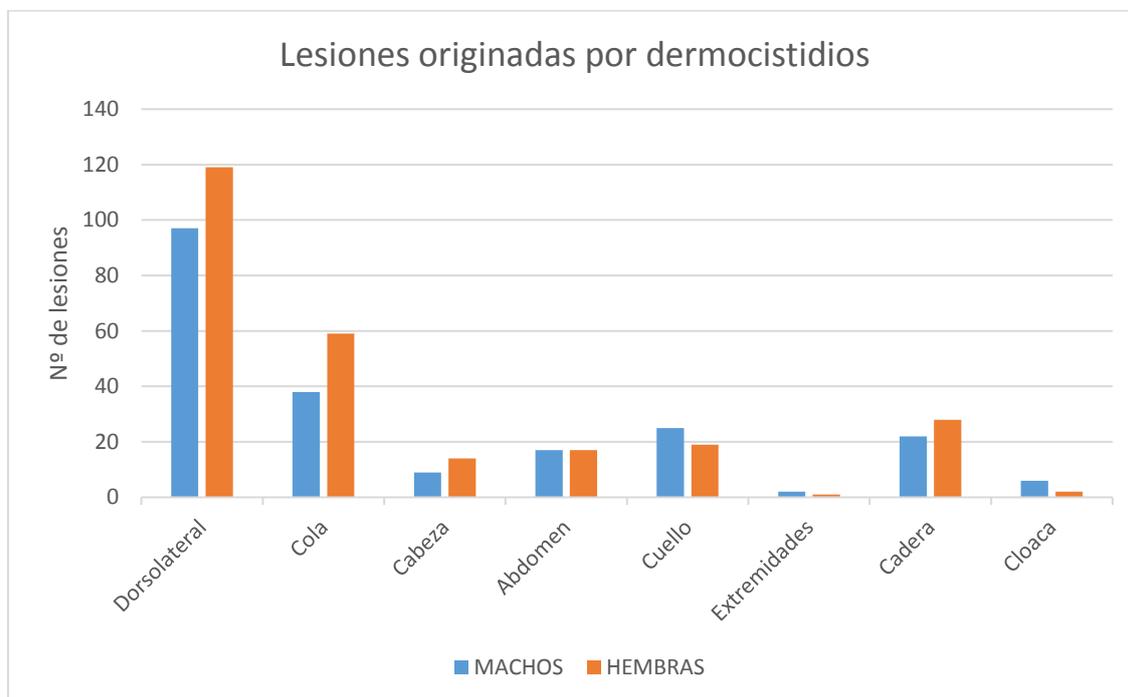


Figura 2: Número de lesiones dérmicas encontradas en *Lissotriton helveticus*, clasificadas en función de su localización en el cuerpo y en función del sexo. Estos datos corresponden a los ejemplares infectados capturados en la sesión de muestreo del 30/03/19.

Para analizar si existen diferencias estadísticamente significativas en el número medio de lesiones entre machos y hembras, se realizó la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon, ya que previamente se comprobó la falta de normalidad de los conjuntos de datos mediante el test Shapiro (p -valor $< 0,05$).

Con los valores obtenidos de la prueba de Wilcoxon ($W=2348$; p -valor= $0,266$) podemos concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas en el número medio de lesiones entre machos y hembras.

La mortalidad de *Lissotriton helveticus* registrada en la zona de estudio fue baja, observándose únicamente dos individuos muertos durante todas las sesiones de muestreo. Uno de los ejemplares fue detectado en estado de descomposición y no mostraba signos claros de estar infectado por dermatocistidios. Sin embargo, el otro ejemplar presentaba quistes en su cuerpo de los cuales emergían hifas, evidenciando la presencia de hongos en asociación con la enfermedad (Figura 3).

Durante las jornadas de muestreo se detectaron otras especies de anfibios conviviendo en simpatria con *Lissotriton helveticus*. Estas especies fueron: tritón ibérico (*Lissotriton boscai*), tritón jaspeado (*Triturus marmoratus*), salamandra común (*Salamandra salamandra*), rana común (*Pelophylax perezi*), ranita de San Antonio (*Hyla molleri*) y sapillo pintojo (*Discoglossus galganoi*). Estas especies fueron registradas en densidades menores que *Lissotriton helveticus* y en ninguna de ellas se detectó la presencia de quistes u otras lesiones cutáneas.



Figura 3: a) Ejemplar de *Lissotriton helveticus* localizado muerto. Las flechas rojas señalan los quistes acompañados de crecimiento fúngico. b) Detalle de las hifas observadas en uno de los quistes en el mismo ejemplar. Fotos: David Dopereiro.

4.2. Autopsia y análisis histopatológico

Durante el examen *postmortem* del ejemplar autopsiado no se detectó la presencia de quistes en los órganos internos del animal. Se detectaron un total de 17 quistes repartidos por la zona dorsolateral, abdomen, cabeza, cadera y cola (Figura 4a). El ejemplar presentaba las siguientes medidas: 61,2 mm de longitud total; 33,8 mm de hocico-cloaca y un peso de 1,122 g.

A simple vista los quistes presentaban un color blanquecino-grisáceo y un aspecto esponjoso; no obstante, la consistencia era dura. Al ejercer una ligera presión sobre los mismos mostraban facilidad para ser expulsados al exterior (Figura 4b).



Figura 4: a) Hembra de *Lissotriton helveticus* a la que se le practicó la eutanasia y se le realizó la autopsia. b) Vista macroscópica de dos quistes. Fotos: David Dopereiro.

Las imágenes histológicas confirman que la naturaleza de los quistes es compatible con una infección originada por dermocistidios. Los quistes muestran una estructura esférica e irregular, localizándose por debajo de la epidermis y deformando los estratos esponjoso y compacto de la dermis (Figura 5a). Están separados del tejido del hospedador por unas paredes eosinofílicas de aproximadamente 5 μm de grosor (Figura 5b).

En el interior de los quistes se pueden observar estructuras basofílicas compatibles con endosporas en desarrollo. Estas estructuras mayoritariamente presentan una morfología semicircular de 8 μm de diámetro y se encuentran agrupadas en cámaras ovaladas de 10-25 μm de largo. Cada cámara está formada por 2-4 esporas en división, lo que parece señalar que estas estructuras todavía no han madurado (Figura 5c). A medida que nos acercamos a la pared externa, en el lumen del quiste, las esporas adquieren un mayor tamaño (15 μm), dejan de estar agrupadas y se tiñen más intensamente de hematoxilina, lo cual indica el estado de madurez de las mismas (Figura 5d). Durante el examen histológico no se detectaron evidencias de flagelos en ninguna de las esporas.

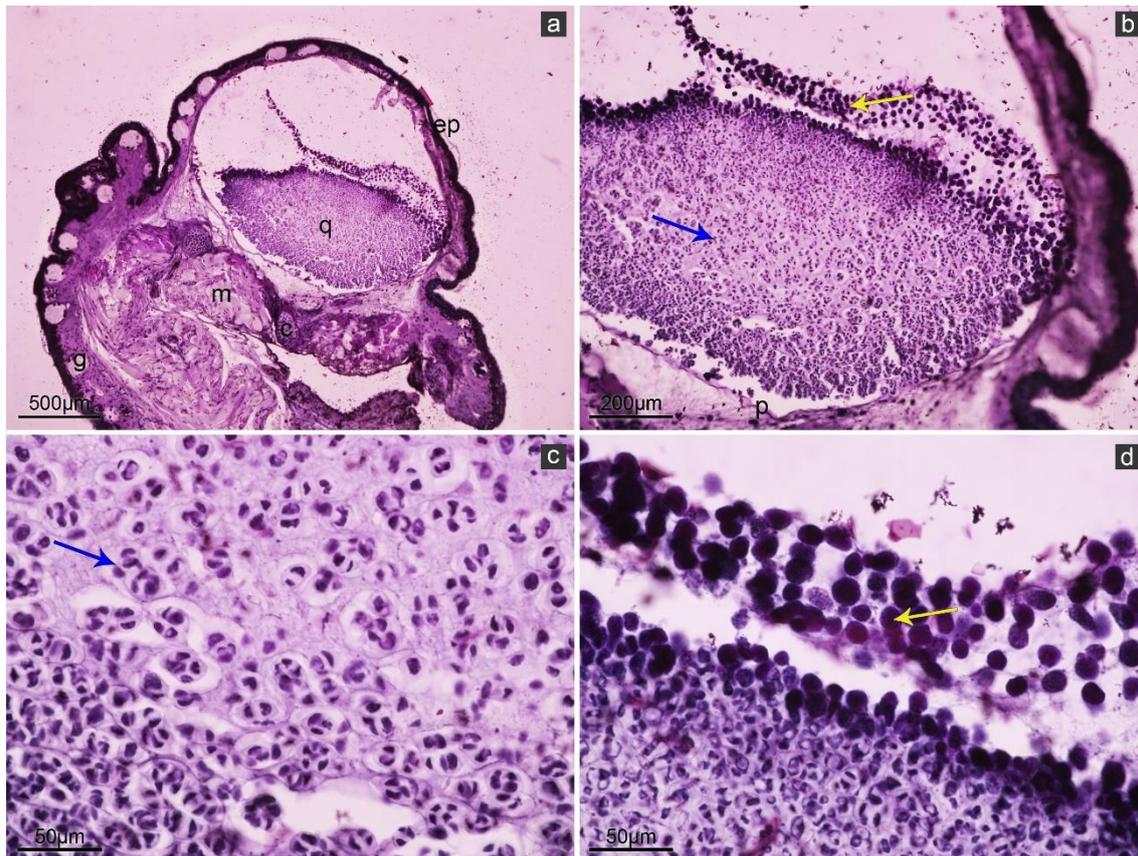


Figura 5: a) Quiste intradérmico originado por un parásito del orden Dermocystida. El quiste está parcialmente lleno de endosporas. b) Las esporas inmaduras (flecha azul) aparecen en una posición más interna del quiste, mientras que las esporas maduras (flecha amarilla) ocupan una posición más externa, embebidas en el lumen del quiste. c) Esporas inmaduras almacenadas en cámaras. d) Esporas maduras. Estructuras específicas: (q) quiste; (ep) epidermis; (g) glándula mucosa; (m) tejido muscular; (p) pared del quiste. Fotos: David Dopereiro.

4.3. Evolución de la enfermedad entre las fases acuática y terrestre

El tritón empleado para este análisis fue retenido en cautividad durante 25 días. A lo largo de este periodo el ejemplar experimentó la transición entre su fase acuática y su fase terrestre. Mostró una retracción de las palmeaduras en sus extremidades posteriores, de la cresta dorsocaudal y del filamento caudal; acompañado de un engrosamiento de la piel y de la adquisición de una coloración ocrácea (Figura 6). Estas modificaciones son características del cambio a fase terrestre.

Los primeros días en los que el tritón permaneció en el terrario, ocupaba la mayor parte del tiempo dentro del agua, mostrándose activo. A partir del tercer día, el ejemplar comenzó a salir del agua y a permanecer más tiempo en la zona terrestre, al mismo tiempo que restringía su actividad diaria. Transcurrido el quinto día, el tritón solo fue observado en la zona cubierta por musgo, empezando a mostrar indicios de cambio a fase terrestre.

Durante el tiempo en el que el tritón estuvo en cautividad, se pudo apreciar una clara reducción de los quistes dérmicos. Al comienzo del estudio, el tritón mostraba quistes incipientes en el cuello y varios quistes maduros en la zona dorsolateral (Figura 6a). Al cabo de una semana los quistes incipientes del cuello se mostraron más desarrollados mientras que los quistes dorsolaterales desaparecieron por completo (Figura 6b). A las dos semanas los quistes del cuello manifestaron una clara disminución, pero todavía existían evidencias de su presencia (Figura 6c). Finalmente, a las tres semanas el ejemplar no presentaba ningún quiste en su cuerpo (Figura 6d).

Mientras que el tritón estuvo en cautividad no aparecieron lesiones nuevas, únicamente se desarrollaron las existentes y finalmente se curaron. Además de los cambios ya señalados, el ejemplar mostró una disminución de tamaño y peso.

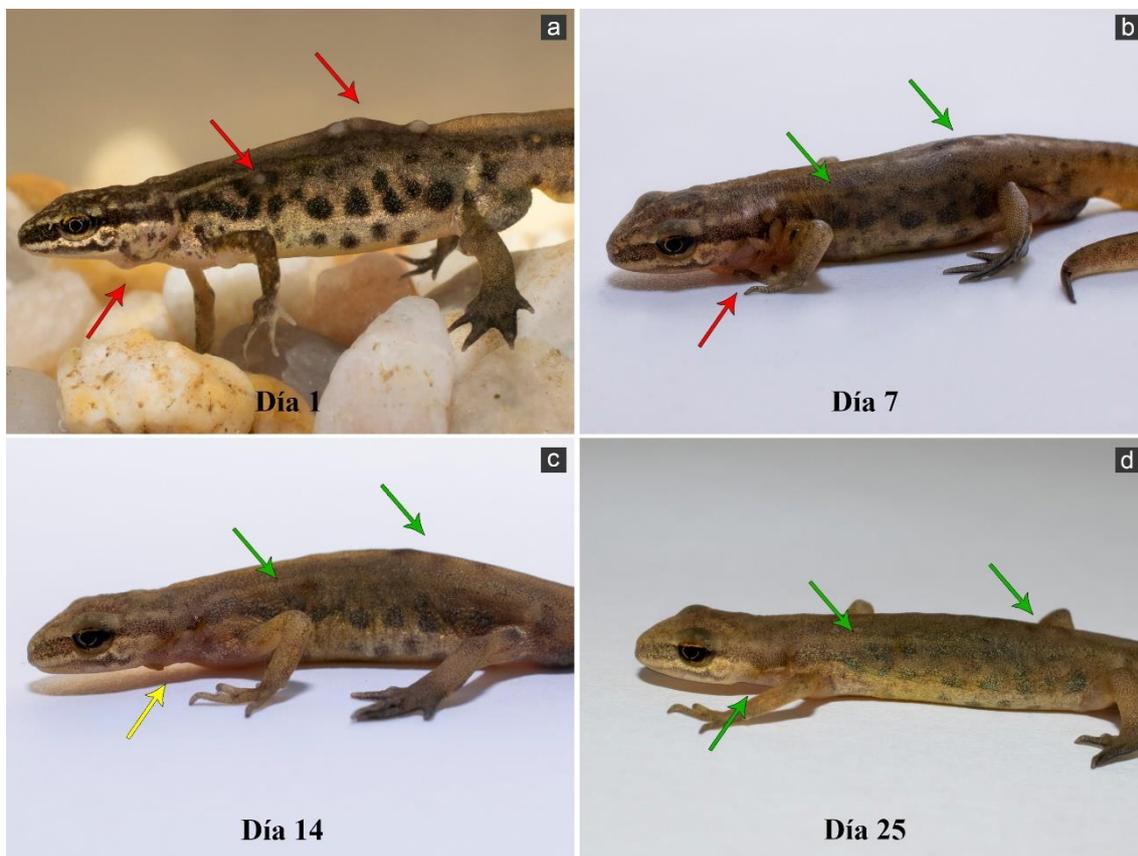


Figura 6: Imágenes del ejemplar de tritón palmeado en las que se observa la evolución de los quistes durante la transición a fase terrestre. Las flechas rojas señalan los quistes desarrollados, las flechas amarillas indican quistes en proceso de curación y las flechas verdes señalan los quistes curados. a) Ejemplar al comienzo del estudio. b) Ejemplar al transcurrir una semana. c) Ejemplar al transcurrir dos semanas. d) Ejemplar al transcurrir tres semanas y cuatro días. Fotos: David Dopereiro.

5. DISCUSIÓN

Los parásitos del orden Dermocystida constituyen un grupo de organismos poco conocido pertenecientes a la clase Mesomycetozoa, un linaje de protozoos a menudo referido como ancestro de los metazoos y que se sitúa en el límite entre los animales y los verdaderos hongos (González-Hernández *et al.*, 2010). En los últimos años, el número de informes por casos de anfibios afectados por dermocistidios se ha intensificado. Es posible que la razón de este incremento sea que estos parásitos estén aumentando en distribución y/o abundancia (González-Hernández *et al.*, 2010). A raíz de esto, surge la necesidad de ampliar nuestro conocimiento sobre cómo afectan estos parásitos a las poblaciones de anfibios.

El enfoque de este trabajo es el de estudiar la dinámica parásito-hospedador en la única población detectada de *Lissotriton helveticus* infectada por dermocistidios en Galicia. De manera previa a este estudio, el diagnóstico de los dermocistidios en dicha población se realizó únicamente en base a la patología macroscópica y la morfología de los quistes parasitarios (Galán & Dopereiro, 2017).

La naturaleza de las lesiones aquí detalladas muestra una gran similitud con las descritas en Francia (González-Hernández *et al.*, 2010; Cortouis *et al.*, 2013) y en Escocia (Fiegna *et al.*, 2017). Son lesiones quísticas de color blanquecino-grisáceo y de forma esférica, que pueden estar acompañadas de úlceras y de hemorragias subcutáneas. Además, se encontraron algunos ejemplares que presentaron edemas severos generalizados por todo el cuerpo, únicamente detectados con anterioridad en los tritones palmeados afectados por dermocistidios de Escocia (Fiegna *et al.*, 2017).

Al igual que afirma Clarke (2017), no parece que estos edemas formen parte de la progresión habitual de la enfermedad, sino que solamente ocurren en ciertas ocasiones. Es posible que sean consecuencia de un desequilibrio osmótico y electrolítico derivado de un proceso secundario de la enfermedad. Por ejemplo, algunas enfermedades renales y hepáticas en anfibios pueden ocasionar edemas similares (Crawshaw & Weinkle, 2000), por lo que sería factible que de alguna manera la enfermedad afectase a estos órganos internos. En este estudio no se detectaron quistes en los órganos internos del tritón autopsiado, pero puede que la presencia de quistes hepáticos esté relacionada con los edemas generalizados.

Los resultados histológicos aquí presentados también muestran una alta similitud con los obtenidos en las poblaciones infectadas del sur de Francia (González-Hernández *et al.*, 2010) y Escocia (Fiegna *et al.*, 2017). De la misma manera, en el interior de los quistes se encontraron agrupaciones de endosporas en cámaras septadas, pudiéndose observar como el grado de desarrollo de las esporas variaba según la ubicación en el quiste. En la parte más interna se localizaron las esporas inmaduras (formando agrupaciones de 2-4 elementos) mientras que en la parte más cercana a la epidermis se localizaron las esporas maduras. Este patrón de maduración parece coincidir más con el descrito por Fiegna *et al.* (2017) que por el descrito por González-Hernández *et al.* (2010), donde los autores proponen que las esporas inmaduras se sitúan en el centro y a medida que se distancian van madurando en todas las direcciones.

Los quistes se localizaron en mayor proporción en la zona dorsolateral de los tritones, seguidos de la cola y, en menor número, las otras regiones del cuerpo. La distribución de estas lesiones no coincide con las descritas para otros dermocistidios del género *Amphibiocystidium*, en las que la mayoría de las lesiones se localizan en la zona ventral de los anfibios infectados (Pascolini *et al.*, 2003; Densmore & Green, 2007; Raffel *et al.*, 2008). Sin embargo, sí que coincide con las descritas para los dermocistidios encontrados en el sur de Francia y Escocia, en dónde las lesiones se localizan principalmente en la región dorsal de los tritones infectados. Los análisis filogenéticos realizados por Fiegna *et al.* (2017) determinaron que los dermocistidios encontrados en Escocia y los encontrados en Francia por González-Hernández *et al.* (2010), no se clasifican dentro del género *Amphibiocystidium*, sino que se tratan de una nueva especie dentro del género *Amphibiothecum*, que ellos nombran como *Amphibiothecum meredithae*.

Poco se conoce sobre el ciclo de vida de los dermocistidios que afectan a anfibios, incluso la vía de transmisión sigue siendo una incógnita. En el estudio realizado por Clarke (2017) sobre la población infectada de *Lissotriton helveticus* de Escocia, se propone que las esporas pueden actuar como agentes infecciosos, liberándose a través de las úlceras o diseminándose en el interior del hospedador para reinfectar nuevos tejidos. Los quistes podrían ser liberados de forma intacta, siendo estos capaces de sobrevivir al ambiente por largos periodos de tiempo y transmitir la enfermedad a un nuevo individuo mediante un contacto oportunista (Clarke, 2017).

En la población infectada de A Limia, las charcas son estacionales y los dermocistidios tendrían que sobrevivir durante el verano en un ambiente seco, o parasitando a los tritones palmeados en fase terrestre. Esta última hipótesis resulta menos plausible, puesto que, al analizar la evolución de la enfermedad durante el cambio de fase acuática a fase terrestre, se pudo observar como las lesiones se iban reduciendo progresivamente hasta desaparecer. En base a estas observaciones, sería posible que los dermocistidios no pudieran parasitar a los tritones palmeados en fase terrestre. Estos resultados son similares a los detallados por Clarke (2017), que pudo examinar como los tritones de la población infectada de Escocia superaban la enfermedad al permanecer dos semanas en cautividad. Además, pudo observar como los tritones infectados tenían una mayor tendencia a salir del agua en comparación con los tritones no infectados de su estudio. Se especuló que este comportamiento puede ser un mecanismo desarrollado por los tritones para liberarse de la enfermedad (Clarke, 2017).

La manera por la cual estos parásitos sobreviven en ausencia de agua sigue siendo una incógnita. Cabe la posibilidad de que el parásito permanezca en una forma latente cuando el tritón está en fase terrestre, o que sea capaz de sobrevivir en el ambiente durante la estación seca. Incluso podría existir otro organismo que actúe como vector del parásito y le permita sobrevivir durante esta época desfavorable. Por ejemplo, se cree que en el tritón verde americano (*Notophthalmus viridescens*), las sanguijuelas podrían actuar como vectores de parásitos del género *Ichthyophonus* (Raffel *et al.*, 2006).

Al analizar la prevalencia de la enfermedad en la población estudiada, observamos que varió notablemente en función del período de muestreo. Si estudiamos la dinámica poblacional en la charca 1 a lo largo del año 2019, podemos concluir que a medida que avanza el tiempo, tanto la abundancia relativa de la especie como la prevalencia de la enfermedad aumentan. Es posible que en la primera jornada de este año la prevalencia fuera baja porque los tritones acabasen de entrar en el agua, y a medida que invirtieron más tiempo en el medio líquido, continuaron infectándose hasta alcanzar la prevalencia más alta en la última sesión de 2019. Resulta interesante resaltar como el *sex ratio* en las primeras sesiones estuvo sesgado a favor de las hembras, mientras que en la última jornada la proporción se equilibró. Estos resultados son contradictorios a los que cabría esperar, puesto que cuando los tritones se desplazan a las charcas para la reproducción, habitualmente son los machos los primeros en entrar al agua (Harrison *et al.*, 1983).

Si comparamos la prevalencia de la enfermedad entre machos y hembras en la misma charca, observamos que en el muestreo del 24/02/2019 la prevalencia era mucho mayor en machos (53,8%), que en hembras (17,4%). Sin embargo, en el muestreo del 30/03/2019 la prevalencia para machos y hembras fue prácticamente igual (entorno al 67% en ambos sexos). Es posible que este sesgo hacia los machos en el inicio de temporada, sea debido a que los machos son más susceptibles a la enfermedad. La razón de esto podría radicar en diferencias intrínsecas en la defensa inmune entre machos y hembras, o en una menor disponibilidad energética de los machos para la inmunidad, debido al desarrollo de caracteres sexuales secundarios (Zuk & McKean, 1996). En la última sesión, cuando la prevalencia fue similar en ambos sexos, el promedio de lesiones por individuo fue ligeramente mayor en hembras que en machos. Se analizó si existían diferencias en el número de lesiones entre los dos sexos y el análisis concluyó que estas diferencias no eran estadísticamente significativas. Por lo que, cuando la enfermedad se estabiliza, parece que afecta de la misma manera a machos y hembras.

En la última jornada, también se observó que la abundancia relativa de *Lissotriton helveticus* fue mucho mayor que en el resto de sesiones. Estas diferencias probablemente sean debidas a variaciones en la actividad de los individuos a causa de las condiciones climáticas. Hasta esa fecha, únicamente se habían detectado tritones infectados en la charca 1, pero en esta jornada también se detectaron en las charcas adyacentes. Es posible que estos resultados sean consecuencia de una expansión de los parásitos, pero también cabe la posibilidad de que se trate de un error de muestreo. Tal vez, los tritones infectados siempre estuvieran en las charcas circundantes, pero como la abundancia de la especie era baja, no se pudieron localizar. El elevado número de ejemplares encontrados en la última sesión permitiría haber detectado a los individuos infectados.

Al analizar la prevalencia entre la charca 1 y el conjunto de charcas circundantes, se observó que existen diferencias estadísticamente significativas. Estas diferencias podrían ser debidas a que la charca 1 muestra unas características físico-químicas que puedan ser más idóneas para el parásito, o que esta charca constituya un hábitat más favorable para los tritones palmeados. Si examinamos las características físicas de los diferentes medios acuáticos de la zona de estudio, observamos que no hay grandes diferencias en cuanto a los parámetros aquí medidos (vegetación, permanencia, naturalidad, corriente, superficie, profundidad). Por lo que, las razones por las que la charca 1 presenta mayores densidades

de *Lissotriton helveticus* y mayor prevalencia de dermocistidios, son todavía desconocidas.

Los valores de pH obtenidos fueron ligeramente ácidos, como cabría esperar en la comarca de A Limia (Villarino *et al.*, 2017). Sin embargo, Clarke (2017) observó que la prevalencia de la enfermedad aumentaba con la alcalinidad del agua. De hecho, utilizaron el pH como variable predictiva de la enfermedad y nunca detectaron charcas sin infección a pH superiores a 5,8. Los valores de pH obtenidos oscilaron entre 6,1 y 6,6; sin mostrar variaciones entre los distintos medios acuáticos estudiados. Por lo que, esta variable tampoco explicaría las diferencias de prevalencia entre charcas. Según las predicciones de Clarke (2017) la prevalencia de la enfermedad con esta acidez no debería ser tan alta. No obstante, las mediciones de pH sólo se pudieron realizar en una de las sesiones y no cuentan con la suficiente robustez como para extraer conclusiones fidedignas, sirviendo únicamente de aproximación. Sería interesante realizar mediciones de pH regulares en la zona de estudio, y correlacionar estos datos con los valores de prevalencia. Es posible que esta variable ambiental esté relacionada con las variaciones temporales en la prevalencia de la enfermedad.

En base a todos los datos aquí aportados, podemos concluir que la población de *Lissotriton helveticus* infectada por dermocistidios de Galicia muestra numerosas similitudes con las poblaciones infectadas de Escocia y del sur de Francia. A falta de realizar los análisis moleculares pertinentes, es posible que los dermocistidios detectados en Galicia pertenezcan a la especie *Amphibiothecum meredithae*, descrita por Fiegna *et al.* (2017).

Finalmente, no parece que la infección por dermocistidios constituya una grave amenaza para la viabilidad de la especie en la zona de estudio. La mortalidad detectada fue muy baja y parece que los individuos infectados son capaces de resolver la enfermedad. Tampoco parece suponer una amenaza para el resto de anfibios, puesto que de todas las especies detectadas, sólo *Lissotriton helveticus* mostró síntomas de infección. No obstante, sería interesante seguir monitorizando esta zona para determinar si los dermocistidios se encuentran en proceso de expansión o se mantienen aislados en el grupo de charcas. En conclusión, resultaría conveniente seguir estudiando esta población para poder recopilar más información sobre la desconocida biología de estos parásitos.

6. a. CONCLUSIONES

1. La información existente sobre los dermocistidios y cómo afectan a las poblaciones de anfibios es muy limitada. Todavía se desconocen aspectos clave, como el ciclo biológico, los mecanismos de transmisión, o la capacidad de sobrevivir fuera del hospedador en ausencia de agua.
2. Según los datos obtenidos, estos parásitos permanecen de manera estable en la población de *Lissotriton helveticus* estudiada, ya que se detectaron tres años consecutivos. A pesar de que hubo variaciones temporales en la prevalencia de la enfermedad, estos cambios aparentan estar sujetos a la actividad de los tritones.
3. Los análisis macroscópicos e histológicos de las lesiones detectadas mostraron una gran similitud con las lesiones descritas en otras poblaciones infectadas por dermocistidios, concretamente las de Escocia y el sur de Francia. En base a estas semejanzas, es probable que se trate de la misma especie, *Amphibiothecum meredithae*.
4. A pesar de la patología extrema que llegaron a presentar algunos ejemplares, los tritones parecen ser capaces de resolver la infección. Al estudiar la transición entre la fase acuática y la fase terrestre, se pudo observar la desaparición de las lesiones.
5. Las prospecciones realizadas en la zona de estudio y los alrededores, parecen indicar que la infección permanece confinada por el momento en un pequeño grupo de charcas.

6. b. CONCLUSIÓNS

1. A información existente sobre os dermocistidios e como afectan ás poboacións de anfibios é moi limitada. Aínda se descoñecen aspectos clave como o ciclo biolóxico, os mecanismos de transmisión, ou a capacidade de sobrevivir fóra do anfitrión en ausencia de auga.
2. Segundo os datos obtidos, estes parasitos permanecen estables na poboación de *Lissotriton helveticus* estudada, xa que se detectaron tres anos consecutivos. Aínda que houbo variacións temporais na prevalencia da enfermidade, estes cambios semellan estar suxeitos á actividade dos limpafontes.

3. As análises macroscópicas e histolóxicas das lesións atopadas mostraron unha gran similitude coas lesións descritas noutras poboacións infectadas por dermocistidios, concretamente as de Escocia e o sur de Francia. Baseándose nestas semellanzas, é probable que sexa a mesma especie, *Amphibiothecum meredithae*.
4. Malia a patoloxía extrema que chegaron a amosar algúns exemplares, os limpafontes semellan ser capaces de resolver a infección. Ao estudar a transición entre as fases acuática e terrestre, púidose observar a desaparición das lesións.
5. As mostraxes realizadas na área de estudo e arredores, semellan indicar que a infección permanece confinada polo momento nun pequeno grupo de charcas.

6. c. CONCLUSIONS

1. The existing information about the dermocystids, and how they affect amphibian populations, is limited. Key aspects such as the life cycle, transmission mechanisms or the ability to survive outside the host without water, are still unknown.
2. According to the obtained data, these parasites remain stable in the studied population of *Lissotriton helveticus*, since they were detected during three consecutive years. Although there were temporal variations in the prevalence of the disease, these changes appear to be subject to the activity of the newts.
3. The macroscopic and histological examination of the detected lesions showed a high similarity with the lesions described in other populations infected by dermocystids, specifically those in Scotland and the south of France. Based on this affinity, it is likely that they belong to the same species, *Amphibiothecum meredithae*.
4. Despite the extreme pathology that some individuals presented, the newts seem to be able to solve the infection. It was possible to observe how the lesions disappeared by studying the transition between the aquatic and terrestrial phases.
5. Surveys conducted in the study area and surroundings seem to indicate that the infection remains confined to a small group of ponds for now.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. J. (2000). Pond permanence and the effects of exotic vertebrates on anurans. *Ecological Applications*, 10(2), 559-568.
- AmphibiaWeb*. (2019). Recuperado 1 junio, 2019, de <https://amphibiaweb.org/>
- Bellot, F. (1966). La vegetación de Galicia. *Anales del Instituto Botánico A. J. Cavanilles*, 24(1), 3-306.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., ... Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 9031-9036.
- Blaustein, A. R., & Wake, D. B. (1990). Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology & Evolution*, 5(7), 203-204.
- Blaustein, A. R., Romansic, J. M., Kiesecker, J. M., & Hatch, A. C. (2003). Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and distributions*, 9(2), 123-140.
- Broz, O., & Privora, M. (1952). Two skin parasites of *Rana temporaria*: *Dermocystidium ranae* Guyénot & Naville and *Dermosporidium granulorum* n. sp. *Parasitology*, 42(1-2), 65-69.
- Carey, C. (1993). Hypothesis concerning the causes of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado. *Conservation Biology*, 7(2), 355-362.
- Clarke, C. L. (2017). *Investigating the host-parasite dynamics of a novel amphibian dermocystid disease in an isolated population of palmate newts in the UK* (Tesis doctoral, University of Edinburgh, United Kingdom). Recuperada de <https://www.era.lib.ed.ac.uk/>
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., ... Warwick, C. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory animals*, 30(4), 293-316.
- Courtois, E. A., Cornuau, J. H., Loyau, A., & Schmeller, D. S. (2013). Distribution of *Amphibiocystidium* sp. in palmate newts (*Lissotriton helveticus*) in Ariège, France. *Herpetology Notes*, 6, 539-543.
- Crawshaw, G. J., & Weinkle, T. K. (2000). Clinical and pathological aspects of the amphibian liver. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 9(3), 165-173.
- Cunningham, A. A., Daszak, P., Stuart, S. N., Hoffmann, M., Chanson, J., Cox, N., ... Young, B. (2008). Chytridiomycosis: driver of amphibian declines and extinctions. En S. N. Stuart, M. Hoffman, J. S. Chanson, N. A. Cox, R. J. Berridge, P. Ramani & B. E. Young. (Eds.), *Threatened Amphibians of the World* (pp. 49-50). Barcelona: Lynx Edicions.
- Cushman, S. A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological conservation*, 128(2), 231-240.
- Czopek, J. (1959). Skin and lung capillaries in European common newts. *Copeia*, 1959(2), 91-96.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science*, 287(5452), 443-449.
- Densmore, C. L., & Green, D. E. (2007). Diseases of amphibians. *ILAR Journal*, 48(3), 235-254.

- Diego-Rasilla, F. J. (2011). Tritón palmeado – *Lissotriton helveticus*. En A. Salvador & I. Martínez-Solano (Eds.), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Recuperado 1 junio, 2019, de <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Diego-Rasilla, F. J. (2017). Parasitic dermic cyst in *Mesotriton alpestris* (caudata: salamandridae). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 28(2), 56-57.
- Duffus, A. L., & Cunningham, A. A. (2010). Major disease threats to European amphibians. *The Herpetological Journal*, 20(3), 117-127.
- Feldman, A.T., & Wolfe, D. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. En C. E. Day. (Ed.), *Histopathology. Methods and Protocols* (pp. 31-43). New York, NY: Humana Press.
- Feldman, S. H., Wimsatt, J. H., & Green, D. E. (2005). Phylogenetic classification of the frog pathogen *Amphibiothecum* (*Dermosporidium*) *penneri* based on small ribosomal subunit sequencing. *Journal of wildlife diseases*, 41(4), 701-706.
- Fiegna, C., Clarke, C. L., Shaw, D. J., Baily, J. L., Clare, F. C., Gray, A., ... Meredith, A. L. (2017). Pathological and phylogenetic characterization of *Amphibiothecum* sp. infection in an isolated amphibian (*Lissotriton helveticus*) population on the island of Rum (Scotland). *Parasitology*, 144(4), 484-496.
- Galán, P., & Fernández-Arias, G. (1993). *Anfibios e réptiles de Galicia*. Vigo: Xerais.
- Galán, P. (2017). La situación de los anfibios amenazados de Galicia y su relación con el estado de conservación de los humedales. En P. Ramil-Rego, L. Gómez-Orellana, & J. Ferreiro da Costa. (Eds.), *Conservación e xestión de humidais en Galicia* (pp. 49-65). Lugo: Horreum-Ibader.
- Galán, P., & Dopereiro, D. (2017). Infección por dermocistidios (Dermocystida) en una población de *Lissotriton helveticus* de A Limia (Ourense, Galicia). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 28(1), 74-77.
- González-Hernández, M., Denoël, M., Duffus, A. J., Garner, T. W., Cunningham, A. A., & Acevedo-Whitehouse, K. (2010). Dermocystid infection and associated skin lesions in free-living palmate newts (*Lissotriton helveticus*) from Southern France. *Parasitology International*, 59(3), 344-350.
- Guyénot, E., & Naville, A. (1922). Un nouveau protiste, du genre *Dermocystidium*, parasite de la grenouille. *Dermocystidium ranæ* nov. spec. *Revue Suisse de Zoologie*, 29, 133-145.
- Harrison, J. D., Griffiths, S. P., & Slater, F. M. (1983). The breeding migrations of smooth and palmate newts (*Triturus vulgaris* and *T. helveticus*) at a pond in mid Wales. *Journal of Zoology*, 199(2), 249-258.
- Jennings, M. R., & Hayes, M. P. (1985). Pre-1900 overharvest of California red-legged frogs (*Rana aurora draytonii*): The inducement for bullfrog (*Rana catesbeiana*) introduction. *Herpetologica*, 41(1), 94-103.
- Jensen, J. B., & Camp, C. D. (2003). Human exploitation of amphibians: direct and indirect impacts. En R. D. Semlitsch (Ed.), *Amphibian Conservation* (pp. 199-213). Washington D. C.: Smithsonian Institution.
- Johnson, P. T., Lunde, K. B., Thurman, E. M., Ritchie, E. G., Wray, S. N., Sutherland, D. R., ... Blaustein, A. R. (2002). Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs*, 72(2), 151-168.

- Kiesecker, J. M., & Blaustein, A. R. (1995). Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 11049-11052.
- Kiesecker, J. M., Blaustein, A. R., & Belden, L. K. (2001). Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, 410(6829), 681-684.
- Martínez-Silvestre, A., Fernandez-Guiberteau, D., Pérez-Sorribes, L., & Velarde, R. (2017). Infección por dermatocistidios en *Lissotriton helveticus* en Cataluña: nuevos datos y apuntes sobre su diagnóstico. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 28(2), 66-69.
- Pascolini, R., Daszak, P., Cunningham, A. A., Tei, S., Vagnetti, D., Bucci, S., ... Di Rosa, I. (2003). Parasitism by *Dermocystidium ranae* in a population of *Rana esculenta* complex in Central Italy and description of *Amphibiocystidium* n. gen. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(1), 65-74.
- Pechmann, J. H., & Wilbur, H. M. (1994). Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica*, 50(1), 65-84.
- Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P., Foster, P. N., ... Young, B. E. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439(7073), 161-167.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing (v.3.6.0) [Software de computadora]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Raffel, T. R., Dillard, J. R., & Hudson, P. J. (2006). Field evidence for leech-borne transmission of amphibian *Ichthyophonus* sp. *The Journal of Parasitology*, 92(6), 1256-1264.
- Raffel, T. R., Bommarito, T., Barry, D. S., Witiak, S. M., & Shackelton, L. A. (2008). Widespread infection of the Eastern red-spotted newt (*Notophthalmus viridescens*) by a new species of *Amphibiocystidium*, a genus of fungus-like mesomycetozoan parasites not previously reported in North America. *Parasitology*, 135(2), 203-215.
- Relyea, R. A., & Diecks, N. (2008). An unforeseen chain of events: lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations. *Ecological Applications*, 18(7), 1728-1742.
- Rivas-Martínez, S. (1987). *Memoria del Mapa de Series de Vegetación de España. 1: 400000*. Madrid: ICONA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., & Waller, R. W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1786.
- Villarino, A., González, S., & Bárcena, F. (2017). *Aves da Limia. Dende a lagoa de Antela aos nosos días*. Ourense: Centro de Estudos da Limia.
- Vredenburg, V. T. (2004). Reversing introduced species effects: experimental removal of introduced fish leads to rapid recovery of a declining frog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), 7646-7650.
- Zuk, M., & McKean, K. (1996). Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. *International Journal for Parasitology*, 26(10), 1009-1024.

Anexo I: Características de los diferentes medios acuáticos de la zona de estudio.

Charca	Tipo de medio acuático	Superficie (m ²)	Profundidad máxima (cm)	Vegetación acuática (%)	Vegetación terrestre sumergida (%)	Movimiento del agua	Permanencia de la charca	Naturalidad
1	Charcas estacionales en herbazales húmedos no higroturbosos.	20	60	60	40	Corriente nula	Estacional	Natural
2	Charcas estacionales en herbazales húmedos no higroturbosos.	60	50	70	30	Corriente nula	Estacional	Natural
3	Charcas estacionales en herbazales húmedos no higroturbosos.	18	50	50	50	Corriente nula	Estacional	Natural
4	Charcas estacionales en herbazales húmedos no higroturbosos.	250	100	90	10	Corriente nula	Estacional	Natural
5	Charcas estacionales en herbazales húmedos no higroturbosos.	50	30	0	100	Corriente nula	Estacional	Natural

Anexo II: Fotografías de las diferentes charcas de la zona de estudio. © D. Dopereiro.

Charca 1



Charca 2



Charca 3



Charca 4



Charca 5



Todas estas fotografías corresponden a la localidad de estudio, en A Saínza de Abaixo, Rairiz de Veiga, Comarca de A Limia, Ourense.

Anexo III: Fotografías de tritones palmeados infectados. © D. Dopereiro.

Macho con una hemorragia en el ojo derecho



Detalle macroscópico de los quistes presentes en la cola de un individuo



Hembra con edema generalizado y quistes parasitarios



Hembra con lesiones nodulares en su costado derecho



Vista dorsal de un macho infectado



Vista dorsal de una hembra infectada



