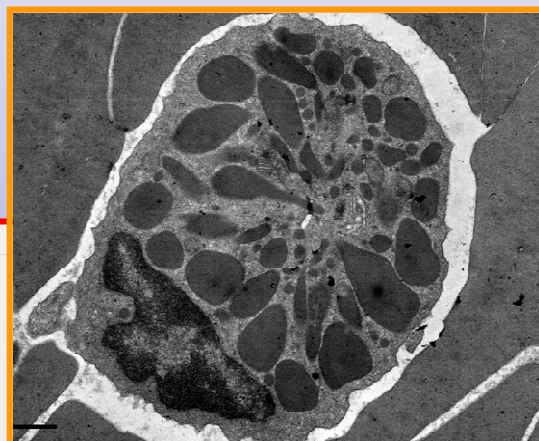
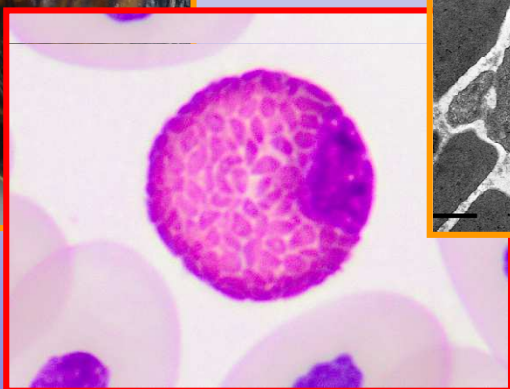


## TESIS DOCTORAL

# CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CITOQUÍMICA Y ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS Y ESTUDIO HEMATOLÓGICO EN *TRACHEMYS SCRIPTA SCRIPTA*



Programa de Doctorado en Clínica e Investigación Terapéutica

Departamento de Patología Animal, Producción Animal,  
Bromatología y Tecnología de los Alimentos

**Juan Daniel Hernández Marrero**

Las Palmas de Gran Canaria

2015







Anexo I

**D.<sup>a</sup> NOEMÍ CASTRO NAVARRO, SECRETARIA DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

**CERTIFICA,**

Que la Comisión de Doctores del Departamento en su sesión extraordinaria de fecha 26 de octubre de 2015, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación a la tesis doctoral titulada "CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CITOQUÍMICA Y ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS Y ESTUDIO HEMATOLÓGICO EN *TRACHEMYS SCRIPTA*" presentada por el doctorando D. Juan Daniel Hernández Marrero y dirigida por el doctor D. Jorge Orós Montón.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 6 del Reglamento para la elaboración, defensa, tribunal y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Arucas, a veintiséis de octubre de dos mil quince.







**PROGRAMA DE DOCTORADO  
CLÍNICA E INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA**

**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CITOQUÍMICA Y  
ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS Y  
ESTUDIO HEMATOLÓGICO EN *TRACHEMYS SCRIPTA SCRIPTA***

*Memoria que, para optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,  
presenta el Licenciado*

**JUAN DANIEL HERNÁNDEZ MARRERO**

Director:

**Dr. JORGE ORÓS MONTÓN**

**Las Palmas de Gran Canaria, 14 de octubre de 2015**



**PROGRAMA DE DOCTORADO  
CLÍNICA E INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA**

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN  
ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS**

**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CITOQUÍMICA Y  
ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS Y  
ESTUDIO HEMATOLÓGICO EN *TRACHEMYS SCRIPTA SCRIPTA***

Doctorando:

JUAN DANIEL HERNÁNDEZ MARRERO

Director:

Dr. JORGE ORÓS MONTÓN



*Fdo. Jorge Orós Montón*



*Fdo. Juan D. Hdez Marrero*

Las Palmas de Gran Canaria, 14 de octubre de 2015





**JORGE ORÓS MONTÓN**, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA, FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**INFORMO:**

Que el trabajo de investigación titulado **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CITOQUÍMICA Y ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS Y ESTUDIO HEMATOLÓGICO EN *TRACHEMYS SCRIPTA SCRIPTA***, ha sido realizado por D. Juan Daniel Hernández Marrero, en el Departamento de Morfología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, bajo mi dirección y asesoramiento técnico y científico, y que una vez revisada la presente Memoria, la encuentro apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Las Palmas de Gran Canaria a 14 de octubre de dos mil quince.



*Fdo. Jorge Orós Montón*



A todos aquellos a los que no he podido dedicar el tiempo que se merecían por haber estado enfrascado en la elaboración de esta tesis; mis padres, hermanos y sobre todo a Patry y a mi sobrina Irati. Espero ser capaz de compensarles algún día. También a todos mis amigos,... ellos saben que les debo unas cuantas.



**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Las Células Sanguíneas de los Reptiles.....</b>	<b>5</b>
2.1.1. El Eritrocito de los Reptiles.....	5
2.1.2. Los Leucocitos Granulocíticos en Reptiles.....	10
2.1.2.1. El Neutrófilo de los Reptiles.....	10
2.1.2.2. El Heterófilo de los Reptiles.....	12
2.1.2.3. El Eosinófilo de los Reptiles.....	16
2.1.2.4. El Basófilo de los Reptiles.....	19
2.1.3. Los Leucocitos Mononucleares en Reptiles.....	22
2.1.3.1. El Linfocito de los Reptiles.....	22
2.1.3.2. El Monocito de los Reptiles.....	27
2.1.3.3. El Azurófilo de los Reptiles.....	30
2.1.4. El Trombocito de los Reptiles.....	33
<b>2.2. Las Células Sanguíneas de los Quelonios.....</b>	<b>39</b>
2.2.1. El Eritrocito de los Quelonios.....	39
2.2.2. Los Leucocitos Granulocíticos en Quelonios.....	42
2.2.2.1. El Neutrófilo de los Quelonios.....	42
2.2.2.2. El Heterófilo de los Quelonios.....	43
2.2.2.3. El Eosinófilo de los Quelonios.....	45
2.2.2.4. El Basófilo de los Quelonios.....	48
2.2.3. Los Leucocitos Mononucleares en Quelonios.....	50
2.2.3.1. El Linfocito de los Quelonios.....	50
2.2.3.2. El Monocito de los Quelonios.....	52
2.2.3.3. El Azurófilo de los Quelonios.....	55
2.2.4. El Trombocito de los Quelonios.....	55



<b>2.3. Las Células Sanguíneas de los Emídidos (Familia Emydidae).....</b>	<b>58</b>
2.3.1. El Eritrocito de los Emídidos.....	58
2.3.2. Los Leucocitos Granulocíticos en Emídidos.....	61
2.3.2.1. El Neutrófilo de los Emídidos.....	61
2.3.2.2. El Heterófilo de los Emídidos.....	61
2.3.2.3. El Eosinófilo de los Emídidos.....	63
2.3.2.4. El Basófilo de los Emídidos.....	65
2.3.3. Las Leucocitos Mononucleares en Emídidos.....	67
2.3.3.1. El Linfocito de los Emídidos.....	67
2.3.3.2. El Monocito de los Emídidos.....	68
2.3.3.3. El Azurófilo de los Emídidos.....	70
2.3.4. El Trombocito de los Emídidos.....	70
<b>2.4. Valores Hematológicos de los Reptiles.....</b>	<b>73</b>
2.4.1. El Hematocrito de los Reptiles.....	73
2.4.2. El Nivel de Hemoglobina de los Reptiles.....	76
2.4.3. Índices Eritrocitarios de los Reptiles.....	77
2.4.4. Recuento Total de Eritrocitos y Leucocitos de los Reptiles.....	78
2.4.5. Recuento de Trombocitos de los Reptiles.....	80
2.4.6. Recuento Diferencial Leucocitario de los Reptiles.....	81
<b>2.5. La Bioquímica Sanguínea de los Reptiles.....</b>	<b>90</b>
2.5.1. Las Proteínas Totales (Sólidos Totales).....	90
<b>2.6. Valores Hematológicos de los Quelonios.....</b>	<b>92</b>
2.6.1. El Hematocrito de los Quelonios.....	92
2.6.2. El Nivel de Hemoglobina de los Quelonios.....	95
2.6.3. Índices Eritrocitarios de los Quelonios.....	96
2.6.4. Recuento Total de Eritrocitos y Leucocitos de los Quelonios.....	96
2.6.5. Recuento de Trombocitos de los Quelonios.....	100
2.6.6. Recuento Diferencial Leucocitario de los Quelonios.....	100

<b>2.7. La Bioquímica Sanguínea de los Quelonios.....</b>	<b>109</b>
2.7.1. Las Proteínas Totales (Sólidos Totales).....	109
<b>2.8. Valores Hematológicos de los Emídidos (Familia Emydidae).....</b>	<b>112</b>
2.8.1. El Hematocrito de los Emídidos.....	112
2.8.2. El Nivel de Hemoglobina de los Emídidos.....	113
2.8.3. Índices Eritrocitarios de los Emídidos.....	113
2.8.4. Recuento Total de Eritrocitos y Leucocitos de los Emídidos.....	114
2.8.5. Recuento de Trombocitos de los Emídidos.....	115
2.8.6. Recuento Diferencial Leucocitario de los Emídidos.....	116
<b>2.9. La Bioquímica Sanguínea de los Emídidos (Familia Emydidae).....</b>	<b>119</b>
2.9.1. Las Proteínas Totales (Sólidos Totales).....	119
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>121</b>
<b>3.1. Especímenes en Estudio (Tortugas).....</b>	<b>121</b>
<b>3.2. Obtención de Muestras Sanguíneas.....</b>	<b>126</b>
<b>3.3. Microscopia Óptica Rutinaria.....</b>	<b>127</b>
<b>3.4. Determinación de las Dimensiones Celulares.....</b>	<b>128</b>
<b>3.5. Análisis Estadístico de las Dimensiones Celulares.....</b>	<b>129</b>
<b>3.6. Técnicas Citoquímicas.....</b>	<b>129</b>
3.6.1. Fosfatasa Ácida (ACP).....	130
3.6.2. Bencidina Peroxidasa (Mieloperoxidasa) (PER).....	131
3.6.3. $\alpha$ -Naftil Butirato Esterasa (NBE).....	133
3.6.4. Naftol Cloroacetato Esterasa (CAE).....	134
3.6.5. Sudán Negro B (SBB).....	136
3.6.6. Reacción del Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	137
3.6.7. Azul de Toluidina (AT).....	138
<b>3.7. Microscopia Electrónica.....</b>	<b>139</b>
<b>3.8. Hematocrito.....</b>	<b>140</b>
<b>3.9. Recuento Total de Eritrocitos.....</b>	<b>140</b>

<b>3.10. Recuento Total de Leucocitos.....</b>	<b>141</b>
<b>3.11. Recuento de Trombocitos.....</b>	<b>142</b>
<b>3.12. Recuento Diferencial Leucocitario.....</b>	<b>142</b>
<b>3.13. Estimación del Porcentaje de Eritrocitos Inmaduros.....</b>	<b>143</b>
<b>3.14. Medición del Nivel de Hemoglobina.....</b>	<b>143</b>
<b>3.15. Índices Eritrocitarios.....</b>	<b>143</b>
<b>3.16. Medición de las Proteínas Totales (Sólidos Totales).....</b>	<b>144</b>
<b>3.17. Análisis Estadístico de los Parámetros Hematológicos.....</b>	<b>144</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>147</b>
<b>4.1. Células Sanguíneas.....</b>	<b>147</b>
<b>4.2. Dimensiones y Morfología Celular.....</b>	<b>147</b>
4.2.1. El Eritrocito.....	147
4.2.2. El Heterófilo.....	148
4.2.3. El Eosinófilo.....	149
4.1.4. El Basófilo.....	149
4.1.5. El Linfocito.....	150
4.1.6. El Monocito.....	151
4.1.7. El Trombocito.....	151
<b>4.3. Ultraestructura Celular.....</b>	<b>153</b>
4.2.1. El Eritrocito.....	153
4.2.2. El Heterófilo.....	153
4.2.3. El Eosinófilo.....	153
4.1.4. El Basófilo.....	153
4.1.5. El Linfocito.....	154
4.1.6. El Monocito.....	154
4.1.7. El Trombocito.....	154
<b>4.4. Tinciones Citoquímicas.....</b>	<b>155</b>
4.4.1. Fosfatasa Ácida (ACP) con y sin Tartrato.....	155
4.4.2. Bencidina Peroxidasa (Mieloperoxidasa) (PER).....	156
4.4.3. $\alpha$ -Naftil Butirato Esterasa (NBE) con y sin Fluoruro.....	156
4.4.4. Naftol Cloroacetato Esterasa (CAE).....	157
4.4.5. Sudán Negro B (SBB).....	157
4.4.6. Reacción del Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	158
4.4.7. Azul de Toluidina (AT).....	158

<b>4.5. Recopilación de Imágenes.....</b>	<b>159</b>
<b>4.6. Valores Hematológicos y Bioquímicos.....</b>	<b>184</b>
4.6.1. El Hematocrito.....	184
4.6.2. Los Sólidos Totales (Proteínas Totales).....	185
4.6.3. La Hemoglobina.....	187
4.6.4. Recuento Total de Eritrocitos y Leucocitos.....	189
4.6.5. Recuento de Trombocitos.....	191
4.6.6. Los Índices Eritrocitarios.....	193
4.6.7. Recuento Diferencial Leucocitario.....	195
4.6.8. Porcentaje de Eritrocitos Inmaduros.....	197
<b>4.7. Estudio Estadístico.....</b>	<b>200</b>
4.7.1. Valores Hematológicos y Bioquímicos.....	200
4.7.2. Concordancia entre las Determinaciones de Trombocitos por los Métodos CAM y FROT.....	204
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>207</b>
<b>5.1. Morfología y Caracterización de las Células Sanguíneas.....</b>	<b>207</b>
<b>5.2. Valores Hematológicos y Bioquímicos.....</b>	<b>219</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>229</b>
<b>7. RESUMEN.....</b>	<b>231</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>233</b>
<b>9. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>235</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>237</b>





## 1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La tortuga o galápago de vientre amarillo o de orejas amarillas (*Trachemys scripta scripta* -Schoepff, 1792-), es un quelonio que pertenece al suborden Cryptodira y a la familia Emydidae, en la que existen aproximadamente 12 géneros y 48 especies, la mayoría de ellas conocidas como tortugas de agua dulce. El género *Trachemys* incluye 15 especies, todas ellas distribuidas por América del Norte, Centro y Suramérica. La especie *Trachemys scripta*, engloba a su vez 3 subespecies diferentes (*T. scripta elegans*, *T. scripta scripta* y *T. scripta troostii*), estrechamente relacionadas entre sí. Todas ellas habitan en ambientes semiacuáticos y son principalmente carnívoras/ omnívoras (ERNST Y BARBOUR, 1989; FRANK Y RAMUS, 1995; BOYER Y BOYER, 2006; BROTONS, 2007; FRITZ Y HAVAS, 2007). La subespecie objeto de este estudio tiene su área de distribución natural en el sureste de Estados Unidos (FRITZ Y HAVAS, 2007).

A medida que aumenta la importancia de las tortugas de agua dulce como nuevos animales de compañía y que su presencia como pacientes se vuelve más habitual en las clínicas veterinarias, se hace crucial un mayor conocimiento de sus características anatómicas y fisiológicas. Ello incluye una detallada descripción y caracterización de sus células sanguíneas y el establecimiento de los parámetros hematológicos normales para estas especies. Sin embargo, la clasificación de las células sanguíneas en reptiles ha sido históricamente problemática, debido a la variabilidad de los criterios empleados en su categorización y al incierto estatus de las líneas celulares en estos animales (WORK ET AL., 1998). Es por eso que, aunque inicialmente los estudios orientados a identificar y describir las células sanguíneas en reptiles se basaban exclusivamente en la microscopía óptica estándar (SAINT GIRONS, 1970; WOOD Y EBANKS, 1984), investigaciones más recientes han añadido el uso de las técnicas de tinción citoquímica y de la microscopía electrónica, con el objetivo de obtener una mayor homogeneidad y fiabilidad en los resultados (WORK ET AL., 1998; MARTÍNEZ-SILVESTRE ET AL., 2005; SALAKIJ ET AL., 2002; SALAKIJ ET AL., 2014). A pesar de ello, hoy en día todavía se desconocen muchos aspectos de la hematología de los reptiles y muchas especies (incluidas las habituales como mascotas) no han sido objeto de estudios estructurados que establezcan una adecuada descripción de sus características hematológicas. Esto convierte a los reptiles en el grupo de vertebrados menos estudiado, en comparación con los mamíferos y las aves.

En los reptiles, al igual que en otros vertebrados (a excepción de los mamíferos), los eritrocitos son nucleados y generalmente ovales. A pesar de las diferencias morfológicas, la función de los eritrocitos en los reptiles es similar a la de los mamíferos (HAWKEY Y DENNET, 1989).

## *Introducción y Objetivos*

El trombocito es otra célula nucleada muy abundante en la sangre periférica de los reptiles, análoga funcionalmente a las plaquetas de los mamíferos (SAINT GIRONS, 1970; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; HAWKEY Y DENNET, 1989; FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996B; RASKIN, 2000).

Es en los leucocitos donde encontramos una mayor variabilidad de criterios. Si bien la clasificación de linfocitos y basófilos parece clara, con una estructura y funcionalidad similar a la de los mamíferos, la descripción de las restantes líneas celulares presenta una mayor complejidad y disparidad de opiniones (MONTALI, 1988; WATSON, 1997).

Históricamente se ha hablado, en quelonios y crocodilianos, de la existencia de dos tipos de granulocitos acidofílicos, derivados de una única línea celular (JORDAN Y FLIPPIN, 1913; CHARIPPER Y DAVIS, 1932; JORDAN, 1938; SAINT GIRONS, 1970) y han sido clasificados como granulocitos Tipo I y Tipo II (CANFIELD, 1985), o como eosinófilos Tipo I y Tipo II (PIENAAR, 1962; AZEVEDO Y LUNARDI, 2003). A pesar de ello, está más extendida y aceptada la idea de que estas células proceden de líneas celulares diferentes; la heterófila y la eosinófila (MATEO *ET AL.*, 1984), clasificándose por tanto como heterófilos y eosinófilos (WATSON, 1997).

El heterófilo se considera funcionalmente análogo a los neutrófilos de mamíferos, a pesar de sus diferencias enzimáticas y bioquímicas. Si bien es cierto que existen descripciones de neutrófilos en muestras sanguíneas de reptiles (SAINT GIRONS, 1970; FRYE, 1973; DESSER, 1978; ROSSKOPF, 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; FRYE, 1991; MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; AGUIRRE *ET AL.*, 1995), no se corresponden con hallazgos frecuentes en estas especies y la mayoría de los autores no los aceptan como parte de la fórmula leucocitaria (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; MONTALI, 1988; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; HAWKEY Y DENNET, 1989; WORK Y BALAZS, 1999; RASKIN, 2000; ROSSKOPF, 2000; SMITH *ET AL.*, 2000).

Los monocitos en reptiles parecen compartir similares características morfológicas y funcionales con los de los mamíferos. Sin embargo, en el orden Squamata aparece un tipo celular exclusivo llamado azurófilo o monocito azurófilo que presenta características intermedias entre un granulocito y un monocito (MONTALI, 1988; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; HAWKEY Y DENNET, 1989).

La condición de animales ectotérmicos de los reptiles implica una gran dependencia de los factores ambientales externos (temperatura ambiente, fotoperiodo) que influyen en la aparición de variaciones cíclicas anuales en su fisiología (CHEYLAN, 1981). Dichos factores pueden ser causantes de cambios en los parámetros hematológicos según variaciones estacionales, sexo y edad del individuo (DUGUY, 1970).

Teniendo en cuenta todos los aspectos anteriormente mencionados, se plantea la presente Tesis Doctoral: **Caracterización Morfológica, Citoquímica y Ultraestructural de las Células Sanguíneas y Estudio Hematológico en *Trachemys scripta scripta***, con los siguientes objetivos:

1. Descripción morfológica de las células sanguíneas de *Trachemys scripta scripta*.
2. Descripción ultraestructural de las células sanguíneas de *Trachemys scripta scripta*.
3. Caracterización citoquímica de dichas células.
4. Determinación de los valores de los parámetros hematológicos para esta especie y estudio comparativo entre sexos, pesos y estaciones.



## 2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.- LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE LOS REPTILES

#### 2.1.1.- El Eritrocito de los Reptiles

Excepto en el caso de los mamíferos, los eritrocitos de todos los vertebrados son nucleados, con morfología ovalada. En las aves los núcleos son más alargados que en los reptiles, que suelen presentar una morfología más redondeada. Algo similar pero menos evidente ocurre con la morfología del citoplasma. Generalmente los eritrocitos de los reptiles tienden a ser de mayor tamaño que los de las aves, y éstos son más grandes que los de los mamíferos. Sin embargo, los eritrocitos más grandes se han descrito en los anfibios (FRYE, 1977; HAWKEY Y DENNET, 1989). En función de los datos publicados el reptil con los eritrocitos de mayor tamaño es el tuátara (*Sphenodon punctatus*) (Orden Rhynchocephalia) (SAINT GIRONS, 1970). Los tamaños eritrocitarios medios de los principales grupos de reptiles se presentan en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Dimensiones en  $\mu\text{m}$  de eritrocitos en reptiles (PIENAAR, 1962; SAINT GIRONS, 1970; FRYE, 1981; SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

	DM (Citoplasma)	Dm (Citoplasma)	DM (Núcleo)	Dm (Núcleo)
<b>Orden Chelonia</b>	18.5-20	10-12	5-6.5	4-5
<b>O. Rhynchocephalia</b>	19-25	13-16	8-9	5-6
<b>Suborden Sauria<sup>1</sup></b>	13-22	5-13.5	5.5-8	2.5-4.5
<b>Suborden Serpentes<sup>1</sup></b>	15-19	8-11	5-8	3-4
<b>Orden Crocodylia</b>	16-17	9-10	5-6	3.5-4

<sup>1</sup>Subórdenes pertenecientes al Orden Squamata. DM: diámetro mayor; Dm: diámetro menor.

Hay autores que aseguran que el tamaño celular de los eritrocitos puede estar influenciado por el nivel evolutivo de la especie. Así, reptiles más primitivos como cocodrilianos y quelonios tendrían eritrocitos mayores, mientras que serían más pequeños en especies más evolucionadas como los lacértidos (WINTROBE, 1933). De forma similar SAINT GIRONS (1970) relacionó el tamaño celular con el nivel metabólico de cada especie.



### **-Características tintoriales y morfología**

Los frotis sanguíneos en reptiles y otros grupos de animales pueden procesarse para su estudio hematológico con varios tipos de tinciones. Las más utilizadas son las tinciones tipo Romanowsky, como Wright, Giemsa, Wright-Giemsa, Wright-Leishman, May-Grünwald o el panóptico rápido. La más generalizada en Veterinaria ha sido la técnica de Wright (CAMPBELL, 1996B; RASKIN, 2000).

El citoplasma de los eritrocitos maduros se tiñe con una coloración naranja-rosada y generalmente muestra una textura homogénea con tinciones tipo Romanowsky. Los núcleos, centrales y ovalados aunque a veces irregulares o pleomórficos, tienden a ser basófilos con coloraciones violetas-azuladas (CAMPBELL, 1996B; DOTSON *ET AL.*, 1997; RASKIN, 2000; CAMPBELL, 2004A). La presencia de núcleo hace que los eritrocitos de reptiles no muestren la biconcavidad con la que aparecen estas células en los mamíferos. La cromatina nuclear es densamente granular y el núcleo se condensa a medida que la célula envejece. En ocasiones los eritrocitos pierden el núcleo, denominándose entonces “eritroplástidos”, siendo normal encontrar algunos en el frotis, siempre que su número no sea elevado. El núcleo libre resultante queda recubierto de una fina capa de citoplasma. Se cree que esto forma parte del proceso natural de expulsión de los núcleos de los eritrocitos, pero también puede producirse por roturas celulares durante la elaboración del frotis sanguíneo (FRYE, 1991).

Frecuentemente aparecen inclusiones basófilas redondas o irregulares en el citoplasma eritrocitario de muchas especies de reptiles. En ocasiones suelen considerarse artefactos generados durante la preparación de la extensión sanguínea (CAMPBELL, 2004A), aunque estudios ultraestructurales los han asociado a orgánulos degenerados (ALLEMAN *ET AL.*, 1992, WORK *ET AL.*, 1998) o más recientemente a precipitados de hemoglobina, similares a los cuerpos de Heinz vistos en mamíferos (BASILE *ET AL.*, 2011). En iguana verde (*Iguana iguana*) se observan inclusiones citoplasmáticas de apariencia cristalina, cuadradas, rectangulares o hexagonales (HARR *ET AL.*, 2001). Algo similar ocurre en iguana rinoceronte (*Cyclura cornuta*) (SIMPSON Y HARVEY, 1980), aunque en ambos casos se desconoce la causa. En otras especies se han descrito vacuolas citoplasmáticas hasta en un 1% de los eritrocitos (SALAKIJ *ET AL.*, 2002).

Se considera normal un cierto nivel de poiquilocitosis (alteraciones de la morfología celular) o anisocitosis (cambios del tamaño celular) en los eritrocitos de muchas especies de reptiles, salvo que estas alteraciones se incrementen porcentualmente, pudiendo indicar entonces procesos patológicos, respuestas regenerativas o desórdenes eritrocitarios (RASKIN, 2000).

En la anemia se observa un incremento de la policromasia y por tanto del número de eritrocitos inmaduros. También es frecuente en individuos jóvenes o durante la ecdisis. Los eritrocitos binucleados, con bordes nucleares anómalos (anisocariosis) o actividad mitótica, suelen asociarse con respuestas regenerativas marcadas (CAMPBELL, 2004A; HEARD *ET AL.*, 2004). También pueden aparecer en reptiles en post-hibernación o en asociación a enfermedad inflamatoria severa, malnutrición o inanición (HAWKEY Y DENNETT, 1989). En respuestas regenerativas podemos encontrar un punteado basófilo en el citoplasma, aunque también puede aparecer en pacientes con toxicosis avanzada. La hipocromasia suele asociarse a deficiencia de hierro o enfermedad inflamatoria crónica.

Los eritrocitos inmaduros suelen mostrar un citoplasma más pequeño, redondeado y basófilo que las células maduras. El núcleo es redondeado y de mayor tamaño, con cromatina agrupada de tinción menos intensa (CAMPBELL, 1996B; ALLEMAN *ET AL.*, 1999; CAMPBELL, 2004A; HEARD *ET AL.*, 2004). En los frotis sanguíneos no es raro encontrar reticulocitos, eritrocitos policromatófilos (inmaduros) y cuerpos de Howell-Jolly (FRYE, 1977). Su número varía pero puede llegar a ser de hasta un 10-15% del total de eritrocitos (WATSON, 1997). En la serpiente de cascabel diamantina (*Crotalus adamanteus*) los policromatófilos aparecen en porcentaje inferior al 1% de eritrocitos (ALLEMAN *ET AL.*, 1999), mientras que HEARD *ET AL.* (2004) citan un porcentaje inferior al 5% de reticulocitos en la mayoría de los reptiles.

Los reticulocitos de reptiles y aves muestran un halo de retículo alrededor del núcleo con un punteado basófilo que se visualiza frecuentemente con las tinciones tipo Romanowsky (CAMPBELL, 2004A).

Los rubricitos son los análogos de los eritrocitos nucleados de los mamíferos. Suelen aparecer en proporciones inferiores al 1% en la mayoría de los reptiles y tienen la capacidad de replicarse fuera de la médula ósea, por lo que en ocasiones aparecen binucleados, generalmente en respuesta a la anemia (HEARD *ET AL.*, 2004).

La interpretación de los frotis teñidos para contabilizar reticulocitos es problemática ya que puede hallarse material reticular en casi todos los eritrocitos. Este factor muestra su importancia cuando se emplean tinciones específicas como el nuevo azul de metileno, similar a la técnica empleada en mamíferos. Por tanto, la valoración de la presencia de procesos regenerativos debe basarse en el número de células policromatófilas presentes y en su morfología citoplásmica y nuclear con tinciones tipo Romanowsky (HAWKEY Y DENNET, 1989).

### **-Eritropoyesis en reptiles**

La eritropoyesis tiene lugar normalmente en la médula ósea en mamíferos, aves y reptiles. El proceso es muy similar en los tres grupos, con la excepción de la pérdida del núcleo en los mamíferos (Tabla 2.2) (HAWKEY Y DENNET, 1989).

En condiciones fisiológicas la tasa de producción de nuevos eritrocitos es igual a la de destrucción de células viejas y está determinada por la vida media celular. En mamíferos la vida media celular está relacionada con la tasa metabólica y el peso corporal. Así, la supervivencia eritrocitaria es más corta y la eritropoyesis más activa en animales de menor tamaño y con metabolismos basales más elevados, que pueden a su vez responder más rápidamente a las pérdidas de sangre (HAWKEY Y DENNET, 1989).

Los eritrocitos de los reptiles tienen una vida media muy superior a los de aves y mamíferos. Algunos autores citan 600-800 días (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991), mientras que otros han observado viabilidades de hasta 3 años (BRACE Y ATLAND; 1955; RODNAN *ET AL.*, 1957; BRACE Y ATLAND, 1962). Es evidente que la elevada longevidad de los eritrocitos de los reptiles se debe a su reducido metabolismo (ROSSKOPF, 2000), aunque hay autores que sugieren que la vida media también puede verse influenciada por la temperatura ambiental (CLINE Y WALDMAN, 1962).

Tras su muerte el núcleo del eritrocito sufre picnosis, se hincha y pierde la cromatina. Puede haber lisis de la membrana celular y nuclear y su contenido liberarse al plasma circulante, o bien ser fagocitada la célula por un monocito o cualquier otra célula con capacidad fagocítica. Se ha comprobado que linfocitos, heterófilos, neutrófilos y trombocitos pueden desarrollar actividad fagocítica, encontrándose bacterias y detritos celulares en su interior (FRYE, 1991).

Los restos eritrocitarios pueden ser utilizados para generar nuevas células en la médula ósea, aunque en reptiles puede haber otras vías eritropoyéticas (FRYE, 1991):

- En respuesta a condiciones de estrés y/o pérdida crónica de sangre se activan zonas de eritropoyesis extramedulares, como el hígado y el bazo (EFRATI *ET AL.*, 1970; FRYE, 1981).
- Los eritrocitos maduros pueden sufrir división mitótica en una suerte de progresión retrógrada, sucediendo tanto en médula ósea como en sangre circulante.
- Se han visto eritrocitos maduros ricos en hemoglobina en división amitótica generando dos o más células hijas.
- Los trombocitos de reptiles muestran la capacidad de transformarse morfológica y funcionalmente en eritrocitos portadores de hemoglobina vía división mitótica o amitótica (FRYE, 1981; 1991).

**Tabla 2.2.** Comparación de la eritropoyesis normal en mamíferos, aves y reptiles (HAWKEY Y DENNET, 1989).

MAMÍFEROS	AVES Y REPTILES
<b>Proeritroblasto:</b> célula redondeada de gran tamaño. Núcleo grande, excéntrico o central. Cromatina nuclear finamente granulada y espacios nucleolares. Citoplasma muy basófilo.	<b>Proeritroblasto:</b> célula redondeada o ameboide de gran tamaño. La cromatina nuclear forma una reticulación laxa con gran formación de acúmulos. Nucléolo grande. Citoplasma muy basófilo con espacios mitocondriales.
<b>Eritroblasto basófilo:</b> célula redondeada pequeña con cromatina nuclear granulada, sin nucléolo. Citoplasma basófilo.	<b>Eritroblasto basófilo:</b> célula redondeada de menor tamaño, con acúmulos de cromatina nuclear. Nucléolo de menor tamaño. Citoplasma basófilo, ausencia de espacios mitocondriales.
<b>Eritroblasto policromatófilo:</b> célula redonda de menor tamaño, núcleo más pequeño en relación al citoplasma, grupos irregulares de cromatina. Citoplasma gris o ligeramente eosinófilo.	<b>Eritroblasto policromatófilo joven:</b> célula redondeada pequeña, núcleo relativamente pequeño con acúmulos de cromatina, ausencia de nucléolo. Citoplasma grisáceo o ligeramente eosinófilo.
<b>Eritroblasto ortocromático:</b> citoplasma eosinófilo o algo basófilo. Núcleo pequeño, uniformemente basófilo o picnótico.	<b>Eritroblasto policromatófilo maduro:</b> célula pequeña, redondeada o ligeramente oval con núcleo redondo o ligeramente ovalado con acúmulos irregulares de cromatina. Citoplasma grisáceo o rojo pálido.
<b>Reticulocito:</b> ligeramente más pequeño, sin núcleo. Citoplasma eosinófilo o con tinte basófilo. La tinción del reticulocito revela la presencia de uno o más gránulos o filamentos.	<b>Eritroblasto ortocromático:</b> citoplasma totalmente eosinófilo. Núcleo de mayor tamaño que el del eritrocito maduro, con acúmulos irregulares de cromatina. La tinción para reticulocitos evidencia abundantes gránulos citoplasmáticos formando una banda perinuclear.
<b>Eritrocito maduro:</b> más pequeño, redondo, eosinófilo y con cierta palidez central indicativa de biconcavidad.	<b>Eritrocito maduro:</b> célula ovalada con citoplasma uniformemente eosinófilo. Núcleo ovalado, alargado u ocasionalmente redondeado en los reptiles.

### -Técnicas citoquímicas

Algunos estudios en reptiles describen la ausencia de respuesta de los eritrocitos a las técnicas de tinción citoquímica (ALLEMAN *ET AL.*, 1999; HARR *ET AL.*, 2001). No obstante, hay especies en las que se ha detectado positividad eritrocitaria a algunas de estas técnicas. Así, en la cobra real (*Ophiophagus hannah*) se describe actividad focal a la fosfatasa ácida y la  $\beta$ -glucoronidasa (SALAKIJ *ET AL.*, 2002). RASKIN (2010) describe positividad puntiforme para el ácido periódico de Schiff (PAS) en el citoplasma de los eritrocitos en boas, mientras que se ha detectado positividad focal para  $\alpha$ -naftil acetato esterasa en el varano de agua asiático (*Varanus salvator*) (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

**Tabla 2.3.** Tinciones citoquímicas del eritrocito de los reptiles (GERZELI, 1954; DESSAUER, 1970; CAXTON-MARTINS, 1977; CAXTON-MARTINS Y NGANWUCHU, 1978; recopilado en SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

TINCIÓN CITOQUÍMICA	REACCIÓN DEL ERITROCITO
<b>ENZIMAS</b>	
Fosfatasa ácida	Positivo
Fosfatasa alcalina	Negativo
Beta glucoronidasa	Negativo
Esterasa	Negativo
Peroxidasa	Positivo
Deshidrogenasa ácido láctico	Positivo
<b>POLISACÁRIDOS</b>	
Reacción del ácido periódico de Schiff	Positivo/Negativo
Azul alcian	No determinado
Azul de toluidina	No determinado
<b>LÍPIDOS</b>	
Sudán negro B	Negativo
Sudán neutro III	No determinado

### -Ultraestructura del eritrocito

Mediante el uso de la microscopía electrónica se confirma la morfología elíptica de los eritrocitos de reptiles, con superficie aplanada, sin abultamientos a nivel del núcleo (DESSER Y WELLER, 1979B; SALAKIJ *ET AL.*, 2002; MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005; SALAKIJ *ET AL.*, 2014). En *Ophiophagus hannah* se detectan vacuolas citoplasmáticas hasta en un 1% de los eritrocitos (SALAKIJ *ET AL.*, 2002), mientras que en *Varanus salvator* aparecen orgánulos degenerados en forma de inclusiones citoplasmáticas, además de hemoglobina difusa distribuida por el citoplasma. Menos frecuentemente se observa dicha hemoglobina en forma de cristales (SALAKIJ *ET AL.*, 2014). El uso del microscopio electrónico también ha permitido constatar la presencia de mitocondrias en el citoplasma de los eritrocitos inmaduros (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

### -La hemoglobina en reptiles

La hemoglobina forma parte de los eritrocitos de todos los vertebrados y es la responsable de la capacidad transportadora de oxígeno de la sangre. La estructura específica de dicha molécula no ha sido completamente establecida en reptiles, pero se cree

que es muy similar a la del resto de vertebrados. Se acepta que en reptiles la afinidad de la sangre por el oxígeno depende de la especie, la edad, el peso corporal y la temperatura ambiental (MURRAY, 1996).

## 2.1.2.- Los Leucocitos Granulocíticos en Reptiles

Los leucocitos granulocíticos son aquellos que presentan en el citoplasma acúmulos de gránulos específicos que pueden mostrar diferentes morfologías. Están presentes en la sangre periférica de mamíferos, aves y reptiles. En mamíferos se clasifican como neutrófilos, eosinófilos y basófilos en función de la reacción de sus gránulos citoplasmáticos y por tanto, de su coloración en respuesta a tinciones tipo Romanowsky (HAWKEY Y DENNET, 1989). En aves y reptiles también encontramos tres tipos diferentes de granulocitos funcionalmente similares a los de mamíferos. Sin embargo, existen algunas diferencias en la morfología y la nomenclatura ya que la célula homóloga al neutrófilo presenta en su citoplasma un número importante de gránulos ovales y/o espiculados de coloración eosinófila, por lo que la denominación “neutrófilo” no sería la más correcta para esta célula, denominándose heterófilo (HAWKEY Y DENNET, 1989). Sin embargo, hay autores que se reafirman en la presencia de neutrófilos en la sangre de aves y reptiles (SAINT GIRONS, 1970; DESSER, 1978; FRYE, 1978; ROSSKOPF, 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; AGUIRRE *ET AL.*, 1995).

Los granulocitos inmaduros tienden a ser escasos en la sangre periférica en condiciones fisiológicas. Se suele asociar un aumento marcado de su número a procesos en los que existe una mayor demanda de los mismos o a alteraciones de la función medular. Se diferencian de los granulocitos maduros por su mayor tamaño, cantidad de gránulos específicos y mayor basofilia citoplasmática. La granulopoyesis es similar en mamíferos, aves y reptiles. La primera célula reconocible de la serie granulocítica es el mieloblasto (granuloblasto), que evoluciona a promielocito (progranulocito), mielocito, metamielocito y finalmente granulocito maduro (HAWKEY Y DENNET, 1989).

### 2.1.2.1.- El Neutrófilo de los Reptiles

Los neutrófilos son los granulocitos más numerosos en los mamíferos. Su función principal es la degradación bacteriana mediante quimiotaxis, opsonización, ingestión y lisis. Su número puede aumentar en respuesta a infecciones bacterianas o fúngicas, daño tisular, algunas enfermedades metabólicas, leucemias mieloides y estrés (HAWKEY Y DENNET, 1989).

Varios autores afirman la existencia de neutrófilos en la sangre de los reptiles (SAINT GIRONS, 1970; FRYE, 1973, 1977; DESSER, 1978; FRYE, 1978; CHIODINI Y SUNDBERG, 1982; ROSSKOPF, 1982; ROSSKOPF *ET AL.*, 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; AGUIRRE *ET AL.*, 1995), a pesar de que anteriormente se contabilizaban en el frotis como monocitos (ALDER Y HUBER, 1923; BERNSTEIN, 1938; PIENAAR, 1962) o se confundían con linfocitos, basófilos, heterófilos, azurófilos o simplemente se denominaban como “otro leucocito” (FRYE, 1991). Sin embargo, cuando están presentes, los neutrófilos de los reptiles tienden a ser bastante escasos y la mayoría de

los autores o no los consideran como leucocitos propios de reptiles o bien no los han encontrado en sus estudios (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; MONTALI, 1988; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; BOURDEAU, 1989; HAWKEY Y DENNET, 1989; FRYE, 1991; HAIGH, 1991; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; ARNOLD, 1994; MURO *ET AL.*, 1994; GOTTDENKER Y JACOBSON, 1995; CAMPBELL, 1996B; DIVERS *ET AL.*, 1996; TROIANO *ET AL.*, 1996, 1997; ELIMAN, 1997; ANDERSON *ET AL.*, 1997; DOTSON *ET AL.*, 1997; WATSON, 1997; BRADLEY *ET AL.*, 1998; WORK *ET AL.*, 1998; TROIANO Y SILVA, 1998; ALLEMAN *ET AL.*, 1999; CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999; WORK Y BALAZS, 1999; FUENTES *ET AL.*, 2000; RASKIN, 2000; ROSSKOPF, 2000; SMITH *ET AL.*, 2000; HARR *ET AL.*, 2001; LEBLANC, 2001; CUADRADO *ET AL.*, 2002; SALAKIJ *ET AL.*, 2002; LLOYD, 2003; FISSE *ET AL.*, 2004; FONTENOT *ET AL.*, 2004; MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005; SALAKIJ *ET AL.*, 2014 ).

### **-Características tintoriales, citoquímicas y morfología**

El neutrófilo en reptiles reacciona de forma positiva a las técnicas citoquímicas de la peroxidasa y la fosfatasa alcalina y presenta características tintoriales similares a las de los neutrófilos de mamíferos cuando se procesa con los reactivos Cytocolor® y Neutrocolor® (FRYE, 1991).

El neutrófilo presenta, por lo general, un núcleo no segmentado con cromatina fuertemente agrupada (FRYE, 1991), aunque en algunas especies, como en *Sphenodon punctatus* se detecta segmentación nuclear (DESSER, 1978). El citoplasma suele contener finos gránulos azurófilos que le dan su coloración azul-grisácea, además de inclusiones y finas hebras fibrilares. Pueden observarse vacuolas lipídicas que suelen estar fagocitando restos celulares, bacterias u otras inclusiones, y que dan a la célula una apariencia tóxica. También es frecuente la presencia de pseudopodia (FRYE, 1991).

Los cambios morfológicos más frecuentes de los neutrófilos son los que reflejan inmadurez y toxicidad. La presencia en sangre periférica de células inmaduras es un indicador de hiperplasia mielóide asociada a malignidad, infección u otras enfermedades inflamatorias y permite distinguir entre procesos patológicos y neutrofilia secundaria a estrés (HAWKEY Y DENNET, 1989).

### **-Ultraestructura del neutrófilo**

Los estudios que describen ultraestructuralmente los neutrófilos de reptiles son escasos. En *Sphenodon punctatus* se han descrito ultraestructuralmente tanto los neutrófilos inmaduros (mielocitos) como los maduros. Los primeros muestran una superficie bastante regular, con la presencia de gránulos citoplasmáticos ovoides electrodensos y un núcleo compacto. Por el contrario, los neutrófilos maduros presentan una superficie bastante irregular y núcleo segmentado (DESSER Y WELLER, 1979A).

### 2.1.2.2.- El Heterófilo de los Reptiles

El heterófilo se corresponde funcional y bioquímicamente con el neutrófilo de los mamíferos (TAYLOR Y KAPLAN, 1961; EFRATI *ET AL.*, 1970). Se considera la célula inflamatoria principal, contabilizándose en elevado número en situaciones de sepsis y necrosis (BOYER, 1995; DIVERS, 2000A). En base a estudios ultraestructurales y citoquímicos, la función primaria del heterófilo es la fagocitosis (DUGUY, 1970; SYPEK Y BORYSENKO, 1988), participando en las respuestas inflamatorias asociadas a infecciones microbianas y parasitarias y en las inflamaciones inespecíficas (JACOBSON, 1980; JACOBSON *ET AL.*, 1980, 1983; SYPEK Y BORYSENKO, 1988). Al contrario que los neutrófilos de mamíferos, los heterófilos tienen una mayor dependencia de mecanismos independientes del oxígeno para la destrucción de los microorganismos fagocitados (CAMPBELL, 2004A).

#### -Dimensiones celulares

Los heterófilos de la mayoría de los reptiles son células grandes, con un tamaño medio de 10-23  $\mu\text{m}$  (ATLAND Y PARKER, 1955; ATLAND Y THOMPSON, 1958; ANDERSEN, 1961; AGID *ET AL.*, 1961; BERKSON, 1966; SAINT GIRONS, 1970; RASKIN, 2000), aunque hay variaciones entre las distintas especies e incluso dentro de un mismo individuo (SAINT GIRONS, 1970). Así, en *Crotalus adamanteus* los heterófilos son los leucocitos de mayor tamaño, aproximadamente de 1.5 a 2 veces el tamaño de los eritrocitos maduros, con un ratio núcleo/citoplasma menor a 1:5 (ALLEMAN *ET AL.*, 1999). Lo mismo sucede en la serpiente ratonera amarilla (*Elaphe obsoleta quadrivittata*) (DOTSON *ET AL.*, 1997), en *Ophiophagus hannah*, en la que los heterófilos presentan un diámetro de entre 16-20  $\mu\text{m}$  (SALAKIJ *ET AL.*, 2002) o en *Varanus salvator* con medidas de 11 a 17  $\mu\text{m}$  de diámetro (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

#### -Características tintoriales y morfología

La cualidad que mejor caracteriza y distingue a los heterófilos de otros granulocitos son sus gránulos citoplasmáticos fusiformes (RYERSON, 1943; TAYLOR Y KAPLAN, 1961; FRYE, 1976, 1991; CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997), aunque la morfología y tamaño de los mismos varía según las especies. Así, tienden a ser de menor tamaño, ovalados y menos numerosos en los cocodrilianos o de forma más alargada y más numerosos en lagartos y serpientes (FRYE, 1991). La tinción que adquieren dichos gránulos se muestra intermedia entre la del eosinófilo y la del basófilo (FRYE, 1977). En la mayoría de los reptiles los gránulos se tiñen de coloración rojiza-anaranjada con tinciones tipo Romanowsky, mientras que en los cocodrilianos muestran un color rojo ladrillo (HAWKEY Y DENNET, 1989; FRYE, 1991). En *Ophiophagus hannah* y en *Varanus salvator* los gránulos se tiñen fuertemente eosinófilos con tinciones Wright-Giemsa (SALAKIJ *ET AL.*, 2002; SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

La intensidad del color de los gránulos de los heterófilos puede variar según el método de fijación utilizado. Con el uso de metanol los gránulos adquieren una coloración marrón clara o naranja-rosada, mientras que el uso de acetona produce una coloración azul negruzca (ATLAND Y PARKER, 1955; ATLAND Y THOMPSON, 1958; ANDERSEN, 1961; AGID *ET AL.*, 1961; BERKSON, 1966). En serpientes se obtiene una tinción más intensa de los gránulos en aquellos frotis fijados con formaldehído o teñidos con Wright-Giemsa de un solo paso, que no requiere fijación previa con alcohol. Por el contrario, el uso de metanol genera tinciones de menor intensidad, por lo que suele afirmarse que no es apropiado para

preservar correctamente los heterófilos en serpientes (DOTSON *ET AL.*, 1995, TROIANO *ET AL.*, 1997; ALLEMAN *ET AL.*, 1999). Además, la fijación con glutaraldehído no permite obtener una buena tinción de otras células sanguíneas, por lo que la técnica recomendada de tinción es la de Wright-Giemsa de un solo paso (ALLEMAN *ET AL.*, 1999). En el dragón de agua chino (*Physignathus* spp.) los gránulos se tiñen menos eosinófilos y menos visibles con el uso de Diff-Quick o panóptico rápido que usando la tinción Wright modificada (LEBLANC, 2001).

El heterófilo de los reptiles presenta generalmente un núcleo basófilo excéntrico, no lobulado, redondo u ovalado, con coloración de azul claro a púrpura (RYERSON, 1943; PIENAAR, 1962; KÉLENYI Y NEMETH, 1969; FRYE, 1981; HAWKEY Y DENNET, 1989; CAMPBELL, 1996B; DOTSON *ET AL.*, 1997). Sin embargo, algunas especies de lagartos como la iguana azul de Gran Cayman (*Cyclura nubila lewisi*) (FISSE *ET AL.*, 2004), *Iguana iguana* (HARR *ET AL.*, 2001) o el dragón barbudo (*Pogona vitticeps*) (ELIMAN, 1997) presentan lobulación en el núcleo que les otorga una apariencia similar al heterófilo aviar (CANFIELD Y SHEA, 1988; MONTALI, 1988; HAWKEY Y DENNET, 1989).

El heterófilo de *Physignathus* spp. contiene, además de los habituales gránulos heterófilos alargados, un segundo tipo de gránulos eosinófilos de contorno redondeado o irregular. El núcleo es basófilo, redondo o segmentado, dependiendo del estado de maduración celular (LEBLANC, 2001).

El citoplasma del heterófilo cuando no está cubierto completamente por los gránulos muestra una coloración pálida, aunque puede aparecer ligeramente basófilo (WATSON, 1997).

En *Crotalus adamanteus* se describen dos variantes morfológicas del heterófilo. La primera presenta abundante citoplasma con numerosos gránulos eosinófilos de contorno irregular y en ocasiones un pequeño número de gránulos pequeños y basófilos. La segunda contiene gránulos ligeramente eosinófilos con un acúmulo focal, generalmente perinuclear, de gránulos fuertemente eosinófilos de contorno irregular. En ambos casos el núcleo es pequeño, redondo u oval y excéntrico (ALLEMAN *ET AL.*, 1999).

Se cree que la maduración de la serie granulocítica de reptiles se puede completar en sangre periférica, lo que generaría diferentes intensidades en la tinción de los gránulos heterófilos (EGAMI Y SASSA, 1988) y en algunos casos distintas morfologías nucleares (LEBLANC, 2001). El aumento de la presencia de heterófilos inmaduros en el frotis suele indicar un incremento de la demanda de células maduras que resulta en un agotamiento de las reservas y la consecuente liberación de células inmaduras (CAMPBELL, 1996B).

Los cambios morfológicos celulares dan más información sobre la presencia de patologías inflamatorias y/o infecciosas que el recuento celular (WATSON, 1997). La detección de heterófilos con apariencia anormal en el frotis ayuda a diagnosticar enfermedades infecciosas, generalmente bacterianas. Estos heterófilos tóxicos muestran una mayor basofilia citoplasmática, granulación anormal y vacuolización. También pueden aparecer células degranuladas, pudiendo ser artefactos generados durante la preparación del frotis o bien, un signo de toxicidad (DOTSON *ET AL.*, 1995, CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997; CAMPBELL, 2004A). El núcleo de dichas células suele ser de tinción más oscura, mostrando evidencias de picnosis (ALLEMAN *ET AL.*, 1999). Otro signo de alteración es la presencia de lobulación nuclear en especies en las que de forma fisiológica no está descrita (CAMPBELL, 1996B, 2004A).



### -Técnicas citoquímicas

Por lo general se considera que los heterófilos de aves y reptiles no presentan actividad mieloperoxidasa, mientras los eosinófilos son peroxidasa positivos. Esto suele emplearse como método de distinción entre ambos tipos celulares (KÉLENYI Y NEMETH, 1969; MATEO *ET AL.*, 1984; MAXWELL, 1984; MONTALI, 1988; EGAMI Y SASSA, 1988; ANDREASEN Y LATIMER, 1990; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; BOUNOUS *ET AL.*, 1996). Dicha negatividad a la peroxidasa, frente a la respuesta positiva de los neutrófilos de mamíferos, sugiere que los heterófilos son incapaces de producir la misma respuesta oxidativa frente a las bacterias. Esta puede ser la causa de que los reptiles respondan a la infección bacteriana con piogranulomas, en lugar de con una respuesta supurativa como la de los mamíferos (HEARD *ET AL.*, 2004). Por el contrario, algunos autores describen actividad peroxidasa en los heterófilos de algunas serpientes y lagartos (CAXTON-MARTINS Y NGANWUCHU, 1978; MATEO *ET AL.*, 1984; MONTALI, 1988; SYPEK Y BORYSENKO, 1988). Estas discrepancias podrían deberse a que el único acidófilo presente en muchos reptiles del orden Squamata combine características del heterófilo y del eosinófilo, lo que explicaría las descripciones de positividad a la peroxidasa en los heterófilos de los Squamata, si se da por hecho que los eosinófilos son los únicos acidófilos claramente positivos a la peroxidasa hallados en reptiles (KÉLENYI Y NEMETH, 1969; MONTALI, 1988). Sin embargo, en el lagarto gigante de El Hierro (*Gallotia simonyi*) se describen tanto heterófilos como eosinófilos, y los primeros presentan positividad a la bencidina peroxidasa, además de al PAS y a la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa, mientras que los eosinófilos carecen de actividad peroxidasa en esta especie (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005).

En *Crotalus adamanteus* se describe positividad a la reacción del PAS, la cloroacetato esterasa y la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa, pero no a la bencidina peroxidasa (ALLEMAN *ET AL.*, 1999). En iguanas hay estudios que describen positividad para dihidroclorido bencidina peroxidasa y PAS (FUENTES *ET AL.*, 2000), mientras que otros autores hablan de respuesta positiva al PAS, bencidina peroxidasa y sudán negro B (SBB) y moderadamente positiva a la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa y fosfatasa ácida. Esto hace que los heterófilos de las iguanas sean bastante similares a los neutrófilos de mamíferos (HARR *ET AL.*, 2001). El agama común (*Agama agama*) también presenta heterófilos positivos a la bencidina peroxidasa (CAXTON-MARTINS Y NGANWUCHU, 1978). En el alligator americano (*Alligator mississippiensis*) se ha citado positividad frente a esterases no específicas, ACP, fosfatasa alcalina, peroxidasa (3-amino-9-etil-carbazol) y PAS (sin diastasa); siendo negativo al naftol AS-D cloroacetato esterasa, al PER y al PAS con diastasa (MONTALI, 1988). En *Ophiophagus hannah* los gránulos heterófilos se tiñen moderadamente con SBB y la  $\beta$ -glucoronidasa; y son negativos, o adquieren una tinción débil, con la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa y la fosfatasa ácida (SALAKIJ *ET AL.*, 2002). En *Varanus salvator* existe positividad a SBB,  $\alpha$ -naftil acetato esterasa y  $\beta$ -glucoronidasa (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

En *Ophiophagus hannah* se ha establecido la hipótesis de la existencia de diferentes estadios de desarrollo en los heterófilos circulantes, en base a los diferentes patrones de tinción citoquímica de las células al ser tratadas con la fosfatasa ácida y la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa, mostrando cantidades diferentes de ácido hidrolasa (SALAKIJ *ET AL.*, 2002).

Citoquímicamente, se han identificado lípidos, glucógeno, peroxidasa y fosfatasa ácida y alcalina en los leucocitos de varias especies de reptiles (Tabla 2.4) (HORII *ET AL.*, 1951; PIENAAR, 1962; EFRATI *ET AL.*, 1970).

**Tabla 2.4.** Tinciones citoquímicas del heterófilo de los reptiles (GERZELI, 1954; PIENAAR, 1962; DESSAUER, 1970; CAXTON-MARTINS, 1977; CAXTON-MARTINS Y NGANWUCHU, 1978; DESSER, 1978; recopilado en SYPEK Y BORYSENKO, 1988)

TINCIÓN CITOQUÍMICA	REACCIÓN DEL HETERÓFILO
<b>ENZIMAS</b>	
Fosfatasa ácida	Positivo
Fosfatasa alcalina	Positivo/Negativo
Beta glucoronidasa	Positivo
Esterasa	Positivo
Peroxidasa	Positivo/Negativo
Deshidrogenasa ácido láctico	No determinado
<b>POLISACÁRIDOS</b>	
Reacción del ácido periódico de Schiff	Positivo
Azul alcian	Negativo
Azul de toluidina	Positivo
<b>LÍPIDOS</b>	
Sudán negro B	Positivo
Sudán neutro III	Negativo

### -Ultraestructura del heterófilo

Ultraestructuralmente, el heterófilo del yacaré del pantanal (*Caiman crocodilus yacare*) muestra una forma esférica, con contorno irregular y prolongaciones citoplasmáticas. El citoplasma es abundante, conteniendo gran cantidad de gránulos de tamaño y electrodensidad variables, de forma esférica, oval, elíptica o irregular. Se observan numerosas vesículas electrolúcidas, pocas mitocondrias, retículo endoplasmático y ribosomas. En algunas regiones aparecen estructuras que se asemejan a formaciones fibrilares. El núcleo es excéntrico y muestra cromatina adherida a la membrana de la envoltura nuclear. Se hace evidente la presencia de un nucléolo menos electrodensito (DE MOURA ET AL., 1997). Los gránulos citoplasmáticos del heterófilo de *Gallotia simonyi* también presentan gran heterogeneidad en su tamaño y electrodensidad (MARTÍNEZ-SILVESTRE ET AL., 2005). En *Varanus salvator* se describen dos tipos diferentes de gránulos citoplasmáticos, un primer grupo más numeroso, de gran tamaño y forma de varilla, con electrodensidad variable y otro grupo más escaso, de forma redondeada y elevada electrodensidad (SALAKIJ ET AL., 2014).

En *Crotalus adamanteus* se confirma ultraestructuralmente la presencia de dos variaciones morfológicas de heterófilo. Ambas variantes muestran gránulos citoplasmáticos de tamaño grande y pleomórficos, pero en una los gránulos son homogéneamente electrodensos y en la otra, unos gránulos son electrodensos y otros presentan una matriz más clara (ALLEMAN ET AL., 1999). De forma similar, los heterófilos de *Ophiophagus hannah* se clasifican en dos subtipos en función de la electrodensidad de sus gránulos. Éstos son generalmente grandes y pleomórficos con densidad electrónica variable, pero unos pocos heterófilos contienen gránulos de electrodensidad homogénea. El resto de las características de ambos tipos celulares son iguales, incluyendo la presencia de mitocondrias y pequeños acúmulos de retículo endoplasmático y la morfología nuclear, dentada con acúmulos periféricos de heterocromatina. Estas diferencias sugieren la existencia de diferentes estadios de desarrollo de los heterófilos circulatorios (SALAKIJ ET AL., 2002). La misma idea se desprende del estudio ultraestructural en *Elaphe obsoleta*

*quadrivitatta*, en la que los gránulos citoplasmáticos se clasifican en dos grupos en función de su electrodensidad (BOUNOUS *ET AL.*, 1996).

### 2.1.2.3.- El Eosinófilo de los Reptiles

La clasificación clásica divide a las células acidófilas en heterófilos y eosinófilos (FRYE 1973, 1981), lo que parece cierto para cocodrilianos y quelonios, pero no para muchos de los reptiles del orden Squamata, ya que en estas especies se suele hablar de la existencia de un único acidófilo, el heterófilo (FRYE, 1991). Sin embargo, en ocasiones se describe el eosinófilo en algunos Squamata (KÉLENYI Y NEMETH, 1969; ZAPATA *ET AL.*, 1981; MONTALI, 1988). Ese es el caso de la serpiente de cascabel sudamericana (*Crotalus durissus terrificus*) (TROIANO *ET AL.*, 1997), de *Ophiophagus hannah* (SALAKIJ *ET AL.*, 2002) y de *Gallotia simonyi* (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005). También aparecen eosinófilos en *Cyclura cornuta* e *Iguana iguana*, aunque en estas especies estas células no reaccionan a ninguna técnica citoquímica (FUENTES *ET AL.*, 2000). Por el contrario, *Pogona vitticeps*, *Crotalus adamanteus*, el monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*) y *Varanus salvator* carecen de acidófilos eosinófilos (ELIMAN, 1997; ALLEMAN *ET AL.*, 1999; COOPER-BAILEY *ET AL.*, 2011; SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

Externamente heterófilos y eosinófilos son muy similares entre sí, lo que conduce en muchas ocasiones a errores en el recuento celular diferencial, pero por lo general se acepta que ambos proceden de precursores diferentes (MATEO *ET AL.*, 1984).

La función del eosinófilo se relaciona con la fagocitosis de inmunocomplejos asociados a infecciones parasitarias, aunque son necesarios estudios adicionales (MEAD Y BORYSENKO, 1984A; SYPEK Y BORYSENKO, 1988). En aligatores con infecciones experimentales parasitarias se ha detectado una marcada eosinofilia con recuentos de hasta el 60% del total de la serie leucocitaria (GLASSMAN *ET AL.*, 1979). Así, hay autores que utilizan el recuento de eosinófilos como un indicador de infestación parasitaria (ROSSKOPF, 2000).

### -Dimensiones celulares

El tamaño medio del eosinófilo en reptiles es de 9 a 20  $\mu\text{m}$  (ALDER Y HUBER, 1923; AUSTIN *ET AL.*, 1927; RYERSON, 1943; ATLAND Y PARKER, 1955; ATLAND Y THOMPSON, 1958; ANDERSEN, 1961; AGID *ET AL.*, 1961; PIENAAR, 1962; KÉLENYI Y NEMETH, 1969; EFRATI *ET AL.*, 1970; SAINT GIRONS, 1970; DESSER Y WELLER, 1979A; MEAD Y BORYSENKO, 1984A; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; WORK *ET AL.*, 1998), aunque varía en función de la especie (Tabla 2.5). Los eosinófilos de mayor tamaño se encuentran en serpientes, mientras que los lagartos ostentan los más pequeños (SAINT GIRONS, 1970; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; RASKIN, 2000). Quelonios y cocodrilianos muestran eosinófilos de tamaño intermedio (SAINT GIRONS, 1970). Así, como ejemplo, encontramos que en *Ophiophagus hannah* los eosinófilos tienen un diámetro aproximado de 11-18  $\mu\text{m}$ , siendo de tamaño inferior a los heterófilos, pero mayores que los basófilos (SALAKIJ *ET AL.*, 2002).

**Tabla 2.5.** Diámetros mayores de los eosinófilos en reptiles no quelonios (SAINT GIRONS Y DUGUY, 1963; FRYE, 1991)

ESPECIE	MEDIA	RANGO
<b>Orden Rhyncocephalia</b>		
<i>Sphenodon punctatus</i>	14.78	9-23
<b>Orden Squamata</b>		
<b>Suborden Sauria</b>		
<i>Heteronota binoei</i>	16.68	13-20
<i>Lygosoma (Sphenomorphus) sp.</i>	14.04	10-16
<i>Lacerta muralis</i>	13.58	11-16
<i>Lacerta agilis</i>	13.90	12-16
<i>Lacerta vivipara</i>	14.43	12-16
<i>Lacerta viridis</i>	14.25	12-17
<i>Psammodromus algirus</i>	10.42	9-12
<i>Anguis fragilis</i>	14.20	11-17
<i>Heloderma suspectum</i>	14.20	10-18
<b>Suborden Serpentes</b>		
<i>Coronella austriaca</i>	18.00	16-19
<i>Elaphe longissima</i>	18.18	16-20
<i>Elaphe scalaris</i>	15.70	15-17
<i>Coluber viridiflavus</i>	17.88	15-20
<i>Natrix natrix</i>	17.59	14-20
<i>Natrix maura</i>	18.22	16-20
<i>Malpolon monspessulanus</i>	19.20	18-20
<i>Pseudechis australis</i>	16.73	15-19
<i>Vipera aspis</i>	17.70	16-20
<i>Vipera berus</i>	18.13	15-20
<b>Orden Crocodilia</b>		
<i>Crocodylus niloticus</i>	16.25	

Medidas expresadas en  $\mu\text{m}$ 

### -Características tintoriales y morfología

El eosinófilo de reptiles se caracteriza, al igual que en aves y mamíferos, por sus gránulos redondeados naranja-rojizos con tinciones tipo Romanowsky (RYERSON, 1943; PIENAAR, 1962; KÉLENYI Y NEMETH, 1969; EFRATI *ET AL.*, 1970; SAINT GIRONS, 1970; DESSER Y WELLER, 1979A; MEAD Y BORYSENKO, 1984A; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991; WATSON, 1997; WORK *ET AL.*, 1998) y por su núcleo, frecuentemente excéntrico, redondo u ovalado, débilmente basófilo y que puede aparecer simple o lobulado (MONTALI, 1988; FRYE, 1991). También se ha descrito al núcleo en posición central (MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; CAMPBELL, 1996B). Su citoplasma es más basófilo y suele ser más visible que el del heterófilo (HAWKEY Y DENNET, 1989; WATSON, 1997) y la membrana celular puede presentar numerosos pseudópodos (FRYE, 1991).

Los gránulos eosinófilos de algunas especies como las iguanas se tiñen típicamente de azul con tinciones tipo Romanowsky (HAWKEY Y DENNET, 1989). En *Iguana iguana* el citoplasma presenta un gran número de gránulos redondos azul claro o verdosos, con un núcleo excéntrico redondo u oval (HARR *ET AL.*, 2001). De forma similar,

los eosinófilos de *Ophiophagus hannah* contienen un gran número de gránulos redondos de color azul pálido que suelen dificultar la visualización del núcleo celular. Sin embargo, algunos eosinófilos contienen un escaso número de gránulos grandes, homogéneos y de coloración basófila clara que protruyen de la membrana celular (SALAKIJ ET AL., 2002). Otras serpientes, como *Elaphe obsoleta* y la pitón real (*Phyton regius*) presentan eosinófilos oscuros (MONTALI, 1988; SCHUMACHER ET AL., 1994; DOTSON ET AL., 1995; JOHNSON Y BENSON, 1996; RASKIN, 2000).

Los eosinófilos de *Crotalus durissus terrificus* mantienen la morfología y coloración estándar, con núcleo redondo o bilobulado excéntrico y gránulos citoplasmáticos esféricos, homogéneos y eosinófilos (TROIANO ET AL., 1997).

Los eosinófilos pueden degranularse en respuesta al estrés, manteniendo sus gránulos intactos y pudiendo observarse éstos con tinción supravital, fuertemente teñidos pero carentes de su capacidad para aceptar la eosina u otras tinciones similares (FRYE, 1991).

Los eosinófilos de los reptiles adquieren una coloración naranja-rojiza cuando se usa el metanol como fijador, mientras que su tonalidad es azul negruzca si se fijan con acetona (ALDER Y HUBER, 1923; AUSTIN ET AL., 1927; ATLAND Y PARKER, 1955; ATLAND Y THOMPSON, 1958; ANDERSEN, 1961; AGID ET AL., 1961).

### **-Técnicas citoquímicas**

Estos granulocitos han generado mucha polémica en cuanto a su clasificación y diferenciación (NOBLE, 1931; RYERSON, 1943, 1949; PIENAAR, 1962; TAYLOR ET AL., 1963; ANDREW, 1965; ELKAN Y ZWART, 1967; KÉLENYI Y NEMETH, 1969; EFRATI ET AL., 1970; FRYE, 1973; CAXTON-MARTINS Y NGANWUCHU, 1978; GLASSMAN Y BENNETT, 1978A, 1978B; WILL, 1978, 1979; DESSER Y WELLER, 1979A; ZAPATA ET AL., 1981; FRYE, 1981; MATEO ET AL., 1984; MONTALI, 1988; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; AZEVEDO Y LUNARDI, 2003). Algunos de estos autores consideran la existencia de dos eosinófilos en la sangre de algunos reptiles; un primer tipo (eosinófilo propiamente dicho) con gránulos citoplasmáticos redondos que reaccionan de forma positiva a las técnicas citoquímicas de la bencidina peroxidasa neutral y alcalina, y un segundo tipo de eosinófilo (heterófilo) con gránulos fusiformes o alargados negativos a la bencidina peroxidasa (FRYE, 1991). De forma similar, NOBLE (1931) clasificó los eosinófilos en dos grupos; los verdaderos eosinófilos, que son positivos a la peroxidasa de Graham-Knoll (tinción con 3-amino-9-etilcarbazol) y los heterófilos, peroxidasa negativos y positivos al sudán negro.

Se acepta que los gránulos de los eosinófilos reaccionan positivamente a las técnicas basadas en la peroxidasa (Tabla 2.6) (KÉLENYI Y NEMETH, 1969; MATEO ET AL., 1984; MAXWELL, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988), tal como ocurre en el lagarto de arena (*Lacerta agilis*) (KÉLENYI Y NEMETH, 1969). Los eosinófilos de *Ophiophagus hannah* sólo se tiñen en escaso número con la  $\beta$ -glucuronidasa (SALAKIJ ET AL., 2002). De igual manera, el lagarto agama negro (*Agama stellio*) presenta eosinófilos sin actividad peroxidasa, pero con positividad a la fosfatasa ácida y a la reacción del PAS (EFRATI ET AL., 1970). En *Gallotia simonyi* tampoco aparece actividad peroxidasa. En esta especie se observa positividad a fosfatasa ácida, cloroacetato esterasa y  $\alpha$ -naftil acetato esterasa (MARTÍNEZ-

SILVESTRE *ET AL*, 2005). En el caso de *Iguana iguana* los eosinófilos son negativos para todas las técnicas citoquímicas empleadas (HARR *ET AL.*, 2001).

**Tabla 2.6.** Tinciones citoquímicas del eosinófilo de los reptiles (GERZELI, 1954; PIENAAR, 1962; DESSAUER, 1970; CAXTON-MARTINS, 1977; CAXTON-MARTINS Y NGANWUCHU, 1978; DESSER, 1978; recopilado en SYPEK Y BORYSENKO, 1988)

TINCIÓN CITOQUÍMICA	REACCIÓN DEL EOSINÓFILO
<b>ENZIMAS</b>	
Fosfatasa ácida	Positivo
Fosfatasa alcalina	Positivo
Beta glucoronidasa	Positivo
Esterasa	Positivo/Negativo
Peroxidasa	Positivo
Deshidrogenasa ácido láctico	No determinado
<b>POLISACÁRIDOS</b>	
Reacción del ácido periódico de Schiff	Positivo
Azul alcian	Positivo
Azul de toluidina	Negativo
<b>LÍPIDOS</b>	
Sudán negro B	Positivo/Negativo
Sudán neutro III	Negativo

### **-Ultraestructura del eosinófilo**

Los estudios ultraestructurales en *Caiman crocodilus yacare* muestran un eosinófilo de forma esférica u ovalada, con prolongaciones citoplasmáticas cortas y delgadas. El abundante citoplasma es rico en mitocondrias y gránulos citoplasmáticos voluminosos con electrodensidad de moderada a intensa, de forma esférica y/o oval. Algunos gránulos muestran una estructura interna heterogénea, formada por material finamente granuloso. También aparecen pequeños acúmulos de retículo endoplasmático y algunos ribosomas y pequeñas vesículas. El núcleo se muestra excéntrico y redondeado, con heterocromatina periférica y un nucléolo en ocasiones visible (DE MOURA *ET AL.*, 1997).

Las descripciones ultraestructurales del eosinófilo en reptiles del orden Squamata no son muy abundantes. En *Sphenodon punctatus* el núcleo apareció lobulado y el citoplasma lleno de gránulos irregulares en la forma, pero de electrodensidad alta y homogénea, además de inclusiones granulares más pequeñas, mitocondrias y beta-glucógeno. Se describen otros orgánulos citoplasmáticos con menos frecuencia (DESSER Y WÉLLER, 1979A). En *Gallotia simonyi* los gránulos citoplasmáticos también manifiestan electrodensidad homogénea (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005). Los eosinófilos de *Ophiophagus hannah* no presentan orgánulos en su citoplasma (SALAKIJ *ET AL.*, 2002).

#### **2.1.2.4.- El Basófilo de los Reptiles**

Es el leucocito granulocítico de más reciente identificación en reptiles. Los estudios ultraestructurales y citoquímicos han revelado muchas similitudes entre los basófilos de los reptiles y los de los mamíferos, por lo que se les supone la misma función como principales responsables de la respuesta alérgica y antigénica, portando inmunoglobulinas

de superficie y respondiendo, al activarse, con la liberación del mediador histamina mediante un mecanismo de degranulación. Participan en procesos infecciosos y/o inflamatorios (MEAD *ET AL.*, 1983; SYPEK *ET AL.*, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; RASKIN, 2000).

### -Dimensiones celulares

El tamaño medio de los basófilos oscila entre 7-20  $\mu\text{m}$  (Tabla 2.7) (ALDER Y HUBER, 1923; AUSTIN *ET AL.*, 1927; ATLAND Y PARKER, 1955; ATLAND Y THOMPSON, 1958; MONTALI, 1988), encontrándose en serpientes los de mayor tamaño, seguidos de los de quelonios y cocodrilianos. Los basófilos más pequeños aparecen en lagartos (MONTALI, 1988), aunque es en *Sphenodon punctatus* donde se han descrito los basófilos de mayor tamaño (SAINT GIRONS, 1970).

En *Crotalus adamanteus* el basófilo se describe de menor tamaño que el heterófilo, con un ratio núcleo/citoplasma moderadamente bajo (1:3) (ALLEMAN *ET AL.*, 1999). En *Ophiophagus hannah* el diámetro de los basófilos es de 8-12  $\mu\text{m}$  (SALAKIJ *ET AL.*, 2002) y en *Varanus salvator* de 6 a 9  $\mu\text{m}$  (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

**Tabla 2.7.** Diámetros mayores de los basófilos de diferentes reptiles no quelonios (SAINT GIRONS Y DUGUY, 1963; FRYE, 1991)

ESPECIE	MEDIA	RANGO
<b>Orden Rhyncocephalia</b>		
<i>Sphenodon punctatus</i>	14.43	12-20
<b>Orden Squamata</b>		
<b>Suborden Sauria</b>		
<i>Heteronota binoei</i>	10.90	8-15
<i>Lygosoma (Sphenomorphus) sp.</i>	8.33	7-10
<i>Lacerta muralis</i>	10.80	9-13
<i>Lacerta agilis</i>	8.10	7-9
<i>Lacerta vivipara</i>	10.47	9-12
<i>Lacerta viridis</i>	11.90	10-13
<i>Psammodromus algirus</i>	9.70	8-11
<i>Anguis fragilis</i>	11.89	9-15
<i>Heloderma suspectum</i>	10.92	8-16
<b>Suborden Serpentes</b>		
<i>Coronella austriaca</i>	11.00	10-12
<i>Elaphe longissima</i>	12.53	9-16
<i>Elaphe scalaris</i>	10.10	9-11
<i>Coluber viridiflavus</i>	13.02	10-15
<i>Natrix natrix</i>	10.18	8-12
<i>Natrix maura</i>	11.83	9-15
<i>Malpolon monspessulanus</i>	11.70	11-13
<i>Vipera aspis</i>	12.26	9-16
<i>Vipera berus</i>	11.69	9-16
<b>Orden Crocodylia</b>		
<i>Crocodylus niloticus</i>	13.50	

Medidas expresadas en  $\mu\text{m}$

### -Características tintoriales y morfología

Las tinciones acuosas pueden generar alteraciones en los gránulos de los basófilos, por lo que las técnicas de tinción más adecuadas son las que emplean como fijador el alcohol, o bien las tinciones tipo Romanowsky o el azul de Toloudina (SYPEK Y

BORYSENKO, 1988; CAMPBELL, 1996B). El uso de metanol otorga a los basófilos una coloración azul metacromática (ALDER Y HUBER, 1923; AUSTIN *ET AL.*, 1927; ATLAND Y PARKER, 1955; ATLAND Y THOMPSON, 1958). Con la técnica Wright-Giemsa los gránulos citoplasmáticos se preservan bien en algunas especies (ALLEMAN *ET AL.*, 1999), aunque no ocurre igual con todos los reptiles del orden Squamata. Por ejemplo, los gránulos basófilos de la víbora jaracaca (*Bothrops jaracaca*) no se mantienen adecuadamente con fijaciones basadas en el metanol (EGAMI Y SASSA, 1988). Los basófilos de *Ophiophagus hannah* son más difíciles de identificar debido a la coloración azulada que adquieren sus gránulos, prefiriéndose el uso de tinciones Wright (SALAKIJ *ET AL.*, 2002).

Los basófilos poseen gránulos citoplasmáticos basófilos metacromáticos que adquieren un color púrpura con tinciones tipo Romanowsky (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996B). Su núcleo se tiñe oscuro y suele ser de localización central (FRYE, 1991), o ligeramente excéntrico y sin lobulaciones (CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997). En reptiles, al contrario que en mamíferos, no se han observado basófilos con núcleo segmentado (HEARD *ET AL.*, 2004). Sin embargo, la valoración del núcleo es complicada mediante el uso de la microscopía óptica, ya que los gránulos citoplasmáticos fuertemente teñidos dificultan su visualización (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997).

En *Crotalus adamanteus* el citoplasma celular es de contorno esférico, albergando un elevado número de gránulos basófilos, redondos y homogéneos, que tienden a enmascarar el núcleo, que tiene morfología ovalada y localización excéntrica (TROIANO *ET AL.*, 1997; ALLEMAN *ET AL.*, 1999). El basófilo de *Ophiophagus hannah* es muy similar y los gránulos se tiñen intensamente basófilos y están frecuentemente localizados en un polo celular, desplazando al núcleo a una posición excéntrica (SALAKIJ *ET AL.*, 2002). Se han realizado descripciones muy similares en *Elaphe obsoleta quadrivittata* (DOTSON *ET AL.*, 1997) y en *Varanus salvator*, en el que el núcleo aparece con morfología esférica y los gránulos citoplasmáticos muestran metacromasia con la tinción del nuevo azul de metileno (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

En *Pogona vitticeps* (ELIMAN, 1997) y *Physignathus* spp. (LEBLANC, 2001) los gránulos muestran una coloración violeta y morfología redondeada, oscureciendo total o parcialmente el núcleo, que se encuentra en posición central.

En *Iguana iguana* los gránulos citoplasmáticos son redondos, azul oscuro o morados, y el núcleo es redondo u oval (HARR *ET AL.*, 2001).

### **-Técnicas citoquímicas**

Los basófilos de *Ophiophagus hannah* reaccionan positivamente con la técnica del PAS, Sudán negro B,  $\alpha$ -naftil acetato esterasa y  $\beta$ -glucuronidasa (SALAKIJ *ET AL.*, 2002), mientras que los de *Crotalus adamanteus* sólo muestran positividad al PAS (ALLEMAN *ET AL.*, 1999). En ambos casos no existe respuesta positiva al azul de Toluidina. Esto difiere de los resultados obtenidos en varias especies de quelonios y cocodrilianos, en los que se detecta positividad frente a esta técnica citoquímica (MATEO *ET AL.*, 1984; MONTALI, 1988; ALLEMAN *ET AL.*, 1992), al igual que en varias especies de iguana (*Cyclura cornuta* e *Iguana iguana*), que a su vez mostraron negatividad frente al PAS y la dihidroclorido benzidina peroxidasa (Tabla 2.8) (FUENTES *ET AL.*, 2000). Sin embargo, los estudios de otros autores difieren de estos resultados. Así, HARR *ET AL.* (2001) describen para los



basófilos de *Iguana iguana* positividad leve frente al PAS, pero negatividad frente a las otras técnicas citoquímicas, incluido el azul de Toluidina.

Los basófilos de *Gallotia simonyi* son positivos para el azul de Toluidina y la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005).

**Tabla 2.8.** Tinciones citoquímicas del basófilo de los reptiles (GERZELI, 1954; PIENAAR, 1962; DESSAUER, 1970; CAXTON-MARTINS, 1977; CAXTON-MARTINS Y NGANWUCHU, 1978; DESSER, 1978; recopilado en SYPEK Y BORYSENKO, 1988)

TINCIÓN CITOQUÍMICA	REACCIÓN DEL BASÓFILO
<b>ENZIMAS</b>	
Fostatasa ácida	Positivo/Negativo
Fosfatasa alcalina	Positivo/Negativo
Beta glucoronidasa	Positivo
Esterasa	Positivo/Negativo
Peroxidasa	Negativo
Deshidrogenasa ácido láctico	No determinado
<b>POLISACÁRIDOS</b>	
Reacción del ácido periódico de Schiff	Positivo
Azul alcian	Positivo
Azul de toluidina	Negativo
<b>LÍPIDOS</b>	
Sudán negro B	Negativo
Sudán neutro III	No determinado

### -Ultraestructura del basófilo

Ultraestructuralmente los basófilos de *Sphenodon punctatus* muestran un contorno citoplasmático bastante regular y un núcleo compacto. Los abundantes gránulos aparecen ovoides y homogéneamente electrodensos, aunque en muchos basófilos los gránulos se muestran alterados o degenerados, conteniendo microtúbulos en su estructura interna. También se describe en el citoplasma la presencia de mitocondrias, partículas de beta-glucógeno y algunos microfilamentos (DESSER Y WELLER 1979A). FRYE (1991) describe un núcleo redondo con un nucléolo denso y ovalado, y los gránulos de los basófilos de *Ophiophagus hannah* aparecen pequeños, homogéneos y electrodensos (SALAKIJ *ET AL.*, 2002), similar a lo descrito en *Varanus salvator*, en el que además se describe un núcleo grande y ovalado (SALAKIJ *ET AL.*, 2014). Por el contrario, los basófilos de *Gallotia simonyi* muestran gránulos con elevada y con moderada electrodensidad (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005).

## 2.1.3.- Los Leucocitos Mononucleares en Reptiles

### 2.1.3.1.- El Linfocito de los Reptiles

La función de los linfocitos en reptiles es muy similar a la de mamíferos y aves. Existen dos tipos principales de linfocitos, T y B, que desarrollan diferentes funciones. Los

linfocitos B producen varios tipos de inmunoglobulinas mientras que las diferentes poblaciones de linfocitos T participan en la moderación de la respuesta inmune (CAMPBELL, 1996B; RASKIN, 2000; CAMPBELL, 2004A). Los linfocitos también pueden desarrollar actividad fagocítica, ya que en situaciones de bacteriemia se han encontrado fagocitando microorganismos o eritrocitos (FRYE, 1991).

En el caso de los reptiles y al contrario de lo que ocurre en aves y mamíferos, la respuesta inmune está influenciada por las condiciones ambientales. Así, las bajas temperaturas pueden reducirla o incluso inhibirla (CAMPBELL, 2004A).

Existen estudios que aportan la idea de la existencia de una importante heterogeneidad en los linfocitos de reptiles, que se manifiesta con variabilidad en los niveles de células T y B (SYPEK Y BORYSENKO, 1988). Esta heterogeneidad ha sido extensamente estudiada en varias especies de lagartos: el agame (*Calotes versicolor*) (PITCHAPPAN Y MUTHUKKARUPPAN, 1977), el eslizón ocelado (*Chalcides ocellatus*) (EL RIDI Y KANDIL, 1981) y el agama negro (*Agama stellio*) (NEGM Y MANSOUR, 1983). Y también en serpientes, como la serpiente ratonera real (*Spalerosophis diadema*) (MANSOUR ET AL., 1980) y la serpiente ratonera japonesa (*Elaphe quadrivirgata*) (KAWAGUCHI ET AL., 1980), así como en la tortuga mordedora (*Chelydra serpentina*) (MEAD Y BORYSENKO, 1984B).

Las células T son los linfocitos predominantes en timo, bazo y sangre periférica (SYPEK Y BORYSENKO, 1988) y se ha sugerido la existencia de dos antígenos T diferenciados (PITCHAPPAN Y MUTHUKKARUPPAN, 1977; MEAD Y BORYSENKO, 1984B; recopilado en SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

### **-Dimensiones celulares**

El linfocito de los reptiles es bastante similar al de aves y mamíferos (BRADLEY, 1937; LUCAS Y JAMROZ, 1961; ANDREW, 1965; HAWKEY, 1975; MATEO ET AL., 1984; CAMPBELL, 1996B; RASKIN, 2000). Puede variar en tamaño desde una célula pequeña, de contorno redondeado, a otra de mayores dimensiones. Los linfocitos pequeños miden de 5.5 a 10  $\mu\text{m}$  y los grandes de 11 a 14.5  $\mu\text{m}$  (RYERSON, 1949; PIENAAR, 1962; SAINT GIRONS, 1970; SYPEK Y BORYSENKO, 1988). En ocasiones, se consideran los leucocitos de mayor tamaño hallados en el frotis sanguíneo de algunos reptiles (WATSON, 1997).

La mayoría de los linfocitos de *Crotalus adamanteus* muestran un tamaño pequeño, inferior a la tercera parte del tamaño de un eritrocito maduro. Un menor número de linfocitos presenta un tamaño intermedio, de la mitad a la tercera parte de un eritrocito maduro. Además, en esta especie los trombocitos superan en tamaño a los linfocitos, aunque no ocurre lo mismo en muchas otras especies de reptiles (ALLEMAN ET AL., 1999).

El linfocito de *Varanus salvator* muestra un pequeño tamaño, de 6-10  $\mu\text{m}$  (SALAKI ET AL., 2014).

### **-Características tintoriales y morfología**

Los linfocitos se han considerado los leucocitos de más difícil identificación en los frotis sanguíneos de reptiles, principalmente porque tienden a confundirse con los trombocitos (HAWKEY Y DENNET, 1989; WATSON, 1997; ELIMAN, 1997; ALLEMAN ET AL., 1999; HARR ET AL., 2001). Sin embargo, los linfocitos suelen ser más grandes, con un

núcleo también más grande, redondo y compacto, que se diferencia del de los trombocitos en la menor densidad de su cromatina nuclear. Además, los linfocitos no presentan la tendencia a la aglutinación que muestran los trombocitos en el frotis y poseen gránulos azurófilos que son más finos y numerosos que los que aparecen en los trombocitos (WATSON, 1997; RASKIN, 2000). Su típico citoplasma es finamente granular, adquiriendo una coloración basófila clara con tinciones tipo Romanowsky y con frecuencia pueden observarse inclusiones azurófilas y/o hialinas (HAWKEY Y DENNET, 1989; FRYE, 1991; MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; MURO *ET AL.*, 1994; CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997; RASKIN, 2000).

Los linfocitos de *Pogona vitticeps* presentan un citoplasma basófilo y un núcleo redondo con un fino patrón reticular. Externamente presentan una morfología más esférica que la del trombocito y un mayor ratio núcleo/citoplasma (ELIMAN, 1997). El linfocito de *Physignathus* spp. es muy similar y se diferencia de los trombocitos por su contorno redondeado y escaso citoplasma de coloración gris-azulada (LEBLANC, 2001).

Los linfocitos de *Crotalus durissus terrificus* se han descrito como células redondas, con núcleo central o ligeramente excéntrico y un citoplasma basófilo claro (TROIANO *ET AL.*, 1997).

En el caso de *Crotalus adamanteus* se han descrito dos variedades morfológicas linfocitarias. La mayoría de los linfocitos son de pequeño tamaño, bien diferenciados y con citoplasma basófilo y granular, mientras que un 1% de los linfocitos muestra un tamaño intermedio, con citoplasma basófilo más voluminoso, caracterizado por la presencia de finos gránulos azurófilos y un núcleo pequeño, redondo y excéntrico, con un elevado ratio núcleo/citoplasma (ALLEMAN *ET AL.*, 1999). Algo similar ocurre en *Elaphe obsoleta quadrivittata*, con linfocitos pequeños y linfocitos grandes. Los pequeños son típicamente redondos, aunque a veces su contorno puede ser irregular, con un núcleo central o excéntrico, que va de redondo a poligonal. El escaso citoplasma es finamente granular y ligeramente basófilo. El núcleo es violeta claro, con un patrón de cromatina borroso. Los linfocitos grandes muestran un núcleo más pleomórfico, un citoplasma más basófilo y un ratio núcleo/citoplasma menor (DOTSON *ET AL.*, 1997).

Los linfocitos de *Gallotia simonyi* muestran un tamaño que oscila de tan grande como un monocito a tan pequeño como un trombocito, aunque generalmente el tamaño es superior al de éstos, con un citoplasma basófilo más abundante y un patrón de cromatina más denso que el del núcleo de los trombocitos (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005).

La mayoría de los linfocitos de *Ophiophagus hannah* se presentan como células pequeñas bien diferenciadas (SALAKIJ *ET AL.*, 2002), igual que en *Varanus salvator*, en el que además, el escaso citoplasma muestra en contadas ocasiones gránulos azurófilos (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

La **célula plasmática** es una fase activada del linfocito B, responsable de la producción de anticuerpos, muy similar en su morfología y características tintoriales al plasmocito de los mamíferos (FRYE, 1991). Son parecidas en tamaño y tinción a los linfocitos, pero lo suficientemente diferentes como para poder distinguirlas en el frotis sanguíneo de reptiles. Su citoplasma adquiere una coloración azul intensa, exceptuando la zona del hialoplasma o “halo” perinuclear, que es de un tono azul claro. Dicho hialoplasma se corresponde con el complejo de Golgi (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; CAMPBELL, 1988; HAWKEY Y DENNET, 1989; CAMPBELL, 1991, 1996B, 2004A; HEARD *ET AL.*, 2004) y mide

aproximadamente un tercio del tamaño nuclear (CAMPBELL, 1988; HAWKEY Y DENNET, 1989; CAMPBELL, 1991, 1996B). El núcleo suele aparecer en posición excéntrica, mostrando una coloración azul oscura con tinciones tipo Romanowsky y generalmente presenta un patrón de cromatina condensada en su periferia (FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996B). En situaciones de estimulación inmune elevada pueden observarse en su citoplasma cuerpos claros tipo Rusell (FRYE, 1991).

Las células plasmáticas no son habituales en la sangre periférica de reptiles sanos (CAMPBELL, 1996B), siendo su número inferior al de linfocitos. Su recuento no suele exceder el 0.2-0.5%, aunque puede elevarse en casos de infección o ante otras estimulaciones inmunogénicas (FRYE, 1991) (Tabla 2.9).

**Tabla 2.9.** Porcentaje de células plasmáticas en algunas especies de reptiles (PIENAAR, 1962; FRYE, 1991)

ESPECIE	Nº DE EJEMPLARES	% CÉLULAS PLASMÁTICAS
<b>Orden Squamata</b>		
<b>Suborden Sauria</b>		
<i>Agama atra</i>	3	1.6
<i>Agama atricollis</i>	1	0.9
<i>Chamaeleo dilepsis dilepsis</i>	2	1.2
<i>Cordylus giganteus</i>	1	1.2
<i>Cordylus jonesii</i>	2	2.6
<i>Cordylus vittifer</i>	20	0.9
<i>Ichnotropis squamulosa</i>	2	0.8
<i>Lygodactylus c. capensis</i>	5	4.2
<i>Mabuya capensis</i>	1	3.2
<i>Mabuya striata</i>	2	1.2
<i>Mabuya varia</i>	3	0.6
<i>Pachydactylus c. capensis</i>	3	2.3
<i>Pachydactylus bibroni</i>	2	2.9
<i>Varanus niloticus</i>	2	3.1
<i>Albabophis rufulus</i>	2	0.8
<b>Suborden Serpentes</b>		
<i>Causus rhombeatus</i>	2	2.4
<i>Crotaphopeltis hotamboeia</i>	2	2.4
<i>Naja nigrocollis</i>	1	2.4
<i>Psammophis s. subtaeniatus</i>	1	1.6
<b>Orden Crocodylia</b>		
<i>Crocodylus niloticus</i>	1	1.6
<b>Orden Chelonia</b>		
<i>Geochelone pardalis</i>	1	0.0
<i>Homopus areolatus</i>	1	0.8
<i>Pelomedusa subrufa</i>	1	1.6
<i>Pelusios sinuatus</i>	1	0.4

Los linfocitos circulantes en sangre se originan en timo, médula ósea, bazo y otros tejidos linfopoyéticos (CAMPBELL, 1996B). En algunos reptiles pueden provenir también de las glándulas tonsilares (HAWKEY Y DENNET, 1989). No es frecuente localizar linfocitos inmaduros (linfoblastos, prolinfocitos) en sangre periférica de reptiles. Estas células suelen tener un núcleo de mayor tamaño y cromatina menos basófila y un citoplasma de mayor

tamaño y más basófilo que los linfocitos maduros. Los linfoblastos muestran un prominente nucléolo (CAMPBELL, 1996B). En los prolinfocitos el nucléolo tiende a ser simple y bien definido pero, en ocasiones, se pueden observar dos nucléolos. Estas formas inmaduras pueden aparecer en sangre periférica en respuesta al estrés severo o ante neoplasias reticulares (FRYE, 1991).

### -Técnicas citoquímicas

Los estudios citoquímicos publicados revelan que en varias especies de reptiles los linfocitos no muestran positividad a ninguna de las técnicas citoquímicas empleadas. Esto es así para *Crotalus adamanteus* (ALLEMAN ET AL., 1999), iguanas (FUENTES ET AL., 2000; HARR ET AL., 2001) y tortuga del desierto (*Gopherus agassizii*) (ALLEMAN ET AL., 1992). Por el contrario, los linfocitos de *Alligator mississippiensis* muestran intensa positividad al PAS (MATEO ET AL., 1984). En *Elaphe obsoleta quadrivittata* y *Bothrops jaracaca* los linfocitos también expresan positividad al PAS, pero más débilmente (EGAMI Y SASSA, 1988; BOUNOUS ET AL., 1996). Los linfocitos de *Agama agama* son positivos al PAS y a la fosfatasa ácida (CAXTON-MARTINS Y NGANWUCHU, 1978), mientras que los de *Gallotia simonyi* sólo reaccionan positivamente para la fosfatasa ácida (MARTÍNEZ-SILVESTRE ET AL., 2005).

En los linfocitos de *Ophiophagus hannah* se describen tres patrones de tinción citoquímica para la fosfatasa ácida, la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa y la  $\beta$ -glucuronidasa, ya que para las tres técnicas los linfocitos pueden reaccionar de forma negativa, débilmente granular o con un gran punto focal. El patrón finamente granular se corresponde con la presencia de numerosos gránulos pequeños positivos, mientras que el punto focal aparece como un único punto positivo de gran tamaño (SALAKIJ ET AL., 2002). Algo muy similar se ha descrito en *Varanus salvator* ya que en respuesta a la  $\beta$ -glucuronidasa y a la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa, un 86% de los linfocitos es negativo, un 10% muestra patrón finamente granular y un 4% presenta un punto focal (SALAKIJ ET AL., 2014).

**Tabla 2.10.** Tinciones citoquímicas del linfocito de los reptiles (PIENAAR, 1962; CAXTON-MARTINS, 1977; CAXTON-MARTINS Y NGANWUCHU, 1978; recopilado en SYPEK Y BORYSENKO, 1988)

TINCIÓN CITOQUÍMICA	REACCIÓN DEL LINFOCITO
<b>ENZIMAS</b>	
Fosfatasa ácida	Positivo/Negativo
Fosfatasa alcalina	Positivo/Negativo
Beta glucuronidasa	Positivo
Esterasa	No determinado
Peroxidasa	Negativo
Deshidrogenasa ácido láctico	No determinado
<b>POLISACÁRIDOS</b>	
Reacción del ácido periódico de Schiff	Positivo/Negativo
Azul alcian	No determinado
Azul de toluidina	Negativo
<b>LÍPIDOS</b>	
Sudán negro B	Negativo
Sudán neutro III	No determinado

### **-Ultraestructura del linfocito**

La membrana citoplasmática del linfocito muestra numerosas prolongaciones tipo pseudópodo, visibles con el microscopio electrónico (FRYE, 1991). En *Crotalus adamanteus* el citoplasma presenta numerosos polirribosomas pero poco retículo endoplasmático, con un núcleo irregularmente redondeado y con un patrón de heterocromatina periférica (ALLEMAN *ET AL.*, 1999). En *Ophiophagus hannah* los linfocitos muestran un escaso citoplasma con polirribosomas y alguna mitocondria. El núcleo es redondo con acúmulos periféricos de heterocromatina (SALAKIJ *ET AL.*, 2002). En *Gallotia simonyi* los linfocitos siempre muestran pseudopodia bajo el microscopio electrónico. El citoplasma aparece lleno de ribosomas libres y con escasas mitocondrias y el núcleo es redondo con suaves indentaciones (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005). El linfocito de *Varanus salvator* presenta polirribosomas en su citoplasma y alguna mitocondria (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

En el caso de las células plasmáticas la microscopía electrónica revela la presencia de pseudópodos en la membrana celular, así como retículo endoplasmático rugoso y liso y un complejo de Golgi bastante desarrollado (FRYE, 1991).

### **2.1.3.2.- El Monocito de los Reptiles**

Los monocitos tienen como función principal la fagocitosis (FRYE, 1991; RASKIN, 2000). Participan en las respuestas inflamatorias y juegan un papel activo en la formación del granuloma (pasando a ser macrófagos en los tejidos) y en la generación de las células gigantes multinucleadas, participando especialmente en las respuestas granulomatosas a las infecciones bacterianas y a las desencadenadas por los huevos de los trematodos espiróquidos (COX *ET AL.*, 1980; GREINER *ET AL.*, 1980; JACOBSON, 1980; JACOBSON *ET AL.*, 1980; GLAZEBROOK *ET AL.*, 1981; BURKE Y RODGERS, 1982; WOLKE *ET AL.*, 1982; EVANS, 1983; JACOBSON *ET AL.*, 1983). También participan en las interacciones antígeno-inmunoglobulina específicas, especialmente en las que intervienen las inmunoglobulinas M e Y (MEAD Y BORYSENKO, 1984A; SEKIZAWA *ET AL.*, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; CAMPBELL, 1996B).

### **-Dimensiones celulares**

Los monocitos son generalmente los leucocitos de mayor tamaño hallados en el frotis sanguíneo de reptiles, superando incluso el tamaño de los linfocitos grandes (HAWKEY Y DENNETT, 1989; FRYE, 1991; RASKIN, 2000; ROSSKOPF, 2000). Sus dimensiones citoplasmáticas pueden ser bastante variables, oscilando entre 8-20  $\mu\text{m}$ , incluso en la sangre de un mismo individuo (SYPEK Y BORYSENKO, 1988). En *Iguana iguana* los monocitos son variables en tamaño, con un rango que oscila desde aproximadamente la mitad a dos veces el tamaño del eritrocito (HARR *ET AL.*, 2001).

### **-Características tintoriales y morfología**

El monocito de reptiles es muy similar al hallado en aves y mamíferos (BRADLEY, 1937; LUCAS Y JAMROZ, 1961; ANDREW, 1965; HAWKEY, 1975; MATEO *ET AL.*, 1984). Posee un núcleo simple en forma de “U” o curvado (FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996B).

La fijación con metanol otorga a los monocitos de reptiles una coloración azul

grisácea clara (ALDER Y HUBER, 1923; AUSTIN *ET AL.*, 1927; ATLAND Y THOMPSON, 1958; ANDERSEN, 1961). El citoplasma varía de fino a moderadamente granular, tiñéndose también de azul-grisáceo claro con tinciones tipo Romanowsky (FRYE, 1991; RASKIN, 2000), y cuando la célula está fisiológicamente activa, en su interior se pueden encontrar bacterias fagocitadas, restos celulares y vacuolas lipídicas, además de otros materiales fagocitados (FRYE, 1991; HEARD *ET AL.*, 2004). También puede observarse eritrofagia en sangre circulante, indicando que la hemólisis intravascular puede ocurrir en los reptiles, aunque la anemia hemolítica inmunomediada está poco documentada (HEARD *ET AL.*, 2004).

Los monocitos de *Crotalus durissus terrificus* se caracterizan por su núcleo basófilo arriñonado y su abundante citoplasma vacuolizado (TROIANO *ET AL.*, 1997), mientras que en *Elaphe obsoleta quadrivittata* estas células presentan un núcleo pleomórfico ligeramente basófilo y excéntrico, así como un citoplasma gris claro, de fina a moderadamente granular, pudiendo presentarse vacuolizado (DOTSON *ET AL.*, 1997).

El monocito de *Pogona vitticeps* se describe como el leucocito de mayor tamaño mostrando un citoplasma vacuolizado de ligera tinción azurófila y un núcleo de contorno arriñonado (ELIMAN, 1997). El monocito de *Physignathus* spp. también representa el leucocito de mayor tamaño y con morfología más pleomórfica. Generalmente presentan un abundante citoplasma grisáceo que a menudo contiene múltiples vacuolas. El núcleo suele ser redondo o irregular, pero no segmentado (LEBLANC, 2001).

En *Gallotia simonyi* el núcleo del monocito muestra un gran tamaño y frecuentemente aparece lobulado. El abundante citoplasma se tiñe débilmente basófilo con May-Grünwald-Giemsa y todos los monocitos estudiados presentan vacuolas de diferentes tamaños y en número variable (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005). El núcleo de los monocitos de *Varanus salvator* aparece con forma de riñón y en posición excéntrica (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

Generalmente a los monocitos que presentan citoplasma finamente granular y azurófilo se les suele llamar azurófilos (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; WATSON, 1997). Muchos autores emplean el término azurófilo para referirse a todos los monocitos de reptiles (TROIANO *ET AL.*, 1997), como sucede en *Crotalus adamanteus* (ALLEMAN *ET AL.*, 1999). Otros autores consideran a esta célula como un leucocito agranulocito diferente, aunque derivado del monocito (ROSSKOPF, 2000); tal es el caso de lo observado en *Crotalus durissus terrificus* (TROIANO *ET AL.*, 1997), *Pogona vitticeps* (ELIMAN, 1997), *Cyclura conutus* e *Iguana iguana* (FUENTES *ET AL.*, 2000), *Gallotia simonyi* (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005) y *Varanus salvator* (SALAKIJ *ET AL.*, 2014). HARR *ET AL.* (2001) describen el citoplasma de los monocitos con un color azulado con vacuolas claras, aunque algunas células muestran gránulos citoplasmáticos azurófilos. Sin embargo, consideran que tanto los monocitos con gránulos azurófilos como los que no los presentan deben incluirse en el término monocito, ya que sus características citoquímicas son muy similares.

Hay autores que describen al azurófilo como un leucocito exclusivo de iguanas y muchas especies de serpientes, ocupando una función similar a la del monocito (MONTALI, 1988; RASKIN, 2000).

Los monocitos pueden presentar alteraciones morfológicas que hacen que se denominen monocitos tóxicos. Dichas alteraciones pueden incluir vacuolización citoplasmática anormal y granulación. Además, los monocitos reactivos con frecuencia exhiben membranas citoplasmáticas con proyecciones, gránulos grandes o contienen

bacterias fagocitadas y detritus celulares. Frecuentemente estas células dominan las respuestas inflamatorias en algunas especies de serpientes y lagartos (MCCRACKEN, 1993; WATSON, 1997).

### -Técnicas citoquímicas

Los monocitos de *Cyclura conuta* e *Iguana iguana* son PAS-positivos (FUENTES ET AL., 2000). Para otros autores, los monocitos de *Iguana iguana*, además de ser ligeramente positivos al PAS, reaccionan de forma moderada a la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa e intensamente a la fosfatasa ácida (HARR ET AL., 2001). Asimismo, estos autores clasifican como monocitos a los monocitos con gránulos azurófilos y a las células que no los presentan, puesto que reaccionan citoquímicamente de la misma manera.

Los monocitos de *Gallotia simonyi* no reaccionan positivamente para ninguna de las técnicas citoquímicas estudiadas (MARTÍNEZ-SILVESTRE ET AL., 2005), mientras que SALAKIJ ET AL. (2014) describen respuesta positiva a la peroxidasa y la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa para los monocitos de *Varanus salvator*.

**Tabla 2.11.** Tinciones citoquímicas del monocito de los reptiles (PIENAAR, 1962; CAXTON-MARTINS, 1977; CAXTON-MARTINS Y NGANWUCHU, 1978; recopilado en SYPEK Y BORYSENKO, 1988)

TINCIÓN CITOQUÍMICA	REACCIÓN DEL MONOCITO
<b>ENZIMAS</b>	
Fosfatasa ácida	Positivo
Fosfatasa alcalina	Positivo
Beta glucoronidasa	Positivo
Esterasa	No determinado
Peroxidasa	Positivo/Negativo
Deshidrogenasa ácido láctico	No determinado
<b>POLISACÁRIDOS</b>	
Reacción del ácido periódico de Schiff	Positivo
Azul alcian	No determinado
Azul de toluidina	Positivo
<b>LÍPIDOS</b>	
Sudán negro B	Positivo
Sudán neutro III	No determinado

### -Ultraestructura del monocito

Las descripciones ultraestructurales del monocito en reptiles no quelonios no son muy abundantes. MARTINEZ-SILVESTRE ET AL. (2005) describen ultraestructuralmente el monocito de *Gallotia simonyi* como una célula con un núcleo con heterocromatina densa y homogénea y un citoplasma portador de algunos gránulos de gran tamaño y vacuolas de diferentes tallas, así como con algunos ribosomas.



### 2.1.3.3.- El Azurófilo de los Reptiles

El azurófilo es un nuevo tipo de leucocito de los reptiles, inicialmente considerado exclusivo del orden Squamata (MONTALI, 1988; HAWKEY Y DENNET, 1989, 1994; DIVERS *ET AL.*, 1996; TROIANO *ET AL.*, 1996, 1997; ELIMAN, 1997; ANDERSON *ET AL.*, 1997; TROIANO Y SILVA, 1998; CHRISTOPHER, *ET AL.*, 1999; ALLEMAN *ET AL.*, 1999; FUENTES *ET AL.*, 2000). En un primer momento se incluyó dentro de las células mononucleares y se le otorgó una función similar a la de los monocitos de los cuales procedía (MONTALI, 1988; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; RASKIN, 2000). Se especuló mucho con la idea de que los azurófilos eran monocitos activados presentes en sangre circulante (DUGUY, 1970; SAINT GIRONS, 1970; CAMPBELL, 1996), existiendo una gran variedad de opiniones encontradas que aún persiste actualmente, debido a que esta célula presenta simultáneamente características de acidófilo y de monocito (MONTALI, 1988; HAWKEY Y DENNET, 1989; WATSON, 1997). Algunos autores relacionan esta célula con los granulocitos neutrófilos (JORDAN, 1938; SAINT GIRONS, 1970; MACMAHON Y HOMER, 1975; WILL, 1978; FRYE, 1981; ALLEMAN *ET AL.*, 1999), mientras que otros emplean el término azurófilo para los monocitos que presentan citoplasma azurofílico (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; MURO *ET AL.*, 1994; CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997; HARR *ET AL.*, 2001; CAMPBELL, 2004A). Asimismo, algunos autores han descrito azurófilos en reptiles del orden Chelonia (HAWKEY Y DENNET, 1989; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; ANDERSON *ET AL.*, 1997; TROIANO Y SILVA, 1998; CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999; SMITH *ET AL.*, 2000), y otros han encontrado su existencia en reptiles del orden Crocodylia (HAWKEY Y DENNET, 1989; ALLEMAN *ET AL.*, 1999; FONTENOT *ET AL.*, 2004). Sin embargo, existen autores que afirman que en varias especies de lagartos se han clasificado erróneamente los monocitos como azurófilos, ya que los estudios se han basado únicamente en la coloración púrpura de su citoplasma. Mediante estudios citoquímicos de estas células en iguanas se ha demostrado que carecen de la actividad peroxidasa que presentan los azurófilos de las serpientes. Las características citoquímicas hacen que dichas células en iguanas sean idénticas a los monocitos, por lo que no deberían denominarse de otra manera (HARR *ET AL.*, 2001). Actualmente se considera que sólo las serpientes poseen azurófilos, puesto que esta denominación debe sólo mantenerse para aquellas células monocitoides que se muestran positivas a la bencidina peroxidasa (HEARD *ET AL.*, 2004).

Se ha descrito que los azurófilos pueden sufrir una transición de una morfología tipo granulocito a una tipo mononuclear bajo determinadas condiciones. En lagartos se suelen encontrar diferentes estadios celulares intermedios similares a los neutrófilos o a otros granulocitos (WILL, 1978).

Según HAWKEY y DENNET (1989), no se posee suficiente información sobre el origen y función de los azurófilos. No obstante, se cree que juegan un papel importante en las respuestas inflamatorias, particularmente en ofidios, y que la azurofilia y los cambios tóxicos en la morfología celular suelen ser indicativos de infección. Otros autores consideran que el azurófilo, al derivar del monocito, comparte la función de éste (MONTALI, 1988; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; RASKIN, 2000). Por ello se afirma que los azurófilos, al igual que los monocitos, incrementan su número en la respuesta antigénica y en presencia de enfermedades infecciosas, ya que participan en las interacciones antígeno-inmunoglobulina específica, especialmente en las que están involucradas la IgM y la IgY (MEAD Y BORYSENKO, 1984A; SEKIZAWA *ET AL.*, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988). Asimismo, los estudios realizados en *Iguana iguana* han revelado al azurófilo como una célula inflamatoria y reactiva de importancia, aunque siempre precedida por el heterófilo (DIVERS *ET AL.*, 1996).

### **-Dimensiones celulares**

El azurófilo de *Crotalus adamanteus* es ligeramente superior en tamaño al eritrocito, con un ratio núcleo/citoplasma moderadamente bajo, aproximadamente 1:3 (ALLEMAN *ET AL.*, 1999). En *Ophiophagus hannah* el diámetro de esta célula es de entre 10 y 17  $\mu\text{m}$ , con un ratio núcleo/citoplasma también de 1:3 (SALAKIJ *ET AL.*, 2002). En *Elaphe obsoleta quadrivittata* los azurófilos son similares en tamaño a los heterófilos (DOTSON *ET AL.*, 1997). Los azurófilos de *Pogona vitticeps* presentan el mismo tamaño, o ligeramente inferior, que los monocitos (ELIMAN, 1997). En *Gallotia simonyi* el ratio núcleo/citoplasma es bajo, de 1:3 a 1:4 (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005), mientras que los azurófilos de *Varanus salvator* tienen un tamaño medio de 8 a 14  $\mu\text{m}$ , con un núcleo voluminoso (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

### **-Características tintoriales y morfología**

Se desconoce a ciencia cierta el origen y función del azurófilo, aunque se supone que procede de la serie monocítica, debido a su morfología redonda, núcleo simple y finos gránulos azurófilos citoplasmáticos. Sin embargo, parece poseer características morfológicas intermedias entre el monocito y los granulocitos (MONTALI, 1988).

Varios autores describen al azurófilo muy similar al monocito, en cuanto a tamaño y morfología nuclear (DIVERS *ET AL.*, 1996; JOHNSON Y BENSON, 1996), mientras otros lo consideran como un monocito pequeño, con un citoplasma de granulación variable (WATSON, 1997).

Otros autores consideran que la morfología del azurófilo puede variar desde redonda y pequeña, similar a los linfocitos, hasta mucho mayor, semejándose a un monocito, lo que podría implicar diferentes estadios de maduración celular (HAWKEY Y DENNET, 1989).

Para RASKIN (2000) la característica morfológica más destacable del azurófilo es que su citoplasma contiene gránulos eosinófilos finos y abundantes, que le pueden otorgar una coloración rojo-púrpura.

Un factor a destacar de los azurófilos es que, cuando se exponen a tinciones tipo Romanowsky, su citoplasma muestra una reacción metacromática, lo que puede facilitar su reconocimiento e identificación en los frotis sanguíneos rutinarios (HAWKEY Y DENNET, 1989).

Los azurófilos de *Crotalus adamanteus* se describen como células redondas, con un citoplasma lleno de gránulos azurófilos y un moderado número de vacuolas claras. El núcleo aparece central o ligeramente excéntrico, con morfología redonda o irregular, con cromatina condensada. En esta especie las células monocitoides sin granulación azurófila son tan escasas que no se incluyen en el recuento leucocitario (ALLEMAN *ET AL.*, 1999).

El azurófilo de *Crotalus durissus terrificus* se describe como una célula redonda, de núcleo excéntrico y lobulado y con citoplasma azul claro, a veces de apariencia granular (TROIANO *ET AL.*, 1997).

El contorno celular de los azurófilos de *Elaphe obsoleta quadrivittata* varía de redondo a apariencia monocitoide, con un núcleo redondo o lenticular, generalmente

excéntrico, con cromatina condensada no muy aparente. El citoplasma se muestra gris-azulado, granular y ocasionalmente con vacuolas (DOTSON *ET AL.*, 1997).

Los azurófilos de *Ophiophagus hannah* se describen como células redondas, con dos variantes celulares. Un primer tipo contiene numerosos gránulos azurófilos, y otro muestra una apariencia más monocitoide, con escasos gránulos citoplasmáticos. Se cree que las células del primer tipo son más inmaduras, ya que las del segundo tipo contienen numerosos lisosomas. El núcleo es redondo o irregular con cromatina condensada y posición central o excéntrica (SALAKIJ *ET AL.*, 2002).

En *Pogona vitticeps* la clave para distinguir los azurófilos de los monocitos es su citoplasma heterocromático, con sus gránulos esféricos de coloración rosa y azul (eosinófila y azurófila). El núcleo aparece excéntrico, redondo o arrionado (ELIMAN, 1997). Sin embargo, otros autores han descrito azurofilia pura para el citoplasma de estas células en esta especie (SAINT GIRONS, 1970).

El citoplasma de los azurófilos de *Gallotia simonyi* muestra vacuolas dispersas de diversos tamaños y gránulos azurófilos no tan intensamente teñidos como los de los granulocitos. El núcleo es no lobulado y suele aparecer en posición central (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005).

El núcleo del azurófilo de *Varanus salvator* se describe grande y redondeado y su citoplasma presenta numerosos gránulos azurófilos (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

### **-Técnicas citoquímicas**

Al igual que ocurre en el monocito de los mamíferos, se ha descrito positividad de los gránulos de los azurófilos frente a la reacción de la peroxidasa (MONTALI, 1988). De hecho, hay autores que afirman que la denominación de azurófilo sólo debería mantenerse para las células monocitoides que reaccionen positivamente frente a la bencidina peroxidasa (HEARD *ET AL.*, 2004).

En *Crotalus adamanteus* los gránulos azurófilos se tiñen intensamente con las técnicas citoquímicas de la benzidina peroxidasa y SBB y de forma menos intensa y difusa con PAS (ALLEMAN *ET AL.*, 1999), recordando al patrón de tinción citoquímica del neutrófilo de mamíferos (BAGGIOLINI, 1972). Sin embargo, estas células no se tiñen con la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa, la cual es un marcador citoquímico usado para caracterizar las células de origen monocítico en los mamíferos. Las características citoquímicas de los azurófilos de *Bothrops jaracaca* son muy similares a las de *Crotalus adamanteus* (EGAMI Y SASSA, 1988). Sin embargo, difieren ligeramente de las de *Elaphe obsoleta quadrivittata*, pues en esta especie, además de teñirse con la peroxidasa y el SBB, también muestran positividad frente a la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa y a la cloroacetato esterasa (BOUNOUS *ET AL.*, 1996). Los azurófilos de *Ophiophagus hannah* se tiñen intensamente con SBB y moderadamente con PAS y  $\alpha$ -naftil acetato esterasa (SALAKIJ *ET AL.*, 2002).

En *Cyclura conuta* e *Iguana iguana* se han descrito tanto monocitos como azurófilos, siendo estos últimos positivos frente al PAS y la dihidroclorido benzidina peroxidasa (FUENTES *ET AL.*, 2000).

Los azurófilos de *Gallotia simonyi* reaccionan positivamente a la fosfatasa ácida,  $\alpha$ -naftil acetato esterasa y cloroacetato esterasa (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005), mientras

que los de *Varanus salvator* se tiñen moderadamente con la peroxidasa y la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa (SALAKIJ ET AL., 2014).

#### **-Ultraestructura del azurófilo**

Ultraestructuralmente, los azurófilos de *Crotalus adamanteus* muestran numerosos gránulos citoplasmáticos pequeños rodeados de membrana. También aparecen en el citoplasma un número moderado de mitocondrias grandes, retículo endoplásmico rugoso y lisosomas, así como pequeños procesos citoplasmáticos y algunas vacuolas. La membrana nuclear se halla rodeada de un pequeño acúmulo de heterocromatina (ALLEMAN ET AL., 1999).

Mediante microscopía electrónica de barrido el azurófilo de *Ophiophagus hannah* muestra una membrana celular muy irregular con algunos microporos. Ultraestructuralmente, también se detectan diferencias entre las dos variantes celulares descritas. Una variante muestra numerosos gránulos pequeños ligados a membrana, algunas mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso. La otra variante de azurófilo contiene numerosas vacuolas de gran tamaño y mitocondrias (SALAKIJ ET AL., 2002).

El azurófilo de *Gallotia simonyi* muestra a nivel ultraestructural una significativa cantidad de heterocromatina nuclear periférica. El citoplasma presenta un número moderado de orgánulos, entre los que se encuentran las mitocondrias, aparato de Golgi y lisosomas (MARTINEZ-SILVESTRE ET AL., 2005).

En *Varanus salvator* los azurófilos presentan numerosos gránulos ligados a membrana, mitocondrias y retículo endoplasmático. Al igual que en *Ophiophagus Hannah* la microscopía electrónica de barrido revela una membrana celular muy irregular (SALAKIJ ET AL., 2014).

### **2.1.4.- El Trombocito de los Reptiles**

El origen de los trombocitos está en las células multinucleadas tipo megacariocito de la médula ósea y en focos de hematopoyesis extramedular. Los trombocitos de reptiles recuerdan a los megacariocitos de mamíferos. Tanto los trombocitos maduros como los megacariocitos pueden funcionar como fagocitos activos, como demuestra la presencia de bacterias y restos tisulares y de eritrocitos en sus citoplasmas (FRYE, 1991; WATSON, 1997).

Los trombocitos son similares en cuanto a su función a las plaquetas de los mamíferos, y juegan un importante papel en la formación del trombo, coagulación sanguínea y cicatrización de heridas (FRYE, 1991; WATSON, 1997; RASKIN, 2000). Si bien los estímulos que desencadenan la adhesión y agregación pueden ser diferentes, parece que las plaquetas y los trombocitos funcionan de forma similar en los procesos homeostáticos. La tendencia de estas células a ser activadas por contacto con superficies extrañas puede originar cambios en su morfología durante la toma de muestras de sangre, excepto cuando se procede de forma muy cuidadosa. La activación de los trombocitos produce una vacuolización citoplasmática, alteraciones en su contorno y agregación. Aunque la activación celular frecuentemente facilita la identificación de los trombocitos, también

puede ocultar cambios cuantitativos y morfológicos clínicamente significativos (HAWKEY Y DENNET, 1989; CAMPBELL, 1996B). Además, se ha afirmado que los trombocitos con núcleo polimórfico (HAWKEY Y DENNET, 1989; CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997) o los trombocitos multinucleados (WATSON, 1997) pueden estar asociados a enfermedades inflamatorias severas.

Los trombocitos son pluripotenciales, lo que les permite ser transformados en eritrocitos, y al igual que sucede con el eritrocito, una vez maduros, pueden volver a sufrir división mitótica y amitótica (FRYE, 1991).

La pluripotencialidad de los trombocitos se demuestra en reptiles anémicos, mediante el uso de la técnica de la bencidina peroxidasa, que detecta cantidades mínimas de hemoglobina. Con el uso de tinciones Wright o Giemsa también se comprobó que estas células portaban pigmentos sanguíneos. La confirmación llegó con la inducción de anemia en varios individuos, modificándose la morfología de los trombocitos, que pasaron de células normales a células aumentadas de tamaño, con uno o más nucléolos prominentes y un mayor contenido de hemoglobina citoplasmática (FRYE, 1991).

### **-Dimensiones celulares**

Las dimensiones del trombocito pueden ser bastante variables, dependiendo de si presenta una forma elíptica o ha adquirido una morfología más redondeada. En general se considera que su tamaño suele oscilar entre 5-9  $\mu\text{m}$  de ancho por 8-16  $\mu\text{m}$  de largo, tendiendo a ser células relativamente pequeñas en la mayoría de las especies (BERNSTEIN, 1938; RYERSON, 1949; TAYLOR Y KAPLAN, 1961; PIENAAR, 1962; DESSER, 1978; WOOD Y EBANKS, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

A modo de ejemplo, los trombocitos de *Crotalus adamanteus* aparecen como células pequeñas, la tercera parte del tamaño del eritrocito maduro (ALLEMAN ET AL., 1999), mientras que en *Ophiophagus hannah* miden aproximadamente la mitad de un eritrocito maduro, aunque los trombocitos que aparecen agrupados en el frotis tienden a ser más pequeños, aproximadamente como un linfocito (SALAKIJ ET AL., 2002). El trombocito de *Varanus salvator* también suele medir la mitad que el eritrocito maduro (SALAKIJ ET AL., 2014).

### **-Características tintoriales y morfología**

La aplicación de tinciones supravitales ayuda a diferenciar a los trombocitos (que aceptan la tinción) de los eritrocitos (que no la aceptan) (FRYE, 1991).

Morfológicamente el trombocito de reptiles varía de elíptico/fusiforme a redondo (BERNSTEIN, 1938; RYERSON, 1949; TAYLOR Y KAPLAN, 1961; PIENAAR, 1962; DESSER, 1978; WOOD Y EBANKS, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988), con un núcleo grande, basófilo y de posición central, con cromatina por lo general más homogénea que la del eritrocito (CAMPBELL, 1996B; FRYE, 1991). El citoplasma de muchos de los trombocitos de reptiles varía de azul claro a poco coloreado y es agranular (FRYE, 1991), aunque con granulación azurófila ocasional (HAWKEY Y DENNET, 1989; CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997; RASKIN, 2000).

Los trombocitos activados son comunes y muestran vacuolización citoplasmática y contornos irregulares (CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997; CAMPBELL, 2004A) y pueden ser

hallados en reptiles anémicos (WATSON, 1997), observándose con frecuencia en condiciones sépticas severas, tales como la septicemia producida por *Salmonella* spp. (ROSSKOPF, 2000). Por tanto, aunque la razón de la variación en las características morfológicas de los trombocitos se desconoce, se considera que puede estar relacionada con la actividad que desarrollan estas células o con su activación durante la toma de sangre (HEARD *ET AL.*, 2004).

En ocasiones pueden observarse trombocitos binucleados en los frotis sanguíneos de reptiles anémicos, por lo que se les supone capaces de dividirse amitóticamente, al igual que los eritrocitos (FRYE, 1991).

Los trombocitos tienen tendencia a adherirse entre ellos y formar agregados en los frotis sanguíneos (HAWKEY Y DENNET, 1989; FRYE, 1991; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; MURO *ET AL.*, 1994; CAMPBELL, 1996B; TROIANO *ET AL.*, 1996; ELIMAN, 1997; WATSON, 1997; ALLEMAN *ET AL.*, 1999). Cuando esto sucede puede ser difícil apreciar su citoplasma (CAMPBELL, 2004A).

Los trombocitos pueden confundirse con los linfocitos o con los núcleos rotos de los eritrocitos (HAWKEY Y DENNET, 1989; ELIMAN, 1997; WATSON, 1997; ALLEMAN *ET AL.*, 1999), si bien los trombocitos suelen ser de menor tamaño que los linfocitos, poseen más cantidad de citoplasma y su tendencia a la aglutinación en los frotis sanguíneos los distingue. Además, si poseen gránulos azurófilos citoplasmáticos se presentan en menor número que los del linfocito (WATSON, 1997).

Los trombocitos inmaduros de reptiles son parecidos a los de las aves, y su presencia refleja una respuesta regenerativa (CAMPBELL, 2004A).

Los trombocitos de *Pogona vitticeps* generalmente se describen elipsoidales, con un núcleo redondo fuertemente teñido, además de un citoplasma de coloración clara. Tienden a aparecer agregados en el frotis, distinguiéndose así de los linfocitos (ELIMAN, 1997). Los trombocitos de *Physignathus* spp. mantienen la misma morfología elíptica, con un citoplasma gris muy claro, más abundante que el de los linfocitos. Su núcleo presenta un patrón de cromatina muy denso, siendo más basófilo que el núcleo de los linfocitos (LEBLANC, 2001).

Los trombocitos de *Crotalus adamanteus* pueden encontrarse aislados o formando agregados. Presentan un citoplasma ligeramente basófilo, aunque a veces aparece claro o moderadamente vacuolizado y en ocasiones puede desarrollar pseudópodos. El núcleo se muestra ovalado con cromatina densa, con un ratio núcleo/citoplasma alto, pero no tanto como el de los linfocitos (ALLEMAN *ET AL.*, 1999).

En *Ophiophagus hannah* los trombocitos son alargados, con citoplasma ligeramente basófilo. El núcleo es oval, con cromatina densa y un ratio núcleo/citoplasma moderadamente elevado. Son fácilmente diferenciados de los linfocitos por la vacuolización citoplasmática perinuclear que presentan (SALAKIJ *ET AL.*, 2002).

Los trombocitos de *Elaphe obsoleta quadrivittata* suelen presentar dos morfologías. Una es elíptica con bordes lisos, con el eje mayor del núcleo paralelo al de la célula. La otra es generalmente redonda, aunque puede presentarse deforme, con bordes irregulares. En ambas formas el núcleo es central y densamente basófilo, con un patrón de cromatina condensada no muy aparente. El citoplasma comúnmente es poco coloreado y difícil de

discernir, particularmente en los trombocitos redondos. Con frecuencia pueden observarse estas células agregadas (DOTSON *ET AL.*, 1997).

El citoplasma del trombocito de *Gallotia simonyi* ocasionalmente muestra pseudopodia y en algunas células sólo supone un pequeño halo alrededor del núcleo celular. Dicho núcleo es similar en tamaño al del eritrocito (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005).

Los trombocitos de *Varanus salvator* son redondos u ovals, con un citoplasma claro y pequeñas vacuolas ocasionales (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

### **-Técnicas citoquímicas**

La mayoría de los trombocitos de reptiles contienen vacuolas claras que se corresponden con depósitos de glucógeno, que actúan como fuente de energía. Dichas estructuras se tiñen positivamente con PAS. Esto permite distinguir los trombocitos redondos y con escaso citoplasma de los linfocitos, ya que estos últimos no se suelen teñir con PAS (HEARD *ET AL.*, 2004).

Esta característica se cumple en *Crotalus adamanteus*, ya que frente a la positividad del PAS de los trombocitos, los linfocitos se muestran negativos. En esta especie, los trombocitos también responden positivamente a la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa, aunque el patrón de tinción es menos intenso que con la técnica del PAS (ALLEMAN *ET AL.*, 1999). El mismo patrón de tinción citoquímica se observa en *Iguana iguana* (HARR *ET AL.*, 2001).

En *Ophiophagus hannah* sólo un pequeño número de trombocitos se tiñen intensamente con PAS, con una reacción bien definida a nivel perinuclear. Los trombocitos también se tiñen débilmente con la fostatasa ácida y la  $\beta$ -glucoronidasa (SALAKIJ *ET AL.*, 2002).

Los trombocitos de *Gallotia simonyi* no reaccionan positivamente con ninguna de las técnicas citoquímicas utilizadas (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005), mientras que los de *Varanus salvator* son positivos para la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa y la  $\beta$ -glucuronidasa (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

**Tabla 2.12.** Tinciones citoquímicas del trombocito de los reptiles (PIENAAR, 1962; CAXTON-MARTINS Y NGANWUCHU, 1978; DESSER Y WELLER, 1979; recopilado en SYPEK Y BORYSENKO, 1988)

TINCIÓN CITOQUÍMICA	REACCIÓN DEL TROMBOCITO
<b>ENZIMAS</b>	
Fosfatasa ácida	Positivo
Fosfatasa alcalina	Negativo
Beta glucoronidasa	No determinado
Esterasa	No determinado
Peroxidasa	Negativo
Deshidrogenasa ácido láctico	No determinado
<b>POLISACÁRIDOS</b>	
Reacción del ácido periódico de Schiff	Positivo
Azul alcian	No determinado
Azul de toluidina	Negativo
<b>LÍPIDOS</b>	
Sudán negro B	Negativo
Sudán neutro III	No determinado

### -Ultraestructura del trombocito

Ultraestructuralmente, el núcleo del trombocito suele presentarse lobulado con heterocromatina densa (FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996B; RASKIN, 2000). El citoplasma de las células activas muestra pseudópodos que contienen material finamente granular (DESSER Y WELLER, 1979B; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991), además de numerosos filamentos similares a fibrina entre, y alrededor, de las células (DESSER Y WELLER, 1979B; SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

Los trombocitos de *Sphenodon punctatus* presentan varios tipos de orgánulos citoplasmáticos, incluyendo ribosomas, mitocondrias y vacuolas citoplasmáticas, conteniendo éstas material filamentoso o inclusiones esféricas electrodensas. El beta-glucógeno se encuentra distribuido por el citoplasma, especialmente concentrado en los pseudópodos (DESSER Y WELLER, 1979B).

Los trombocitos de *Caiman crocodilus yacare* son predominantemente elípticos y con un volumen citoplasmático variable, generalmente más abundante en los polos, donde se aprecia un área de baja electrodensidad y aspecto homogéneo. En la región perinuclear se observan gran cantidad de túbulos y vesículas electrolúcidas del sistema canalicular. Aparecen también vacuolas con gránulos densos, microtúbulos, algunas mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso, ribosomas y vesículas de pinocitosis. El núcleo es elíptico, presentando hendiduras y heterocromatina electrodensa, además de poros nucleares en la membrana (DE MOURA ET AL., 1997).

Los trombocitos de *Crotalus adamanteus* contienen abundante retículo endoplasmático rugoso y polirribosomas, un pequeño número de grandes mitocondrias perinucleares y gránulos pequeños ligados a membrana. Además, el citoplasma presenta un número variable de procesos citoplasmáticos y grandes vacuolas de baja electrodensidad. El núcleo muestra un típico patrón de heterocromatina periférica (ALLEMAN ET AL., 1999).



## Revisión Bibliográfica

Mediante la microscopía electrónica de barrido los trombocitos de *Ophiophagus hannah* se muestran como células alargadas de superficie lisa (SALAKIJ ET AL., 2002), muy similar a lo descrito en *Varanus salvator* (SALAKIJ ET AL., 2014).

El citoplasma de los trombocitos de *Gallotia simonyi* presenta pseudópodos, vacuolas y pequeños gránulos asociados a membrana. Las mitocondrias son muy abundantes, siendo el tipo celular con mayor número de éstas. El núcleo se caracteriza por su heterocromatina periférica (MARTÍNEZ-SILVESTRE ET AL., 2005).

## 2.2.- LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE LOS QUELONIOS

### 2.2.1.- El Eritrocito de los Quelonios

#### -Dimensiones celulares

De acuerdo con varios autores, los eritrocitos de los quelonios presentan los siguientes tamaños medios (PIENAAR, 1962; SAINT GIRONS, 1970; FRYE, 1981):

- Diámetro mayor citoplasmático: 18.5-20  $\mu\text{m}$
- Diámetro menor citoplasmático: 10-12  $\mu\text{m}$
- Diámetro mayor nuclear: 5-6.5  $\mu\text{m}$
- Diámetro menor nuclear: 4-5  $\mu\text{m}$
- Ratio (núcleo/citoplasma): 0.08-0.15

**Tabla 2.13.** Dimensiones eritrocitarias en varias especies de quelonios (FRYE, 1991)

	ERITROCITO				NÚCLEO				Ratio
	DM	Dm	DM/Dm	S	DM	Dm	DM/Dm	S	
<i>Testudo graeca</i>	18.5	10.6	1.75	153.8	6.1	4.3	1.42	20.6	0.134
<i>Pelomedusa subrufa</i>	19.0	10.2	1.86	150.0	5.1	4.3	1.19	12.1	0.079

DM: diámetro mayor en  $\mu\text{m}$ . Dm: diámetro menor en  $\mu\text{m}$ . S: superficie ( $\mu\text{m}^2$ ) Ratio: ratio núcleo/citoplasma

**Tabla 2.14.** Media, desviación estándar y rangos de las dimensiones citoplasmáticas de los eritrocitos de tortugas bobas juveniles (*Caretta caretta*) (CASAL Y ORÓS, 2007)

	Área	Perímetro	Diámetro mayor	Diámetro menor
<b>Eritrocito</b>	194.28±27.54 126.43-288.80	51.19±3.53 41.89-61.40	19.05±1.35 16.22-22.76	12.85±1.25 9.69-16.53

Todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$ , excepto el área, en  $\mu\text{m}^2$

En tortuga verde (*Chelonia mydas*) los eritrocitos se caracterizan por tener un diámetro mayor medio de 17 a 20  $\mu\text{m}$  (WORK ET AL., 1998).

#### -Características tintoriales y morfología

Los eritrocitos de los quelonios teñidos con una tinción rápida tipo Romanowsky aparecen como células elipsoidales de contorno uniforme, con núcleo elipsoidal y central y un citoplasma rosado, uniforme y que a menudo contiene inclusiones o vacuolización (WILKINSON, 2004). Dichas inclusiones tienden a ser anulares, irregulares y basófilas, y aparecen de forma habitual en algunas especies de quelonios.

Las estructuras mitóticas o la binucleación pueden observarse en los eritrocitos de los quelonios, particularmente en presencia de inflamación, en la época post-hibernación o durante la anorexia. Las células con contorno de huso o de hoz pueden ser más frecuentes en animales con evidencia de hemólisis (WILKINSON, 2004). En juveniles de tortuga boba

(*Caretta caretta*) los eritrocitos que se detectan en división mitótica se vuelven menos frecuentes a medida que el animal crece (BRADLEY ET AL., 1998).

En la tortuga del desierto (*Gopherus agassizii*) los eritrocitos maduros se muestran homogéneos en tamaño, contorno celular y coloración. Son células generalmente ovales, con un núcleo oval o irregularmente redondeado, con cromatina densa de coloración oscura. Es frecuente hallar eritrocitos con cuerpos intracitoplasmáticos basófilos y punteados que se asocian siempre con una vacuola (ALLEMAN ET AL., 1992).

Los eritrocitos de *Chelonia mydas* son células ovaladas con coloración verde-naranja claro y núcleo de contorno oval, violeta-azulado (WORK ET AL., 1998) y localización central (WOOD Y EBANKS, 1984). Muchos eritrocitos muestran pequeñas inclusiones amorfas en el citoplasma, adyacentes a los polos celulares o al núcleo. Cuando las muestras son tratadas con el nuevo azul de metileno estas inclusiones aparecen pálidas, con ausencia de tinción (WORK ET AL., 1998). En esta especie también se han descrito eritrocitos de núcleo libre, caracterizados por un núcleo redondo eosinófilo con un patrón de cromatina granular condensada. En ocasiones pueden ir acompañados de pequeños acúmulos de citoplasma azul oscuro (BRADLEY ET AL., 1998).

Los eritrocitos de *Caretta caretta* muestran una coloración citoplasmática rosa pálido y un núcleo de oval a redondo, en ocasiones indentado, azul-violeta. Al igual que en *Chelonia mydas*, algunos eritrocitos presentan inclusiones basófilas de pequeño tamaño en su citoplasma (CASAL Y ORÓS, 2007).

#### - Precursores eritrocitarios

La vida media de los eritrocitos de las tortugas marinas es muy larga, entre 600 y 800 días (ALTMAN Y BRACE, 1962), muy similar a lo descrito en las tortugas caja, en las que el pico de respuesta reticulocitaria a la pérdida de sangre tarda 5 semanas en completarse (RAPHAEL, 2003).

Los eritrocitos inmaduros de los quelonios tienen un tamaño variable, con un contorno más redondeado y menos regular que el del eritrocito maduro. Su núcleo es central, de mayor tamaño y al igual que el citoplasma, más redondeado y menos regular que el de las células maduras. El citoplasma se tiñe más oscuro y azulado, presentando sudanofilia. En el frotis sanguíneo podemos observar eritrocitos en diferentes fases de maduración, siendo algunos precursores más pequeños que los eritrocitos maduros (WILKINSON, 2004).

La proporción de eritroblastos tiene potencial diagnóstico ya que se usa para la distinción entre las anemias regenerativas y no regenerativas. En la práctica, sin embargo, este parámetro es muy variable en los animales sanos y es difícil alcanzar conclusiones fiables (WILKINSON, 2004). Es de destacar que por lo general, en tortugas de tierra, al igual que en otras especies, la anisocitosis y el incremento del número de células policromatófilas se asocia con anemias, particularmente con la anemia post-hibernación (HAWKEY Y DENNET, 1989).

Los eritrocitos inmaduros de *Gopherus agassizii* muestran un citoplasma redondo con basofilia aumentada (policromatófilos). Su núcleo es de mayor tamaño y contiene una menor cantidad de cromatina condensada de coloración clara. El citoplasma es irregularmente redondo y más pequeño que el del eritrocito maduro. En el estudio de

ALLEMAN *ET AL.* (1992) los eritrocitos policromatófilos representaron menos del 1% del recuento total de eritrocitos en animales clínicamente sanos.

Los eritrocitos policromatófilos de la tortuga rusa (*Testudo horsfieldi*) presentan un contorno regular, liso y ovalado con un citoplasma azul-vióláceo, ligeramente granulado y con vacuolas pequeñas. El núcleo es central, grande, ovalado y de color claro (KNOTKOVA *ET AL.*, 2002).

Los eritrocitos inmaduros de *Caretta caretta* son células pequeñas, redondas u ovaladas, con un pequeño núcleo violeta redondeado o ligeramente oval y con un patrón de cromatina condensada. El núcleo se vuelve más basófilo a medida que la célula madura. El citoplasma presenta una coloración azulada más oscura que la de las células maduras (BRADLEY *ET AL.*, 1998).

### **-Técnicas citoquímicas**

En la mayoría de las especies de quelonios los eritrocitos no reaccionan de forma positiva con ninguna de las técnicas citoquímicas estudiadas (WORK *ET AL.*, 1998; CASAL Y ORÓS, 2007; CHUNG *ET AL.*, 2009). Como excepción, los eritrocitos de la tortuga del templo de cabeza amarilla (*Hieremys annandalii*) son positivos a la peroxidasa y al nuevo azul de metileno (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

### **-Ultraestructura del eritrocito**

Ultraestructuralmente los eritrocitos de *Caretta caretta* aparecen ovals con un núcleo oval con heterocromatina densa (CASAL *ET AL.*, 2007).

En algunos eritrocitos de *Chelonia mydas* y *Caretta caretta* se pueden detectar ultraestructuralmente inclusiones pleomórficas, electrodensas y carentes de núcleo y de orgánulos reconocibles (WORK *ET AL.*, 1998; CASAL *ET AL.*, 2007). Dichas inclusiones son demasiado grandes como para considerarse partículas virales (CHEVILLE, 1983; CASAL *ET AL.*, 2007). Teniendo en cuenta la ausencia de pared celular y de membrana y la carencia de pili, no se consideran bacterias. Estas inclusiones se consideran orgánulos degenerados (WORK *ET AL.*, 1998; CASAL *ET AL.*, 2007). En *Gopherus agassizii* estos cuerpos están formados por material radiodenso carente de una organización específica, aunque algunos parecen ser remanentes de membranas y también se les asocia con orgánulos degenerados, posiblemente mitocondrias (ALLEMAN *ET AL.*, 1992). WILKINSON (2004) llegó a la misma conclusión estudiando dichas inclusiones ultraestructuralmente, pero no pudo determinar la importancia clínica de las mismas.

Sin embargo, estudios más recientes en *Caretta caretta* han asociado estas inclusiones con precipitados de hemoglobina inestable, recordando a los cuerpos de Heinz de humanos (BASILE *ET AL.*, 2011). En dicho estudio el porcentaje de eritrocitos maduros portadores de inclusiones osciló entre el 3 y el 82%, y cada eritrocito sólo presentó un cuerpo de inclusión.

### **-La hemoglobina de los quelonios**

Al igual que en otros vertebrados, la molécula de la hemoglobina es una parte constituyente del eritrocito y es la responsable de las propiedades respiratorias de la sangre de los reptiles. En quelonios se ha comprobado que la afinidad por el oxígeno es diferente

entre especies acuáticas y terrestres. Por lo general, las tortugas acuáticas tienen una menor afinidad por el oxígeno, por lo que tienden a liberarlo más fácilmente que las especies terrestres. Se puede deducir que esto supone una adaptación evolutiva de los quelonios acuáticos para conseguir una liberación de oxígeno máxima durante los períodos de inmersión (MURRAY, 1996).

El nivel de hemoglobina de los eritrocitos de los quelonios es aproximadamente la mitad del encontrado en animales homeotermos (FRAIR, 1977A).

El pH y la temperatura son factores que regulan la afinidad de la unión del oxígeno a la hemoglobina en humanos y tortugas. Ambos factores están sujetos a cambios significativos derivados de las actividades normales en la vida de las tortugas marinas. La hemoglobina de los quelonios normalmente presenta una menor afinidad por el oxígeno que la de la especie humana, por lo que se ve menos influenciada por los cambios de pH y temperatura (LUTZ Y LAPENNAS, 1982; GIARDINA *ET AL.*, 1992; PETRUZZELLI *ET AL.*, 1996).

Los valores de hemoglobina en *Gopherus agassizii* fluctúan dependiendo del año de medición y de la estación. Así, se han observado más elevados en septiembre que en mayo y julio (DICKINSON *ET AL.*, 2002).

Algunos estudios muestran correlación entre los niveles de hemoglobina y la actividad, ontogenia, temperatura y talla corporal en las tortugas marinas (LUTZ Y DUNBAR-COOPER, 1984).

## 2.2.2.- Los Leucocitos Granulocíticos en Quelonios

### 2.2.2.1.- El Neutrófilo de los Quelonios

La mayoría de autores afirman la ausencia de neutrófilos en quelonios (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; BOURDEAU, 1989; FRYE, 1991; HAIGH, 1991; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; CANNON, 1992; ARNOLD, 1994; MURO *ET AL.*, 1994; GOTTDENKER Y JACOBSON, 1995; ANDERSON *ET AL.*, 1997; BRADLEY *ET AL.*, 1998; TROIANO Y SILVA, 1998; WORK *ET AL.*, 1998; CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999; WORK Y BALAZS, 1999; SMITH *ET AL.*, 2000; DICKINSON *ET AL.*, 2002; LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003).

Sin embargo, algunos autores han hallado neutrófilos en los quelonios *Caretta caretta* (GEORGE, 1996), *Chelonia mydas* (WOOD Y EBANKS, 1984; AGUIRRE *ET AL.*, 1995) y *Gopherus agassizii* (ROSSKOPF, 1982). Sin embargo, según ANDERSON *ET AL.* (1997), los neutrófilos de *Gopherus agassizii* pueden ser en realidad los monocitos azurófilos descritos posteriormente por ALLEMAN *ET AL.* (1992) en esta especie.

El neutrófilo de *Chelonia mydas* se describe como una célula generalmente esférica y con un diámetro mayor aproximado de  $17 \pm 3.1 \mu\text{m}$ , ligeramente superior al eosinófilo. El núcleo es periférico, redondo u oval y fuertemente basófilo. Los gránulos, de coloración muy eosinófila, se localizan centralmente y son menos numerosos y más grandes que los del eosinófilo. El citoplasma muestra una coloración azul clara (WOOD Y EBANKS, 1984). Estas células representan el leucocito menos numeroso en el recuento diferencial leucocitario (WOOD Y EBANKS, 1984; AGUIRRE *ET AL.*, 1995), pero su número tiende a

aumentar en respuesta al estrés (AGUIRRE *ET AL.*, 1995). Mediante el uso de la microscopía electrónica, otros autores han afirmado que los neutrófilos descritos en esta especie de tortuga marina se corresponden en realidad con eosinófilos grandes degranulados (WORK *ET AL.*, 1998).

### 2.2.2.2.- El Heterófilo de los Quelonios

Los heterófilos de los quelonios se consideran funcionalmente análogos a los neutrófilos de mamíferos (MONTALI, 1988). Sin embargo, algunos autores no identifican heterófilos en sus estudios en algunas especies de quelonios, como *Chelonia mydas* (WOOD Y EBANKS, 1984) y tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) (CANNON, 1992).

#### -Dimensiones celulares

Los heterófilos de los quelonios se describen como células de gran tamaño (MURO *ET AL.*, 1994; MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994). En *Testudo horsfieldi* muestran un diámetro de 13.3  $\mu\text{m}$ , con un núcleo de aproximadamente 5.9  $\mu\text{m}$  (KNOTKOVA *ET AL.*, 2002), mientras que en *Chelonia mydas* presentan un tamaño de entre 10 y 18  $\mu\text{m}$  (WORK *ET AL.*, 1998).

**Tabla 2.15.** Media, desviación estándar y rangos de las dimensiones citoplasmáticas de los heterófilos de tortugas bobas juveniles (*Caretta caretta*) (CASAL Y ORÓS, 2007)

	Área	Perímetro	Diámetro mayor	Diámetro menor
<b>Heterófilo</b>	228.94±47.21 133.20-333.36	54.16±5.61 41.56-64.68	17.83±1.87 13.94-21.06	16.30±1.81 11.75-20.26

Todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$ , excepto el área, en  $\mu\text{m}^2$

#### -Características tintoriales y morfología

Los heterófilos de los quelonios aparecen como células redondeadas (MURO *ET AL.*, 1994; MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994), con márgenes irregulares y algunas veces presentando pseudópodos (WILKINSON, 2004). Su citoplasma contiene gránulos fusiformes-baciliformes (MURO *ET AL.*, 1994; MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994), naranja pálido y refráctiles (WILKINSON, 2004), tan numerosos que desplazan parcialmente el núcleo a la periferia celular (FRYE, 1991). Éste se muestra redondo u oval, muy coloreado y raramente bilobulado (MURO *ET AL.*, 1994; WILKINSON, 2004). La segmentación nuclear parece más frecuente en animales que presentan una inflamación activa, aunque también puede ocurrir en animales sanos (WILKINSON, 2004).

En los quelonios, especialmente en tortugas acuáticas y terrapenes, los gránulos tienden a teñirse de una coloración rojo-marróncea con tinciones tipo Romanowsky y el núcleo suele localizarse en la periferia (FRYE, 1991).

Los heterófilos de *Gopherus agassizii* contienen un núcleo simple de contorno redondo o irregular y de localización generalmente excéntrica, así como numerosos gránulos alargados que se muestran eosinófilos con el uso de la tinción Wright-Giemsa (ALLEMAN *ET AL.*, 1992).

Los heterófilos de *Testudo horsfieldi* contienen gránulos citoplasmáticos alargados rojo-anaranjados, aunque la morfología de los mismos puede no apreciarse cuando el

citoplasma se presenta repleto de ellos. El núcleo tiene localización excéntrica, de coloración azul clara y morfología oval o redondeada (KNOTKOVA *ET AL.*, 2002).

BRADLEY *ET AL.* (1998) describieron los heterófilos en ejemplares de *Caretta caretta* de menos de un año de edad como células ovaladas o elongadas con gránulos citoplasmáticos de color naranja que, frecuentemente, dificultan la visualización del núcleo. Éste es débilmente basófilo, con un patrón de cromatina condensada. El citoplasma aparece de color claro o ligeramente basófilo. CASAL Y ORÓS (2007) describen los heterófilos de los juveniles de *Caretta caretta* teñidos con una tinción rápida tipo Romanowsky como células con un núcleo excéntrico, oval, denso y fuertemente violeta, con cromatina agrupada. Ocasionalmente el núcleo aparece central, mostrando entonces una forma redonda. El abundante citoplasma se tiñe débilmente eosinófilo, conteniendo numerosos gránulos fusiformes y eosinófilos, en ocasiones difíciles de diferenciar.

El núcleo de los heterófilos de *Chelonia mydas* se muestra denso, redondo u oval, violeta-azulado y con posición excéntrica. Los abundantes gránulos citoplasmáticos se tiñen con un tono rojo pálido (WORK *ET AL.*, 1998).

Los cambios tóxicos que tienen lugar en los heterófilos suelen presentarse como vacuolización, aparición de gránulos anómalos o coloración azulada del citoplasma (WILKINSON, 2004). En *Testudo horsfieldi* los heterófilos tóxicos muestran inclusiones redondas negras variables en tamaño y número que pueden llegar a cubrir al núcleo celular. También se ha descrito la presencia de gránulos en forma de huso (KNOTKOVA *ET AL.*, 2002).

En ocasiones pueden detectarse mieloblastos en los frotis sanguíneos de los quelonios. Se describen como células con una moderada cantidad de citoplasma agranular, ligeramente basófilo, y un núcleo ovoide central o ligeramente excéntrico de gran tamaño y con un gran nucleolo (GARNER *ET AL.*, 1996).

### **-Técnicas citoquímicas**

Las respuestas a las tinciones citoquímicas de los heterófilos de reptiles son generalmente muy variables (SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

A diferencia de lo que ocurre con los neutrófilos de los mamíferos, los heterófilos de los quelonios carecen de actividad peroxidasa, como indica la ausencia de tinción frente a la bencidina peroxidasa de los heterófilos de *Gopherus agassizii* (ALLEMAN *ET AL.*, 1992), hecho también documentado en los heterófilos de otros reptiles (MATEO *ET AL.*, 1984; MONTALI, 1988). Los gránulos de los heterófilos de *Gopherus agassizii*, además de carecer de respuesta frente a la peroxidasa, también resultan negativos a la actividad de la fosfatasa alcalina, aunque se observa una ligera positividad en el citoplasma de algunas células. Tanto la fosfatasa alcalina como la peroxidasa se consideran marcadores específicos para los lisosomas de los neutrófilos de mamíferos (JAIN, 1986A; MONTALI, 1988). Estas discrepancias pueden deberse a diferencias funcionales entre los heterófilos de reptiles y aves y los neutrófilos de mamíferos (ALLEMAN *ET AL.*, 1992).

Los gránulos de los heterófilos de *Gopherus agassizii* no se tiñen con ninguna técnica citoquímica; sin embargo, se observa una gran área focal de tinción en el citoplasma celular cuando se tratan con cloroacetato esterasa,  $\alpha$ -naftil butirato esterasa y fosfatasa ácida (ALLEMAN *ET AL.*, 1992). Las tinciones citoquímicas pueden observarse

dentro o alrededor de una determinada zona cuando las enzimas se localizan en los orgánulos celulares, pero también pueden teñirse enzimas libres, no rodeadas de membrana (BOZDECH Y BAINTON, 1981). El área focal de tinción puede que no represente sólo un orgánulo que contiene esas enzimas, sino una acumulación de orgánulos, posiblemente lisosomas, en una zona determinada de la célula (ALLEMAN *ET AL.*, 1992).

Los heterófilos de *Chelonia mydas* se tiñen con  $\alpha$ -naftil butirato esterasa y su citoplasma es PAS positivo (WORK *ET AL.*, 1998), mientras que en los juveniles de *Caretta caretta* se detecta positividad para la bencidina peroxidasa, además de para la fosfatasa ácida (con y sin tartrato), la cloroacetato esterasa, el sudán negro B y débilmente para el PAS (CASAL Y ORÓS, 2007).

### **-Ultraestructura del heterófilo**

En *Chelonia mydas* el núcleo presenta acúmulos moderados de heterocromatina y el citoplasma contiene numerosos gránulos electrodensos alargados o redondos. También aparece una pequeña cantidad de gránulos pleomórficos de diferentes densidades electrónicas, retículo endoplasmático y algunas mitocondrias (WORK *ET AL.*, 1998).

Ultraestructuralmente, los heterófilos de los juveniles de *Caretta caretta* muestran una forma redonda, con un núcleo excéntrico circular, conteniendo acúmulos moderados de heterocromatina. El abundante citoplasma contiene numerosos gránulos electrodensos redondos o alargados y un escaso número de gránulos pleomórficos de densidad variable. También algunas mitocondrias y retículo endoplasmático (CASAL *ET AL.*, 2007).

### **2.2.2.3.- El Eosinófilo de los Quelonios**

Los eosinófilos se observan con frecuencia como respuesta a infecciones parasitarias (GLAZEBROOK *ET AL.*, 1981; JAIN, 1986B; MURO *ET AL.*, 1994).

Los eosinófilos de las tortugas fagocitan complejos inmunes, indicando así su participación en las respuestas inmunes (MEAD Y BORYSENKO, 1984A; MURO *ET AL.*, 1994).

Se citan 3 clases de inmunoglobulinas séricas en tortugas: Ig M, Ig Y e Ig N (CHARTRAND *ET AL.*, 1971; BENEDICT Y POLLARD, 1972; LESLIE Y CLEM, 1972; recopilado en SYPEK Y BORYSENKO, 1988). La presencia de la inmunoglobulina citofílica en el eosinófilo de reptiles se demuestra mediante interacciones antígeno-específicas con eritrocitos de oveja, en tortugas apropiadamente inmunizadas con dichos eritrocitos (MEAD Y BORYSENKO, 1984B, SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

### **-Dimensiones celulares**

Los eosinófilos de las tortugas y cocodrilos presentan un tamaño intermedio entre los de las serpientes y los saurios (SAINT GIRONS, 1970).

En la tortuga mora (*Testudo graeca*) el diámetro mayor de los eosinófilos presenta una media de 14.19  $\mu\text{m}$ , con un rango de 11 a 17  $\mu\text{m}$  (SAINT GIRONS Y DUGUY, 1963; FRYE, 1991). En *Testudo horsfieldi* estas células son ligeramente mayores que los heterófilos, con un diámetro citoplasmático aproximado de 13.5  $\mu\text{m}$  y un núcleo de 8.6  $\mu\text{m}$  (KNOTKOVA *ET AL.*, 2002).



WOOD Y EBANKS (1984) describen el eosinófilo de *Chelonia mydas* como una célula de gran tamaño, con  $13.4 \pm 2.2 \mu\text{m}$  de diámetro, mientras que WORK ET AL. (1998) detectan dos tamaños celulares diferenciados en esta especie. Los eosinófilos pequeños, de 12 a 16  $\mu\text{m}$  de diámetro y los grandes, de 14 a 22  $\mu\text{m}$ . De forma similar, en *Lepidochelys kempii* también se citan dos tipos de eosinófilos: los grandes, de 14  $\mu\text{m}$  de diámetro, con gránulos de 1.8-2.0  $\mu\text{m}$  y menos frecuentes, los pequeños, de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (CANNON, 1992).

Los eosinófilos de *Caretta caretta* representan la célula de mayor tamaño (Tabla 2.16.) y sólo se detecta una variante morfológica (CASAL Y ORÓS, 2007).

**Tabla 2.16.** Media, desviación estándar y rangos de las dimensiones citoplasmáticas de los eosinófilos de tortugas bobas juveniles (*Caretta caretta*) (CASAL Y ORÓS, 2007)

	Área	Perímetro	Diámetro mayor	Diámetro menor
<b>Eosinófilo</b>	259.60±50.12	58.67±5.72	20.02±2.23	16.87±1.92
	160.40-375.80	46.43-70.32	15.65-25.31	13.17-21.26

Todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$ , excepto el área, en  $\mu\text{m}^2$

### -Características tintoriales y morfología

Los granulocitos eosinófilos de los quelonios se caracterizan por sus gránulos esféricos de color rosa pálido (MURO ET AL., 1994) o eosinofílicos cuando se tiñen con las tinciones adecuadas (MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994). Son células grandes, redondeadas y con un núcleo pequeño azulado de localización central (MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; MURO ET AL., 1994) o periférica (MURO ET AL., 1994), pudiendo presentarse lobulado (WILKINSON, 2004).

Los eosinófilos de *Gopherus agassizii* son similares a los heterófilos, conteniendo numerosos gránulos eosinófilos en su citoplasma, discernibles de los gránulos heterófilos por su contorno redondeado. El núcleo es simple, excéntrico y redondeado o ligeramente irregular (ALLEMAN ET AL., 1992).

Los eosinófilos de *Testudo horsfieldi* son células redondas, con gránulos citoplasmáticos más oscuros que los de los heterófilos, rojos y redondos. El núcleo se presenta excéntrico, con coloración uniforme y cromatina condensada (KNOTKOVA ET AL., 2002).

BRADLEY ET AL. (1998) describen los eosinófilos de ejemplares de *Chelonia mydas* de menos de un año de edad como células de citoplasma claro, con gránulos citoplasmáticos redondos, de tamaño variable y coloración roja oscura. El núcleo es eosinófilo, de contorno oval o dentado y cromatina condensada. CASAL Y ORÓS (2007) describen el eosinófilo de juveniles de *Caretta caretta* como una célula de núcleo excéntrico, oval o redondo e intensamente violeta, con cromatina condensada. El abundante citoplasma es débilmente basófilo, con un moderado número de gránulos redondos eosinofílicos bien definidos, con un tamaño de 1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente.

WOOD Y EBANKS (1984) observan sólo una variable morfológica del eosinófilo en *Chelonia mydas* describiéndolo como una célula redonda, con núcleo redondo o ligeramente ovalado, de posición periférica y débilmente basófilo. Los abundantes

gránulos citoplasmáticos son esféricos y fuertemente eosinófilos. WORK ET AL. (1998) describen dos tipos celulares en *Chelonia mydas*, los eosinófilos pequeños y los grandes. Los pequeños muestran un núcleo bien definido, redondo y de color violeta-azulado, con un citoplasma azulado que presenta numerosos gránulos redondos, gris-naranja o de coloración clara, lo que les da apariencia de linfocito vacuolizado. Los eosinófilos grandes tienen un núcleo amorfo, excéntrico y de coloración violeta-azulada. Su abundante citoplasma es claro o ligeramente granular, conteniendo escasos gránulos redondos con un centro naranja pálido, y rodeados por un halo azul-naranja ligeramente refráctil. Los gránulos metacromáticos bien definidos y de tamaño variable son infrecuentes en los eosinófilos de la toruga verde.

En *Lepidochelys kempii* también se citan eosinófilos grandes y pequeños. Los grandes se caracterizan por un núcleo redondo u ovoide excéntrico, con un citoplasma lleno de unos 70-85 gránulos refráctiles redondos u ovoides, de coloración naranja y localización periférica. También pueden observarse gránulos más pequeños y menos refráctiles. Los eosinófilos pequeños son menos frecuentes, con una menor cantidad de gránulos grandes refráctiles redondos (CANNON, 1992).

Existen pocos estudios que hablen de la presencia de dos tipos morfológicos de eosinófilos en reptiles. Así, además de en *Lepidochelys kempii* (CANNON, 1992) y en *Chelonia mydas* (WORK ET AL., 1998), se han descrito en la tortuga india de caparazón blando (*Lissemys punctata*) (DE Y MAITI, 1981, 1982). WORK ET AL. (1998) deducen que los eosinófilos grandes encontrados en *Chelonia mydas* representan células activadas degranuladas o que contienen material granular coalescente en respuesta a estímulos inflamatorios. Sin embargo, no hay datos suficientes para determinar diferencias en la madurez entre los dos tipos celulares.

### **-Técnicas citoquímicas**

Por lo general, en contraste con los heterófilos, los eosinófilos de muchas especies de quelonios son positivos a la peroxidasa con las técnicas de la bencidina o la p-phenylenediamina, y pueden diferenciarse de los heterófilos por pruebas citoquímicas simples (KÉLENYI Y NEMETH, 1969; MATEO ET AL., 1984; MAXWELL, 1984).

Los eosinófilos de *Gopherus agassizii* resultan fácilmente identificables puesto que los gránulos reaccionan positivamente a la bencidina peroxidasa, mientras que los gránulos heterófilos se muestran negativos. Los gránulos eosinófilos no se tiñen con ninguna otra tinción citoquímica, y sólo se observan pequeñas áreas citoplasmáticas positivas a la técnica de la cloroacetato esterasa (ALLEMAN ET AL., 1992). Análogamente, los gránulos eosinófilos de la tortuga de caja europea (*Emys orbicularis*) reaccionan positivamente a la peroxidasa (KÉLENYI Y NEMETH, 1969).

En *Lepidochelys kempii* los gránulos refráctiles de los eosinófilos pequeños reaccionan intensamente con la fosfatasa ácida, en contraste con los gránulos de los eosinófilos grandes, que son negativos. Generalmente, los eosinófilos grandes exhiben positividad moderada frente a la fosfatasa alcalina, localizándose principalmente en los gránulos más pequeños y menos refráctiles. Los gránulos refráctiles grandes muestran actividad de moderada a intensa frente a la mieloperoxidasa y la adenosin trifosfatasa. La positividad a la reacción del PAS parece concentrarse exclusivamente en los gránulos más pequeños y menos refráctiles de los eosinófilos grandes. Lo mismo sucede con la actividad esterasa inespecífica. Un moderado número de gránulos pequeños de los eosinófilos

grandes se muestra positivo a los lípidos neutros cuando se tratan con Sudán negro B (CANNON, 1992).

En *Chelonia mydas* tanto los gránulos de los eosinófilos grandes como los de los pequeños se tiñen intensamente con la cloroacetato esterasa y marginalmente con la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa y con el PAS (WORK ET AL., 1998).

Los gránulos de los eosinófilos de *Caretta caretta* reaccionan de forma positiva para la fosfatasa ácida (con y sin tartrato),  $\alpha$ -naftil butirato esterasa (con fluoruro sódico), cloroacetato esterasa y PAS, y son moderadamente positivos para el Sudán negro B (CASAL Y ORÓS, 2007).

#### **-Ultraestructura del eosinófilo**

El núcleo de los eosinófilos de *Chelonia mydas* es redondo u oval, con cantidades variables de heterocromatina. Los eosinófilos pequeños muestran gránulos redondos densamente homogéneos y bien definidos, que frecuentemente aparecen deformados por estructuras cristalinas internas. Algunos eosinófilos también presentan numerosos gránulos de densidad variable y vacuolas claras, múltiples y pequeñas o grandes e individuales. Los eosinófilos grandes muestran en su abundante citoplasma numerosas vacuolas coalescentes, claras y mal definidas. Algunos gránulos grandes, redondos o pleomórficos, de densidad variable y bien definidos, aparecen en un extremo celular. Algunos de estos gránulos presentan un núcleo electrodenso, recordando a los gránulos cristaloides encontrados en otras especies. Las mitocondrias, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi son más frecuentes en los eosinófilos pequeños (WORK ET AL., 1998).

Los eosinófilos de *Caretta caretta* presentan una forma redonda homogénea, con un núcleo redondo u oval, con un contenido variable de heterocromatina. Los gránulos citoplasmáticos aparecen bien definidos, homogéneamente electrodensos y circulares, sin estructuras cristalinas internas. Algunas células muestran vacuolas claras, en patrón múltiple o como una única vacuola de gran tamaño. Las mitocondrias, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi se identifican con facilidad (CASAL ET AL., 2007).

#### **2.2.2.4.- El Basófilo de los Quelonios**

Los basófilos juegan un importante papel en la defensa del organismo en aves y reptiles, especies en las que el número de basófilos circulantes es considerablemente superior al de los mamíferos (MONTALI, 1988).

ROSSKOPF (2000) ha descrito un aumento de basófilos circulantes en diferentes especies de quelonios en respuesta a infestaciones parasitarias intestinales.

En los basófilos de quelonios, tras inmunización con eritrocitos de ovejas, se hallan antígenos específicos de anticuerpos citofílicos con función reagínica y, por tanto, asociados a reacciones de hipersensibilidad (MEAD ET AL., 1983; SYPEK ET AL., 1984).

#### **-Dimensiones celulares**

Aunque generalmente los basófilos de los quelonios se describen como células pequeñas (WILKINSON, 2004), sólo *Sphenodon punctatus* y los cocodrilianos presentan basófilos más grandes que los observados en quelonios (SAINT GIRONS, 1970).

El diámetro mayor de los basófilos de *Testudo graeca* tiene de media 11  $\mu\text{m}$ , con un rango de 8 a 15  $\mu\text{m}$  (SAINT GIRONS Y DUGUY, 1963; FRYE, 1991), mientras que en *Testudo horsfieldi* estas células presentan un diámetro aproximado de 9.5  $\mu\text{m}$  (KNOTKOVA ET AL., 2002).

Los basófilos de *Caretta caretta* tienen un tamaño similar al heterófilo de esta especie, o ligeramente inferior (BRADLEY ET AL 1998). Sin embargo, CASAL Y ORÓS (2007) no determinaron las dimensiones celulares del basófilo en esta especie debido a la dificultad para detectar este leucocito en el frotis sanguíneo.

De igual forma, WORK ET AL. (1998) no pudieron determinar las dimensiones celulares del basófilo de *Chelonia mydas* debido a su escasez en el frotis sanguíneo. WOOD Y EBANKS (1984) establecieron el tamaño del basófilo para esta especie, definiéndola como una célula pequeña, con un diámetro de  $5.8 \pm 0.9\mu\text{m}$ , aproximadamente el tamaño del núcleo del eritrocito.

### **-Características tintoriales y morfología**

Los basófilos de los quelonios son esféricos con un núcleo no lobulado (WILKINSON, 2004), raramente visible al ser ocultado por los abundantes gránulos citoplasmáticos (MURO ET AL., 1994; WILKINSON, 2004). Estos gránulos se caracterizan por su color azul oscuro y morfología esférica (MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; MURO ET AL., 1994; WILKINSON, 2004), aunque también pueden tener forma de varilla (MURO ET AL., 1994). Dichos gránulos son importantes a la hora de diferenciar estas células de los heterófilos tóxicos, en los que los gránulos tienden a tornarse oscuros y redondeados (WILKINSON, 2004).

Los basófilos de *Gopherus agassizii* se identifican fácilmente en las preparaciones sanguíneas tratadas con Wright-Giemsa debido a la presencia de numerosos gránulos citoplasmáticos redondos y densamente basófilos. Los gránulos suelen ser tan numerosos que tienden a enmascarar el núcleo celular (ALLEMAN ET AL., 1992). Muy similares son los basófilos de *Testudo horsfieldi*, ya que se muestran repletos de gránulos redondos de gran tamaño. La coloración de éstos varía de violeta a azul o negruzca. Su núcleo prácticamente no es visible, aunque suele presentar acúmulos de cromatina (KNOTKOVA ET AL., 2002).

En *Caretta caretta* el citoplasma se muestra abundante, de coloración azul clara y conteniendo gránulos violetas (metacromáticos). En ocasiones pueden aparecer parcialmente degranulados, con un citoplasma de apariencia apolillada. El núcleo es eosinófilo, con cromatina condensada (BRADLEY ET AL 1998). CASAL Y ORÓS (2007) describen estas células en esta especie de tortuga marina con una superficie redondeada y un núcleo excéntrico y denso, de color azul-violeta y un patrón de cromatina agrupada. Los gránulos citoplasmáticos son grandes y basófilos, y frecuentemente enmascaran al núcleo.

Los basófilos de *Chelonia mydas* se describen como células redondas, con un núcleo denso, violeta-azulado de posición central y un citoplasma bien definido, lleno de gránulos basófilos pequeños que tienden a ocultar el núcleo (WOOD Y EBANKS, 1984; WORK ET AL., 1998 ).

### **-Técnicas citoquímicas**

En la mayoría de las especies de quelonios en las que se han realizado estudios citoquímicos, los basófilos han resultado positivos exclusivamente para el azul de toluidina (ALLEMAN *ET AL.*, 1992; WORK *ET AL.*, 1998; CASAL Y ORÓS, 2007).

### **-Ultraestructura del basófilo**

Ni WORK *ET AL.* (1998) en *Chelonia mydas*, ni CASAL Y ORÓS (2007) en *Caretta caretta* pudieron determinar las características ultraestructurales del basófilo en esas especies debido a la escasez de estas células en la sangre de estos quelonios.

## **2.2.3.- Los Leucocitos Mononucleares en Quelonios**

### **2.2.3.1.- El Linfocito de los Quelonios**

Determinadas variaciones patológicas pueden generar aumentos de los niveles de linfocitos circulantes, tales como la estimulación inmune y las neoplasias linforreticulares (FRYE, 1991). La linfocitosis se suele asociar con la inflamación, los procesos de cicatrización, el parasitismo y la leucemia (WILKINSON, 2004).

La linfopenia patológica tiende a aparecer ante una disminución de la capacidad de respuesta inmunitaria por parte del animal, tanto por condiciones ambientales adversas, como por el uso de glucocorticoides o fármacos inmunosupresores (MURO *ET AL.*, 1994). También puede diagnosticarse en condiciones de estrés (LANCE, 1990; HAJDUK *ET AL.*, 1992; AGUIRRE *ET AL.*, 1995) y de hipotermia (SMITH *ET AL.*, 2000), además de en procesos de anorexia/malnutrición, durante la hibernación o en enfermedades linfoproliferativas (WILKINSON, 2004).

### **-Dimensiones celulares**

Los linfocitos se describen como células de tamaño variable (MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; MURO *ET AL.*, 1994; WILKINSON, 2004).

Los linfocitos de *Testudo horsfieldi* muestran un diámetro de aproximadamente 5.7  $\mu\text{m}$  (KNOTKOVA, *ET AL.*, 2002).

WOOD Y EBANKS (1984) establecen un tamaño medio para los linfocitos de *Chelonia mydas* de  $11.3 \pm 2.7 \mu\text{m}$ , aunque observan células tan pequeñas como un basófilo y otras más grandes que el neutrófilo o el eosinófilo. WORK *ET AL.* (1998) describen el linfocito de esta especie como una célula pequeña de 6 a  $14\mu\text{m}$ .

El diámetro del linfocito de *Lepidochelys kempii* mide entre 7.2 y  $8.5 \mu\text{m}$  (CANNON, 1992).

Los linfocitos de *Caretta caretta* se describen también como células pequeñas (Tabla 2.17) (CASAL Y ORÓS, 2007).

**Tabla 2.17.** Media, desviación estándar y rangos de las dimensiones citoplasmáticas de los linfocitos de tortugas bobas juveniles (*Caretta caretta*) (CASAL Y ORÓS, 2007)

	Área	Perímetro	Diámetro mayor	Diámetro menor
<b>Linfocito</b>	106.82±24.56 66.72-177.70	37.09±4.30 29.87-49.60	12.31±1.48 9.70-16.66	11.10±1.33 8.06-14.55

Todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$ , excepto el área, en  $\mu\text{m}^2$

### -Características tintoriales y morfología

Los linfocitos de los quelonios muestran un citoplasma azulado, ligeramente granular (MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; MURO *ET AL.*, 1994; WILKINSON, 2004), y pueden contener partículas fagocitadas y en ocasiones, pequeños gránulos eosinófilos. Su superficie puede presentar pequeños pseudópodos y se describen gránulos periféricos en algunas preparaciones, lo cual puede ser artefactual (WILKINSON, 2004). Ocasionalmente pueden contener inclusiones hialinas (MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; MURO *ET AL.*, 1994) y azurófilas (MURO *ET AL.*, 1994). Su núcleo es grande, lateral en los linfocitos de mayor tamaño y central en los linfocitos pequeños, en los que ocupa casi la totalidad del citoplasma (MURO *ET AL.*, 1994). Estos leucocitos se presentan con frecuencia en el frotis moldeados por las células adyacentes (WILKINSON, 2004). Los linfocitos inmaduros poseen mayor cantidad de citoplasma y un nucleolo más grande, siendo similares a los linfocitos de mamíferos (WILKINSON, 2004).

Los linfocitos de *Gopherus agassizii* son morfológicamente similares a los de los mamíferos, con escasa cantidad de citoplasma. El ratio núcleo/citoplasma es elevado y comúnmente el núcleo presenta cromatina condensada. La similitud morfológica entre los linfocitos y los trombocitos de esta especie puede conducir a errores en la fórmula leucocitaria. Las características distintivas de los linfocitos con respecto a los trombocitos se basan en sus contornos citoplasmáticos redondeados y mayor tamaño, así como en la tinción más clara de su núcleo (ALLEMAN *ET AL.*, 1992). La morfología celular de los linfocitos de *Testudo horsfieldi* es similar a la de *Gopherus agassizii*, presentando un núcleo compacto oscuro y un fino citoplasma con bordes azulados o violetas (KNOTKOVA, *ET AL.*, 2002).

Los estudios existentes en *Chelonia mydas* discrepan ligeramente en cuanto a la morfología de los linfocitos. WOOD Y EBANKS (1984) los describen como células esféricas u ovals, con un núcleo de contorno irregular que puede ocupar la mayor parte de la célula o sólo un tercio. El citoplasma aparece azul-violáceo pálido, sin gránulos, pero con vacuolas. WORK *ET AL.* (1998) describen un núcleo redondo bien definido violeta-azulado, con abundante cromatina condensada. Rodeando al núcleo, hay un halo citoplasmático granular y basófilo, a menudo con burbujas. Al contrario que en *Gopherus agassizii*, WORK *ET AL.* (1998) no tuvieron problemas para diferenciar los linfocitos de los trombocitos en muestras frescas de sangre.

Los linfocitos pequeños de *Lepidochelys kempii* aparecen como células redondas u ovals, con un núcleo denso y redondo, ocasionalmente dentado, que ocupa casi todo el volumen celular. El citoplasma es azul pálido, pudiendo contener escasos gránulos azurófilos (CANNON, 1992).

CASAL Y ORÓS (2007) describen el linfocito de *Caretta caretta* como una célula con núcleo redondo, bien definido, violeta-azulado y portador de cromatina agrupada. Alrededor del núcleo se extiende una fina capa de citoplasma basófilo moderadamente granular. El ratio núcleo/citoplasma estimado fue habitualmente de 0.6.

#### **-Técnicas citoquímicas**

Tanto en *Gopherus agassizii* como en *Chelonia mydas* los linfocitos no reaccionan positivamente a ninguna de las técnicas citoquímicas estudiadas (ALLEMAN *ET AL.*, 1992; WORK *ET AL.*, 1998).

Los linfocitos pequeños de *Lepidochelys kempii* muestran actividad esterasa no específica muy leve en algunos gránulos, pero no así para el resto de las enzimas hidrolíticas u oxidativas ni para los lípidos. Algunos gránulos o partículas intracelulares aparecen PAS-positivos, por lo que el glucógeno constituye probablemente la fuente de energía del linfocito en esta especie (CANNON, 1992).

En el linfocito de *Caretta caretta* sólo se detecta respuesta positiva moderada a la  $\alpha$ -naphthil butirato esterasa sin inhibición de fluoruro sódico (CASAL Y ORÓS, 2007).

El que los linfocitos de la mayoría de las especies de quelonios estudiadas muestren escasez de hidrolasas en su paquete enzimático puede estar asociado a la ausencia de actividad fagocítica de los linfocitos pequeños ya que la función principal de estas células es la de mediar en la respuesta celular y humoral (WILLIAMS *ET AL.*, 1972).

#### **-Ultraestructura del linfocito**

Ultraestructuralmente, el linfocito de *Chelonia mydas* se describe como una célula con un núcleo redondo, frecuentemente dentado, con grandes agrupaciones de heterocromatina. El escaso citoplasma muestra pocas mitocondrias, retículo endoplasmático y pequeños gránulos electrodensos (WORK *ET AL.*, 1998).

Los linfocitos de *Caretta caretta* son muy similares ultraestructuralmente a los de *Chelonia mydas*. Muestran una forma irregularmente circular, con un núcleo redondeado, frecuentemente dentado y con cantidades abundantes de heterocromatina. El escaso citoplasma contiene algunas mitocondrias, polirribosomas, retículo endoplasmático y pequeños gránulos electrodensos (CASAL *ET AL.*, 2007).

### **2.2.3.2.- El Monocito de los Quelonios**

La función principal de los monocitos de los quelonios es la fagocitosis, como se desprende del estudio in vitro en el galápagos de cuello ladeado de Hilarie (*Phrynopys hilarii*) constatándose además la tendencia de estos leucocitos a fusionarse para formar células gigantes multinucleadas, que probablemente tienen un importante papel en los procesos de "limpieza" de la sangre (PITOL *ET AL.*, 2008).

Una vez abandonan la sangre y pasan a los tejidos, los monocitos se diferencian a macrófagos, que contribuyen al desarrollo de la respuesta inflamatoria (CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999).

La monocitosis aparece en los procesos infecciosos crónicos (necrosis tisulares, procesos supurativos crónicos), y en las infecciones víricas (poxvirus), clamidiasis (MURO *ET AL.*, 1994) y granulomas (AGUIRRE *ET AL.*, 1995). En general, la monocitosis puede presentarse en respuesta a la infección aguda o crónica y a la inflamación, aunque la frecuencia con que la monocitosis es diagnosticada depende mucho de los rangos de referencia empleados (WILKINSON, 2004).

### -Dimensiones celulares

Los monocitos se consideran células de tamaño superior al linfocito (MURO *ET AL.*, 1994). Su diámetro suele representar 1-1.5 veces el diámetro mayor del eritrocito (WILKINSON, 2004).

Los monocitos de *Testudo horsfieldi* presentan un diámetro aproximado de 15.5  $\mu\text{m}$  (KNOTKOVA, *ET AL.*, 2002).

Los monocitos de *Chelonia mydas* muestran un tamaño superior al de los linfocitos, con un diámetro de entre 11 y 26  $\mu\text{m}$  (WORK *ET AL.*, 1998).

BRADLEY *ET AL.* (1998) describen el tamaño del monocito de *Caretta caretta* similar al del heterófilo, mientras que CASAL Y ORÓS (2007) observan que el diámetro de los monocitos de esta especie es un 33% superior al de los linfocitos (Tabla 2.18).

**Tabla 2.18.** Media, desviación estándar y rangos de las dimensiones citoplasmáticas de los monocitos de tortugas bobas juveniles (*Caretta caretta*) (CASAL Y ORÓS, 2007)

	Área	Perímetro	Diámetro mayor	Diámetro menor
<b>Monocito</b>	187.81 $\pm$ 40.55	49.69 $\pm$ 5.53	16.41 $\pm$ 1.91	14.77 $\pm$ 1.65
	108.96-301.91	38.44-64.73	12.97-20.60	10.34-19.34

Todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$ , excepto el área, en  $\mu\text{m}^2$

### -Características tintoriales y morfología

Los monocitos de los quelonios suelen presentar un contorno celular uniforme. Su citoplasma es azul pálido, a menudo vacuolizado con apariencia espumosa y ligeramente granular. Su núcleo es variable, frecuentemente oval o dentado con forma arriñonada, pudiendo presentar un solo nucléolo grande (WILKINSON, 2004) y conteniendo cromatina fina (MURO *ET AL.*, 1994).

Los monocitos de *Testudo horsfieldii* presentan un gran núcleo que contiene fina y pálida cromatina. Estas células poseen un contorno cuadrangular y su abundante citoplasma es azul-grisáceo y puede presentar vacuolas (KNOTKOVA, *ET AL.*, 2002).

En la sangre de *Gopherus agassizii* se identifican dos tipos de monocitos circulantes. Los monocitos tipo I, más abundantes, son células de apariencia similar a los monocitos de mamíferos. Contienen un núcleo simple de contorno irregular y una moderada cantidad de citoplasma basófilo que a menudo contiene una o más vacuolas claras. Los monocitos tipo II tienen una apariencia similar aunque muestran un número bajo o moderado de gránulos citoplasmáticos pequeños y azurófilos, con un núcleo que va de lobulado a pleomórfico (ALLEMAN *ET AL.*, 1992). Este último tipo celular se identifica también en otros reptiles (WILL, 1978) y es morfológicamente diferente a los azurófilos



identificados en serpientes y aligátors, y probablemente se corresponde con los monocitos azurófilos (MATEO *ET AL.*, 1984; MONTALI, 1988).

Los monocitos de *Chelonia mydas* se describen como células redondas o ameboides. El núcleo es esférico, ovalado o dentado, de color violeta-azulado y con un fino patrón de cromatina. El citoplasma es moderadamente basófilo, con bordes bien definidos o irregulares y vacuolas de tamaño variable. No presentan gránulos azurófilos (WORK *ET AL.*, 1998).

Los estudios que describen los monocitos de los ejemplares juveniles de *Caretta caretta* coinciden en la mayoría de sus características, salvo en la coloración del núcleo. BRADLEY *ET AL.* (1998) describen un núcleo eosinófilo mientras que CASAL Y ORÓS (2007) lo describen violeta-azulado. Generalmente la morfología nuclear aparece oval, arriñonada o fusiforme, con un patrón de cromatina menos agrupado que el linfocito. Son células redondas o ameboides con citoplasma moderadamente basófilo, que a veces desarrolla pseudopodia, y vacuolas ocasionales de talla variable. No presentan gránulos azurófilos (BRADLEY *ET AL.*, 1998; CASAL Y ORÓS, 2007). El ratio núcleo/citoplasma estimado es generalmente de 0.5, menor al de los linfocitos de esta especie (CASAL Y ORÓS, 2007).

#### **-Técnicas citoquímicas**

El monocito tipo I de *Gopherus agassizii* se tiñe con la técnica citoquímica de la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa (ALLEMAN *ET AL.*, 1992), al igual que los monocitos de mamíferos (JAIN, 1986A) y de otros reptiles (MATEO *ET AL.*, 1984; MONTALI, 1988). También muestra positividad a la fofatasa ácida y en ocasiones, a la cloroacetato esterasa (ALLEMAN *ET AL.*, 1992).

Los monocitos de *Chelonia mydas* reaccionan positivamente con las técnicas de la fofatasa ácida y el PAS, y débilmente con la cloroacetato esterasa y la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa (WORK *ET AL.*, 1998). Sin embargo, los monocitos de la tortuga boba (*Caretta caretta*) sólo muestran positividad moderada para la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa sin inhibición de fluoruro sódico (CASAL Y ORÓS, 2007).

En los fagocitos mononucleares circulantes de *Phrynopys hilarii* se detecta positividad a enzimas lisosomiales como las fofatasas ácidas o la trimetafosfatasa. Así, la  $\beta$ -glicerofastatasa ácida se detecta en los lisosomas y en el interior de los fagolisosomas. La reacción a la citidina 5-monofosfatasa ácida se produce alrededor de los lisosomas y la trimetafosfatasa se detecta también en el interior de los fagolisosomas (PITOL *ET AL.*, 2008).

#### **-Ultraestructura del monocito**

Los monocitos de *Chelonia mydas* presentan un núcleo con escasa heterocromatina en el que ocasionalmente puede detectarse el nucléolo. El abundante citoplasma contiene un gran complejo de Golgi, mitocondrias, retículo endoplasmático y algunos pequeños gránulos electrodensos (WORK *ET AL.*, 1998).

La descripción ultraestructural del monocito de *Caretta caretta* es muy similar a lo anteriormente observado para esta célula en *Chelonia mydas* (CASAL *ET AL.*, 2007).

Los fagocitos mononucleares de *Phrynopys hilarii* muestran en su citoplasma, tras un proceso de incubación, mitocondrias, lisosomas y fagolisosomas conteniendo partículas

que están siendo digeridas (PITOL *ET AL.*, 2008).

### **2.2.3.3.- El Azurófilo de los Quelonios**

Los azurófilos se han identificado en algunos quelonios, aunque no es un hallazgo frecuente (HAWKEY Y DENNET, 1989; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; ARNOLD, 1994; ANDERSON *ET AL.*, 1997; TROIANO Y SILVA, 1998; CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999; SMITH *ET AL.*, 2000; DICKINSON *ET AL.*, 2002).

Aunque se observan con frecuencia en reptiles del orden Squamata (CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999), la función de los azurófilos se desconoce (MONTALI, 1988; CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999). Sin embargo, se ha afirmado que la azurofilia puede producirse en asociación a un proceso infeccioso o inflamatorio (WILKINSON, 2004).

Los fácilmente identificables azurófilos de los reptiles del orden Squamata son inusuales en el orden Chelonia (ANDERSON *ET AL.*, 1997). Los azurófilos se consideran monocitos con granulaciones azurófilas en el citoplasma y la mayoría de los autores los identifican como monocitos (MURO *ET AL.*, 1994).

#### **-Dimensiones, morfología celular y técnicas citoquímicas**

En *Gopherus agassizii* se identifican dos tipos de monocitos. Los monocitos tipo II, poco frecuentes, son similares a los del tipo I, aunque contienen un número bajo o moderado de gránulos citoplasmáticos pequeños, azurófilos, con un núcleo de lobulado a pleomórfico (ALLEMAN *ET AL.*, 1992). Los azurófilos de esta especie presentan actividad peroxidasa en sus gránulos. Este tipo celular se identifica también en otros reptiles (WILL, 1978) y es morfológicamente diferente a los azurófilos identificados en serpientes y aligátores, correspondiéndose probablemente con los monocitos azurófilos (MATEO *ET AL.*, 1984; MONTALI, 1988).

También se han descrito azurófilos en *Testudo horsfieldi*. Presentan un diámetro aproximado de 9.7  $\mu\text{m}$ , con un gran núcleo de 8.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, que usualmente aparece ligeramente dentado o con una forma semiesférica. La cromatina es de color violeta oscuro, firmemente condensada y el citoplasma presenta una coloración azul-grisácea y cierta cantidad de gránulos rosados (KNOTKOVA *ET AL.*, 2002).

### **2.2.4.- El Trombocito de los Quelonios**

Los trombocitos son similares a las plaquetas de los mamíferos y juegan un papel activo en la formación del trombo, coagulación sanguínea y cicatrización de heridas (FRYE, 1991; WATSON, 1997; RASKIN, 2000).

#### **-Dimensiones celulares**

El tamaño de los trombocitos de los quelonios está sometido a grandes variaciones. Se ha establecido la media de 5-9  $\mu\text{m}$  de diámetro menor, por 8-16  $\mu\text{m}$  de diámetro mayor (BERNSTEIN, 1938; TAYLOR Y KAPLAN, 1961; WOOD Y EBANKS, 1984).

WORK ET AL. (1998) describen al trombocito de *Chelonia mydas* como una célula de menor tamaño que el eritrocito, con 9-12  $\mu\text{m}$  de diámetro mayor. WOOD Y EBANKS (1984) referencian un diámetro mayor de  $13.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$  y un diámetro menor de  $5.9 \pm 0.9 \mu\text{m}$ , ligeramente superior al núcleo del eritrocito.

Las medidas celulares del trombocito en juveniles de *Caretta caretta* se muestran en la Tabla 2.19 (CASAL Y ORÓS, 2007).

**Tabla 2.19.** Media, desviación estándar y rangos de las dimensiones citoplasmáticas de los trombocitos de tortugas bobas juveniles (*Caretta caretta*) (CASAL Y ORÓS, 2007)

	Área	Perímetro	Diámetro mayor	Diámetro menor
<b>Trombocito</b>	64.52±16.38 35.58-109.40	32.88±5.06 23.71-42.75	13.50±2.45 9.15-18.35	6.19±0.99 4.01-9.36

Todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$ , excepto el área, en  $\mu\text{m}^2$

### -Características tintoriales y morfología

El trombocito se describe como una célula elíptica con bordes redondeados. El citoplasma es escaso y de color azul muy pálido. El núcleo es central, tan grande que ocupa casi la totalidad de la célula, con un borde liso y coloración azul oscura (MURO ET AL., 1994) mucho más intensa y con mayor densidad que la de los linfocitos (HAWKEY Y DENNET, 1989; WILKINSON, 2004). Además, en quelonios estas células se suelen observar más pequeñas que los linfocitos (HAWKEY Y DENNET, 1989).

*Gopherus agassizii*, al igual que otros reptiles, presenta trombocitos de mayor tamaño que el de las plaquetas de los mamíferos y frecuentemente aparecen formando agregados. Se observan sutiles diferencias entre los trombocitos y los linfocitos, aunque la distinción entre ambos suele ser difícil. Los trombocitos contienen un núcleo redondo que es más pequeño y más circular que el del linfocito, además de contener una cromatina más densa y oscura. Muestran escasos acúmulos de citoplasma ligeramente basófilo que es más angular que el de los linfocitos, formando una o más proyecciones puntiagudas. En ocasiones se observan pequeños gránulos azurófilos en el citoplasma (ALLEMAN ET AL., 1992).

El trombocito de *Testudo horsfieldi* presenta un núcleo redondo u oval oscuro. El citoplasma se observa redondeado alrededor del núcleo, o bien, ovalado, y es transparente, con una bien visible membrana citoplasmática (KNOTKOVA ET AL., 2002).

WOOD Y EBANKS (1984) describen el trombocito de *Chelonia mydas* con un núcleo densamente basófilo, oval o bilobulado, rodeado por un delgado citoplasma claro, visible en forma de áreas alargadas que parten de los polos nucleares. En esta especie los trombocitos tienden a confundirse con los basófilos, aunque el contorno aparece más irregular en los primeros. WORK ET AL. (1998) no tuvieron problemas para distinguir a los trombocitos de *Chelonia mydas* de otras células sanguíneas, especialmente de los linfocitos, y afirmaron que el uso de preparaciones de sangre fresca sin enfriar, favorece que los trombocitos retengan sus características morfológicas originales. Por otro lado, su descripción morfológica de los trombocitos en esta especie de tortuga marina es muy similar a la desarrollada por WOOD Y EBANKS en 1984.

El trombocito de *Caretta caretta* es descrito por BRADLEY ET AL. (1998) como una célula oval o elongada, con un citoplasma claro o ligeramente azulado. El núcleo redondeado muestra una coloración eosinófila y un patrón de cromatina condensada. CASAL Y ORÓS (2007) los describen como células ovaladas, aunque también observan trombocitos redondos. El núcleo aparece generalmente ovalado, con una tinción fuerte azul-violeta y cromatina agrupada. El escaso citoplasma se acumula en los polos de las células de morfología ovalada, o en forma de halo alrededor del núcleo de las células redondeadas. En ambos casos, la coloración del citoplasma es muy pálida, casi transparente.

#### **-Técnicas citoquímicas**

Citoquímicamente, los trombocitos de *Gopherus agassizii* muestran positividad citoplasmática a la técnica de la fostatasa ácida, permitiendo diferenciarlos de los linfocitos, ya que en esta especie, estos últimos no reaccionan positivamente a ninguna técnica citoquímica (ALLEMAN ET AL., 1992). Lo mismo sucede en *Chelonia mydas*, cuyos trombocitos se tiñen positivos con la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa y PAS, mientras que los linfocitos no asumen ninguna característica tintorial (WORK ET AL., 1998).

Los trombocitos de los juveniles de *Caretta caretta* sólo muestran positividad para la técnica del PAS (CASAL Y ORÓS, 2007).

#### **-Ultraestructura del trombocito**

Los trombocitos de *Chelonia mydas* se describen ovalados o fusiformes, con núcleos ovals o lobulados, ricos en heterocromatina. Los bordes celulares muestran algunas proyecciones digitiformes, y a menudo aparecen pequeñas membranas uniformes adheridas a gránulos y estructuras claras canaliculares en el citoplasma (WORK ET AL., 1998). Estos sistemas canaliculares abiertos son una característica muy frecuente de este tipo celular en muchos reptiles (SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

En los juveniles de *Caretta caretta* los trombocitos son similares a los descritos en *Chelonia mydas*, mostrando una típica forma ovalada, aunque también aparecen células redondas. El núcleo, generalmente oval, contiene heterocromatina periférica. El resto de las características celulares son idénticas a las observadas en *Chelonia mydas*, incluyendo la presencia de estructuras canaliculares claras en el citoplasma (CASAL ET AL., 2007).

Los trombocitos de *Phrynopys hiliarii* presentan morfología fusiforme y núcleo lobulado. En el citoplasma pueden encontrarse grandes vesículas y estructuras canaliculares, además de retículo endoplasmático agranular, complejo de Golgi y escasos ribosomas libres. Tras su activación y agregación, se desencadenan alteraciones estructurales que se traducen en el desarrollo de numerosas proyecciones filopodales, un aumento del número de vacuolas y el cambio de morfología de fusiforme a esférica (PELLIZZON ET AL., 2002).

## 2.3.- LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE LOS EMÍDIDOS (Familia Emydidae)

### 2.3.1.- El Eritrocito de los Emídidos

#### -Dimensiones celulares

Los eritrocitos de los juveniles de la tortuga de vientre rojo americana (*Pseudemys rubriventris*) muestran un tamaño medio de 20 x 10  $\mu\text{m}$  (INNIS ET AL., 2007). En la tortuga asiática amarilla de charca (*Ocadia sinensis*) el diámetro mayor de los eritrocitos, medido mediante el uso del microscopio óptico, es de  $14.4 \pm 3.1 \mu\text{m}$ , mientras que con la microscopía electrónica el tamaño es de 15 a 20  $\mu\text{m}$  (CHUNG ET AL., 2009). En la tortuga del templo de cabeza amarilla (*Hieremys annandalii*) el diámetro mayor del eritrocito es de  $15.81 \pm 2.56 \mu\text{m}$  y el diámetro menor  $10.01 \pm 1.54 \mu\text{m}$  (CHANSUE ET AL., 2011).

Los tamaños celulares de los eritrocitos de la hicotea (*Trachemys callirostris*) se describen en la Tabla 2.20 (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

**Tabla 2.20.** Medidas citoplasmáticas y nucleares de los eritrocitos de hicoteas (*Trachemys callirostris*) (CARRASCAL VELÁSQUEZ ET AL., 2014)

	Área total	Área núcleo	Área citoplasma	Diámetro mayor	Diámetro menor
<b>Eritrocito</b>	278.0 $\pm$ 8.5	37.0 $\pm$ 3.0	241.0 $\pm$ 9.0	24.20 $\pm$ 1.3	14.0 $\pm$ 0.9

Las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$ , excepto el área, en  $\mu\text{m}^2$

Los tamaños celulares de los eritrocitos de varias especies de emídidos se describen en la Tabla 2.21 (ARIZZA ET AL., 2014) y en la Tabla 2.22 (FRYE, 1991).

**Tabla 2.21.** Medidas citoplasmáticas y nucleares de los eritrocitos de varias especies de emídidos (ARIZZA ET AL., 2014)

	Diámetro mayor celular	Diámetro menor celular	Área citoplasma	Diámetro mayor núcleo	Diámetro menor núcleo	Área núcleo
<i>Emys trinacris</i>	22.5 $\pm$ 1.21	14.1 $\pm$ 0.44	249.4 $\pm$ 21.58	6.3 $\pm$ 0.16	5.1 $\pm$ 0.34	25.2 $\pm$ 2.48
<i>Emys orbicularis galloitalica</i>	21.7 $\pm$ 1.51	11.5 $\pm$ 0.98	195.8 $\pm$ 1.16	6.6 $\pm$ 0.75	5.7 $\pm$ 0.47	29.5 $\pm$ 0.27
<i>Emys orbicularis hellenica</i>	21.7 $\pm$ 1.01	12.5 $\pm$ 0.98	214.0 $\pm$ 22.8	7.5 $\pm$ 0.54	5.7 $\pm$ 0.47	33.6 $\pm$ 3.74
<i>Trachemys scripta elegans</i>	19.2 $\pm$ 0.62	13.6 $\pm$ 0.61	204.9 $\pm$ 15.46	6.0 $\pm$ 0.37	5.3 $\pm$ 0.25	25.2 $\pm$ 2.8

Las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$ , excepto el área, en  $\mu\text{m}^2$

**Tabla 2.22.** Dimensiones eritrocitarias en galápagos leproso (*Clemmys caspica leprosa*) (FRYE, 1991)

	Eritrocito				Núcleo				Ratio
	DM	Dm	DM/Dm	S	DM	Dm	DM/Dm	S	
<i>Clemmys caspica leprosa</i>	19.0	10.9	1.74	162.5	6.5	4.8	1.35	24.5	0.151

DM: diámetro mayor en  $\mu\text{m}$ . Dm: diámetro menor en  $\mu\text{m}$ . S: superficie ( $\mu\text{m}^2$ ) Ratio: ratio núcleo/citoplasma

DAVIS Y HOLCOMB (2008) establecen diferencias de tamaño entre eritrocitos portadores y no portadores de inclusiones citoplasmáticas en tortuga pintada (*Chrysemys picta picta*) concluyendo que las células portadoras de inclusiones tienden a ser más largas, estrechas y con menos superficie que las no portadoras (Tabla 2.23), si bien no observan diferencias estadísticamente significativas entre los tamaños nucleares.

**Tabla 2.23.** Medidas citoplasmáticas de los eritrocitos de la tortuga pintada (*Chrysemys picta picta*) (DAVIS Y HOLCOMB, 2008)

	Diámetro mayor (Rango y media)	Diámetro menor (Media)	Área citoplasma
<b>Eritrocitos sin inclusiones</b>	13.8-19.2 (16.3)	8.4	111.3
<b>Eritrocitos con inclusiones</b>	14.8-19 (17.0)	7.6	106.3

Las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$ , excepto el área, en  $\mu\text{m}^2$

### -Características tintoriales y morfología

Los eritrocitos de los juveniles de *Pseudemys rubriventris* se describen como células elípticas, con un núcleo basófilo central y un citoplasma con coloración de gris claro a rosado (INNIS ET AL., 2007). En *Chrysemys picta picta* una media del 17.5% de los eritrocitos muestra cuerpos de inclusión con coloración de azul claro a azul oscuro y una forma redondeada. Siempre se visualizan de manera individual, frecuentemente cerca del núcleo, pero sin desplazar a éste de su posición central y sin estar asociados a vacuolas o estructuras cristalinas. Su tamaño varía entre 0.6 y 1.3  $\mu\text{m}$ , con una media de 0.89  $\mu\text{m}$  (DAVIS Y HOLCOMB, 2008). Por el contrario, menos de un 1% de los eritrocitos de *Ocacia sinensis* presentan cuerpos de inclusión basófilos asociados a una vacuola y con remanentes de membrana, considerándose orgánulos degenerados, posiblemente mitocondrias. Estas células se describen con forma oval, con un núcleo oval o irregularmente redondeado, conteniendo cromatina densa y oscura (CHUNG ET AL., 2009). Más de un 50% de los eritrocitos de *Hieremys annandalii* presentan cuerpos intracitoplasmáticos puntiformes y basófilos, y algunas células también muestran estructuras en forma de gota protruyendo la membrana celular. Los eritrocitos maduros de esta especie son generalmente ovalados, con núcleo redondo, aunque se aprecia un nivel moderado de anisocitosis y poiquilocitosis. En ocasiones se detectan eritrocitos inmaduros, de morfología redondeada y un núcleo 2-3 veces mayor que el de las células maduras (CHANSUE ET AL., 2011).

El uso de la tinción de Wright muestra a los eritrocitos de *Trachemys callirostris* como células ovaladas con núcleo redondo de posición central y basófilo (coloración azul). El citoplasma aparece grisáceo traslúcido (CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014).

Los eritrocitos maduros de la tortuga de charca siciliana (*Emys trinacris*) son bastante homogéneos en cuanto a su morfología y tinción. Usando la técnica de May-Grünwald Giemsa muestran una forma elíptica y un abundante citoplasma de color rosa pálido. El núcleo, de posición central, violeta-azulado y oval o redondeado, presenta cromatina condensada profundamente basófila y su eje mayor es paralelo al de la célula. Algunos eritrocitos presentan también pequeñas inclusiones citoplasmáticas e incluso vacuolas (ARIZZA *ET AL.*, 2014).

#### **-Técnicas citoquímicas**

Los eritrocitos de *Ocadia sinensis* no reaccionan positivamente a ninguna técnica citoquímica (CHUNG *ET AL.*, 2009), como sucede en muchas otras especies de quelonios (WORK *ET AL.*, 1998; CASAL Y ORÓS, 2007). Sin embargo, en los eritrocitos de *Hieremys annandalii* se describe una fuerte reacción positiva para la peroxidasa, y en las preparaciones incubadas con el nuevo azul de metileno aparece tinción puntiforme en todos los estadios de desarrollo eritrocitario (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

#### **-Ultraestructura del eritrocito**

Ultraestructuralmente los eritrocitos de *Ocadia sinensis* presentan forma elipsoidal y apariencia de cúpula en el área nuclear (CHUNG *ET AL.*, 2009). Los eritrocitos de *Hieremys annandalii* son muy similares a los de *Ocadia sinensis*. Las células maduras presentan varios orificios en la membrana citoplasmática. Los eritrocitos inmaduros son más pequeños y con una superficie más irregular que los maduros. Mediante microscopía electrónica de transmisión los eritrocitos de esta especie muestran una electrodensidad uniforme. Se describen algunos focos electrodensos tipo inclusión y algunas mitocondrias. El citoplasma de algunas células aparece lleno de hemoglobina cristalizada (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

#### **-La hemoglobina en emídidos**

En estudios realizados en tortugas de Florida (*Trachemys scripta*) se ha constatado una considerable variación de la afinidad del oxígeno entre eritrocitos individuales, asociado a la presencia de dos tipos funcionales de molécula de hemoglobina en estas células. Estos dos tipos de hemoglobina no estarían separados en grupos celulares diferentes, sino que estarían presentes en todos los eritrocitos circulantes (FRISCHE *ET AL.*, 2001).

## 2.3.2.- Los Leucocitos Granulocíticos en Emídidos

### 2.3.2.1.- El Neutrófilo de los Emídidos

Ninguno de los autores o artículos referenciados en esta revisión bibliográfica ha descrito neutrófilos en especies de quelonios emídidos.

### 2.3.2.2.- El Heterófilo de los Emídidos

#### -Dimensiones celulares

Los heterófilos de los juveniles de *Pseudemys rubriventris* presentan un tamaño aproximado de 13  $\mu\text{m}$  de diámetro (INNIS ET AL., 2007). El tamaño de los heterófilos de *Hieremys annandalii* es muy similar ( $13.66 \pm 1.73 \mu\text{m}$  de diámetro), siendo el segundo leucocito en tamaño después del azurófilo (CHANSUE ET AL., 2011). Los heterófilos de *Ocadia sinensis* representan los leucocitos de mayor tamaño descritos para esta especie, mostrando un diámetro en el microscopio óptico de  $16.8 \pm 2.6 \mu\text{m}$ , aunque mediante la microscopía electrónica se describen con un tamaño de 5.1-6.6  $\mu\text{m}$  (CHUNG ET AL., 2009).

Los tamaños celulares de los heterófilos de *Trachemys callirostris* se describen en la Tabla 2.24. En esta especie este tipo celular se corresponde con el leucocito de mayor tamaño (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

**2.24.** Áreas citoplasmáticas y nucleares de los heterófilos de hicoetas (*Trachemys callirostris*) (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014)

	Área total	Área núcleo	Área citoplasma
<b>Heterófilo</b>	224.0 $\pm$ 1.2	52.3 $\pm$ 1.3	171.3 $\pm$ 2.0

Las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}^2$

En *Emys trinacris* no se observaron diferencias significativas entre el tamaño de los heterofilos de las tortugas macho ( $13.9 \pm 6.71 \mu\text{m}$ ) y las hembras ( $13.3 \pm 1.27 \mu\text{m}$ ), y también esta célula representó el leucocito de mayor tamaño para esta especie (ARIZZA ET AL., 2014).

#### -Características tintoriales y morfología

Bajo el microscopio óptico los heterófilos de *Pseudemys rubriventris* muestran un núcleo excéntrico, de circular a ligeramente irregular, con un ratio núcleo/citoplasma relativamente bajo. El citoplasma aparece lleno de numerosos gránulos fusiformes con coloración rosada o naranja (INNIS ET AL., 2007).

La morfología irregular de los heterófilos de *Ocadia sinensis* es muy similar a la mostrada por los eosinófilos de esta especie. El abundante citoplasma contiene numerosos gránulos eosinofílicos alargados (CHUNG ET AL., 2009).

En el galápagos de Orbigny (*Chrysemys dorbignii*) los heterófilos fueron



nombrados inicialmente como “eosinófilos tipo II” debido a la eosinofilia exhibida por sus gránulos citoplasmáticos en respuesta a tinciones tipo Romanowsky. Estos gránulos muestran una morfología alargada y fueron difíciles de distinguir. Estas células son polimórficas con un núcleo excéntrico (AZEVEDO Y LUNARDI, 2003).

Los heterófilos de *Hieremys annandalii* muestran una morfología irregular, conteniendo numerosos gránulos fusiformes, muy apretados entre sí, y un núcleo excéntrico. Mediante la tinción Wright-Giemsa los gránulos presentan una coloración roja oscura y una superficie dentada, mientras que con la tinción de Wright aparecen de un brillante color rojo-anaranjado. Sin embargo, cuando se tiñen con Diff-Quik, los gránulos no muestran coloración alguna (CHANSUE ET AL., 2011).

La morfología externa de los heterófilos de *Trachemys callirostris* es más homogénea, generalmente redondeada. El núcleo ocupa una posición excéntrica y aparece redondo o en ocasiones aplanado, con cromatina basófila de color morado opaco. Los gránulos citoplasmáticos son fusiformes y alargados con coloración acidófila (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

El núcleo de los heterófilos de *Emys trinacris*, al contrario que en el resto de los emídidos estudiados, aparece segmentado, con posición lateral, basófilo y con cromatina densa. El citoplasma, cuando no queda completamente enmascarado por los grandes gránulos eosinófilos de morfología fusiforme que contiene, muestra una coloración débilmente azulada o clara (ARIZZA ET AL., 2014).

### **-Técnicas citoquímicas**

Los heterófilos de *Chrysemys dorbignih* muestran actividad para la trimetafosfatasa en la mayoría de los gránulos citoplasmáticos, y también presentan actividad fosfatasa alcalina en la membrana de los gránulos alargados. En la membrana citoplasmática y algunos gránulos pequeños se detecta actividad esterasa no específica. También hay detección de proteínas básicas en gránulos citoplasmáticos y en el núcleo, y actividad peroxidasa en algunos gránulos citoplasmáticos cuando la reacción se incubaba en pH neutro. Sin embargo, si la incubación se realiza en pH alcalino, la actividad peroxidasa se ve claramente disminuída (AZEVEDO Y LUNARDI, 2003).

En *Ocadia sinensis* sólo se detecta positividad frente a la peroxidasa, mostrándose como una tinción débil en los gránulos citoplasmáticos, que son PAS negativos (CHUNG ET AL., 2009).

Los gránulos de los heterófilos de *Hieremys annandalii* también muestran positividad muy débil a la peroxidasa, mientras que el citoplasma es positivo para el Sudán negro B, la fosfatasa ácida y alcalina, la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa y PAS (CHANSUE ET AL., 2011).

### **-Ultraestructura del heterófilo**

Los heterófilos de *Chrysemys dorbignih* muestran un núcleo indentado con heterocromatina cerca de la envuelta nuclear. El citoplasma contiene mitocondrias pequeñas, escaso retículo endoplasmático y aparato de Golgi poco notable. Se describe también un fino granulado electrodensito compatible con depósitos de glucógeno. Los gránulos aparecen como una población heterogénea, con forma redonda-alargada o

acampanada y también se describen gránulos pequeños rodeados por una membrana que contiene material homogéneamente electrodensos (AZEVEDO Y LUNARDI, 2003).

La microscopía electrónica de barrido revela un contorno celular irregular, rugoso y con proyecciones en forma de cresta en los heterófilos de *Ocadia sinensis* (CHUNG ET AL., 2009).

Mediante la microscopía electrónica de barrido los gránulos de los heterófilos de *Hieremys annandalii* se aprecian ovoides y protruyen contra la membrana celular. Con la microscopía electrónica de transmisión los gránulos aparecen grandes y pleomórficos, en su mayoría fusiformes, con áreas de electrodensidad variable. Los gránulos heterofílicos presentan un núcleo central de matriz heterogénea electrodensa. Los ribosomas son escasos y el citoplasma no está vacuolizado. El núcleo es pleomórfico y rico en eucromatina (CHANSUE ET AL., 2011).

### 2.3.2.3.- El Eosinófilo de los Emídidos

#### -Dimensiones celulares

En *Pseudemys rubriventris* sólo se observa un tipo celular de eosinófilo, y su tamaño oscila entre 14-18  $\mu\text{m}$ , siendo el leucocito de mayor tamaño en este emídido (INNIS ET AL., 2007). Por el contrario, los eosinófilos de *Hieremys annandalii* representan el granulocito más pequeño de esta especie, con un diámetro de  $10.61 \pm 1.22 \mu\text{m}$  (CHANSUE ET AL., 2011). Los eosinófilos de *Ocadia sinensis* son el segundo leucocito en tamaño, después del heterófilo, con un diámetro en microscopía óptica de  $15.1 \pm 2.4 \mu\text{m}$  y de 4.3-4.9  $\mu\text{m}$  en microscopía electrónica (CHUNG ET AL., 2009).

Los tamaños celulares de los eosinófilos de *Trachemys callirostris* se describen en la Tabla 2.25. En esta especie, este leucocito sólo es superado en tamaño por el heterófilo (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

**Tabla 2.25.** Áreas citoplasmáticas y nucleares de los eosinófilos de hicoteas (*Trachemys callirostris*) (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014)

	Área total	Área núcleo	Área citoplasma
<b>Eosinófilo</b>	198.0 $\pm$ 5.0	43.0 $\pm$ 2.3	154.5 $\pm$ 5.6

Las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}^2$

El tamaño de los eosinófilos de *Emys trinacris* es de  $13.5 \pm 5.67 \mu\text{m}$  en machos y de  $12.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$  en hembras, siguiendo en dimensiones al heterófilo (ARIZZA ET AL., 2014).

#### -Características tintoriales y morfología

Los eosinófilos de *Pseudemys rubriventris* se caracterizan por poseer un núcleo bilobulado o irregular de posición excéntrica y basófilo. El ratio núcleo/citoplasma es

relativamente bajo. Los abundantes gránulos citoplasmáticos se muestran circulares y de color rosado o anaranjado (INNIS *ET AL.*, 2007).

En *Ocadia sinensis* el núcleo se observa simple, redondo o con forma irregular y localización central. Con las tinciones de Wright y Giemsa estas células muestran numerosos gránulos redondos eosinófilos (CHUNG *ET AL.*, 2009).

Los eosinófilos de *Chrysemys dorbignii* se muestran como células redondeadas de núcleo excéntrico, con un citoplasma lleno de gránulos redondos y de gran tamaño, que se tiñen eosinófilos en respuesta a tinciones tipo Romanowsky (AZEVEDO Y LUNARDI, 2003).

Los granulocitos eosinófilos de *Hieremys annandalii* son típicamente redondos, con un núcleo excéntrico y un citoplasma lleno de gránulos esféricos. Empleando las tinciones de Wright-Giemsa y Wright estos gránulos se tiñen de color púrpura, mientras que con el Diff-Quick aparecen rojo-anaranjados (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

Los eosinófilos de *Trachemys callirostris* son células redondeadas, con núcleo redondo de posición central o periférica y coloración morada. Los gránulos citoplasmáticos se muestran circulares y rosados (CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014).

Los eosinófilos de *Emys trinacris* son fácilmente reconocibles por sus gránulos citoplasmáticos redondos y eosinofílicos. El núcleo presenta gruesa cromatina agrupada, y se tiñe intensamente azul. Su morfología es de redonda a oval, simple o bilobulado, con localización lateral, cerca de la membrana celular (ARIZZA *ET AL.*, 2014).

#### **-Técnicas citoquímicas**

Los gránulos de los eosinófilos de *Chrysemys dorbignii*, al contrario de lo que sucede en el heterófilo, no presentan actividad trimetafosfatasa ni fosfatasa alcalina. Se observa actividad esterasa no específica en la membrana celular. Las proteínas básicas se detectan tanto en los gránulos como en el núcleo celular, al igual que lo observado en heterófilos. La actividad peroxidasa de los eosinófilos aparece muy susceptible al peróxido de hidrógeno, llevando a la destrucción parcial de los gránulos. Sin embargo, los gránulos intactos muestran actividad peroxidasa tanto en pH neutro como alcalino (AZEVEDO Y LUNARDI, 2003).

En *Ocadia sinensis* se describe una respuesta citoquímica similar a los heterófilos, mostrando positividad a la peroxidasa, pero no al PAS (CHUNG *ET AL.*, 2009).

Los eosinófilos de *Hieremys annandalii* reaccionan positivamente a todas las técnicas citoquímicas estudiadas salvo al azul de toluidina, es decir, muestran positividad para la peroxidasa, el Sudán negro B, las fosfatasas ácida y alcalina, la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa, el PAS y el nuevo azul de metileno (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

#### **-Ultraestructura del eosinófilo**

Los eosinófilos de *Chrysemys dorbignii* muestran un núcleo dentado con heterocromatina cerca de la envoltura nuclear. El citoplasma presenta algunas mitocondrias, grandes cantidades de retículo endoplasmático rugoso y un bien desarrollado complejo de Golgi. Los gránulos citoplasmáticos aparecen grandes y esféricos rodeados

por una membrana que contiene material homogéneamente electrodenso. También se observan algunos gránulos más pequeños (AZEVEDO Y LUNARDI, 2003).

Mediante la microscopía electrónica de barrido los eosinófilos de *Ocadia sinensis* muestran una superficie irregular, con proyecciones en forma de cresta, pero una morfología general redonda u ovalada (CHUNG ET AL., 2009).

Mediante microscopía electrónica de barrido los eosinófilos de *Hieremys annandalii* se muestran con forma de mórula debido a la protrusión de los gránulos contra el citoplasma. La microscopía electrónica de transmisión revela una superficie celular cubierta por microvellosidades. Los abundantes gránulos aparecen grandes, redondos y con electrodensidad homogénea. La densidad de estos gránulos es superior a la de los heterófilos. En el citoplasma se observan escasos ribosomas pequeños y mitocondrias, pero no vacuolas. El núcleo presenta principalmente heterocromatina (CHANSUE ET AL., 2011).

#### 2.3.2.4.- El Basófilo de los Emídidos

##### -Dimensiones celulares

Los basófilos de *Pseudemys rubriventris* muestran un tamaño de 12-15  $\mu\text{m}$  de diámetro, similar al descrito para los heterófilos, pero inferior al de los eosinófilos (INNIS ET AL., 2007). En el caso de *Hieremys annandalii* el basófilo es el segundo granulocito en tamaño después del heterófilo, con un diámetro de  $12.87 \pm 6.2 \mu\text{m}$  (CHANSUE ET AL., 2011). Los basófilos de *Ocadia sinensis* representan el tercer granulocito en cuanto a dimensiones, con un diámetro en microscopía óptica de  $13.4 \pm 2.1 \mu\text{m}$  y de 3.1-4.7  $\mu\text{m}$  en microscopía electrónica de barrido (CHUNG ET AL., 2009). En *Trachemys callirostris* el basófilo también representa el tercer granulocito en tamaño, con un área total de  $86 \pm 3.6 \mu\text{m}^2$ , sólo superando en dimensiones al linfocito y al trombocito (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014). El basófilo de *Emys trinacris* se describe como una célula pequeña, de unos 9.49  $\mu\text{m}$  de diámetro, sin diferencias de tamaño significativas entre machos y hembras. Muestra un gran núcleo en proporción a su tamaño celular, midiendo  $7.09 \pm 0.25 \mu\text{m}$  (ARIZZA ET AL., 2014).

##### -Características tintoriales y morfología

Los basófilos de *Pseudemys rubriventris* se caracterizan por un núcleo central o ligeramente excéntrico, de coloración azul pálida, que frecuentemente aparece disimulado por la presencia de numerosos gránulos citoplasmáticos fuertemente basófilos. Mediante el uso de Diff-Quik® el citoplasma suele aparecer vacuolizado o apollado debido a la degranulación de sus gránulos hidrosolubles bajo condiciones de fijación inadecuadas. Los gránulos se preservan y distinguen mejor en preparaciones bien fijadas y teñidas con Wright-Leishman (INNIS ET AL., 2007).

Los basófilos de *Ocadia sinensis* se identifican fácilmente en los frotis teñidos con Wright y Giemsa por la presencia de numerosos gránulos citoplasmáticos redondos y basófilos. El núcleo ocupa una posición central (CHUNG ET AL., 2009).

Los basófilos de *Hieremys annandalii* muestran una morfología variable, al igual que el número y tamaño de sus gránulos citoplasmáticos. Usando la tinción Wright-Giemsa

el núcleo aparece rojo-violeta, pero los gránulos no se tiñen, aunque frecuentemente ocultan el núcleo. Con la tinción de Wright los gránulos se observan de color azul oscuro o negro-violeta, pero el núcleo no adquiere coloración. Ni los gránulos ni el núcleo se tiñen en respuesta al Diff-Quick (CHANSUE ET AL., 2011).

De forma muy similar a lo descrito en el resto de los emídidos estudiados, los basófilos de *Emys trinacris* muestran un núcleo redondo de localización central. Los abundantes gránulos citoplasmáticos aparecen con una coloración violeta muy oscura (ARIZZA ET AL., 2014).

#### **-Técnicas citoquímicas**

Los basófilos de *Ocadia sinensis* reaccionan fuertemente frente a la peroxidasa, pero no muestran positividad en respuesta al PAS (CHUNG ET AL., 2009).

En los basófilos de *Hieremys annandalii* se detecta positividad citoplasmática para la peroxidasa y el PAS, y tinción positiva de los gránulos para el nuevo azul de metileno. El azul de toluidina, sin embargo, no genera respuesta tintorial en esta especie (CHANSUE ET AL., 2011).

#### **-Ultraestructura del basófilo**

El uso de la microscopía electrónica de barrido en los basófilos de *Ocadia sinensis* pone de manifiesto una superficie celular suave, con protuberancias ligeramente redondeadas (CHUNG ET AL., 2009).

Con la misma técnica, los basófilos de *Hieremys annandalii* muestran características especiales que los diferencian de las otras células. Su superficie muestra numerosas microvellosidades, y los gránulos de diferentes tamaños generan protrusiones en la membrana citoplasmática. La microscopía electrónica de transmisión permite observar que los basófilos tienen vacuolas de gran tamaño conteniendo en algunos casos gránulos densos en su interior. El abundante citoplasma presenta gránulos finamente lamelares y electrodensos y numerosas mitocondrias. El núcleo presenta principalmente heterocromatina (CHANSUE ET AL., 2011).

### 2.3.3.- Los Leucocitos Mononucleares en Emídidos

#### 2.3.3.1.- El Linfocito de los Emídidos

Aunque la función principal de los linfocitos B es la de producir varios tipos de inmunoglobulinas y la de los linfocitos T consiste en participar en la moderación de la respuesta inmune (CAMPBELL, 1996; RASKIN, 2000; CAMPBELL, 2004A), algunos estudios recientes en *Trachemys scripta* han puesto de manifiesto que las células B tienen la capacidad de ingerir partículas extrañas *in vitro*. Esto sugiere que los linfocitos B de reptiles pueden actuar de forma complementaria como células fagocíticas (ZIMMERMAN *ET AL.*, 2010).

#### -Dimensiones celulares

Los linfocitos de *Pseudemys rubriventris* representan el leucocito de menor tamaño en esta especie con un diámetro aproximado de 8-10  $\mu\text{m}$  (INNIS *ET AL.*, 2007). Algo similar sucede en *Hieremys annandalii*, especie en la que el linfocito aparece como la célula sanguínea de menor tamaño, con  $6.41 \pm 0.61 \mu\text{m}$  (CHANSUE *ET AL.*, 2011). También el linfocito de *Ocadia sinensis* es el leucocito más pequeño de esta especie, aunque su tamaño en microscopía óptica ( $11.2 \pm 2.3 \mu\text{m}$  de diámetro) es bastante superior al observado en *Hieremys annandalii*. Mediante microscopía electrónica de barrido el diámetro del linfocito mide 3.2-3.6  $\mu\text{m}$  (CHUNG *ET AL.*, 2009).

Los tamaños celulares de los linfocitos de *Trachemys callirostris* se describen en la Tabla 2.26. En esta especie este leucocito aparece como la célula sanguínea de menor tamaño (CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014).

**Tabla 2.26.** Áreas citoplasmáticas y nucleares de los linfocitos de hicoetas (*Trachemys callirostris*) (CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014)

	Área total	Área núcleo	Área citoplasma
<b>Linfocito</b>	75.0 $\pm$ 2.0	52.0 $\pm$ 2.0	23.71 $\pm$ 2.0

Las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}^2$

Los linfocitos de *Emys trinacris* son la célula sanguínea más pequeña de este emídido. El diámetro celular en los machos es de  $6.7 \pm 2.12 \mu\text{m}$  y en las hembras es  $6.5 \pm 1.26 \mu\text{m}$  (ARIZZA *ET AL.*, 2014).

#### -Características tintoriales y morfología

Los linfocitos de *Pseudemys rubriventris* se caracterizan por un ratio núcleo/citoplasma relativamente elevado, siendo el núcleo central, circular y basófilo, y el citoplasma escaso y de coloración débilmente azulada (INNIS *ET AL.*, 2007).

En *Ocadia sinensis* también se observa un ratio núcleo/citoplasma elevado. El escaso citoplasma aparece basófilo y el núcleo presenta frecuentemente cromatina agrupada. Los linfocitos se diferencian de los trombocitos en esta especie por sus bordes citoplasmáticos rugosos y por su núcleo más grande y de tinción más clara (CHUNG *ET AL.*, 2009).

Los linfocitos de *Hieremys annandalii* aparecen como células redondeadas con un ratio núcleo/citoplasma alto. El núcleo se presenta excéntrico y portador de cromatina condensada. Las características tintoriales son similares independientemente de la técnica de tinción empleada. El citoplasma se observa basófilo, con un área más clara alrededor del núcleo. La mayoría de los linfocitos son agranulares, pero algunas células poseen unos pocos gránulos pequeños de coloración roja (CHANSUE ET AL., 2011).

Los linfocitos de *Trachemys callirostris* también presentan una morfología generalmente redondeada. El núcleo es grande, ocupando aproximadamente un 70% del tamaño celular, y contiene cromatina condensada y una coloración morada. El escaso citoplasma aparece basófilo-grisáceo (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

En *Emys trinacris* ARIZZA ET AL. (2014) no tuvieron problemas para distinguir los linfocitos de los trombocitos, ya que morfológicamente ambos tipos celulares resultaron muy diferentes. Los linfocitos son células redondas con un ratio núcleo/citoplasma elevado. El escaso citoplasma se tiñe de color azul y el núcleo es redondo con un fino patrón reticular.

#### **-Técnicas citoquímicas**

Los linfocitos de *Ocadia sinensis* no se tiñeron con ninguna de las dos técnicas citoquímicas empleadas para la caracterización celular en esta especie (CHUNG ET AL., 2009).

Por el contrario, en *Hieremys annandalii* los linfocitos muestran positividad para la fosfatasa ácida, la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa y el PAS, pero sólo a nivel de los gránulos citoplasmáticos (CHANSUE ET AL., 2011).

#### **-Ultraestructura del linfocito**

La microscopía electrónica de barrido muestra al linfocito de *Ocadia sinensis* como una célula de morfología redonda o irregular, con una superficie también irregular, caracterizada por proyecciones en forma de cresta (CHUNG ET AL., 2009).

De igual manera, con el uso de la microscopía electrónica de superficie, el linfocito de *Hieremys annandalii* aparece con una forma redonda y una superficie irregular, con proyecciones citoplasmáticas y microvellosidades. La microscopía electrónica de transmisión muestra un citoplasma rico en pseudópodos, grandes mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso y ribosomas libres. El núcleo aparece redondo o dentado, conteniendo heterocromatina (CHANSUE ET AL., 2011).

### **2.3.3.2.- El Monocito de los Emídidos**

#### **-Dimensiones celulares**

El tamaño de los monocitos de *Pseudemys rubriventris* es muy similar al de los heterófilos, con 13  $\mu\text{m}$  de diámetro (INNIS ET AL., 2007). El monocito de *Ocadia sinensis* tiene un tamaño en microscopía óptica de  $12.5 \pm 1.6 \mu\text{m}$ , inferior al de los granulocitos

pero superior al de los linfocitos, mientras que con la microscopía electrónica de barrido se observa un tamaño de 4.7-5.4  $\mu\text{m}$  (CHUNG ET AL., 2009).

Los tamaños celulares de los monocitos de *Trachemys callirostris* se describen en la Tabla 2.27. En esta especie el monocito muestra un menor tamaño que el heterófilo y el eosinófilo, pero es mayor que el linfocito y el basófilo (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

**Tabla 2.27.** Áreas citoplasmáticas y nucleares de los monocitos de hicotetas (*Trachemys callirostris*) (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014)

	Área total	Área núcleo	Área citoplasma
<b>Monocito</b>	170.0 $\pm$ 2.2	103.0 $\pm$ 3.0	67.10 $\pm$ 3.5

Las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}^2$

En *Emys trinacris* y *Trachemys callirostris* el monocito es superado en tamaño por el heterófilo y el eosinófilo. No se aprecian diferencias significativas entre las medidas celulares de machos y hembras. Así, en los machos el diámetro celular es de  $11.3 \pm 4.81 \mu\text{m}$  y en las hembras,  $11.7 \pm 1.75 \mu\text{m}$  (ARIZZA ET AL., 2014).

#### **-Características tintoriales y morfología**

CHANSUE ET AL. (2011) no describen monocitos en la sangre de *Hieremys annandalii*. En su lugar identificaron azurófilos, algo que no se ha observado en ninguno de los otros emídidos en estudio.

Los monocitos de *Pseudemys rubriventris* presentan una forma de circular a irregular, con un núcleo grande, basófilo, bilobulado o irregular. El citoplasma aparece débilmente basófilo y en ocasiones contiene vacuolas claras (INNIS ET AL., 2007).

El citoplasma de los monocitos de *Ocadia sinensis* se tiñe basófilo y su núcleo muestra morfología en forma de “U”. La presencia de una o más vacuolas citoplasmáticas es un hallazgo habitual pero no se detectan gránulos azurófilos (CHUNG ET AL., 2009).

Los monocitos de *Trachemys callirostris* son células redondas, sin granulación citoplasmática. El citoplasma es débilmente basófilo, con una tonalidad azul-grisácea. El núcleo es grande, con forma de media luna o redondeado y ocupa gran parte de la célula. Su coloración es basófila de mayor intensidad que la del citoplasma (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

Los monocitos de *Emys trinacris* presentan una gran cantidad de citoplasma de color débilmente gris-azulado, finamente granular o vacuolizado. El núcleo es ovalado o arriñonado, con un patrón de cromatina denso cerca de la membrana nuclear (ARIZZA ET AL., 2014).



### **-Técnicas citoquímicas**

Los monocitos de *Ocadia sinensis* sólo muestran ser débilmente positivos para el PAS y no en todos los casos, y no son positivos a la técnica de la peroxidasa (CHUNG ET AL., 2009).

### **-Ultraestructura del monocito**

La microscopía electrónica de barrido muestra al monocito de *Ocadia sinensis* como una célula de bordes muy rugosos y proyecciones irregulares en forma de cresta, además de estructuras del citoesqueleto en la superficie (CHUNG ET AL., 2009).

### **2.3.3.3.- El Azurófilo de los Emídidos**

*Hieremys annandalii* es la única especie de emídido en la que existe un estudio completo de la morfología de sus células sanguíneas, y en la que se describen azurófilos en lugar de monocitos (CHANSUE ET AL., 2011).

### **-Dimensiones, morfología celular, técnicas citoquímicas y ultraestructura**

Los azurófilos de *Hieremys annandalii* son los leucocitos menos frecuentemente observados y los de mayor tamaño en esta especie. Su forma y tamaño son variables, presentando un diámetro medio de  $14.32 \pm 2.19 \mu\text{m}$ . El citoplasma aparece azurófilo (gris-púrpura) con la tinción de Wright-Giemsa, pero se tiñe azul oscuro con las técnicas de Wright y Diff-Quik. El núcleo se observa pleomórfico y el citoplasma espumoso. Los gránulos citoplasmáticos característicos del azurófilo no se pueden delimitar claramente mediante la microscopía óptica.

Esta célula sólo reacciona positivamente para la técnica citoquímica de la fosfatasa ácida y dicha reacción se localiza exclusivamente en los gránulos citoplasmáticos.

Mediante la microscopía electrónica de barrido el azurófilo presenta numerosas burbujas en la membrana que dificultan la visualización de la superficie celular. La microscopía electrónica de transmisión evidencia la presencia de numerosos gránulos azurofílicos de  $0.3\text{-}0.4 \mu\text{m}$  de diámetro. El citoplasma presenta escasa cantidad de retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y lisosomas. Algunas células son portadoras de grandes vacuolas y emiten pseudópodos de diferentes tamaños. El núcleo es grande con heterocromatina periférica (CHANSUE ET AL., 2011).

### **2.3.4.- El Trombocito de los Emídidos**

#### **-Dimensiones celulares**

Los trombocitos de *Pseudemys rubriventris* presentan un diámetro mayor de  $16 \mu\text{m}$  y un diámetro menor de  $6 \mu\text{m}$  (INNIS ET AL., 2007). Los trombocitos de *Ocadia sinensis* tienen un diámetro de  $9.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$  en microscopía óptica y de  $3.1\text{-}5.6 \mu\text{m}$  con microscopía electrónica de barrido (CHUNG ET AL., 2009).

CHANSUE ET AL. (2011) no establecen un tamaño estándar para los trombocitos de *Hieremys annandalii* pero los describen con un tamaño inferior o similar al de los linfocitos.

Los tamaños celulares de los trombocitos de *Trachemys callirostris* se describen en la Tabla 2.28 (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

**Tabla 2.28.** Áreas citoplasmáticas y nucleares de los trombocitos de hicoetas (*Trachemys callirostris*) (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014)

	Área total	Área núcleo	Área citoplasma	Diámetro mayor	Diámetro menor
<b>Trombocito</b>	77.0±3.0	44.0±1.6	33.3±3.0	14.07±0.9	6.9±0.4

Las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$ , excepto el área, en  $\mu\text{m}^2$

El tamaño celular de los trombocitos de *Emys trinacris* es de  $25.0 \pm 1.23 \times 5.0 \pm 0.89 \mu\text{m}$  en los machos y  $22.9 \pm 0.63 \times 4.8 \pm 0.54 \mu\text{m}$  en las hembras, mientras que el núcleo para ambos sexos muestra un tamaño aproximado de  $12.9 \pm 1.3 \times 4.11 \pm 0.74 \mu\text{m}$  (ARIZZA ET AL., 2014).

### -Características tintoriales y morfología

Los trombocitos de *Pseudemys rubriventris* aparecen como células elípticas, con un núcleo ovoide y basófilo central, y un citoplasma ligeramente basófilo. Suelen observarse en pequeñas agrupaciones (INNIS ET AL., 2007).

El citoplasma de los trombocitos de *Ocadia sinensis* se tiñe ligeramente basófilo. Estas células aparecen frecuentemente agrupadas en el borde de la preparación, y bajo el microscopio óptico pueden ser difíciles de diferenciar de los linfocitos (CHUNG ET AL., 2009).

En *Hieremys annandalii* se describen tres tipos morfológicos de trombocito: esférico, ovoide y fusiforme. Con la tinción de Wright-Giemsa el citoplasma del trombocito se tiñe de color violeta, pero más transparente que el de los linfocitos. Algunos trombocitos presentan vacuolización citoplasmática y se tiñen violeta oscuro (CHANSUE ET AL., 2011).

La forma de los trombocitos de *Trachemys callirostris* es alargada, con un núcleo elíptico y central. El citoplasma suele observarse exclusivamente en la parte proximal y distal de la célula y se muestra traslúcido. El núcleo contiene cromatina condensada y se tiñe de color morado (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

El trombocito de *Emys trinacris* muestra una morfología alargada, con un núcleo central, elíptico y densamente teñido. El citoplasma no presenta gránulos y tiene una apariencia hialina (ARIZZA ET AL., 2014).

### -Técnicas citoquímicas

En los trombocitos de la tortuga de Reeves (*Geochlemys reevesii*) se detecta actividad peroxidasa en la envuelta nuclear y en el retículo endoplasmático rugoso, pero no

en el aparato de Golgi o en los gránulos citoplasmáticos. La actividad fosfatasa ácida se localiza en las inclusiones citoplasmáticas grandes, pero no en los gránulos pequeños. Dicha actividad se ve inhibida con el uso del fluoruro sódico (DAIMON *ET AL.*, 1987).

El citoplasma de los trombocitos de *Ocadia sinensis* se tiñe positivamente con PAS, lo que los diferencia de los linfocitos, que son negativos para esta técnica. Sin embargo, no se obtuvo respuesta para la peroxidasa (CHUNG *ET AL.*, 2009).

Los trombocitos de *Hieremys annandalii* sólo muestran positividad a nivel de sus gránulos citoplasmáticos para el Sudán negro B y el PAS (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

#### **-Ultraestructura del trombocito**

Los trombocitos de *Geochlemys reevesii* muestran una morfología oval o fusiforme, con un gran núcleo multilobulado. A mayores aumentos, en los extremos celulares se detecta un haz marginal de microtúbulos. Aparecen grandes vesículas electrolúcidas y canalículos a lo largo de todo el citoplasma. Los orgánulos citoplasmáticos son escasos, observándose algunas mitocondrias, pequeñas cantidades de retículo endoplasmático rugoso, un pequeño aparato de Golgi y escasos ribosomas libres. También pueden observarse en el citoplasma una o dos inclusiones grandes, de unos 0.5-1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Dichas inclusiones contienen estructuras electro-opacas en su periferia que recuerdan a cuerpos de mielina. También pueden observarse varios gránulos pequeños electrolúcidos de unos 250 nm en el citoplasma. Mediante el método del rutenio rojo se constata que las vesículas y canalículos citoplasmáticos están ramificados y relacionados entre sí y que pueden extenderse hasta el plasmalema, lo cual podría significar que esas estructuras constituyen un sistema conectado de superficie (DAIMON *ET AL.*, 1987).

Con la microscopía electrónica de barrido los trombocitos de *Ocadia sinensis* presentan una morfología irregular y proyecciones citoplasmáticas redondas o en forma de cresta (CHUNG *ET AL.*, 2009).

Mediante microscopía electrónica de barrido los trombocitos de *Hieremys annandalii* se observan como células frecuentemente alargadas con numerosos pseudópodos. Los trombocitos que aparecen con morfología redonda se asocian a la presencia de fibrina con mayor asiduidad que las otras formas celulares. Mediante microscopía electrónica de transmisión se aprecia la cromatina nuclear densamente condensada. En el citoplasma aparecen numerosas vacuolas, mitocondrias, pequeños gránulos y una banda marginal de microtúbulos (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

## 2.4.- VALORES HEMATOLÓGICOS DE LOS REPTILES

### 2.4.1.- El Hematocrito de los Reptiles

El hematocrito se define como la proporción de células existentes en un volumen de sangre. Se emplea para estudiar el porcentaje de eritrocitos circulantes en sangre periférica (LASSEN Y WEISER, 2004), y se considera un buen indicador del estado de salud general del individuo (HERBST Y JACOBSON, 1997).

En la mayoría de los reptiles el rango normal de hematocrito está comprendido entre el 20% y el 40% (WALLACH Y BOEVER, 1983; MARKS Y CITINO, 1990; FRYE, 1991), considerándose aquellos niveles de hematocrito inferiores al 20% como un signo de anemia, mientras que los superiores al 40% pueden indicar la presencia de hemoconcentración y/o policitemia (CAMPBELL, 2004A).

La policitemia puede ser relativa o absoluta;

- La **policitemia relativa** se define como el incremento del nivel de hematocrito asociado a un número de eritrocitos normal. Suele estar causada por una disminución de la volemia, es decir, una disminución del contenido líquido de la sangre (deshidratación).
- La **policitemia absoluta** se produce por un incremento total de la masa (número) de eritrocitos. En función de su fisiopatología, la policitemia absoluta se clasifica como primaria o secundaria. La secundaria a su vez, se divide en adecuada o inadecuada;
  - **Policitemia absoluta primaria.** Los eritrocitos se producen de forma autónoma independientemente de la liberación de eritropoyetina (EPO).
  - **Policitemia absoluta secundaria (PASec).** La producción de eritrocitos es dependiente de la EPO.
    - PASec adecuada. Se produce en respuesta a una hipoxia persistente.
    - PASec inadecuada. Se produce por alteraciones que generan unos niveles séricos elevados de EPO sin que exista una hipoxia sistémica previa. Nefropatías causadas por neoplasias, amiloidosis, infecciones o inflamaciones pueden causar hipoxia local renal y desencadenar entonces la síntesis de EPO (ETTINGER, 2003).

En la mayoría de los casos la policitemia detectada en los pacientes es relativa, causada por un estado de deshidratación. Cuando la policitemia persiste una vez corregida la condición de deshidratación pasa a considerarse una policitemia absoluta, ya sea por un aumento de la producción de eritropoyetina o por una neoplasia de la serie roja (policitemia absoluta primaria), aunque estas condiciones no se han descrito en reptiles (WATSON, 1997).

Cuando existe una elevación o un nivel normal de hematocrito no se puede descartar la posibilidad de que haya una anemia enmascarada por un estado de deshidratación. En estas circunstancias la medición del nivel de proteínas totales puede ayudar a detectar los estados de deshidratación (ROSENTHAL, 2002).

**Tabla 2.29.** Medida del valor hematocrito en algunas especies de reptiles

ESPECIE	HEMATOCRITO (%)
<b>Orden Squamata. Suborden Sauria</b>	
Sauria <sup>1</sup>	16-35
<i>Anolis carolinensis</i> <sup>2</sup>	28
<i>Chamaeleo chamaeleon</i> <sup>3</sup>	24
<i>Corucia zebrata</i> <sup>4</sup>	24-60
<i>Heloderma suspectum</i> <sup>32</sup>	37 (22-50)
Iguanas <sup>5</sup>	30-45
<i>Iguana iguana</i> <sup>6</sup>	30
<i>Iguana iguana</i> <sup>7</sup>	25-38
<i>Iguana iguana</i> <sup>8</sup>	42.10
<i>Iguana iguana</i> <sup>9</sup>	45-52
<i>Iguana iguana</i> <sup>10</sup>	Alto: 35-40 Bajo: 20-24
<i>Iguana iguana</i> <sup>11</sup>	30
<i>Iguana iguana</i> <sup>12,13</sup>	34 (machos) 38 (hembras)
<i>Iguana iguana</i> <sup>14</sup>	24-37
<i>Pogona vitticeps</i> <sup>15</sup>	27
<i>Varanus sp.</i> <sup>16</sup>	27
<i>Varanus salvadorii</i> <sup>17</sup>	38.4
<i>Varanus salvator</i> <sup>33</sup>	31 (Macho); 33 (Hembra)
<b>Orden Squamata. Suborden Serpentes</b>	
Serpentes <sup>1</sup>	16-45
<i>Boa sp.</i> <sup>18</sup>	24-40
<i>Boa constrictor</i> <sup>19</sup>	29
<i>Boa constrictor</i> <sup>20</sup>	18.5
<i>Coluber constrictor</i> <sup>21</sup>	26
<i>Crotalus atrox</i> <sup>22</sup>	31.9
<i>Crotalus horridus</i> <sup>23</sup>	45
<i>Natrix natrix</i> <sup>24</sup>	37
<i>Natrix sipedon</i> <sup>22</sup>	35.5
<i>Phyton sp.</i> <sup>25</sup>	25-40
<i>Phyton sp.</i> <sup>18</sup>	25-40
<i>Phyton regius</i> <sup>26</sup>	10.5-28
<i>Thamnophis sirtalis</i> <sup>22</sup>	28
<b>Orden Crocodylia</b>	
<i>Alligator mississippiensis</i> <sup>27</sup>	20
<i>Alligator mississippiensis</i> <sup>28</sup>	12-38
<i>Caiman sp.</i> <sup>29</sup>	26
<i>Crocodylus niloticus</i> <sup>30</sup>	35
<i>Crocodylus niloticus</i> <sup>28</sup>	14-35
<i>Crocodylus porosus</i> <sup>31</sup>	17-41
<i>Osteolaemus tetraspis</i> <sup>28</sup>	12-33
<i>Paleosuchus palepebrosus</i> <sup>28</sup>	16-28

1: LAWTON, 1991

2: DESSAUER, UNPUBLISHED, 1952; HUTTON Y ORTMAN, 1957; MILLER Y WURSTER, 1956

3: CUADRADO ET AL., 2002

4: WRIGHT Y SKEBA, 1992

5: University of Miami, Avian and Wildlife Laboratory, 1996. In: Exotic companion medicine handbook for veterinarians, 2: 2

- 6: HERNANDEZ Y COULSON, 1951; THORSON, 1968
- 7: DIVERS *ET AL.*, 1996
- 8: HANLEY *ET AL.*, 2004
- 9: ANDERSON, 1992
- 10: ROSENTHAL, 2002
- 11: DIVERS *ET AL.*, 2005
- 12: HARR *ET AL.*, 2001; Datos de B. LOCK (iguanas machos) y datos de L. K. MAXWELL (iguanas hembras). Ambos autores: In: *Biology, Husbandry, and Medicine of the Green iguana*. E. R. Jacobson (ed.). Krieger Publishing Company, Florida. 2003: 101-102
- 13: HEARD *ET AL.*, 2004
- 14: FRYE, 1995; FRYE Y TOWNSEND, 1993
- 15: ELIMAN, 1997
- 16: DESSAUER, UNPUBLISHED, 1952; HAGGAG *ET AL.*, 1965, 1966; KHALIL Y ABDEL-MESSIEH, 1963; ZAIN-UL-ABEDIN Y QAZI, 1965
- 17: FONTENOT *ET AL.*, 2004
- 18: ROSSKOPF *ET AL.*, 1982
- 19: THORSON, 1968
- 20: FRYE, 1973
- 21: DESSAUER, UNPUBLISHED, 1952; HUTTON, 1958
- 22: WALLACH Y BOEVER, 1983
- 23: DEUTSCH Y MCSHAN, 1949
- 24: MUNDAY Y BLANE, 1961; SENIOW, 1963
- 25: DESSAUER, 1970
- 26: JOHNSON Y BENSON, 1996
- 27: ANDERSEN, 1961; AUSTIN *ET AL.*, 1927; COULSON Y HERNANDEZ, 1964; DILL Y EDWARDS, 1935; HOPPING, 1923; THORSON, 1968
- 28: LLOYD, 2003
- 29: DESSAUER, UNPUBLISHED, 1952; DILL Y EDWARDS, 1931A,B; THORSON, 1968
- 30: KHALIL Y ABDEL-MESSIEH, 1963
- 31: MILLAN *ET AL.*, 1997
- 32: COOPER-BAILEY *ET AL.*, 2011
- 33: SALAKIJ *ET AL.*, 2014

Nótese que en *Iguana iguana* las hembras, grávidas o no, mostraron una mayor concentración de hematocrito que los machos, siendo esta diferencia significativa. Ello puede estar relacionado con un incremento en la capacidad de transporte de oxígeno en las hembras de esta especie (HARR *ET AL.*, 2001).

## 2.4.2.- El Nivel de Hemoglobina de los Reptiles

El nivel de hemoglobina (Hb) se determina normalmente mediante el método de la cianometahemoglobina (SEIDEL, 2003).

La concentración de hemoglobina en muchas especies de reptiles varía entre los 6 y 12 g/dL, aunque con frecuencia son inferiores a 10g/dL (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2011).

En la Tabla 2.30 se exponen los niveles de hemoglobina descritos para varias especies de reptiles.

**Tabla 2.30.** Nivel de hemoglobina en algunas especies de reptiles

ESPECIE	Hb (g/dL)
<b>Orden Squamata</b>	
<b>Suborden Sauria</b>	
Sauria <sup>1</sup>	4.6-11.9
<i>Corucia zebrata</i> <sup>2</sup>	7.4-11.6
<i>Heloderma suspectum</i> <sup>10</sup>	7.4 (6.0-9.5)
<i>Iguana iguana</i> <sup>3</sup>	3.5-5.5
<i>Iguana iguana</i> <sup>4</sup>	8.6 (macho) 10.6 (hembra)
<i>Iguana iguana</i> <sup>5</sup>	9.1 (macho) 10.7 (hembra)
<i>Varanus salvator</i> <sup>11</sup>	10.6
<b>Suborden Serpentes</b>	
Serpentes <sup>1,6</sup>	5.2-12
<i>Phyton regius</i> <sup>7</sup>	3.41-8.79
<b>Orden Crocodilia</b>	
<i>Crocodylus niloticus</i> <sup>8</sup>	8-11
<i>Crocodylus porosus</i> <sup>9</sup>	4.7-12.2
<i>Osteolaemus tetraspis</i> <sup>8</sup>	5.3-11
<i>Paleosuchus palpebrosus</i> <sup>8</sup>	6.2-8.8
<i>Alligator mississippiensis</i> <sup>8</sup>	5.7-11.3

1: LAWTON, 1991

2: WRIGHT Y SKEBA, 1992

3: FRYE, 1995; FRYE Y TOWNSEND, 1993

4: HARR *ET AL.*, 2001

5: Datos de B. LOCK (iguanas machos) y datos de L. K. MAXWELL (iguanas hembras). Ambos autores: In: Biology, Husbandry, and Medicine of the Green iguana. E. R. Jacobson (ed.). Krieger Publishing Company, Florida. 2003: 101-102.

6: RAITI, 2002

7: JOHNSON Y BENSON, 1996

8: LLOYD, 2003

9: MILLAN *ET AL.*, 1997

10: COOPER-BAILEY *ET AL.*, 2011

11: SALAKIJ *ET AL.*, 2014

Nótese que en *Iguana iguana*, las hembras, grávidas o no, mostraron un nivel de hemoglobina significativamente mayor que los machos. Ello puede deberse a un incremento en la capacidad de transporte de oxígeno en las hembras de esta especie (HARR *ET AL.*, 2001).

### 2.4.3.- Índices Eritrocitarios de los Reptiles

Los índices eritrocitarios describen el tamaño medio y el contenido en hemoglobina de los eritrocitos. Pueden ser calculados por medio de contadores celulares automáticos o utilizando ecuaciones estándar. Las fórmulas empleadas en mamíferos para calcular el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) pueden ser utilizadas de igual forma en los reptiles (CAMPBELL, 1995).

**VCM:** Hematocrito x 10/Recuento glóbulos rojos ( $10^6$ )

**HCM:** Hemoglobina x 10/Recuento glóbulos rojos ( $10^6$ )

**CHCM:** Hemoglobina x 100/Hematocrito

- El VCM indica el tamaño medio de los eritrocitos. Un valor aumentado, normal o disminuido indica que el eritrocito medio es macrocítico, normocítico o microcítico, respectivamente.
- La HCM indica el contenido medio de hemoglobina por eritrocito. Desde el punto de vista clínico es frecuentemente ignorada.
- La CHCM indica la concentración de hemoglobina en un eritrocito medio. Una CHCM normal o disminuida indica que, morfológicamente, el eritrocito es normocrómico o hipocrómico respectivamente. Un aumento de la CHCM indica un error laboratorial o de muestreo, como puede ocurrir en muestras hemolisadas (WILLARD Y TVEDTEN, 2004).

**Tabla 2.31.** Índices eritrocitarios en algunas especies de reptiles

Especie	VCM (femtolitros)	CHCM (g/dL)	HCM (picogramos)
<i>Corucia zebrata</i> <sup>1</sup>	152-600	17-56	42-111
<i>Crocodylus porosus</i> <sup>2</sup>	240-311	26.1-31.9	72-92
<i>Iguana iguana</i> <sup>3,4</sup>	266 (machos) 279 (hembras)	25.1 (machos) 27.9 (hembras)	
<i>Varanus salvator</i> <sup>5</sup>	284.5	33.0	94.0

1: WRIGHT Y SKEBA, 1992

2: MILLAN ET AL., 1997

3: HARR ET AL., 2001

4: HEARD ET AL., 2004

5: SALAKIJ ET AL., 2014

Nótese que en *Iguana iguana*, las hembras, grávidas o no, mostraron una concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) significativamente mayor que los machos. La deshidratación no causa aumentos en la CHCM, por lo que esta diferencia puede deberse a un incremento en la capacidad de transporte de oxígeno en las hembras de esta especie (HARR ET AL., 2001).



#### **2.4.4.- Recuento Total de Eritrocitos y Leucocitos de los Reptiles**

El número de eritrocitos en sangre periférica de reptiles es generalmente menor que en aves y mamíferos (SYPEK Y BORYSENKO, 1988). El recuento total de eritrocitos (RBC) de los saurios tiende a ser mayor que el de las serpientes (DUGUY, 1970; SYPEK Y BORYSENKO, 1988) y a su vez, las serpientes suelen presentar un mayor RBC que los quelonios (DUGUY, 1970). Parece existir, por tanto, una relación inversa entre el RBC y el tamaño de los glóbulos rojos (SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

Se ha descrito que, en respuesta a enfermedades crónicas, puede producirse un descenso en el recuento de eritrocitos (DIVERS, 2000A). Además, el RBC puede variar a causa de las condiciones ambientales, el estado nutricional, el sexo y la estación. Así, el RBC es mayor previamente a la fase de hibernación y aparece disminuido justo después de ese período (MUSSACHIA Y SIEVERS, 1956; DUGUY, 1970; SAINT GIRONS, 1970; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991).

El número total de leucocitos (WBC) puede experimentar una elevación en respuesta a procesos inflamatorios o infecciosos, especialmente cuando dichos procesos tienen un carácter agudo. En los casos en que las patologías tienen una evolución más crónica es frecuente que se manifieste un WBC normal o ligeramente aumentado. Aunque menos común que en las enfermedades infecciosas, el WBC puede también elevarse en respuesta a la neoplasia. Se suele aceptar que el grado de incremento del WBC se correlaciona con la severidad del proceso patológico experimentado (DIVERS, 2000A).

Los descensos en el WBC pueden asociarse con enfermedad vírica, secuestro celular o trastornos de la médula ósea. También suelen detectarse recuentos bajos o muy bajos de leucocitos durante el período de hibernación y posthibernación (DIVERS, 2000A).

Tabla 2.32. Recuentos totales de eritrocitos y leucocitos en algunas especies de reptiles

Especie	Recuento de eritrocitos (x 10 <sup>5</sup> /microlitro (µl))	Recuento de leucocitos (/µl)
<b>Orden Squamata. Suborden Sauria</b>		
Sauria <sup>1</sup>	4.0-21	12000-22500
<i>Agama atra</i> <sup>2</sup>	12.5	
<i>Chamaeleo chamaeleon</i> <sup>3</sup>	8	31120
<i>Corucia sp.</i> <sup>4</sup>	15	12400
<i>Corucia zebra</i> <sup>4</sup>	8.4-18.3	3900-22400
<i>Heloderma suspectum</i> <sup>30</sup>	5	4600 (3300-6400)
Iguanas <sup>5</sup>	15-35	6000-14000
<i>Iguana iguana</i> <sup>6</sup>	14-58	1700-15000
<i>Iguana iguana</i> <sup>7</sup>	35-58	4300-15000
<i>Iguana iguana</i> <sup>8</sup>		Alto: 8-14 x 10 <sup>6</sup> Bajo: 4-7 x 10 <sup>6</sup>
<i>Iguana iguana</i> <sup>9</sup>	8-20	4500-10000
<i>Iguana iguana</i> <sup>10</sup>	14	14800
<i>Iguana iguana</i> <sup>11, 12</sup>	12.7 (machos) <sup>26</sup> 14.8 (hembras) <sup>27</sup>	15200 (machos) <sup>26</sup> 13300 (hembras) <sup>27</sup>
<i>Iguana iguana</i> <sup>13</sup>	13 (machos) 14 (hembras y juveniles)	15100 (machos) 14800 (hembras)
<i>Lacerta agilis</i> <sup>14</sup>	9.45	
<i>Tarentola mauritanica</i> <sup>15</sup>	6.92-8.42	
<i>Varanus salvadorii</i> <sup>16</sup>	15	11450
<i>Varanus salvator</i> <sup>31</sup>	10,76 (Macho)-11,72(Hembra)	15670 (Macho)-16050 (Hembra)
<b>Orden Squamata. Suborden Serpentes</b>		
Serpientes <sup>17</sup>		1 x 10 <sup>6</sup>
Serpentes <sup>18</sup>	10	6.7-8.1 x 10 <sup>6</sup>
Serpentes <sup>1</sup>	4.0-25	6700-81000
<i>Boa sp.</i> <sup>19</sup>	10-25	4000-10000
<i>Boa constrictor</i> <sup>20</sup>	1.71	6700
<i>Coluber constrictor</i> <sup>21</sup>	7.30-10.75	
<i>Crotalus atrox</i> <sup>22</sup>	0.68	
<i>Elaphe scalaris</i> <sup>23</sup>	11.81	
<i>Natrix maura</i> <sup>24</sup>	3.78-10.7	
<i>Natrix maura</i> <sup>25</sup>	3.8-10.7	
<i>Phyton sp.</i> <sup>25</sup>	1.0-2.5	6000-12000
<i>Phyton sp.</i> <sup>19</sup>	10-25	6000-12000
<i>Phyton regius</i> <sup>26</sup>		14770
<i>Vipera aspis</i> <sup>27</sup>	5.71-14.10	
<b>Orden Crocodilia</b>		
Aligatores <sup>17</sup>		600000
<i>Alligator mississippiensis</i> <sup>28</sup>	6.18-14.80	
<i>Alligator mississippiensis</i> <sup>29</sup>	4-12	1800-20800
<i>Crocodylus niloticus</i> <sup>29</sup>	10	5500-12400
<i>Osteolaemus tetraspis</i> <sup>29</sup>	0.3-4.5	2000-6000
<i>Paleosuchus palepebrosus</i> <sup>29</sup>	4-9	2700-13500

1: LAWTON, 1991

2: PIENAAR, 1962

3: CUADRADO ET AL., 2002

4: WRIGHT Y SKEBA, 1992

## Revisión Bibliográfica

- 5: University of Miami, Avian and Wildlife Laboratory, 1996. In: Exotic companion medicine handbook for veterinarians, 2: 2
- 6: BARTEN, 1993
- 7: ANDERSON, 1992
- 8: ROSENTHAL, 2002
- 9: FRYE Y TOWNSEND, 1993; FRYE, 1995
- 10: HARR *ET AL.*, 2001
- 11: Datos de B. LOCK. In: Biology, Husbandry, and Medicine of the Green iguana. E. R. Jacobson (ed.). 2003: 101-102.
- 12: Datos de L. K. MAXWELL. In: Biology, Husbandry, and Medicine of the Green iguana. E. R. Jacobson (ed.). Krieger Publishing Company, Florida. 2003. Pp. 101-102
- 13: HEARD *ET AL.*, 2004
- 14: ALDER Y HUBER, 1923; PEÑA ROCHE, 1939; SALGUES, 1937
- 15: ALDER Y HUBER, 1923; SALGUES, 1937
- 16: FONTENOT *ET AL.*, 2004
- 17: DIVERS *ET AL.*, 1996; GOTTDENKER Y JACOBSON, 1995; BARTEN, 1993
- 18: RAITI, 2002
- 19: ROSSKOPF *ET AL.*, 1982; University of Miami, Avian and Wildlife Laboratory, 1996. In: Exotic companion medicine handbook for veterinarians, 2: 2
- 20: FRYE, 1973
- 21: HUTTON, 1958
- 22: WALLACH Y BOEVER, 1983
- 23: SALGUES, 1937
- 24: DUGUY, 1967; SALGUES, 1937
- 25: DESSAUER, 1970
- 26: California Avian Laboratory (Citrus Heights, California). In: A. M. Fudge (ed.). 1999. Laboratory Medicine (Avian and Exotic Pets). Philadelphia, W.B. Saunders Company: 375-400
- 27: BABUDIERI, 1930
- 28: ALTMAN Y DITTMER, 1964; COULSON *ET AL.*, 1950; HOPPING, 1923; WINTROBE, 1933
- 29: LLOYD, 2003
- 30: COOPER-BAILEY *ET AL.*, 2011
- 31: SALAKIJ *ET AL.*, 2014

### 2.4.5.- Recuento de Trombocitos de los Reptiles

Actualmente no existe un método completamente fiable para determinar el número de trombocitos en sangre circulante de reptiles. Se puede hacer una estimación de su número en frotis teñidos, buscando un campo al azar en el microscopio donde no se observen agregaciones de trombocitos, y multiplicar el número de trombocitos presentes en este campo por el cuadrado del objetivo utilizado. Se puede repetir en varios campos para obtener una media. Con ello se consigue el número aproximado de trombocitos por microlitro de sangre (RASKIN, 2000; BARROWS *ET AL.*, 2004; WILKINSON, 2004). También se puede realizar un recuento total de trombocitos empleando la técnica de la cámara de Neubauer con el diluyente de Natt y Herrick, con una dilución de la sangre de 1:200. El recuento se hace en la totalidad de la cuadrícula central, en ambos lados de la cámara. El número obtenido se multiplica por 1000, resultando en el número total de trombocitos por  $\mu\text{L}$  de sangre. Sin embargo, los resultados desprendidos mediante esta técnica son variables debido a la dificultad de distinguir estas células de los linfocitos pequeños (FRYE 1991; MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2011).

Se ha descrito que el número de trombocitos en reptiles oscila en un rango de 25-350 células por cada 100 leucocitos (PIENAAR, 1962; SYPEK Y BORYSENKO, 1988), pero el recuento suele ser inferior al 40% y los reptiles sanos frecuentemente exhiben un rango de 10500-19500 trombocitos/ $\mu\text{l}$  de sangre (PIENAAR, 1962; FRYE, 1981). La Tabla 2.33 expone valores de trombocitos para diferentes especies de reptiles.

**Tabla 2.33.** Valores del recuento de trombocitos en diferentes especies de reptiles

Especie	Trombocitos
<i>Caiman latirostris</i> <sup>1</sup>	14 ± 3.2 (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )
<i>Caiman crocodylus jacare</i> <sup>1</sup>	12.7 ± 4 (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )
<i>Crotalus durissus terrificus</i> <sup>2</sup>	6900 ± 2400 (10 <sup>9</sup> /l)

1: TROIANO *ET AL.*, 19962: TROIANO *ET AL.*, 1997

Los trombocitos de *Crotalus adamanteus* representan el segundo tipo celular en abundancia, después de los eritrocitos. Su recuento puede variar mucho en los diferentes frotis sanguíneos, dependiendo de la mayor o menor presencia de agregados trombocitarios que pueden ser consecuencia de una defectuosa toma de sangre (ALLEMAN *ET AL.*, 1999).

*Varanus salvator* presenta una media de 85.5 ± 41.2 trombocitos por cada 100 leucocitos (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

Algunos estudios describen la existencia de variaciones estacionales en el número de trombocitos, observando un descenso de estas células en invierno y un aumento durante el período estival (KAPLAN, 1954; PIENAAR, 1962; DUGUY, 1970; TROIANO *ET AL.*, 1997).

La trombocitopenia en reptiles suele deberse a una excesiva utilización de los trombocitos periféricos o a un descenso en su producción (CAMPBELL, 2004A). Así, puede derivarse de un proceso de coagulación intravascular diseminada u otros desórdenes de la coagulación. La presencia de trombocitos activados en el frotis puede ser señal de coagulación intravascular diseminada (HAWKEY Y DENNET, 1989), aunque también pueden aparecer en respuesta a una mala técnica de obtención de sangre (WATSON, 1997).

La trombocitosis se detecta cuando existe una hemorragia o una infección bacteriana, mientras que la anisocitosis y la presencia de formas gigantes está asociada a menudo con una hiperplasia mieloide y linfoide (HAWKEY Y DENNET, 1989). El polimorfismo nuclear se considera anormal y suele estar asociado a procesos inflamatorios severos (HAWKEY Y DENNETT, 1989).

## 2.4.6.- Recuento Diferencial Leucocitario de los Reptiles

Se pueden emplear numerosas tinciones hematológicas para realizar el recuento diferencial leucocitario. Las tinciones rápidas tienen bastantes ventajas y se consideran adecuadas (WILKINSON, 2004).

### -Neutrófilo

En reptiles sanos, en aquellas especies en las que se ha descrito su presencia, esta célula suele representar un 3-7% del total de leucocitos, y raramente excede el 10% (FRYE, 1991).

### -Heterófilo

Esta célula se ha clasificado como el leucocito más abundante en la mayoría de los cocodrilianos y quelonios (HEARD *ET AL.*, 2004), más aún en los quelonios acuáticos (FRYE,

1973).

El número de heterófilos circulantes en reptiles puede ser muy variable. Algunos autores consideran que puede representar hasta un 40-45% del recuento diferencial leucocitario (TAYLOR Y KAPLAN, 1961; DUGUY, 1970; WOOD Y EBANKS, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; JACOBSON *ET AL.*, 1990; MARKS Y CITINO, 1990; FRYE, 1991; WRIGHT Y SKEBA, 1992), pero hay estudios en los que se afirma que puede llegar a representar hasta un 65% del total de leucocitos (FRYE, 1991).

Hay especies en las que el heterófilo se ha descrito como el segundo leucocito más numeroso del recuento diferencial, como es el caso de *Iguana iguana* (ANDERSON, 1992; HARR *ET AL.*, 2001), la iguana azul del Gran Cayman (*Cyclura nubila lewisi*) (FISSE *ET AL.*, 2004), *Pogona vitticeps* (ELIMAN, 1997), *Varanus salvator* (SALAKIJ *ET AL.*, 2014), el cocodrilo del Nilo (*Crocodylus niloticus*), y el caimán enano (*Paleosuchus palpebrosus*) (LLOYD, 2003). En contraste, en el varano de Papúa (*Varanus salvadorii*) (FONTENOT *ET AL.*, 2004), *Alligator mississippiensis*, el cocodrilo enano (*Osteolaemus tetraspis*) (LLOYD, 2003), el monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*) (COOPER-BAILEY *ET AL.*, 2011) y el camaleón común (*Chamaeleo chamaeleon*) (CUADRADO *ET AL.*, 2002), el heterófilo representa el leucocito más abundante. Sin embargo, en algunas especies de serpiente como *Ophiophagus hannah* los heterófilos constituyen el tercer leucocito en número (SALAKIJ *ET AL.*, 2002), mientras que en *Crotalus adamanteus* los heterófilos y los basófilos representan los leucocitos menos abundantes (ALLEMAN *ET AL.*, 1999).

Debido a que los reptiles son animales ectotérmicos, los leucocitos tienden a fluctuar en sus recuentos influenciados por varios factores, como la estación del año y la temperatura (PIENAAR, 1962; SHEELER Y BARBER, 1964; STENROSS Y BOWMAN, 1968; SEMPLE *ET AL.*, 1970; DUGUY, 1970; ROSSKOPF *ET AL.*, 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; FRYE, 1991; HART *ET AL.*, 1991; ANDERSON, 1996). Algunos estudios no han hallado cambios significativos en los parámetros sanguíneos en función de la edad o el sexo, pero sí en relación con la época del año (TROIANO Y SILVA, 1998). Generalmente se reconoce la gran variabilidad de los leucogramas de reptiles (DUGUY, 1970; HAWKEY Y DENNET, 1989; CAMPBELL, 1996B).

Algunos autores consideran que el número de heterófilos circulantes está influenciado por factores estacionales, observándose recuentos más elevados durante el verano y más bajos durante el período de hibernación (DUGUY, 1970; LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; WATSON, 1997; RASKIN, 2000). También se ha citado un incremento de estas células en hembras grávidas en algunas especies de reptiles (DUGUY, 1970; CUADRADO *ET AL.*, 2002). Otros autores no han hallado evidencias de variaciones en los recuentos totales de leucocitos ni en el porcentaje de heterófilos en función de la estación o del sexo del reptil (CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999).

Los incrementos significativos en el número de heterófilos suelen asociarse a enfermedades inflamatorias (especialmente infecciones microbianas o parasitarias y daños tisulares), aunque también aparecen en trastornos no inflamatorios como el estrés, la neoplasia o la leucemia mieloide (ROSSKOPF, 1982; CAMPBELL, 1996B; RASKIN, 2000; CAMPBELL, 2004A). Varios autores han descrito un aumento del porcentaje de heterófilos como consecuencia del estrés generado en el momento de la captura de los animales (LANCE, 1990; HAJDUK *ET AL.*, 1992; AGUIRRE *ET AL.*, 1995).

La heteropenia se ha descrito en reptiles con enfermedades virales masivas

(ROSSKOPF, 2000), particularmente en la enfermedad de los cuerpos de inclusión de algunas serpientes (JACOBSON, 1999), y algunos autores la relacionan con estados de inmunosupresión (NEIFFER *ET AL.*, 2005).

### **-Eosinófilo**

Los recuentos de eosinófilos suelen oscilar entre el 7-20% del total de leucocitos en los frotis sanguíneos de reptiles (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991), pero generalmente su porcentaje es bastante variable.

Los estudios publicados en lacértidos ponen de manifiesto que estos animales tienen pocos eosinófilos circulantes. Es el caso de *Iguana iguana* (ANDERSON, 1992; HARR *ET AL.*, 2001) y *Cyclura nubila lewisi* (FISSE *ET AL.*, 2004). Asimismo, algunas serpientes como la boa constrictor (*Boa constrictor*) (CHIODINI Y SUNDBERG, 1982; ROSSKOPF *ET AL.*, 1982), la pitón tigrina (*Phyton molurus*), la pitón real (*Phyton regius*) y la pitón reticulada (*Phyton reticulatis*) (ROSSKOPF *ET AL.*, 1982) presentan un número muy bajo de eosinófilos (0-3 %), constituyendo en *Ophiophagus Hannah* el leucocito más escaso (SALAKIJ *ET AL.*, 2002). De igual forma, en *Alligator mississippiensis*, *Crocodylus niloticus*, *Osteolaemus tetraspis* y *Paleosuchus palpebrosus* los eosinófilos suponen generalmente el último leucocito en el recuento diferencial (LLOYD, 2003). Además, en *Physignathus* spp. (LEBLANC, 2001), *Varanus salvadorii* (FONTENOT *ET AL.*, 2004), *Varanus salvator* (SALAKIJ *ET AL.*, 2014), *Heloderma suspectum* (COOPER-BAILEY *ET AL.*, 2011), *Chamaeleo chamaeleon* (CUADRADO *ET AL.*, 2002) y *Elaphe obsoleta quadrivittata* (DOTSON *ET AL.*, 1997) no se describen eosinófilos. Por el contrario, algunas especies de tortugas pueden poseer hasta un 20 % de eosinófilos (TAYLOR Y KAPLAN, 1961; DUGUY, 1970; WOOD Y EBANKS, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; JACOBSON *ET AL.*, 1990; MARKS Y CITINO, 1990; WRIGHT Y SKEBA, 1992).

Se ha postulado que los eosinófilos siempre se presentan en un número inferior al del heterófilo (WATSON, 1997).

El número de eosinófilos puede verse influenciado por factores estacionales, contabilizándose números menores en verano y mayores durante la hibernación (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; DUGUY, 1970; WATSON, 1997). Esta fluctuación se asocia al declive de los eosinófilos en los períodos donde los animales muestran una mayor actividad metabólica (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; DUGUY, 1970). Otros autores no han hallado diferencias en las fórmulas leucocitarias como consecuencia de factores estacionales (TROIANO Y SILVA, 1998).

El recuento de eosinófilos tiende a incrementarse ante estimulaciones parasitarias e inmunológicas no específicas (MEAD Y BORYSENKO, 1984A). La eosinofilia se ha citado en infestaciones por parásitos sanguíneos, digestivos o externos (WATSON, 1997). Bajo estimulación antigénica también se incrementa su número (FRYE, 1991) y se ha demostrado la presencia de la inmunoglobulina citofílica en el eosinófilo de los reptiles (MEAD Y BORYSENKO, 1984B, SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

La eosinopenia en reptiles sólo se ha descrito en respuesta a incrementos en la actividad metabólica de los animales (DUGUY, 1970) y a situaciones de estrés (LANCE, 1990; HAJDUK *ET AL.*, 1992).

### **-Basófilo**

Los basófilos pueden representar un 0-40% del recuento diferencial leucocitario en reptiles (TAYLOR Y KAPLAN, 1961; DUGUY, 1970; ROSSKOPF, 1982; ROSSKOPF *ET AL.*, 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; JACOBSON *ET AL.*, 1990; MARKS Y CITINO, 1990; WRIGHT Y SKEBA, 1992; CAMPBELL, 1996B; RASKIN, 2000; ROSSKOPF, 2000), mientras que otros autores consideran que en muchos individuos sanos y no hibernantes los basófilos pueden suponer el 10-25% del total de leucocitos (FRYE, 1991). Es destacable que en algunos quelonios estas células pueden presentar recuentos superiores al 50% (MICHELS, 1923; MEAD *ET AL.*, 1983; SYPEK *ET AL.*, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988). Sin embargo, es poco frecuente observar basófilos en *Elaphe obsoleta quadrivittata* (DOTSON *ET AL.*, 1995; 1997), *Ophiophagus hannah* (SALAKIJ *ET AL.*, 2002) e *Iguana iguana* (ANDERSON, 1992; HARR *ET AL.*, 2001).

En *Crotalus durissus terrificus* (TROIANO *ET AL.*, 1997), *Crotalus adamanteus* (ALLEMAN *ET AL.*, 1999), *Chamaeleo chamaeleon* (CUADRADO *ET AL.*, 2002) y *Varanus salvator* (SALAKIJ *ET AL.*, 2014) los basófilos representan la célula menos numerosa en el recuento diferencial leucocitario. En *Varanus salvadorii* (FONTENOT *ET AL.*, 2004) constituye el penúltimo leucocito, mientras que en *Alligator mississippiensis*, *Crocodylus niloticus*, *Osteolaemus tetraspis* y *Paleosuchus palpebrosus* supone el tercer o cuarto leucocito en número (LLOYD, 2003). De igual manera, en *Pogona vitticeps* (ELIMAN, 1997), *Cyclura nubila lewisi* (FISSE *ET AL.*, 2004), *Boa constrictor* (CHIODINI Y SUNDBERG, 1982; ROSSKOPF *ET AL.*, 1982) y varias especies de pitones (*Phyton molurus*, *Phyton regius* y *Phyton reticulatis*) (ROSSKOPF *ET AL.*, 1982) los basófilos representan el tercer leucocito en frecuencia en el recuento diferencial leucocitario.

Se ha descrito una pequeña variación estacional en el número de basófilos, disminuyendo su recuento durante la hibernación y aumentando al llegar la época activa del individuo (SAINT GIRONS, 1970; RASKIN, 2000).

A diferencia de lo que ocurre con los mamíferos, en los reptiles es frecuente que se produzca un incremento significativo en el número absoluto de basófilos en respuesta a patógenos bacterianos, especialmente en aquellas especies que en condiciones normales presentan un número elevado de estas células (HEARD *ET AL.*, 2004). Se ha observado basofilia en presencia de ciertos parásitos sanguíneos (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997) como hemogregarinas y tripanosomas, y en infecciones por iridovirus (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; CAMPBELL, 1996B).

### **-Linfocito**

Muchos autores consideran a los linfocitos los leucocitos más numerosos en la sangre periférica de los reptiles (SAINT GIRONS, 1970; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; CAMPBELL, 1996B). En algunas especies los linfocitos pueden representar hasta un 80% del recuento diferencial leucocitario (SYPEK Y BORYSENKO, 1988). Otros autores describen porcentajes superiores al 50% del total de leucocitos en iguanas y tortugas marinas (DIVERS *ET AL.*, 1996; WORK *ET AL.*, 1998). Así sucede en *Iguana iguana* (ANDERSON, 1992; HARR *ET AL.*, 2001) y de forma muy similar en *Cyclura nubila lewisi*, cuyo porcentaje linfocitario puede alcanzar el 46% (FISSE *ET AL.*, 2004). De igual manera, en *Crotalus durissus terrificus* (TROIANO *ET AL.*, 1997), *Crotalus adamanteus* (ALLEMAN *ET AL.*, 1999), la culebra arbórea parda (*Boiga irregularis*) (LAMIRANDE *ET AL.*, 1999), *Ophiophagus hannah* (SALAKIJ *ET AL.*, 2002) y *Elaphe obsoleta quadrivittata* (DOTSON *ET AL.*, 1997), así

como en *Crocodylus niloticus* (PIENAAR, 1962; LLOYD, 2003), *Paleosuchus palpebrosus* (LLOYD, 2003) y *Varanus salvator* (SALAKIJ ET AL., 2014) los linfocitos son los leucocitos más numerosos. Otros autores corroboran esta predominancia linfocitaria para algunas especies de ofidios (PIENAAR, 1962; DUGUY, 1970; ROOSKOPF ET AL., 1982). Contrariamente, otros trabajos realizados en *Crotalus durissus terrificus* y *Boa constrictor* (PIENAAR, 1962; DOTSON ET AL., 1995) hallan al azurófilo como el leucocito predominante. PIENAAR (1962) comprobó una predominancia linfocitaria en varias especies de reptiles sudafricanos: *Pelomedusa subrufa*, *Peliosios sinuatus*, *Agama atra*, *Chamaeleo dilepsis dilepsis*, *Cordylus jonesii*, *Cordylus vittifer*, *Lygodactylus c. capensis*, *Mabuya varia*, *Pachydactylus c. capensis*, *Pachydactylus bibroni*, *Varanus niloticus*, *Albabophis rufulus*, *Crotaphopeltis hotamboei* y *Psammophis s. subtaeniatus*. Lo mismo sucede con *Pogona vitticeps* (ELIMAN, 1997).

Sin embargo, en *Alligator mississippiensis*, *Osteolaemus tetraspis* (LLOYD, 2003), *Chamaeleo chamaeleon* (CUADRADO ET AL., 2002) y *Heloderma suspectum* (COOPER-BAILEY ET AL., 2011) el linfocito es el segundo leucocito más abundante. En *Varanus salvadorii* el linfocito representa el tercer leucocito (FONTENOT ET AL., 2004).

En general se considera que el recuento total y relativo de linfocitos en reptiles es bastante variable, estando influenciado por diversos factores como la especie, la edad, el sexo, la estación del año, el estado nutricional, el grado de parasitismo por hemoprotozoos y metazoos, o la presencia de enfermedades concomitantes (FRYE, 1991).

Muchos autores han descrito recuentos linfocitarios superiores en las hembras de algunas especies de reptiles en comparación con los machos de su misma edad y en idénticas condiciones ambientales (DUGUY, 1970; BORYSENKO Y LEWIS, 1979; GLAZEBROOK ET AL., 1981; BURKE Y RODGERS, 1982; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991; WATSON, 1997; CAMPBELL, 1996B).

En lo que respecta a la edad, los reptiles más jóvenes tienden a mostrar números ligeramente superiores de linfocitos, monocitos, heterófilos y trombocitos, comparados con los ejemplares adultos de su misma especie (FRYE, 1991).

Durante la muda o ecdisis el recuento de linfocitos también tiende a elevarse ligeramente (FRYE, 1991; WATSON, 1997), y lo mismo puede suceder después del apareamiento (WATSON, 1997).

La estación y las condiciones ambientales también afectan al recuento de linfocitos, incrementándose durante los meses calurosos de verano y descendiendo a la llegada del invierno y la hibernación (DUGUY, 1970; HUSSEIN ET AL., 1978; DESSER Y WELLER, 1979A; WRIGHT Y COOPER, 1981; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997). Así, las especies de climas templados presentan una disminución de los linfocitos durante el período de hibernación (HUSSEIN ET AL., 1978; 1979A; 1979B; WRIGHT Y COOPER, 1981; CAMPBELL, 1996B) y en primavera exhiben una proliferación linfocitaria posthibernación. Se ha explicado el descenso en el recuento linfocitario como una consecuencia de la relativa incapacidad de algunas especies de climas templados a desarrollar una respuesta inmune primaria durante las bajas temperaturas invernales o durante el período normal de hibernación (WRIGHT Y COOPER, 1981). Las experiencias clínicas con una variedad de serpientes, lagartos y quelonios de climas templados llevó a proponer esta hipótesis (FRYE, 1991). Las especies tropicales también muestran un declive estacional del número de linfocitos durante el invierno como consecuencia de una



disminución de los linfocitos esplénicos y circulantes (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; CAMPBELL, 1996B).

En contraste, en *Crotalus durissus terrificus* no se hallan variaciones en el recuento diferencial leucocitario y por tanto en el número de linfocitos, en función de la edad o del sexo de los individuos, o en respuesta a la estación (TROIANO ET AL., 1997).

La linfocitosis puede observarse como consecuencia de un proceso inflamatorio o durante la cicatrización de heridas (CAMPBELL, 1996B; JACOBSON, 1999), aunque también puede ocurrir en respuesta a infecciones parasitarias o enfermedades víricas (CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997; JACOBSON, 1999) o durante la ecdisis (WALLACH Y BOEVER, 1983). En serpientes que padecen la enfermedad de los cuerpos de inclusión, además de una marcada linfocitosis, ocasionalmente se pueden detectar dichos cuerpos de inclusión en el interior de los linfocitos (JACOBSON, 1999).

La linfopenia se asocia con estados de malnutrición (DUGUY, 1970; BORYSENKO Y LEWIS, 1979; GLAZEBROOK ET AL., 1981; BURKE Y RODGERS, 1982; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991; WATSON, 1997; CAMPBELL, 1996B, 2004A) o aparece de forma secundaria en respuesta a diversas enfermedades derivadas del estrés y la inmunosupresión (CAMPBELL, 2004A), como el estrés post-captura en reptiles silvestres (LANCE, 1990; HAJDUK ET AL., 1992; AGUIRRE ET AL., 1995).

### **-Monocito**

Los monocitos usualmente se presentan en bajo número en los frotis sanguíneos de la mayoría de las especies de reptiles, constituyendo un 0-10% del recuento diferencial leucocitario (TAYLOR Y KAPLAN, 1961; TAYLOR ET AL., 1963; DUGUY, 1970; OTIS, 1973; ROSSKOPF, 1982; ROSSKOPF ET AL., 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; JACOBSON ET AL., 1990; MARKS Y CITINO, 1990; ALLEMAN ET AL., 1992; WRIGHT Y SKEBA, 1992; CAMPBELL, 1996B). Este rango es mayor en algunas especies de serpientes (HAWKEY Y DENNET, 1989; CAMPBELL, 1996B). Otros autores los contabilizan como 0.5-3% del recuento diferencial leucocitario (FRYE, 1991). Un porcentaje similar (0-3 %) se ha observado en *Boa constrictor* (CHIODINI Y SUNDBERG, 1982; ROSSKOPF ET AL., 1982) y en varias especies de pitones (*Phyton molurus*, *Phyton regius* y *Phyton reticulatis*) (ROSSKOPF ET AL., 1982). Un número inferior al 4 % se ha citado en *Iguana iguana* (ANDERSON, 1992; HARR ET AL., 2001) y *Cyclura nubila lewisi* (FISSE ET AL., 2004). PIENAAR (1962) describió recuentos de monocitos de hasta un 20% en algunos reptiles sudafricanos.

En *Pogona vitticeps* (ELIMAN, 1997), *Varanus salvadorii* (FONTENOT ET AL., 2004) y *Varanus salvator* (SALAKIJ ET AL., 2014) los monocitos representan la célula menos frecuente, después del basófilo. En *Alligator mississippiensis*, *Crocodylus niloticus* y *Paleosuchus palpebrosus* los monocitos constituyen el penúltimo o último leucocito (LLOYD, 2003). El monocito de *Heloderma suspectum* (COOPER-BAILEY ET AL., 2011) representa el último leucocito en número, mientras que en *Chamaeleo chamaeleon* (CUADRADO ET AL., 2002) estas células representan el tercer leucocito más abundante.

Los monocitos no se han observado en ejemplares de *Elaphe obsoleta quadrivittata* sanas (DOTSON ET AL., 1995; 1997), pero se citan en otras especies de serpientes con infecciones bacterianas severas (DOTSON ET AL., 1995). Sin embargo, se observan en algunas especies de serpientes sin patologías: *Ophiophagus hannah*, especie en la que los monocitos y los eosinófilos representan los leucocitos menos numerosos (SALAKIJ ET AL.,

2002); *Crotalus durissus terrificus* (TROIANO ET AL., 1997), en la que son la célula menos frecuente después del basófilo; y *Crotalus adamanteus*, en la que los monocitos se identifican sólo como azurófilos representando el segundo leucocito más numeroso después del linfocito (ALLEMAN ET AL., 1999).

Se ha especulado con que estas células son en realidad azurófilos con cambios morfológicos asociados a una infección o inflamación (DOTSON ET AL., 1997).

Las variaciones estacionales en el número de monocitos son pequeñas, siendo bastante constante su porcentaje relativo (DUGUY, 1970; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; WATSON, 1997). Otros autores niegan incluso la existencia de variaciones estacionales para este leucocito (RASKIN, 2000) o bien, no han observado dichas variaciones en sus investigaciones (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; MURO ET AL., 1994; TROIANO ET AL., 1996; TROIANO ET AL., 1997; ANDERSON ET AL., 1997; TROIANO Y SILVA, 1998).

La monocitosis usualmente sugiere la presencia de un proceso infeccioso crónico u otra estimulación inmunógena. Por ello, el recuento de monocitos tiene una importancia significativa como medida de la respuesta a la terapia clínica y como factor pronóstico de la recuperación del animal (ROSSKOPF, 2000).

La monocitosis se observa frecuentemente en infecciones bacterianas y en algunas infecciones víricas, como la enfermedad de los cuerpos de inclusión de boidos (ROSSKOPF, 2000). En casos de granulomas crónicos de diversas etiologías el recuento monocitario también aumenta significativamente (FRYE, 1991; ROSSKOPF, 2000; CAMPBELL, 2004A). Según CUADRADO ET AL. (2002) la monocitosis en reptiles también podría asociarse con necrosis tisular, como se ha descrito en aves (CAMPBELL, 1994).

### **-Azurófilo**

Los azurófilos en *Crotalus adamanteus* (ALLEMAN ET AL., 1999), *Crotalus durissus terrificus* (TROIANO ET AL., 1997), *Ophiophagus hannah* (SALAKIJ ET AL., 2002) y *Varanus salvadorii* (FONTENOT ET AL., 2004) representan el segundo leucocito más numeroso del recuento diferencial, mientras que en *Varanus salvator* el azurófilo es el tercer leucocito en número (SALAKIJ ET AL., 2014). Esto coincide con las observaciones de otros autores que consideran al azurófilo un leucocito abundante en la sangre de las serpientes (EGAMI Y SASSA, 1988; DOTSON ET AL., 1995; TROIANO ET AL., 1997). Aunque difiere de la opinión de HAWKEY Y DENNET (1989), que generalmente han contabilizado a los azurófilos en bajo número en lagartos sanos, cocodrilos y algunos quelonios. Así sucede en *Pogona vitticeps* (ELIMAN, 1997), *Cyclura nubila lewisi* (FISSE ET AL., 2004) y *Heloderma suspectum* (COOPER-BAILEY ET AL., 2011), en los que tanto los monocitos como los azurófilos presentan los números más bajos en el recuento total de leucocitos. Sin embargo, se cita un recuento de azurófilos de hasta un 20 % del total de leucocitos en *Phyton regius* y en iguanas (DIVERS ET AL., 1996; JOHNSON Y BENSON, 1996).

En *Alligator mississippiensis*, *Crocodylus niloticus* y *Paleosuchus palpebrosus* los azurófilos ocupan un tercer o cuarto lugar en el recuento diferencial leucocitario, mientras que en *Osteolaemus tetraspis* ocupan el penúltimo lugar (LLOYD, 2003).

Se ha postulado que los azurófilos, al igual que los monocitos, incrementan su número después de una lucha antigénica y en presencia de enfermedades infecciosas (MEAD Y BORYSENKO, 1984A; SEKIZAWA ET AL., 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

## Revisión Bibliográfica

En la Tabla 2.34 se exponen los valores del recuento diferencial leucocitario en varias especies de reptiles.

**Tabla 2.34.** Fórmula leucocitaria de diferentes especies de reptiles expresada en porcentajes

Especie	Eosinófilo	Basófilo	Azurófilo	Neutrófilo	Linfocito	Monocito	Heterófilo
<b>Orden Squamata. Suborden Sauria</b>							
<i>Agama atra</i> <sup>1</sup>	14.3	3.7	3.1	1.4	74.3	0.6	
<i>Anguis fragilis</i> <sup>2</sup>	3-67	0-28			10-77	0-3	4-62
<i>Chamaeleo chamaeleon</i> <sup>3</sup>	0	0.5			25	9	66
<i>Chamaeleo dilepsis dilepsis</i> <sup>1</sup>	23.8	3.6	11.0	0.0	59.6	0.0	
<i>Cordylus jonesii</i> <sup>1</sup>	10.0	26.6	11.4	3.4	45.4	0.0	
<i>Cordylus vittifer</i> <sup>1</sup>	13.2	7.2	6.6	3.2	66.8	0.8	
<i>Corucia sp.</i> <sup>4</sup>	4	15	22	0	22	0.6	37
<i>Corucia zebrata</i> <sup>5</sup>	0-18	4-26	8-42		2-40	0-6	16-58
<i>Cyclura nubila lewisi</i> <sup>6</sup>	0.1-5.5	8-31	0-8.5*		28-46		31-51
<i>Heloderma suspectum</i> <sup>20</sup>	0	12	8	0	32	2	46
Iguanas <sup>7</sup>	0-1	0-2			20-45	0-2	40-70
<i>Iguana iguana</i> <sup>8</sup>	0-1	5-11			33-61	12-35	5-55
<i>Iguana iguana</i> <sup>9</sup>	0.5	4.5	10.2		57	0.2	27.6
<i>Iguana iguana</i> <sup>10</sup>	< 2	raro			35-55	< 4	5-55
<i>Iguana iguana</i> <sup>11</sup>	0-2	1-4	15-25		40-65	1-4	30-45
<i>Iguana iguana</i> <sup>12,13</sup>	1 (macho) <sup>14</sup> 1 (hembra) <sup>15</sup>	3 (macho) <sup>14</sup> 4 (hembra) <sup>15</sup>	5 (macho) <sup>14</sup> 2 (hembra) <sup>15</sup>		63 (macho) <sup>14</sup> 69 (hembra) <sup>15</sup>	5 (macho) <sup>14</sup> 5 (hembra) <sup>15</sup>	23 (macho) <sup>14</sup> 19 (hembra) <sup>15</sup>
<i>Iguana iguana</i> <sup>14</sup>	0.7 (macho, hembra) 1.8 (juvenil)	2.7 (macho) 3.4 (hembra) 3.1 (juvenil)			64 (macho) 67 (hembra) 79 (juvenil)	9 (macho) 8 (hembra) 2.4 (juvenil)	24 (macho) 21 (hembra) 13 (juvenil)
<i>Lacerta muralis</i> <sup>2</sup>	1-30	0-12			45-96	0-5	2-23
<i>Lygodactylus c. capensis</i> <sup>1</sup>	13.4	15.6	15.0	0.0	50.8	0.0	
<i>Mabuya varia</i> <sup>1</sup>	34.4	19.0	9.0	0.0	36.6	0.0	
<i>Varanus niloticus</i> <sup>1</sup>	11.3	0.1	10.8	0.0	73.7	0.0	
<i>Varanus salvadorii</i> <sup>15</sup>	0	2	38		14	1	48

<i>Especie</i>	Eosinófilo	Basófilo	Azurófilo	Neutrófilo	Linfocito	Monocito	Heterófilo
<i>Varanus salvator</i> <sup>21</sup>	0	0.8	16.3	0	43.5	1.6	39.1
<b>Orden Squamata. Suborden Serpentes</b>							
<i>Boa</i> sp. <sup>16</sup>	0-3	0-20		0-15	10-60	0-3	20-50
<i>Boa constrictor</i> <sup>17</sup>		2			51	2	9
<i>Causus rhombeatus</i> <sup>1</sup>	12.8	9.2	49.8	8.0	17.2	0.2	
<i>Crotaphopeltis hotamboeia</i> <sup>1</sup>	11.0	11.4	22.8	0.0	51.8	0.0	
<i>Natrix maura</i> <sup>2</sup>	1-68	0-25			4-87	0-5	5-75
<i>Phyton</i> sp. <sup>2</sup>	4	0-10			10-60	0-3	0-20
<i>Phyton</i> sp. <sup>16</sup>	0-3	0-10		0-15	10-60	0-3	20-60
<i>Phyton regius</i> <sup>18</sup>		0-4	7-34		1-49	0-2	40-82
<i>Vipera aspis</i> <sup>2</sup>	0-75	0-40			2-90	0-5	2-65
<b>Orden Crocodilia</b>							
<i>Crocodylus porosus</i> <sup>19</sup>	0-2.7	0-1.6			70-84	0-4.7	13-29

\* Azurófilos + Monocitos

1: Datos ligeramente modificados por PIENAAR, 1962

2: DESSAUER, 1970

3: CUADRADO *ET AL.*, 2002

4: HEARD *ET AL.*, 2004

5: WRIGHT Y SKEBA, 1992

6: FISSE *ET AL.*, 2004

7: University of Miami, Avian and Wildlife Laboratory, 1996. In: Exotic companion medicine handbook for veterinarians, 2: 2

8: BARTEN, 1993

9: DIVERS *ET AL.*, 1996

10: ANDERSON, 1992

11: FRYE, 1995; FRYE Y TOWNSEND, 1993

12: Datos de B. LOCK. In: Biology, Husbandry, and Medicine of the Green iguana. E. R. Jacobson (ed.). 2003: 101-102.

13: Datos de L. K. MAXWELL. In: Biology, Husbandry, and Medicine of the Green iguana. E. R. Jacobson (ed.). Krieger Publishing Company, Florida. 2003: 101-102

14: WRIGHT Y SKEBA, 1992

15: FONTENOT *ET AL.*, 2004

16: ROSSKOPF *ET AL.*, 1982

17: FRYE, 1973

18: JOHNSON Y BENSON, 1996

19: MILLAN *ET AL.*, 1997

20: COOPER-BAILEY *ET AL.*, 2011

21: SALAKU *ET AL.*, 2014

## **2.5.- LA BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE LOS REPTILES**

El plasma de la mayoría de los reptiles es claro o de coloración pajiza, aunque puede aparecer naranja brillante o amarillo en iguanas y camaleones africanos debido a la presencia de pigmentos carotenoides. También se ha descrito de color verde-amarillento en pitones y *Bothrops jaracaca* debido a su contenido en carotenoides y riboflavina (WALLACH Y BOEVER, 1983; CAMPBELL, 2004B).

Los parámetros bioquímicos sanguíneos de los reptiles se muestran más influenciados por factores externos, como el estado nutricional y las condiciones ambientales, que los de los vertebrados endotérmicos (SAMOUR *ET AL.*, 1986; LAWRENCE, 1987; CAMPBELL, 1996B; HEARD *ET AL.*, 2004; WILKINSON, 2004). También suelen verse afectados por la edad y el sexo del individuo (CAMPBELL, 1996B; WILKINSON, 2004).

Las alteraciones de los parámetros bioquímicos inducidas por diferentes condiciones patológicas son similares a las observadas en los mamíferos, aunque existen algunas diferencias (HEARD *ET AL.*, 2004).

### **2.5.1.- Las Proteínas Totales (Sólidos Totales)**

El valor de los sólidos totales es aproximadamente equivalente a la concentración de proteínas plasmáticas, siempre que el plasma muestre una apariencia clara, ya que la lipemia y la hemólisis producen elevaciones artefactuales de su nivel. Se puede determinar de forma sencilla mediante el uso de un refractómetro y una pequeña cantidad de plasma sanguíneo (AIELLO, 2000).

En reptiles las proteínas totales constituyen aproximadamente un 5% del volumen total del plasma (DESSAUER, 1970). La concentración de proteínas totales plasmáticas de los reptiles sanos generalmente está comprendida en el rango de 3-8 g/dL (DAWSON, 1960; DESSAUER, 1970; CHIODINI Y SUNBERG, 1982; ROSSKOPF, 1982; TAYLOR Y JACOBSON, 1982; WALLACH Y BOEVER, 1983; SAMOUR *ET AL.*, 1986; LAWRENCE, 1987; JACOBSON *ET AL.*, 1990; MARKS Y CITINO, 1990; FRYE, 1991; BOLTEN *ET AL.*, 1992; WRIGHT Y SKEBA, 1992; CAMPBELL, 1996B; 2004B).

Las proteínas plasmáticas se dividen en dos componentes principales: la albúmina y las globulinas (MITCHELL, 2001A).

La hipoproteinemia en reptiles se asocia normalmente con la malnutrición crónica, aunque otras posibles causas incluyen malabsorción, maldigestión, enteropatías con pérdida de proteínas, pérdida de sangre severa y enfermedad renal o hepática crónica (CAMPBELL, 1996B; DIVERS, 2000B; CAMPBELL, 2004B), siendo el descenso de los niveles de albúmina el principal causante del descenso neto de las proteínas totales (DIVERS, 2000B; DIVERS *ET AL.*, 2005). Las globulinas también pueden disminuir en respuesta a enfermedad hepática severa, malnutrición o malabsorción (CAMPBELL, 1996B; DIVERS, 2000B).

La hiperproteinemia puede aparecer en casos de deshidratación, o bien por una

elevación de las globulinas asociada a una enfermedad inflamatoria crónica (CAMPBELL, 2004B) o a necrosis tisular (CAMPBELL, 1996B; DIVERS, 2000B). También puede observarse un aumento de los valores de proteínas plasmáticas en hembras durante la foliculogénesis (MARKS Y CITINO, 1990; JACOBSON, 1993; CAMPBELL, 2004B). Esto se debe al aumento de los niveles de albúmina (MITCHELL, 2001), pero sobre todo a la liberación a la sangre de la vitelogenina y otras lipoproteínas (dentro del grupo de las globulinas) que son movilizadas para crear la yema de los huevos (LUMELI, 1997).

En la Tabla 2.35 se muestran los niveles de proteínas plasmáticas de varias especies de reptiles.

**Tabla 2.35.** Valores de proteínas totales plasmáticas en algunas especies de reptiles

Especie	Proteínas totales (g/dL)
<b>Orden Squamata</b>	
<b>Suborden Sauria</b>	
Sauria <sup>1</sup>	3.0-8.1
<i>Chamaeleo chamaeleon</i> <sup>2</sup>	4.7
<i>Corucia</i> sp. <sup>3</sup>	6.5
<i>Dipsosaurus dorsalis</i> <sup>4</sup>	3.8
<i>Heloderma suspectum</i> <sup>20</sup>	6.3
<i>Iguana iguana</i> <sup>5</sup>	6.3
<i>Iguana iguana</i> <sup>6</sup>	4.3-7.3
<i>Iguana iguana</i> <sup>7</sup>	6.2
<i>Iguana iguana</i> <sup>8</sup>	4.5-8.0
<i>Iguana iguana</i> <sup>9</sup>	5.4 (macho) 7.5 (hembra grávida)
<i>Iguana iguana</i> <sup>10</sup>	5.2 (macho) 6.5 (hembra no grávida) 7.5 (hembra grávida)
<i>Iguana iguana</i> <sup>11</sup>	4.5-8.0
<i>Varanus salvator</i> <sup>21</sup>	7.7
<b>Orden Squamata</b>	
<b>Suborden Serpentes</b>	
Serpentes <sup>1,12</sup>	2.9-8.0
<i>Boa constrictor</i> <sup>13</sup>	4.6-8.0
<i>Drymarchon corais</i> <sup>14</sup>	4.6-8.0
<i>Elaphe obsoleta quadrivittata</i> <sup>15</sup>	8.9
<i>Phyton</i> sp. <sup>16</sup>	6.1
<i>Phyton regius</i> <sup>5</sup>	5-8
<i>Pituophis meanoleucus</i> <sup>17</sup>	4.3-5.9
<b>Orden Crocodilia</b>	
<i>Crocodylus niloticus</i> <sup>18</sup>	4.3
<i>Osteolaemus tetraspis</i> <sup>18</sup>	2.5-6.9
<i>Paleosuchus palepebrosus</i> <sup>18</sup>	4.1-7.0
<i>Alligator</i> sp. <sup>19</sup>	3.6-6.9

1: LAWTON, 1991

2: CUADRADO ET AL., 2002

3: WRIGHT Y SKEBA, 1992

4: KOPPLIN ET AL., 1983

5: California Avian Laboratory (Citrus Heights, California). In: A. M. Fudge (ed.). Laboratory Medicine (Avian and Exotic Pets). Philadelphia, W.B. Saunders Company: 375-400

6: ANDERSON, 1992

- 7: DIVERS *ET AL.*, 2005
- 8: FRYE, 1994; FRYE Y TOWNSEND, 1993
- 9: HARR *ET AL.*, 2001
- 10: Datos de B. LOCK (iguanas machos) y datos de L. K. MAXWELL (iguanas hembras). Ambos autores: In: *Biology, Husbandry, and Medicine of the Green iguana*. E. R. Jacobson (ed.). Krieger Publishing Company, Florida. 2003: 101-102.
- 11: FRYE, 1994
- 12: RAITI, 2002
- 13: CHIODINI Y SUNDBERG, 1982; ROSSKOPF *ET AL.*, 1982
- 14: DREW, 1994
- 15: RAMSEY Y DOTSON, 1995
- 16: WALLACH Y BOEVER, 1983
- 17: FRYE, 1994; MADER *ET AL.*, 1985
- 18: LLOYD, 2003
- 19: FRYE, 1994; SUEDEMEYER, 1991
- 20: COOPER-BAILEY *ET AL.*, 2011
- 21: SALAKU *ET AL.*, 2014

## 2.6.- VALORES HEMATOLÓGICOS DE LOS QUELONIOS

En los quelonios el área anatómica de punción venosa puede influir en los parámetros hematológicos y bioquímicos en función de si se produce o no contaminación linfática de la muestra sanguínea. Así, en la tortuga marginada (*Testudo marginata*) LÓPEZ-OLVERA *ET AL.* (2003) se observan en las muestras tomadas de la vena coccígea dorsal niveles inferiores en el recuento total de eritrocitos, el hematocrito, la concentración de hemoglobina, las proteínas totales y otros parámetros bioquímicos, en comparación con las obtenidas de la vena braquial. Se cree que la causa de estas diferencias es la hemodilución por contaminación linfática.

Existen estudios en quelonios en los que se constata la existencia de diferencias estacionales y/o intersexuales en algunos parámetros hematológicos (GRIONI *ET AL.*, 2014; YANG *ET AL.*, 2014).

### 2.6.1.- El Hematocrito de los Quelonios

El hematocrito puede ser un buen indicador del estado de salud aunque las causas de un bajo hematocrito pueden no estar claras. El hematocrito desciende en respuesta a enfermedades debilitantes crónicas como la neoplasia, parasitismo severo y anorexia prolongada (HERBST Y JACOBSON, 1997).

El hematocrito de los quelonios suele ser aproximadamente del 34% en la época posthibernación y del 28% antes de la hibernación (MCARTHUR, 1996).

En la Tabla 2.36 se exponen los valores de hematocrito de algunas especies de quelonios.

Tabla 2.36. Valores de hematocrito en algunas especies de quelonios

Especie	Hematocrito (%)
Quelonios <sup>1</sup>	20-40
Quelonios <sup>2</sup>	32-55
<b>Familia Testudinidae (tortugas terrestres)</b>	
<i>Clemmys muhlenbergii</i> <sup>8</sup> , silvestres	20
<i>Geochelone</i> sp. <sup>4</sup>	17
<i>Geochelone yniphora</i> <sup>3</sup>	20
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>9,10</sup>	23-37
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>11</sup>	25-53
<i>Gopherus polyphemus</i> <sup>12</sup>	23
<i>Malacochersus tornieri</i> <sup>3</sup>	34
<i>Terrapene carolina</i> <sup>5,13</sup>	20-38
<i>Terrapene carolina</i> <sup>14</sup>	28.6
<i>Terrapene carolina</i> <sup>7</sup>	28
<i>Terrapene carolina</i> <sup>6</sup>	20-38
<i>Testudo</i> spp. <sup>15</sup>	24
<i>Testudo graeca</i> <sup>15</sup>	24
<i>Testudo graeca</i> y <i>Testudo hermanni</i> <sup>8</sup>	34 (primavera) 28 (verano)
<i>Testudo hermanni</i> <sup>15</sup>	25
<i>Testudo hermanni</i> <sup>16</sup>	24.44
<i>Testudo horsfieldii</i> <sup>15</sup>	27
<i>Testudo marginata</i> <sup>17</sup>	14
<i>Testudo marginata</i> <sup>15</sup>	23
<i>Testudo radiata</i> <sup>18</sup>	31
<b>Tortugas marinas</b>	
<i>Caretta caretta</i> <sup>19</sup> , edad: 2 meses	18.5
<i>Caretta caretta</i> <sup>19</sup> , edad: 3 meses	16.4
<i>Caretta caretta</i> <sup>19</sup> , edad: 4 meses	19.0
<i>Caretta caretta</i> <sup>19</sup> , edad: 5 meses	18.8
<i>Caretta caretta</i> <sup>19</sup> , edad: 6 meses	20.1
<i>Caretta caretta</i> <sup>19</sup> , edad: 7 meses	19.3
<i>Caretta caretta</i> <sup>19</sup> , edad: 8 meses	20.3
<i>Caretta caretta</i> <sup>19</sup> , edad: 9 meses	20.2
<i>Caretta caretta</i> <sup>19</sup> , edad: 12 meses	20.1
<i>Caretta caretta</i> <sup>20-21</sup>	32
<i>Caretta caretta</i> <sup>22</sup>	32
<i>Caretta caretta</i> <sup>23</sup>	30.5
<i>Caretta caretta</i> <sup>24</sup>	35.4 (rango:28-48)
<i>Caretta caretta</i> <sup>25</sup>	29
<i>Caretta caretta</i> <sup>26</sup>	22
<i>Caretta caretta</i> <sup>27</sup>	29.8
<i>Chelonia mydas</i> <sup>28</sup>	36
<i>Chelonia mydas</i> <sup>27</sup>	35.2
<i>Chelonia mydas</i> <sup>23</sup>	26.3
<i>Chelonia mydas</i> <sup>29</sup>	36
<i>Chelonia mydas</i> <sup>30</sup>	29
<i>Chelonia mydas</i> <sup>22</sup>	30
<i>Chelonia mydas</i> <sup>31</sup>	35.2



## Revisión Bibliográfica

Especie	Hematocrito (%)
<b>Tortugas marinas</b>	
<i>Lepidochelys kempi</i> <sup>32</sup>	30.1
<i>Lepidochelys kempi</i> <sup>33</sup>	31.1
<i>Lepidochelys olivacea</i> <sup>34</sup> , crías	24.5
<i>Lepidochelys olivacea</i> <sup>35</sup> , adultos	31
<b>Tortugas de agua dulce</b>	
<i>Cuora flavomarginata</i> <sup>36</sup>	Machos (31), hembras (27)
<i>Cuora trifasciata</i> <sup>37</sup>	30

- 1: University of Miami, Avian and Wildlife Laboratory. 1996. In: Exotic companion medicine handbook for veterinarians, 2: 6  
2: Grange Laboratories, comunicación personal, 1993. In: S. McArthur (ed.). Veterinary management of tortoises and turtles. Blackwell Science Ltd.: 117.  
3: RAPHAEL, 2003  
4: WANG *ET AL.*, 1999  
5: FRYE, 1994  
6: WALLACH Y BOEVER, 1983  
7: JACKSON, 1991  
8: BRENNER *ET AL.*, 2002  
9: ROSSKOPF, 1982  
10: TAYLOR Y JACOBSON, 1982  
11: Clinical laboratory normals: California desert tortoise. PAL News, Winter 1992-1993: 7  
12: SAMOUR *ET AL.*, 1986  
13: STEIN, 1996  
14: ALTMAN Y DITTMER, 1964  
15: MATHES *ET AL.*, 2005  
16: MURO *ET AL.*, 1998  
17: LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003  
18: GOTTDENKER Y JACOBSON, 1995  
19: BRADLEY *ET AL.*, 1998  
20: FRAIR, UNPUBLISHED, 1964  
21: THORSON, 1968  
22: DESSAUER, 1970  
23: JACOBSON, *ET AL.*, 2004 (datos de Agosto del 2004)  
24: LUTZ Y DUNBAR-COOPER, 1987  
25: WHITMORE, 1994  
26: RAPHAEL, 2003  
27: GELLI *ET AL.*, 2004  
28: WANG *ET AL.*, 1999  
29: NORTON *ET AL.*, 1990  
30: MONTILLA *ET AL.*, 2006  
31: LUTZ, 1990  
32: MCGEHEE, 1979  
33: WHITAKER Y KRUM, 1999  
34: MOHANTY-HEJMADI *ET AL.*, 1984  
35: FRAIR, 1977A  
36: YANG *ET AL.*, 2014 (Valores obtenidos tras sacar la media de los registros de diferentes estaciones)  
37: GRIONI *ET AL.*, 2014

## 2.6.2.- El Nivel de Hemoglobina de los Quelonios

En la Tabla 2.37 se exponen los niveles de hemoglobina de varias especies de quelonios.

**Tabla 2.37.** Valores de hemoglobina en algunas especies de quelonios

Especie	Hb (g/dL)
Quelonios <sup>1</sup>	12-18
<b>Familia Testudinidae</b>	
<b>Tortugas terrestres</b>	
<i>Geochelone radiata</i> <sup>2</sup> (cautivas)	6.7
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>5</sup> (machos)	10.2
<i>Terrapene carolina major</i> <sup>3</sup>	5.9
<i>Testudo graeca</i> y <i>Testudo hermanni</i> <sup>3</sup>	10.1-11.3 (primavera) 9.1-9.5 (verano)
<i>Testudo hermanni</i> <sup>4</sup>	10.1 (invierno) 9.3 (verano)
<b>Tortugas marinas</b>	
<i>Caretta caretta</i> <sup>6</sup> , edad:4 meses	5.28
<i>Caretta caretta</i> <sup>6</sup> , edad:5 meses	5.19
<i>Caretta caretta</i> <sup>6</sup> , edad:6 meses	5.80
<i>Caretta caretta</i> <sup>6</sup> , edad:7 meses	5.42
<i>Caretta caretta</i> <sup>6</sup> , edad:8 meses	6.25
<i>Caretta caretta</i> <sup>6</sup> , edad:9 meses	6.20
<i>Caretta caretta</i> <sup>7-8</sup>	4.7
<i>Caretta caretta</i> <sup>9</sup>	4.7
<i>Caretta caretta</i> <sup>10</sup>	9.82
<i>Caretta caretta</i> <sup>11</sup>	10.1
<i>Chelonia mydas</i> <sup>9</sup>	6.6
<i>Lepidochelys olivacea</i> <sup>9</sup>	3.8
<b>Tortugas de agua dulce</b>	
<i>Cuora flavomarginata</i> <sup>12</sup>	Machos(8.16), henbras (6.72)

1: Grange Laboratories, comunicación personal, 1993. In: S. McArthur (ed.). Veterinary management of tortoises and turtles. Blackwell Science Ltd.: 117

2: RAPHAEL, 2003

3: JACKSON, 1991

4: HEARD *ET AL.*, 2004

5: DICKINSON *ET AL.*, 2002

6: BRADLEY *ET AL.*, 1998

7: FRAIR, unpublished, 1964

8: THORSON, 1968

9: DESSAUER, 1970

10: KELLER *ET AL.*, 2004

11: BOLTEN *ET AL.*, 1992

12: YANG *ET AL.*, 2014 (Valores obtenidos tras sacar la media de los registros de diferentes estaciones)

### 2.6.3.- Índices Eritrocitarios de los Quelonios

En la Tabla 2.38 se exponen los valores de los índices eritrocitarios de varias especies de quelonios.

**Tabla 2.38.** Índices eritrocitarios en algunas especies de quelonios

<i>Especie</i>	MCV (fl)	MCHC (gm/dL)	MCH (pg)
Quelonios <sup>1</sup>	59-77	30-36	20-26
<b>Familia Testudinae</b>			
<b>Tortugas terrestres</b>			
<i>Terrapene carolina</i> <sup>2</sup>	309-587		79-131
<i>Testudo graeca</i> <sup>3</sup>	416 (invierno) 427 (verano)	29.8 (invierno) 32.2 (verano)	124 (invierno) 137 (verano)
<i>Testudo hermanni</i> <sup>3</sup>	402 (invierno) 426 (verano)	31.1 (invierno) 32.2 (verano)	124 (invierno) 137 (verano)
<i>Testudo hermanni</i> <sup>4</sup>	514.8	26.32	122.64
<b>Tortugas marinas</b>			
<i>Caretta caretta</i> <sup>5</sup>	277.9		
<i>Chelonia mydas</i> <sup>6</sup>	730.17		
<i>Chelonia mydas</i> <sup>7</sup>	725	198.18	27.50
<b>Tortugas de agua dulce</b>			
<i>Cuora flacomarginata</i> <sup>8</sup>	389.5(Hembras) 371.25(Machos)	25.5(Hembras) 26.5(Machos)	97.5(Hembras) 97.25(Machos)

1: Grange Laboratories, comunicación personal, 1993. In: S. McArthur (ed.). Veterinary management of tortoises and turtles. Blackwell Science Ltd.: 117

2: WALLACH Y BOEVER, 1983

3: HEARD *ET AL.*, 2004

4: MURO *ET AL.*, 1998

5: GELLI *ET AL.*, 2004

6: MONTILLA *ET AL.*, 2006

7: AGUIRRE *ET AL.*, 1995

8: YANG *ET AL.*, 2014 (Valores obtenidos tras sacar la media de los registros de diferentes estaciones)

### 2.6.4.- Recuento Total de Eritrocitos y Leucocitos de los Quelonios

Debido a su condición de animales ectotérmicos los quelonios están sometidos a una serie de variaciones cíclicas anuales, dependientes de la temperatura ambiente, el fotoperíodo y de variaciones hormonales (MURO *ET AL.*, 1994).

En los quelonios, al igual que en el resto de los reptiles, se han descrito variaciones estacionales en el recuento de eritrocitos (KAPLAN, 1960; PIENAAR, 1962; SHEELER Y BARBER, 1964; STENROSS Y BOWMAN, 1968; DUGUY, 1970; SEMPLE *ET AL.*, 1970; ROSSKOPF, 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; HART *ET AL.*, 1991). En el período invernal suelen observarse los mayores recuentos totales de eritrocitos, así como la mayor concentración de hemoglobina. En el período postinvernal (marzo-abril) se aprecia una disminución en el recuento de eritrocitos, mientras que en el período preinvernal (principios de septiembre a finales de octubre) hay un aumento del recuento total de eritrocitos y un aumento de la concentración de hemoglobina (DUGUY,

1970). De forma opuesta, en la tortuga de caja china (*Cuora flavomarginata*) dichos valores son superiores en verano (YANG ET AL., 2014).

También se observa una disminución significativa de estos valores hematológicos durante el período invernal en *Gopherus agassizii*, siendo dichas variaciones estacionales más acentuadas en las hembras que en los machos (CHRISTOPHER ET AL., 1999). Según DICKINSON ET AL. (2002) los cambios observados en esta especie ocurren en respuesta a la disponibilidad estacional de agua y alimento, llegando a variar en sucesivos años. Todo lo contrario afirman O'CONNOR ET AL. (1994), quienes en sus investigaciones con esta especie de tortuga no hallaron variaciones de los parámetros sanguíneos en función de la época del año.

En las tortugas mora (*Testudo graeca*) y mediterránea (*Testudo hermanni*) las variaciones estacionales se corresponden con descensos del número de eritrocitos desde finales de marzo hasta junio, permaneciendo después estables hasta el mes de octubre. En noviembre se cita un ligero incremento en el número de eritrocitos (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986), seguido de un descenso en el mes de diciembre (GILLES-BAILLIEN, 1973; LAWRENCE Y HAWKEY, 1986).

En la tortuga terrestre argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*) se ha descrito también un aumento de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina en el período invernal, con una disminución durante el período estival (TROIANO Y SILVA, 1998).

Existen dos teorías para explicar las posibles causas del aumento del recuento de eritrocitos, del hematocrito y de la concentración de hemoglobina que experimentan algunos quelonios durante la hibernación. Por un lado, se cree que la deshidratación resultante de la hibernación y el menor consumo de alimentos y agua determinan una disminución del plasma, con secuestro de líquidos en el intersticio y un aumento del recuento de eritrocitos y hematocrito (TROIANO Y SILVA, 1998). STENROSS Y BOWMAN (1968) y FRAIR (1977A) observaron este hecho en varias especies de tortugas, como *Chelydra serpentina*, *Lysemmys punctata*, *Trachemys scripta* y la tortuga de estanque moteada (*Emydoidea blandingii*). Otra teoría propone que el aumento de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina en la época invernal se debe a un estímulo de la eritropoyetina en respuesta a la caída de la tensión de oxígeno mientras el animal hiberna (GAUMMER Y GOODNIGHT, 1957; DUGUY, 1970). No existen evidencias directas que ratifiquen esta última hipótesis. La elevada vida media de los eritrocitos de las tortugas (BRACE Y ATLAND, 1955) y la baja probabilidad de que suceda una fuerte eritropoyesis activa durante el estado de reposo conlleva a afirmar que esta hipótesis no es acertada (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986).

En cuanto a las variaciones en el recuento eritrocitario asociadas al sexo, se suele observar un mayor número de eritrocitos en el macho (DUGUY, 1970; PALOMEQUE ET AL. 1977). Así sucede en la tortuga de caja común (*Terrapene carolina*) (DUGUY, 1970), la tortuga mordedora de Nueva Guinea (*Elseya novaeguineae*) (ANDERSON ET AL., 1997), la tortuga gigante de Aldabra (*Geochelone gigantea*) (HART ET AL., 1991), *Gopherus agassizii* (O'CONNOR ET AL., 1994; CHRISTOPHER ET AL., 1999) y *Cuora flavomarginata* (YANG ET AL., 2014). En contraste, no se encuentra variación debida al sexo en el recuento eritrocitario de los adultos de la tortuga de las grietas (*Malacochersus tornieri*) y la tortuga del desierto común (*Gopherus polyphemus*) (TAYLOR Y JACOBSON, 1982; RAPHAEL ET AL., 1994), ni en los ejemplares jóvenes y adultos de *Chelonoidis chilensis chilensis* (TROIANO Y SILVA, 1998).

Se han descrito variaciones en el recuento eritrocitario asociadas a la edad en algunos quelonios, observándose mayores recuentos de eritrocitos en los adultos (DUGUY,

1970). Sin embargo, algunos quelonios, como *Chelonoidis chilensis chilensis* no muestran dicha variación (TROIANO Y SILVA, 1998).

Algunos autores también han hallado variaciones en el recuento eritrocitario asociadas al tamaño del individuo. Así, FRAIR (1977A) en sus investigaciones sobre la tortuga malaya (*Malayemys spixii*) observó una relación directamente proporcional entre el recuento de eritrocitos, el hematocrito y el tamaño de los ejemplares.

El estrés se ha mostrado como un factor influyente en el descenso de los niveles de hematocrito en quelonios (DUGGAN, 1981; MOBERG, 1985; MAHAPATRA ET AL., 1991; KREGER Y MENCH, 1993; AGUIRRE ET AL., 1995). Dicho estrés puede presentarse de forma aguda (por captura) o crónica (por enfermedad) (AGUIRRE ET AL., 1995).

Las alteraciones patológicas en el recuento total de eritrocitos pueden producirse por defecto (anemia) o exceso (policitemia) (MURO ET AL., 1994). Los eritrocitos de las tortugas tienen una vida media muy larga (FRYE, 1991) por lo que no desarrollan fácilmente anemias asociadas a inflamaciones orgánicas crónicas (MURO ET AL., 1994). La presencia de anemia en un quelonio puede ser artefactual, debida a una hemodilución linfática de la muestra, o asociarse a anorexia post-hibernación, pobres condiciones nutricionales y ambientales, pérdida de sangre, eritrolisis (autoinmune o inducida por hemoparásitos) o deberse a una enfermedad crónica (MCARTHUR ET AL., 2002).

El recuento total de eritrocitos (RBC) de los quelonios suele estar comprendido en el rango de  $0.154-0.980 \times 10^6/\mu\text{l}$ , dependiendo de la especie y de la época del año (RAPHAEL, 2003). En general, el recuento total de leucocitos (WBC) en los quelonios es de 8000-9000/ $\mu\text{l}$  posthibernación y aproximadamente 6000-7000/ $\mu\text{l}$  antes de la hibernación (MCARTHUR, 1996). Como nota relevante, en estudios en tortugas marinas se ha evidenciado que el método de recuento de WBC influye en el resultado. Así, los recuentos realizados con el método Natt & Herrick superaron en cuantía a los realizados con el método Unopette en un rango del 38.5% (ARNOLD, 1994). RASKIN (2000) recomienda no usar el método Unopette.

En la Tabla 2.39 se exponen los valores de RBC y recuento total de leucocitos (WBC) en varias especies de quelonios.

**Tabla 2.39.** Valores de WBC y RBC en varias especies de quelonios

Especie	RBC ( $\times 10^5/\mu\text{l}$ )	WBC ( $/\mu\text{l}$ )
Quelonios <sup>1</sup>	15-25	3000-8000
Quelonios <sup>2</sup>	0.055-0.085	6000-15000
<b>Familia Testudinidae</b>		
<b>Tortugas terrestres</b>		
<i>Geochelone</i> sp. <sup>4</sup>	4.0	3400
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>5,6</sup>	1.20-3.0	6600-8900
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>7</sup>	5-9	3100-9300
<i>Gopherus polyphemus</i> <sup>8</sup>	5.4	15700
<i>Terrapene carolina</i> <sup>3</sup>	0.65	7500
<i>Terrapene carolina</i> <sup>9,10</sup>	3.0-8.0	7500
<i>Terrapene carolina</i> <sup>3</sup>	2.7-8.3	7500
<i>Testudo graeca</i> y <i>Testudo hermanni</i> <sup>7</sup>	8.2-9.6 (primavera) 6.7 (verano)	
<i>Testudo hermanni</i> <sup>11</sup>	4.9	7240
<i>Testudo hermanni</i> <sup>12</sup>	8.3 (invierno) 9.6 (primavera) 6.7 (verano)	10800 (invierno) 7700 (primavera) 9800 (verano)
<i>Testudo marginata</i> <sup>13</sup>	3.4	2770
<i>Testudo radiata</i> <sup>14</sup>	5.0	4300
<b>Tortugas marinas</b>		
<i>Caretta caretta</i> <sup>15</sup>	3.9	14670
<i>Caretta caretta</i> <sup>16</sup>	13	3900
<i>Caretta caretta</i> <sup>17</sup>		3800-3900
<i>Chelonia mydas</i> <sup>18</sup>	6.1	12066
<i>Chelonia mydas</i> <sup>19</sup>	4.2	6160
<i>Chelonia mydas</i> <sup>20</sup>	3.4	2000-3900
<i>Lepidochelys kempi</i> <sup>21</sup>		5700-9500
<b>Tortugas de agua dulce</b>		
<i>Cuora flavomarginata</i> <sup>22</sup>	8.6(Machos)-7.1(Hembras)	3852(Machos)-4186(Hembras)

- 1: University of Miami, Avian and Wildlife Laboratory. 1996. In: Exotic companion medicine handbook for veterinarians, 2: 6  
 2: Grange Laboratories, comunicación personal, 1993. In: S. McArthur (ed.). Veterinary management of tortoises and turtles. Blackwell Science Ltd.: 117  
 3: WALLACH Y BOEVER, 1983  
 4: WANG ET AL., 1999  
 5: ROSSKOPF, 1982  
 6: TAYLOR Y JACOBSON, 1982  
 7: Clinical laboratory normals: California desert tortoise. PAS News, Winter 1992-1993:7  
 8: SAMOUR ET AL., 1986  
 9: FRYE, 1994  
 10: STEIN, 1996  
 11: MURO ET AL., 1998  
 12: HEARD ET AL., 2004  
 13: LÓPEZ-OLVERA ET AL., 2003  
 14: GOTTDENKER Y JACOBSON, 1995  
 15: RAPHAEL, 2003  
 16: GELLI ET AL., 2004  
 17: BRADLEY ET AL., 1998; TURNBULL ET AL., 2000  
 18: NORTON ET AL., 1990  
 19: MONTILLA ET AL., 2006  
 20: WOOD Y EBANKS, 1984  
 21: TURNBULL ET AL., 2000  
 22: YANG ET AL, 2014 (Valores obtenidos tras sacar la media de los registros de diferentes estaciones)

## 2.6.5.- Recuento de Trombocitos de los Quelonios

La trombocitosis está asociada a la liberación de grandes cantidades de trombocitos desde la médula ósea y el bazo en hemorragias como parte del mecanismo de coagulación, o en presencia de infecciones bacterianas por su capacidad fagocitaria (MURO *ET AL.*, 1994).

La trombocitopenia aparece fundamentalmente tras la anemia grave (FRYE, 1991; WILKINSON, 2004) por transformación de los trombocitos maduros en células capaces de transportar hemoglobina, y también en las enfermedades mieloproliferativas (FRYE, 1991).

En la Tabla 2.40 se exponen los recuentos de trombocitos en algunas especies de quelonios.

**Tabla 2.40.** Recuento de trombocitos en algunas especies de quelonios

Especie	Trombocitos/ $\mu$ L
<i>Geochelone pardalis</i> <sup>1</sup>	95*
<i>Testudo hermanni</i> <sup>2</sup>	10000-19000
<i>Testudo hermanni</i> y <i>Testudo graeca</i> <sup>3</sup>	8500-38100
<i>Chelonoidis chilensis chilensis</i> <sup>4</sup>	13000
<i>Caretta caretta</i> <sup>5</sup>	46000 (30000-60000)
<i>Chelonia mydas</i> <sup>6</sup>	36*

\*Por 100 leucocitos

1: PIENAAR, 1962; FRYE, 1991.

2: BOURDEAU, 1989; FRYE, 1991.

3: LAWRENCE Y HAWKEY, 1986. En el mes de Enero

4: TROIANO Y SILVA, 1998. En invierno

5: BRADLEY *ET AL.*, 1998

6: WOOD Y EBANKS, 1984

## 2.6.6.- Recuento Diferencial Leucocitario de los Quelonios

Los estudios realizados en *Cuora flavomarginata* demuestran que los machos de esta especie presentan recuentos significativamente mayores de eosinófilos en comparación con las hembras, mientras que éstas presentan un mayor número de monocitos. A su vez, el nivel de monocitos es menor durante el verano para ambos sexos (YANG *ET AL.*, 2014).

### -Neutrófilo

Algunos autores han descrito la presencia de neutrófilos en tortugas marinas, como *Caretta caretta* (GEORGE, 1996) y *Chelonia mydas* (WOOD Y EBANKS, 1984; AGUIRRE *ET AL.*, 1995).

El neutrófilo de *Chelonia mydas* es el leucocito menos numeroso en el recuento diferencial (WOOD Y EBANKS, 1984; AGUIRRE *ET AL.*, 1995) aunque suele observarse un aumento de su número asociado al estrés, tanto agudo como crónico (AGUIRRE *ET AL.*, 1995). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos autores sólo usaron microscopía óptica para la identificación de los diferentes leucocitos. WORK *ET AL.* (1998) en base a

estudios ultraestructurales y citoquímicos suponen que los neutrófilos descritos por WOOD Y EBANKS (1984) en esta especie se corresponden con los eosinófilos grandes degranulados hallados en sus investigaciones.

### **-Heterófilo**

Los heterófilos de *Testudo graeca* (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986), *Testudo hermanni* (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; BOURDEAU, 1989; FRYE, 1991), *Testudo radiata* (MARKS Y CITINO, 1990), la tortuga terrestre de cuello largo (*Chelodina longicollis*) (HAIGH, 1991), *Geochelone gigantea* (SAMOUR ET AL., 1986), *Caretta caretta* (ARNOLD, 1994; BRADLEY ET AL., 1998; SMITH ET AL., 2000; CASAL Y ORÓS, 2007) y *Cuora flavomarginata* (YANG ET AL., 2014) representan el leucocito más numeroso en el recuento diferencial leucocitario. Asimismo, los heterófilos de *Gopherus agassizii* representan los leucocitos más numerosos en la mayoría de los ejemplares estudiados (ALLEMAN ET AL., 1992; GOTTDENKER Y JACOBSON, 1995; CHRISTOPHER ET AL., 1999; DICKINSON ET AL., 2002), siendo sus valores superiores a los citados para *Testudo radiata* (ROSSKOPF, 1982). Sin embargo, otros autores numeran en último lugar al heterófilo de *Gopherus agassizii* (DESSAUER, 1970; WALLACH Y BOEVER, 1983). En contraste, los heterófilos de *Chelonoidis chilensis chilensis* (TROIANO Y SILVA, 1998), *Terrapene carolina* (DESSAUER, 1970; WALLACH Y BOEVER, 1983; STEIN, 1996), *Gopherus polyphemus* (TAYLOR Y JACOBSON, 1982) y *Testudo marginata* (LÓPEZ-OLVERA ET AL., 2003) representan el segundo leucocito dominante en el recuento celular, similar a lo observado por otros autores (PIENAAR, 1962; SHEELER Y BARBER, 1964; STENROSS Y BOWMAN, 1968; SEMPLE ET AL., 1970; FRAIR, 1972; ROSSKOPF, 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; HART ET AL., 1991). En *Chelonia mydas*, dependiendo del autor citado, los heterófilos constituyen el tercer leucocito más numeroso (WORK ET AL., 1998), el segundo (AGUIRRE ET AL., 1995), o el primer leucocito más abundante (NORTON ET AL., 1990). En *Lepidochelys kempii* los heterófilos son poco numerosos, estando precedidos por los eosinófilos y los linfocitos (CANNON, 1992). En el caso de la tortuga marrón de río (*Kachuga smithi*) JAVAID Y SHARIF (1972) no encontraron heterófilos.

Algunos autores describen la aparición de heteropenia durante el período de hibernación en quelonios y otros reptiles (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; SAAD Y EL RIDI, 1988). Así, en *Testudo graeca* y *Testudo hermanni* se observa un moderado descenso del número de heterófilos entre los meses de enero y marzo (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986). Sin embargo, la heteropenia en reptiles suele describirse en enfermedades virales masivas (ROSSKOPF, 2000), y algunos autores la asocian a inmunosupresión (NEIFFER ET AL., 2005).

En *Chelonoidis chilensis chilensis* no se hallan diferencias significativas en el número de heterófilos en asociación con las variables época del año, edad o sexo (TROIANO Y SILVA, 1998). Tampoco en *Gopherus agassizii* en relación con las variables estación del año, sexo y zona de muestreo (CHRISTOPHER ET AL., 1999; DICKINSON ET AL., 2002).

Existen variaciones en el recuento de heterófilos en respuesta a procesos patológicos. Así, se desarrolla una heterofilia de aparición rápida ante inflamaciones e infecciones bacterianas, llegando incluso a multiplicarse los recuentos de heterófilos por cinco (FRYE, 1991).

En *Chelonia mydas* se observa una marcada heterofilia en los análisis sanguíneos realizados a las 24 horas de la captura de los ejemplares silvestres (AGUIRRE ET AL., 1995). Este fenómeno se ha descrito también en otros reptiles (LANCE, 1990; HAJDUK ET AL.,



1992). Los ratios heterófilo/linfocito representan una medida del estrés crónico en algunas especies (GROSS Y SIEGEL, 1983). Este ratio es menos variable que los números absolutos y tiene una correlación positiva con los niveles de corticosterona. Las tortugas verdes estresadas de forma crónica muestran un incremento significativo de este ratio, así como una correlación positiva con el aumento de corticosterona (AGUIRRE ET AL., 1995).

En general, la heterofilia puede ser estacional, principalmente durante la época estival, o bien debida a inflamación o infección, estrés, trauma o neoplasia. Así, las crías de *Caretta caretta* que resultan localmente lesionadas durante la extracción de sangre exhiben una respuesta inflamatoria que resulta en leucocitosis con heterofilia y linfopenia (BRADLEY ET AL., 1998), similar a la respuesta observada en otros reptiles (MITCHELL, 1996). Sin embargo, puede no observarse heterofilia en una enfermedad infecciosa. En algunas enfermedades virales o bacterianas el recuento de heterófilos puede ser bajo o normal. Los cambios tóxicos suponen un hallazgo importante en estos casos (WILKINSON, 2004).

### **-Eosinófilo**

El número de eosinófilos en las distintas especies de quelonios es muy variable. Generalmente se considera que las tortugas tienen una mayor cantidad de eosinófilos circulantes que los lagartos puesto que algunos quelonios presentan más de un 20% de eosinófilos en el recuento diferencial leucocitario (TAYLOR Y KAPLAN, 1961; DUGUY, 1970; WOOD Y EBANKS, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; JACOBSON ET AL., 1990; MARKS Y CITINO, 1990; WRIGHT Y SKEBA, 1992; RASKIN, 2000). Hay autores que consideran que la fórmula leucocitaria de los quelonios tiene un porcentaje aun mayor de eosinófilos (31-33%) (PIENAAR, 1962; SHEELER Y BARBER, 1964; STENROSS Y BOWMAN, 1968; SEMPLE ET AL., 1970; FRAIR, 1972; ROSSKOPF, 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; HART ET AL., 1991). Esto es especialmente cierto para *Chelonoidis chilensis chilensis*, especie en la que el eosinófilo es la célula más numerosa del recuento diferencial leucocitario (TROIANO Y SILVA, 1998).

Los eosinófilos de *Testudo radiata* (MARKS Y CITINO, 1990), *Testudo graeca*, *Testudo hermanni* (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986) y *Testudo marginata* (LÓPEZ-OLVERA ET AL., 2003) representan el penúltimo leucocito en el recuento diferencial leucocitario, mientras que en *Chelodina longicollis* (HAIGH, 1991), *Gopherus agassizii* (ROSSKOPF, 1982; ALLEMAN ET AL., 1992; GOTTDENKER Y JACOBSON, 1995; CHRISTOPHER ET AL., 1999), *Elseya novaeguineae* (ANDERSON ET AL., 1997), *Geochelone* spp. (SAMOUR ET AL., 1986) y *Cuora flavomarginata* (YANG ET AL., 2014) generalmente constituyen el último leucocito. En *Caretta caretta* los eosinófilos representan el cuarto (BRADLEY ET AL., 1998; SMITH ET AL., 2000) o el tercer leucocito (ARNOLD, 1994; BRADLEY ET AL., 1998; CASAL Y ORÓS, 2007) en el recuento diferencial leucocitario, aunque algunos autores no los han identificado en sus recuentos (HARMS ET AL., 2000B). En *Chelonia mydas* constituyen el segundo (AGUIRRE ET AL., 1995; WORK ET AL., 1998; WORK Y BALAZS, 1999), tercer (AGUIRRE ET AL., 1995; WORK Y BALAZS, 1999), o bien, el tercer o cuarto leucocito (WOOD Y EBANKS, 1984). Sin embargo, en *Lepidochelys kempii* los eosinófilos grandes son los leucocitos más numerosos, mientras que los eosinófilos pequeños constituyen el tercer leucocito predominante (CANNON, 1992).

En algunas especies de quelonios se han descrito diferencias intersexuales en el recuento de eosinófilos. Es el caso de la tortuga negra (*Chelonia mydas agassizii*), en la que el número de eosinófilos del macho es inferior al de la hembra (GRUMBLES ET AL., 1990) o *Cuora flavomarginata*, especie en la que ocurre justamente lo contrario (YANG ET

AL., 2014).

Se han citado también variaciones estacionales en el recuento de eosinófilos en los quelonios. En el período invernal (principios de noviembre a finales de febrero) se observa un incremento de su número, disminuyendo su recuento al llegar el período primaveral (mayo-junio) (DUGUY, 1970; MCARTHUR *ET AL.*, 2002). Ese es el caso de *Testudo graeca* y *Testudo hermanni* (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986).

En *Gopherus agassizii* no se observa variación estacional en el recuento de eosinófilos durante el período de hibernación, pero sí se nota un descenso en su recuento al instaurarse la estación otoñal (ALLEMAN *ET AL.*, 1992; CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999). Sin embargo, según DICKINSON *ET AL.* (2002), no existe variación en el número de eosinófilos según la estación del año, como se ha constatado en *Chelonoidis chilensis chilensis*, especie en la que no se citan variaciones en el recuento eosinófilo en relación con la estación, edad o sexo (TROIANO Y SILVA, 1998).

ROSSKOPF (2000) utiliza los eosinófilos como indicadores del potencial de infestación parasitaria, especialmente ante los parásitos digestivos, ya que la respuesta frente a la infestación por parásitos sanguíneos es variable.

En respuesta a una estimulación antigénica suele incrementarse el número de eosinófilos (FRYE, 1991). Al poseer actividad fagocitaria, los eosinófilos tienden a aumentar en determinadas infecciones bacterianas. También se observa eosinofilia en las parasitosis y en los procesos alérgicos (MURO *ET AL.*, 1994).

En general, la eosinofilia puede ser un fenómeno estacional (sobre todo en invierno, durante la hibernación) (WILKINSON, 2004), o bien deberse a una parasitosis (ROSSKOPF, 1982) o a algún proceso inflamatorio (WILKINSON, 2004).

En *Chelonia mydas* se ha observado eosinopenia (AGUIRRE *ET AL.*, 1995), probablemente ocasionada por el estrés inducido tras la captura (LANCE, 1990; HAJDUK *ET AL.*, 1992). Además, los individuos afectados de fibropapilomatosis también manifiestan eosinopenia (AGUIRRE *ET AL.*, 1995; WORK Y BALAZS, 1999), siendo más intensa en función de la gravedad de los tumores (WORK Y BALAZS, 1999). Se da la circunstancia de que la mayoría de las tortugas verdes con fibropapilomatosis presentan infestación por trematodos vasculares (AGUIRRE *ET AL.*, 1995; DAILEY Y MORRIS, 1995; GRACZYK *ET AL.*, 1995; ADNYANA *ET AL.*, 1997; WORK Y BALAZS, 1998, 1999). Las tortugas responden a estos trematodos vasculares con linfocitos o eosinófilos (GLAZEBROOK *ET AL.*, 1981; AGUIRRE *ET AL.*, 1995; WORK Y BALAZS, 1998), que son secuestrados en los tejidos. Este fenómeno podría explicar la eosinopenia observada en estas tortugas (WORK Y BALAZS, 1999).

### **-Basófilo**

Algunas especies de quelonios pueden presentar más de un 50% de basófilos en su recuento diferencial leucocitario (MICHELS, 1923; MEAD *ET AL.*, 1983; SYPEK *ET AL.*, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988).

En *Chelodina longicollis* (HAIGH, 1991), *Testudo hermanni* (BOURDEAU, 1989; FRYE, 1991), *Gopherus agassizii* (ROSSKOPF, 1982; GOTTDENKER Y JACOBSON, 1995; DICKINSON *ET AL.*, 2002), *Testudo radiat* (MARKS Y CITINO, 1990) y *Cuora flavomarginata* (YANG *ET AL.*, 2014) los basófilos representan el tercer leucocito más numeroso. Sin

embargo, otros autores (ALLEMAN *ET AL.*, 1992; CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999) otorgan un segundo lugar en el recuento diferencial a los basófilos de *Gopherus agassizii*. En *Gopherus polyphemus* (TAYLOR Y JACOBSON, 1982) y *Geochelone* spp. (SAMOUR *ET AL.*, 1986) los basófilos representan el penúltimo leucocito. Además, hay autores que no han hallado basófilos en sus investigaciones en *Testudo graeca*, *Testudo hermanni* (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986) y *Testudo marginata* (LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003).

Los basófilos de *Elseya novaeguineae* representan el cuarto leucocito del recuento diferencial leucocitario (ANDERSON *ET AL.*, 1997), mientras que en *Chelonoidis chilensis chilensis* (TROIANO Y SILVA, 1998) y *Terrapene carolina* (STEIN, 1996) los basófilos son los leucocitos menos numerosos.

En el caso de las tortugas marinas rara vez se encuentran basófilos (BACHERE, 1980; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; CANNON, 1992; ARNOLD, 1994; WORK *ET AL.*, 1998; RASKIN, 2000). Los basófilos de *Chelonia mydas* generalmente representan el penúltimo (WOOD Y EBANKS, 1984; AGUIRRE *ET AL.*, 1995) o el último leucocito (WORK Y BALAZS, 1999) en número, aunque WORK *ET AL.* (1998) y BACHERE (1980) han descrito a los basófilos como células raras en esta especie. Asimismo, NORTON *ET AL.* (1990) no hallaron basófilos en las tortugas verdes sanas estudiadas, pero sí en una tortuga enferma. En *Caretta caretta* los basófilos se contabilizan en último lugar en el recuento diferencial leucocitario (SMITH *ET AL.*, 2000), o bien, no se observan basófilos en la mayoría de las muestras sanguíneas estudiadas (ARNOLD, 1994; CASAL Y ORÓS, 2007) o no se citan en determinados recuentos diferenciales (HARMS *ET AL.*, 2000B). CANNON (1992) muy raramente halló basófilos en *Lepidochelys kempii*.

Se han descrito variaciones estacionales en el recuento de basófilos, observándose disminuciones de su número en el período invernal (DUGUY, 1970), tal como sucede en *Gopherus agassizii* (CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999). El menor número de basófilos durante la hibernación puede ser indicativo de un descenso en la función inmune o a una ausencia de estimulación antigénica, pero esta hipótesis no ha sido corroborada (CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999). Sin embargo, algunos autores como DICKINSON *ET AL.* (2002) no hallan variaciones estacionales en el recuento de estas células. Ocurre lo mismo con el recuento de basófilos de *Chelonoidis chilensis chilensis* en relación con las variables época del año, edad y sexo (TROIANO Y SILVA, 1998). En *Chelonia mydas* con fibropapilomatosis se observa un descenso progresivo en el número de basófilos a medida que aumenta la gravedad del proceso (WORK Y BALAZS, 1999).

Los basófilos tienden a aumentar rápidamente en los procesos inflamatorios (MURO *ET AL.*, 1994). Se observa un incremento en el número de basófilos en *Gopherus agassizii* con enfermedades crónicas, y en diversos quelonios con infestaciones parasitarias intestinales (MARTIN, 1972; ROSSKOPF, 2000) o infección por Haemogregarina (WILKINSON, 2004). Asimismo, se puede detectar un incremento de los basófilos en situaciones de estrés (ROSSKOPF, 1982), aunque la basofilia puede considerarse un proceso normal en algunas especies de quelonios (ROSSKOPF, 1982).

### **-Linfocito**

Los linfocitos de *Terrapene carolina* (FRYE, 1976, 1994; STEIN, 1996), *Gopherus polyphemus* (TAYLOR Y JACOBSON, 1982), *Elseya novaeguineae* (ANDERSON *ET AL.*, 1997), *Testudo marginata* (LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003), del galápagos de caparazón blando del Ganges (*Trionyx gangeticus*) (VERMA Y BANERJEE, 1980), *Lissemys punctata* y *Kachuga*

*smithi* (JAVAID Y SHARIF, 1972) son las células más numerosas del recuento diferencial leucocitario. En *Testudo radiata* (MARKS Y CITINO, 1990), *Testudo hermanni* (BOURDEAU, 1989; FRYE, 1991), *Testudo graeca* (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986), *Gopherus agassizii* (ROSSKOPF, 1982; GOTTDENKER Y JACOBSON, 1995; CHRISTOPHER ET AL., 1999; DICKINSON ET AL., 2002), *Chelodina longicollis* (HAIGH, 1991), *Geochelone* spp. (SAMOUR ET AL., 1986) y *Cuora flavomarginata* (YANG ET AL., 2014) representan el segundo leucocito más abundante. En cambio, ALLEMAN ET AL. (1992) otorgaron un tercer lugar a los linfocitos de *Gopherus agassizii*, lo mismo que sucede con los linfocitos de *Chelonoidis chilensis chilensis* (TROIANO Y SILVA, 1998).

En las tortugas marinas el recuento de linfocitos es variable, pero a menudo supera el 50% del recuento diferencial leucocitario (WORK ET AL., 1998). Los linfocitos de *Caretta caretta* generalmente representan el segundo leucocito dominante en el recuento diferencial leucocitario (ARNOLD, 1994; BRADLEY ET AL., 1998; SMITH ET AL., 2000; CASAL Y ORÓS, 2007). Lo mismo sucede en *Lepidochelys kempii* (CANNON, 1992). Sin embargo, en *Chelonia mydas* estas células suponen los leucocitos más numerosos (WOOD Y EBANKS, 1984; AGUIRRE ET AL., 1995; WORK ET AL., 1998; HARMS ET AL., 2000B), aunque NORTON ET AL. (1990) otorgan un segundo lugar para este leucocito en el recuento diferencial de la especie.

Se han descrito variaciones estacionales en el recuento linfocitario de los quelonios, observándose una disminución del número de linfocitos durante el período invernal y un ascenso en el período estival (DUGUY, 1970; WILKINSON, 2004). Este fenómeno se cita en algunos quelonios como *Gopherus agassizii* (CHRISTOPHER ET AL., 1999), especie en la que el recuento linfocitario también puede verse alterado de un año a otro dependiendo de las lluvias invernales (CHRISTOPHER ET AL., 1999; DICKINSON ET AL., 2002). En *Testudo graeca* los linfocitos también disminuyen entre los meses de enero y marzo, aumentando durante el período de mayor actividad del reptil (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986). También se citan variaciones en el recuento linfocitario debidas al sexo y a la edad del quelonio, observándose un incremento de linfocitos en las hembras y en los individuos jóvenes (DUGUY, 1970; WILKINSON, 2004), aunque otros estudios no observan cambios estadísticamente significativos en la fórmula leucocitaria en función de la edad, el sexo o la estación, como es el caso de *Chelonoidis chilensis chilensis* (TROIANO Y SILVA, 1998).

La linfocitosis se asocia con la inflamación, los procesos de cicatrización, el parasitismo, la leucemia y la estimulación inmune (FRYE, 1991; WILKINSON, 2004).

La linfopenia patológica está asociada a una disminución de la capacidad de respuesta inmunitaria por parte del animal, tanto por condiciones ambientales adversas, como por la utilización de glucocorticoides o fármacos inmunosupresores (MURO ET AL., 1994). La linfopenia puede observarse en condiciones de estrés (LANCE, 1990; HAJDUK ET AL., 1992; AGUIRRE ET AL., 1995) y de hipotermia (SMITH ET AL., 2000). Por tanto, la linfopenia observada durante la hibernación evidencia una supresión de la función inmune y de la producción de anticuerpos, secundaria a la baja temperatura ambiental, alteraciones en el fotoperíodo y elevación de los niveles de cortisol plasmático (SAAD, 1988; MONTALI, 1988; WILKINSON, 2004). La linfopenia también puede observarse en tortugas de tierra que presentan diversas patologías y en los procesos de anorexia/malnutrición y enfermedades linfoproliferativas (WILKINSON, 2004).

En las tortugas marinas la linfopenia puede detectarse bajo condiciones de estrés (LANCE, 1990; HAJDUK ET AL., 1992; AGUIRRE ET AL., 1995) y de hipotermia (SMITH ET AL., 2000), así como en presencia de fibropapilomatosis (AGUIRRE ET AL., 1995; VARELA, 1997; WORK Y BALAZS, 1999), siendo indicativa de supresión y/o inhibición del sistema inmune (AGUIRRE ET AL., 1995). Cabe destacar que las tortugas *Chelonia mydas* con

fibropapilomatosis muestran un incremento del ratio heterófilo/linfocito cuando se agrava la enfermedad (WORK *ET AL.*, 2001).

### **-Monocito**

En *Terrapene carolina* (STEIN, 1996), *Gopherus polyphemus* (TAYLOR Y JACOBSON, 1982) y *Geochelone* spp. (SAMOUR *ET AL.*, 1986) los monocitos representan la tercera célula más numerosa del recuento diferencial leucocitario. Sin embargo, en *Testudo radiata* (MARKS Y CITINO, 1990), *Testudo graeca* (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986) y *Testudo marginata* (LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003) son los leucocitos menos abundantes. Tanto los monocitos como los eosinófilos de *Gopherus agassizii* (ROSSKOPF, 1982), *Testudo hermanni* (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; BOURDEAU, 1989; FRYE, 1991) y *Elseya novaeguineae* (ANDERSON *ET AL.*, 1997) se consideran los leucocitos menos abundantes del recuento diferencial. Sin embargo, otros autores otorgan un penúltimo (CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999; DICKINSON *ET AL.*, 2004) o un cuarto lugar (ALLEMAN *ET AL.*, 1992; GOTTDENKER Y JACOBSON, 1995) para los monocitos de *Gopherus agassizii*. Asimismo, los monocitos de *Chelonoidis chilensis chilensis* (TROIANO Y SILVA, 1998) y de *Cuora flavomarginata* (YANG *ET AL.*, 2014) son los penúltimos leucocitos en el recuento diferencial leucocitario.

Algunos autores no han hallado monocitos en la sangre de *Chelonia mydas* (WOOD Y EBANKS, 1984; AGUIRRE *ET AL.*, 1995) o de *Lepidochelys kempii* (CANNON, 1992). Otros autores no han observado monocitos en *Caretta caretta*, salvo ocasionalmente (aproximadamente en un 23% de las muestras) (ARNOLD, 1994). Sin embargo, para otros autores (WORK *ET AL.*, 1998; WORK Y BALAZS, 1999) los monocitos de *Chelonia mydas* representan el penúltimo leucocito en el recuento diferencial leucocitario, o bien, el tercer leucocito (NORTON *ET AL.*, 1990). De igual manera, hay autores que en *Caretta caretta* han clasificado a los monocitos como tercera célula (HARMS *ET AL.*, 2000B; SMITH *ET AL.*, 2000), o bien, tercera o cuarta célula (BRADLEY *ET AL.*, 1998; CASAL Y ORÓS, 2007).

En *Gopherus polyphemus* se ha citado un aumento de los monocitos durante la primavera (TAYLOR Y JACOBSON, 1982). Según CHRISTOPHER *ET AL.* (1999) los monocitos de *Gopherus agassizii* incrementan su número durante la hibernación. Sin embargo, DICKINSON *ET AL.* (2002) no encontraron variación estacional en el número de monocitos de esta especie. En *Cuora flavomarginata* se ha observado un porcentaje mayor de monocitos en las hembras en comparación con los machos, disminuyendo los niveles de este leucocito en el verano (YANG *ET AL.*, 2014). Sin embargo, muchos autores consideran que el recuento de monocitos no está influenciado por factores estacionales (DUGUY, 1970; TROIANO Y SILVA, 1998; RASKIN, 2000).

En general, la monocitosis puede presentarse en la infección aguda o crónica y la inflamación (WILKINSON, 2004). Está presente en los procesos infecciosos crónicos (necrosis tisulares, procesos supurativos) y en las infecciones víricas (poxvirus) y clamidiasis (MURO *ET AL.*, 1994), soliendo asociarse con la presencia de granulomas (AGUIRRE *ET AL.*, 1995). En tortugas marinas la monocitosis puede diagnosticarse al principio de la rehabilitación de ejemplares hipotérmicos de *Caretta caretta*, *Chelonia mydas* y *Lepidochelys kempii* (TURNBULL *ET AL.*, 2000). En tortugas verdes con fibropapilomatosis se observa monocitosis, que se incrementa en función de la gravedad de la afección tumoral (WORK Y BALAZS, 1999), debido probablemente a la inflamación crónica (CAMPBELL, 1996A). También se describe una disminución del ratio eosinófilo/monocito en estas tortugas a medida que se incrementa la gravedad de la fibropapilomatosis (WORK *ET AL.*, 2001).

**-Azurófilo**

Los azurófilos se han descrito en algunas especies de quelonios (HAWKEY Y DENNET, 1989; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; ANDERSON *ET AL.*, 1997; TROIANO Y SILVA, 1998; CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999; SMITH *ET AL.*, 2000; DICKINSON *ET AL.*, 2002). En la tortuga leopardo (*Geochelone pardalis*) y en *Elseya novaeguineae* (ANDERSON *ET AL.*, 1997) los azurófilos representan el tercer leucocito más numeroso (PIENAAR, 1962; FRYE, 1991). En *Testudo hermanni* los azurófilos son poco frecuentes, representando un 2% del recuento diferencial leucocitario (BOURDEAU, 1989; FRYE, 1991). Igual porcentaje presentan los monocitos azurófilos de *Gopherus agassizii* (ALLEMAN *ET AL.*, 1992). Los azurófilos de *Chelonoidis chilensis chilensis* (TROIANO Y SILVA, 1998) y *Gopherus agassizii* (CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999) representan el cuarto leucocito más abundante. En las tortugas marinas la mayoría de los autores no describen azurófilos (WOOD Y EBANKS, 1984; NORTON *ET AL.*, 1990; CANNON, 1992; AGUIRRE *ET AL.*, 1995; BRADLEY *ET AL.*, 1998; WORK *ET AL.*, 1998; WORK Y BALAZS, 1999; HARMS *ET AL.*, 2000B; WORK *ET AL.*, 2001; CASAL Y ORÓS, 2007). ARNOLD (1994) sólo encontró azurófilos en una de las muestras sanguíneas de *Caretta caretta* estudiadas, mientras que SMITH *ET AL.* (2000) sí hallaron azurófilos en *Caretta caretta*, siendo éstos y los basófilos, los leucocitos menos abundantes.

Algunos autores han descrito variaciones estacionales en el recuento de azurófilos, como sucede en *Gopherus agassizii*, especie en la que el número de estas células se incrementa durante la hibernación (CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999), si bien este hallazgo no se ha citado en otros estudios (DICKINSON *ET AL.*, 2002).

Aunque se desconoce la función concreta de los azurófilos (MONTALI, 1988; CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999), se ha afirmado que la azurofilia puede deberse a un proceso infeccioso y/o inflamatorio (WILKINSON, 2004).

**Tabla 2.41** Recuentos diferenciales leucocitarios de algunas especies de quelonios

Especie	Heterófilo (%)	Eosinófilo (%)	Basófilo (%)	Linfocito (%)	Monocito (%)	Azurófilo (%)	Neutrófilo (%)
Quelonios <sup>1</sup>	35-65	0-2	0-6	25-50	0-2		
<b>Familia testudinidae</b>							
<b>Tortugas terrestres</b>							
<i>Clemmys muhlenbergii</i> <sup>4</sup> , machos silvestres	22	1	15	48	5		
<i>Clemmys muhlenbergii</i> <sup>4</sup> , hembras silvestres	23	3	13	55	4		
<i>Geochelone</i> spp. <sup>5</sup>	71	0.5	2	22	2		
<i>Geochelone pardalis</i> <sup>6</sup>		58	4.6	29.8	2.0	5.2	
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>7</sup>	46-81	0-1	0-39	3-23	0-2		0-1
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>8,9</sup>	35-60	0-4	2-15	25-50	0-4		
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>2,3</sup>	0-3		2-15	25-50	0-4		

Especie	Heterófilo (%)	Eosinófilo (%)	Basófilo (%)	Linfocito (%)	Monocito (%)	Azurófilo (%)	Neutrófilo (%)
<i>Gopherus polyphemus</i> <sup>10</sup>	30		6	57	7		
<i>Terrapene carolina</i> <sup>11,12</sup>	11		8	56	9.4		
<i>Terrapene carolina</i> <sup>13</sup>		10.8*	8.0	56.1	9.4		0.3
<i>Terrapene carolina</i> <sup>2,3</sup>	11		8	56	9.4		
<i>Testudo graeca</i> <sup>14</sup>	66 (invierno) 58 (verano)	0.6 (invierno) 0.3 (verano)		33 (invierno) 41 (verano)	0.4 (invierno) 0.7 (verano)		
<i>Testudo hermanni</i> <sup>15</sup>	50.3	21.0	2.5	22.1	3.7		
<i>Testudo horsfieldi</i> <sup>16</sup>	0.372*	0.048*	0.050*	0.467*	0.012*	0.051*	
<i>Testudo marginata</i> <sup>17</sup>	33.3	8.7		55	0.7		
<i>Testudo radiata</i> <sup>18</sup>	0.68-3.42*	0.025-0.53*	0.1-0.94*	0.4-3.4*	0.025-0.47*		
<b>Tortugas agua dulce</b>							
<i>Cuora flavomarginata</i> <sup>19</sup>	2.2* M 2.6* H	0.016* M 0.007* H	0.36* M 0.39* H	1.21* M 1.00* H	0.086* M 0.182* H		
<b>Tortugas marinas</b>							
<i>Chelonia mydas</i> <sup>20</sup>	82.9	0.47		14.7	1.97		
<i>Chelonia mydas</i> <sup>21</sup>	55.8	4	2.5	33			7
<i>Chelonia mydas</i> <sup>22</sup>	1.4*	1.7*	0*	10*	0.8*		
<i>Chelonia mydas</i> <sup>23</sup>	1.26*	1.25*	0.08*	8.21*	1.08*		
<i>Chelonia mydas</i> <sup>24</sup>		14	9	69			6
<i>Caretta caretta</i> <sup>25</sup>	59.9	3.4	0.2	29.6	7.4	0.2	
<i>Caretta caretta</i> <sup>26</sup> , edad: 2 meses	76.3	2.1	0.2	18.7	2.7		
<i>Caretta caretta</i> <sup>27</sup> , edad: 12 meses	70.29	5.29	0.43	20.71	3.29		
<i>Caretta caretta</i> <sup>27</sup>	60.4	5	0.75	31	0.9	0.06	

\* x10<sup>3</sup>

“M”: Machos // “H”: Hembras

1: University of Miami, Avian and Wildlife Laboratory. 1996. In: Exotic companion medicine handbook for veterinarians, 2: 6

2: DESSAUER, 1970

3: WALLACH Y BOEVER, 1983

4: BRENNER, ET AL., 2002

5: WANG ET AL., 1999

6: PIENAAR, 1962

7: Clinical laboratory normals: California desert tortoise. PAL News, Winter 1992-1993:7

8: ROSSKOPF, 1982

9: TAYLOR Y JACOBSON, 1982

10: SAMOUR ET AL., 1986

11: FRYE, 1994

12: STEIN, 1996

13: ALTMAN Y DITTMER, 1964

14: HEARD ET AL., 2004

15: MURO ET AL., 1998

16: KNOTKOVA ET AL., 2002

17: LÓPEZ-OLVERA ET AL., 2003

- 18: MARKS Y CITINO, 1990  
 19: YANG *ET AL.*, 2014 (Valores obtenidos tras sacar la media de los registros de diferentes estaciones)  
 20: MONTILLA *ET AL.*, 2006  
 21: AGUIRRE *ET AL.*, 1995 (valores 24 horas postcaptura de los ejemplares)  
 22: WORK *ET AL.*, 1998  
 23: WORK Y BALAZS, 1999  
 24: WOOD Y EBANKS, 1984 (ejemplares adultos)  
 25: SMITH *ET AL.*, 2000  
 26: BRADLEY *ET AL.*, 1998  
 27: ARNOLD, 1994

## 2.7.- LA BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE LOS QUELONIOS

El plasma de muchos quelonios sanos puede mostrar una coloración amarillo-anaranjada, pudiendo ser el resultado de la ingestión de pigmentos carotenoides de plantas, por lo que no debería ser necesariamente interpretado como un indicativo de una alteración en la degradación de la hemoglobina (NAKAMURA, 1980).

La contaminación con linfa de las muestras sanguíneas en quelonios causa dilución en algunos parámetros bioquímicos (LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003).

### 2.7.1.- Las Proteínas Totales (Sólidos Totales)

En los quelonios el plasma contiene aproximadamente 4.4 gm/dL de proteínas, con un rango de 2.9-6.1 gm/dL (DESSAUER, 1970).

La hiperalbuminemia puede ser secundaria a la deshidratación (MCARTHUR *ET AL.*, 2002; WILKINSON, 2004), hibernación o a la actividad ovárica (MCARTHUR *ET AL.*, 2002). LAWRENCE (1987) afirmó que las hembras, durante la época estival, presentan un nivel de albúmina un 30% superior al de los machos, probablemente debido a la vitelogénesis. Este hecho también se ha observado en *Gopherus agassizii* (DICKINSON *ET AL.*, 2002). Esto podría explicar los altos niveles de proteínas descritos en las tortugas blancas (*Trionyx spiniferus*) no hibernantes (SEIDEL, 1974). Además, durante la foliculogénesis los niveles de globulinas también pueden observarse elevados (RAPHAEL, 2003). Sin embargo, *Trachemys scripta* y *Terrapene carolina* hibernantes presentan unos niveles de proteínas superiores en los meses de invierno, lo cual puede ser resultado de la hemoconcentración (HUTTON Y GOODNIGHT, 1957).

Parece que la hipoalbuminemia es frecuente en animales inmaduros (WILKINSON, 2004). Así, WHITAKER Y KRUM (1999) citan valores de albúmina en ejemplares juveniles de *Caretta caretta* mucho más bajos que los observados en adultos. Sin embargo, los valores de proteínas totales que se observan en las crías de *Lepidochelys olivacea* son similares a los observados en quelonios maduros (MOHANTY-HEJMADI, *ET AL.*, 1984). También se cita un descenso en los niveles de albúmina en presencia de anorexia, malnutrición, estomatitis, parasitismo intestinal y otras enteropatías (MCARTHUR *ET AL.*, 2002; WILKINSON, 2004), y se ha hipotetizado con que pueda ocurrir en enfermedad hepática, pérdida de sangre o enfermedad renal (WILKINSON, 2004).

En la Tabla 2.42 se muestran los niveles de proteínas plasmáticas de varias especies de quelonios.



**Tabla 2.42.** Valores de proteínas totales plasmáticas en algunas especies de quelonios

Espece	PT (g/dL)
Quelonios <sup>1</sup>	5.5-7.5
<b>Familia Testudinidae. Tortugas terrestres</b>	
<i>Clemmys muhlenbergii</i> <sup>4</sup> , machos silvestres	2.8
<i>Clemmys muhlenbergii</i> <sup>4</sup> , hembras silvestres	2.9
<i>Dipsochelys gigantea</i> <sup>5</sup>	0.5-3.8
<i>Geochelone pardalis</i> <sup>7</sup>	3.2-4.9
<i>Geochelone radiata</i> <sup>2</sup> (cautivas)	3.97
<i>Geochelone radiata</i> <sup>2</sup> (silvestres)	3.3
<i>Geochelone yniphora</i> <sup>2</sup> (cautivas)	3.33
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>8</sup>	2.2-5.0
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>9</sup> (machos)	3.4
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>10,11</sup>	3.6
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>12</sup>	2.3-5.0
<i>Gopherus polyphemus</i> <sup>13</sup>	3.1
<i>Gopherus agassizii</i> <sup>6</sup>	4.6
<i>Kinixys erosa</i> <sup>14</sup>	6.1 ± 0.044
<i>Malacochersus tornieri</i> <sup>15</sup>	2.4-4.1
<i>Malacochersus tornieri</i> <sup>2</sup> (silvestres)	3.1
<i>Testudo</i> sp. <sup>16</sup>	3.4
<i>Testudo graeca</i> <sup>16</sup>	3.25
<i>Testudo graeca/hermanni</i> <sup>17</sup>	1.3-3.8
<i>Testudo hermanni</i> <sup>18</sup>	3.1-5.4
<i>Testudo hermanni</i> <sup>16</sup>	3.65
<i>Testudo hermanni</i> <sup>3</sup>	7.3(invierno) 8.7 (verano)
<i>Testudo horsfieldi</i> <sup>16</sup>	3.32
<i>Testudo horsfieldi</i> <sup>19</sup>	4.51
<i>Testudo marginata</i> <sup>20</sup>	2.03
<i>Testudo marginata</i> <sup>16</sup>	3.25
<i>Testudo radiata</i> <sup>21</sup>	4.0
<b>Tortugas de agua dulce</b>	
<i>Cuora flavomarginata</i> <sup>22</sup>	5.87 (Machos) 6.27 (Hembras)
<i>Cuora trifasciata</i> <sup>23</sup>	5.1
<b>Tortugas marinas</b>	
<i>Caretta caretta</i> <sup>24</sup>	2.0 ± 0.8
<i>Caretta caretta</i> <sup>25</sup> (juveniles, cautivos)	2.0
<i>Caretta caretta</i> <sup>26</sup> , edad:2 meses	1.31
<i>Caretta caretta</i> <sup>26</sup> , edad:3 meses	1.58
<i>Caretta caretta</i> <sup>26</sup> , edad:4 meses	1.69
<i>Caretta caretta</i> <sup>26</sup> , edad:5 meses	1.78
<i>Caretta caretta</i> <sup>26</sup> , edad:6 meses	1.70
<i>Caretta caretta</i> <sup>26</sup> , edad:7 meses	1.53
<i>Caretta caretta</i> <sup>26</sup> , edad:8 meses	1.32
<i>Caretta caretta</i> <sup>26</sup> , edad:9 meses	1.60
<i>Caretta caretta</i> <sup>26</sup> , edad:12 meses	3.0±1.1
<i>Caretta caretta</i> <sup>27-30</sup>	2.0
<i>Caretta caretta</i> <sup>31</sup>	4.5
<i>Caretta caretta</i> <sup>32</sup>	4.0

Especie	PT (g/dL)
<i>Caretta caretta</i> <sup>33</sup>	3.5
<i>Caretta caretta</i> <sup>34</sup>	4.1
<i>Caretta caretta</i> <sup>35</sup>	3.0
<i>Caretta caretta</i> <sup>36</sup>	1.4
<i>Chelonia mydas</i> <sup>37</sup>	2.6-6.9
<i>Chelonia mydas</i> <sup>25</sup> (juveniles, silvestres)	5.1
<i>Chelonia mydas</i> <sup>33</sup>	3.2
<i>Chelonia mydas</i> <sup>27,28,30,38,39</sup>	2.9
<i>Chelonia mydas</i> <sup>40</sup> , cautivas	4.1-5.4
<i>Chelonia mydas</i> <sup>40</sup> , silvestres	4.3
<i>Chelonia mydas</i> <sup>41</sup>	5.1
<i>Chelonia mydas</i> <sup>42</sup> , silvestres. En Oahu	4.2
<i>Chelonia mydas</i> <sup>42</sup> , silvestres. En Hawaii	5.0
<i>Lepidochelys kempfi</i> <sup>24</sup>	3.0-5.0
<i>Lepidochelys kempfi</i> <sup>26</sup>	3,2 ± 0.66
<i>Lepidochelys kempfi</i> <sup>43</sup>	3.1
<i>Lepidochelys olivacea</i> <sup>32</sup>	3.2
<i>Lepidochelys olivacea</i> <sup>44</sup> , crías	4.31

1: Grange Laboratories, comunicación personal, 1993. In: S. McArthur (ed.). Veterinary management of tortoises and turtles. Blackwell Science Ltd.: 117

2: RAPHAEL, 2003

3: HEARD *ET AL.*, 2004

4: BRENNER *ET AL.*, 2002

5: GHEBREMESKEL *ET AL.*, 1991

6: California Avian Laboratory (Citrus Heights, California). In: A. M. Fudge (ed.). Laboratory Medicine (Avian and Exotic Pets). Philadelphia, W.B. Saunders Company: 375-400

7: RAITI Y HARAMATI, 1997

8: ROSSKOPF, 1982

9: DICKINSON *ET AL.*, 2002

10: ROSSKOPF, 1982

11: TAYLOR Y JACOBSON, 1982

12: Clinical laboratory normals: California desert tortoise. PAL News, Winter 1992-1993:7

13: SAMOUR *ET AL.*, 1986

14: OYEWALE *ET AL.*, 1998

15: RAPHAEL *ET AL.*, 1994

16: MATHES *ET AL.*, 2005

17: HARCOURT-BROWN, 1998

18: GÖBEL Y SPÖRLE, 1992

19: KNOTKOVA *ET AL.*, 2002

20: LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003

21: GOTTDENKER Y JACOBSON, 1995

22: YANG *ET AL.*, 2014 (Valores obtenidos tras sacar la media de los registros de diferentes estaciones)

23: GRIONI *ET AL.*, 2014

24: WHITAKER Y KRUM, 1999

25: RAPHAEL, 2003

26: BRADLEY *ET AL.*, 1998

27: FRAIR, unpublished, 1964

28: LEWIS, 1964

29: TERCAFS *ET AL.*, 1963

30: THORSON, 1968

31: ARNOLD, 1994

32: DESSAUER, 1970

33: JACOBSON *ET AL.*, 2004 (datos de Agosto del 2004)

34: BOLTEN *ET AL.*, 1992

35: WHITMORE, 1994

36: GELLI *ET AL.*, 2004

37: BOLTEN Y BJORN DAL, 1992

38: BERKSON, 1966

25: KHALIL, 1947

40: SWIMMER, 2000

41: LUTZ, 1990

42: AGUIRRE, 1996

43: MCGEHEE, 1979

44: MOHANTY-HEJMADI *ET AL.*, 1984

## 2.8.- VALORES HEMATOLÓGICOS DE LOS EMÍDIDOS (Familia Emydidae)

Como ya se ha comentado anteriormente, en los quelonios el área anatómica de punción venosa puede influir en los resultados de los valores hematológicos y de algunos parámetros bioquímicos debido a contaminación linfática (LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003). Este hecho se ha descrito también en los quelonios emídidos (CRAWSHAW Y HOLZ, 1996; INNIS *ET AL.*, 2007), observándose muestras sanguíneas más puras en las punciones yugulares (CRAWSHAW Y HOLZ, 1996). Asimismo, el método de recuento celular y el diluyente/colorante empleado pueden influir en el resultado de los recuentos eritrocitarios y leucocitarios (TSAI *ET AL.*, 2014).

### 2.8.1.- El Hematocrito de los Emídidos

Hay autores que han descrito diferencias en el porcentaje de hematocrito asociadas al sexo, época del año, tamaño de los individuos u origen de los mismos. CHUNG *ET AL.* (2009) observan en *Ocadia sinensis* un nivel de hematocrito significativamente superior en las hembras en comparación con los machos, detectándose los registros máximos durante el mes de junio y los mínimos en noviembre. En *Trachemys callirostris* se constatan diferencias significativas para este valor entre machos y hembras (siendo mayor en estas últimas), entre individuos *in situ* y *ex situ* y con respecto al peso de los especímenes, observándose valores inferiores en los animales de <500grs y >1.500grs, y mayores en el grupo entre 500 y 1.500grs (CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014). Otros autores no detectan diferencias significativas en el valor de hematocrito entre sexos (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

**Tabla 2.43.** Valores de hematocrito en algunas especies de quelonios emídidos

Especie	Hematocrito (%)
<i>Clemmys muhlenbergii</i> <sup>1</sup>	12-33
<i>Graptemys gibbonsi</i> <sup>2</sup>	21.25
<i>Hieremys annandalii</i> <sup>3</sup>	14.90±3.48
<i>Mauremys caspica leprosa</i> <sup>4</sup>	16.29
<i>Ocadia sinensis</i> <sup>5</sup>	24.25 (machos); 27.00 (hembras)
<i>Pseudemys rubriventris</i> <sup>6</sup>	25.67
<i>Trachemys callirostris</i> <sup>7</sup>	29.91±5.04
<i>Trachemys picta</i> <sup>8</sup>	22.9
<i>Trachemys sp.</i> <sup>9,10</sup>	26
<i>Trachemys scripta elegans</i> <sup>11</sup>	17.5
<i>Trachemys scripta elegans</i> <sup>12</sup>	26

1: BRENNER *ET AL.*, 2002

2: PERPIÑAN *ET AL.*, 2008

3: CHANSUE *ET AL.*, 2011

4: RAPHAEL, 2003

5: CHUNG *ET AL.*, 2009. (Los valores se han obtenido promediando los resultados descritos para varias épocas del año)

6: INNIS *ET AL.*, 2007. (Los valores se han obtenido promediando los resultados descritos)

7: CARRASCAL-VELAZQUEZ *ET AL.*, 2014

8: WANG *ET AL.*, 1999

9: FRYE, 1994

10: MARKS Y CITINO, 1990

11: WALLACH Y BOEVER, 1983

12: JACKSON, 1991

## 2.8.2.- El Nivel de Hemoglobina de los Emídidos

En *Ocadia sinensis* no se han observado diferencias entre machos y hembras en lo que respecta a los niveles sanguíneos de hemoglobina, pero sí se han detectado diferencias estacionales, con niveles más altos en los muestreos realizados durante el mes de junio (CHUNG ET AL., 2009). En *Trachemys callirostris* los niveles de hemoglobina de las hembras son superiores a los de los machos, al igual que en los individuos *in situ* en comparación con los *ex situ*. Los animales con pesos <500grs y >1500grs presentan registros de hemoglobina superiores a los de los comprendidos entre los 500 y los 1500grs (CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

En la Tabla 2.44 se exponen los niveles de hemoglobina de varias especies de quelonios de la familia Emydidae.

**Tabla 2.44.** Valores de hemoglobina en varias especies de quelonios emídidos

Especie	Hb (g/dL)
<i>Hieremys annandalii</i> <sup>1</sup>	6.08±1.12
<i>Mauremys caspica leprosa</i> <sup>2</sup> (silvestres, verano)	7.69
<i>Ocadia sinensis</i> <sup>3</sup>	4.87
<i>Trachemys callirostris</i> <sup>4</sup>	4.0±1.0
<i>Trachemys scripta elegans</i> <sup>5</sup>	8.0
<i>Trachemys scripta elegans</i> <sup>6</sup>	8.0

1: CHANSUE ET AL., 2011

2: RAPHAEL, 2003

3: CHUNG ET AL., 2009. (Los valores se han obtenido promediando los resultados descritos para varias épocas del año)

4: CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014

5: JACKSON, 1991

6: HEARD ET AL., 2004

## 2.8.3.- Índices Eritrocitarios de los Emídidos

En la Tabla 2.45 se exponen los valores de los índices eritrocitarios en diversas especies de quelonios de la familia Emydidae.

**Tabla 2.45.** Índices eritrocitarios en algunas especies de emídidos

Especie	MCV (fl)	MCHC (gm/dL)	MCH (pg)
<i>Hieremys annandalii</i> <sup>1</sup>	595.33±209.49	42.85±11.67	245.86±91.53
<i>Ocadia sinensis</i> <sup>2</sup>	587.75	19.5	111.5
<i>Trachemys callirostris</i> <sup>3</sup>	327.0±15.30	14.0±6.0	45±17.50
<i>Trachemys scripta</i> <sup>4</sup>	211-296		96-118
<i>Trachemys scripta elegans</i> <sup>5</sup>	310-1000	31	95-308

1: CHANSUE ET AL., 2011

2: CHUNG ET AL., 2009. (Los valores se han obtenido promediando los resultados descritos para varias épocas del año)

3: CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014

4: WALLACH Y BOEVER, 1983

5: HEARD ET AL., 2004

#### 2.8.4.- Recuento Total de Eritrocitos y Leucocitos de los Emídidos

Al igual que sucede en otros quelonios, en los emídidos los factores ambientales pueden influir en los recuentos de eritrocitos y/o leucocitos. Así, en *Trachemys scripta* el recuento de eritrocitos presenta un nivel de mayo a julio que se incrementa en septiembre, para decrecer hasta alcanzar el mínimo en diciembre y volver a incrementarse a medida que se acerca la primavera (KAPLAN, 1960). Algo parecido ha descrito RAPHAEL (2003) en *Mauremys caspica* silvestre y en *Trachemys scripta elegans*, observando que el recuento total de eritrocitos es mayor en otoño que en verano. Postuló que este hecho puede ser debido a una adaptación consistente en incrementar la capacidad oxigenativa de la sangre antes de la hibernación. Se ha observado hemodilución en ejemplares de *Chrysemys picta* expuestas al frío, y ésta ha sido achacada a la pérdida de eritrocitos circulantes en el hígado y el bazo (MUSSACHIA Y SIEVERS, 1956). El recuento de eritrocitos en *Ocadia sinensis* es más elevado en las mediciones realizadas durante el mes de junio (CHUNG ET AL., 2009).

En cuanto a las diferencias en el recuento de eritrocitos asociadas al sexo, hay autores que citan un mayor número de estas células en el macho, como sucede en el galápagos europeo (*Emys orbicularis*) (DUGUY, 1970), mientras que otros han descrito justo lo contrario, como es el caso de *Trachemys callirostris* (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014), o no han hallado diferencias estadísticamente significativas, como en *Hieremys annandalii* (CHANSUE ET AL., 2011).

En algunas especies se han descrito otros factores influyentes en el recuento de eritrocitos. Por ejemplo, en *Trachemys callirostris* CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL. (2014) observan niveles mayores de eritrocitos en los animales en cautividad frente a los de vida libre y también detectan diferencias en el recuento en relación al tamaño de los individuos.

Los factores externos también son influyentes en el recuento de leucocitos. En *Ocadia sinensis* los mayores recuentos se observan en junio y los menores en noviembre (CHUNG ET AL., 2009).

La influencia del sexo en el recuento de leucocitos varía con la especie. Así, en *Hieremys annandalii* los machos muestran niveles de glóbulos blancos superiores a los de las hembras (CHANSUE ET AL., 2011), ocurriendo justo lo contrario en *Trachemys callirostris* (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014).

En el galápagos de Muhlenberg (*Clemmys muhlenbergii*) el recuento total de leucocitos en los individuos cautivos es superior al de los silvestres (BRENNER ET AL., 2002). La misma circunstancia describieron CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL. (2014) en *Trachemys callirostris*. En esta especie se observa que los ejemplares con pesos inferiores a 500 grs presentan recuentos leucocitarios menores que el resto de los individuos.

En la Tabla 2.46 se exponen los recuentos de eritrocitos y leucocitos en varias especies de quelonios de la familia Emydidae.

**Tabla 2.46.** Valores de WBC y RBC en varias especies de quelonios emídidos

Especie	RBC (x10 <sup>6</sup> /μl)	WBC (/μl)
<i>Clemmys muhlenbergii</i> <sup>1</sup>		3000-13000
<i>Gratemys gibbonsi</i> <sup>2</sup>	0.37	1460
<i>Hieremys annandalii</i> <sup>3</sup>	0.275±0.094	11660±6590
<i>Ocadia sinensis</i> <sup>4</sup>	0.43	8625
<i>Pseudemys rubriventris</i> <sup>5</sup>		12274
<i>Trachemys callirostris</i> <sup>6</sup>	0.92±0.12	12100±5000
<i>Trachemys scripta elegans</i> <sup>7</sup>	0.69	9700

1: BRENNER *ET AL.*, 2002

2: PERPIÑAN *ET AL.*, 2008

3: CHANSUE *ET AL.*, 2011

4: CHUNG *ET AL.*, 2009. (Los valores se han obtenido promediando los resultados descritos para varias épocas del año)

5: INNIS *ET AL.*, 2007. (Los valores se han obtenido promediando los resultados descritos)

6: CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014

7: WALLACH Y BOEVER, 1983

### 2.8.5.- Recuento de Trombocitos de los Emídidos

Algunos estudios hematológicos en emídidos han puesto de manifiesto la existencia de influencias externas en el recuento de trombocitos. Es el caso de *Trachemys callirostris*, especie en la que se ha observado un mayor número de estas células en los animales en cautividad en comparación con los individuos *in situ*. También se describen diferencias en el recuento en función del tamaño y el sexo. Los ejemplares con peso inferior a 500 grs muestran menor número de trombocitos. Las hembras de esta especie presentan más trombocitos que los machos (CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014). Sin embargo, en *Hieremys annandalii* no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras en lo que respecta al recuento de trombocitos (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

**Tabla 2.47.** Recuento de trombocitos en algunas especies de quelonios emídidos

Especie	Trombocitos/μL
<i>Gratemys gibbonsi</i> <sup>1</sup>	128.8*
<i>Hieremys annandalii</i> <sup>2</sup>	10970±5400
<i>Ocadia sinensis</i> <sup>3</sup>	6500
<i>Trachemys callirostris</i> <sup>4</sup>	15000±5400

\* Por cada 100 leucocitos.

1: PERPIÑAN *ET AL.*, 2008

2: CHANSUE *ET AL.*, 2011

3: CHUNG *ET AL.*, 2009. (Los valores se han obtenido promediando los resultados descritos para varias épocas del año)

4: CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014

## 2.8.6.- Recuento Diferencial Leucocitario de los Emídidos

### -Neutrófilo

Ninguno de los estudios hematológicos en quelonios emídidos referenciados en este trabajo describe la presencia de neutrófilos en estas especies.

### -Heterófilo

Los heterófilos se consideran más numerosos en tortugas acuáticas que en otros reptiles (FRYE, 1973).

En *Hieremys annandalii* esta célula representa el leucocito más numeroso (CHANSUE ET AL., 2011) y en *Ocadia sinensis* supone uno de los más abundantes junto con el eosinófilo (CHUNG ET AL., 2009). El heterófilo de *Trachemys callirostris* aparece como el segundo leucocito en número (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014), al igual que en *Clemmys muhlenbergii* (BRENNER ET AL., 2002) y *Trachemys scripta* (DESSAUER, 1970; WALLACH Y BOEVER, 1983). En *Pseudemys rubriventris* el heterófilo se clasifica como el segundo o tercer leucocito (INNIS ET AL., 2007) y en *Graptemys gibbonsi* representa el tercero en número (PERPIÑAN ET AL., 2008). En el caso de *Emys orbicularis* el heterófilo es el segundo leucocito menos numeroso (DESSAUER, 1970).

Las hembras de *Trachemys callirostris* muestran un porcentaje de heterófilos superior al de los machos, y los individuos de menos de 500 grs y más de 1500grs presentan recuentos inferiores que el resto de los animales. No se aprecian diferencias entre los individuos *in situ* y *ex situ* para este parámetro (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014), al contrario de lo que ocurre en *Clemmys muhlenbergii*, especie en la que BRENNER ET AL. (2002) describen un mayor número de heterófilos en los animales salvajes en comparación con los cautivos. En *Ocadia sinensis* los registros de heterófilos en las hembras son también superiores a los de los machos, observándose los mayores recuentos en junio (CHUNG ET AL., 2009). En *Hieremys annandalii* no se observaron diferencias intersexuales estadísticamente significativas para este parámetro (CHANSUE ET AL., 2011).

### -Eosinófilo

Algunos autores no han hallado eosinófilos en *Trachemys scripta* (DESSAUER, 1970; WALLACH Y BOEVER, 1983), mientras que en otras especies este leucocito se ha clasificado como el menos numeroso. Este es el caso de *Graptemys gibbonsi* (PERPIÑAN ET AL., 2008) y *Clemmys muhlenbergii* (BRENNER ET AL., 2002). Los eosinófilos de *Ocadia sinensis* son uno de los leucocitos más abundantes junto con los heterófilos (CHUNG ET AL., 2009), y en *Hieremys annandalii* (CHANSUE ET AL., 2011) y *Emys orbicularis* (DESSAUER, 1970) son el segundo leucocito más numeroso en el recuento diferencial leucocitario. En *Trachemys callirostris* los eosinófilos ocupan el tercer lugar en el recuento (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014) y el cuarto en el caso de *Pseudemys rubriventris* (INNIS ET AL., 2007).

CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL. (2014) no observan diferencias en el recuento de eosinófilos entre machos y hembras de *Trachemys callirostris*, pero sí describen porcentajes mayores de este leucocito en los animales cautivos frente a los silvestres y menores en el grupo de peso comprendido entre 500 y 1500 grs. CHANSUE ET AL. (2011) tampoco detectan diferencias intersexuales en el recuento de eosinófilos en *Hieremys*

*annandalii*, mientras que CHUNG ET AL. (2009) describen que los machos de *Ocadia sinensis* presentan porcentajes de eosinófilos superiores a los de las hembras. En esta especie los niveles más altos de este leucocito se registran en junio y los más bajos en abril. En *Clemmys muhlenbergii*, de forma opuesta a lo descrito en *Ocadia sinensis*, son las hembras las que manifiestan mayores recuentos de eosinófilos (BRENNER ET AL., 2002).

### **-Basófilo**

En algunos emídidos, como *Graptemys gibbonsi* (PERPIÑAN ET AL., 2008) o *Pseudemys rubriventris* (INNIS ET AL., 2007), los basófilos representan el leucocito más abundante, mientras que en *Clemmys muhlenbergii* (BRENNER ET AL., 2002), *Hieremys annandalii* (CHANSUE ET AL., 2011) y *Ocadia sinensis* (CHUNG ET AL., 2009) ocupan el tercer lugar en el recuento diferencial leucocitario. De forma opuesta, los basófilos de *Trachemys callirostris* aparecen como el leucocito menos abundante en esta especie (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014).

En las especies de emídidos estudiadas no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el recuento de basófilos entre machos y hembras (BRENNER ET AL., 2002; CHUNG ET AL., 2009; CHANSUE ET AL., 2011; CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014). Sin embargo, en *Ocadia sinensis* se describen influencias estacionales, observándose los recuentos más bajos de basófilos en abril y los más altos en junio (CHUNG ET AL., 2009). *Trachemys callirostris* no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de basófilos entre animales *in situ* y *ex situ*, pero sí se observa un porcentaje menor de basófilos en los animales de menos de 500 grs (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014).

### **-Linfocito**

El linfocito se muestra como el leucocito más numeroso del recuento diferencial en algunos emídidos, como *Trachemys scripta elegans* (FRYE, 1976), *Clemmys muhlenbergii* (BRENNER ET AL., 2002) y *Trachemys callirostris* (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014). En otras especies, como *Graptemys gibbonsi* (PERPIÑAN ET AL., 2008) representa el segundo leucocito más abundante, o el segundo/tercero del recuento en el caso de *Pseudemys rubriventris* (INNIS ET AL., 2007). Los linfocitos de *Hieremys annandalii* (CHANSUE ET AL., 2011) y de *Ocadia sinensis* (CHUNG ET AL., 2009) ocupan el cuarto lugar del recuento diferencial leucocitario.

Se han descrito diferentes intersexuales en los recuentos de linfocitos de algunas especies de quelonios de la familia Emydidae. Las hembras de *Clemmys muhlenbergii* muestran porcentajes de este leucocito superiores a los de los machos (BRENNER ET AL., 2002), mientras que en *Trachemys callirostris* se describe lo contrario (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014). En *Hieremys annandalii* (CHANSUE ET AL., 2011) y *Ocadia sinensis* (CHUNG ET AL., 2009) no se detectan diferencias estadísticamente significativas para este parámetro entre sexos. En esta última especie se aprecian influencias estacionales para el recuento de linfocitos, observándose los mayores niveles en abril y junio (CHUNG ET AL., 2009). EN *Trachemys callirostris* los individuos muestreados *in situ* presentan porcentajes de linfocitos superiores a los de los animales *ex situ*, no apreciándose diferencias en relación al tamaño (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014).



**-Monocito**

En la mayoría de los emídidos los monocitos son células poco abundantes. Es el leucocito menos frecuente en *Pseudemys rubriventris* (INNIS ET AL., 2007) y *Ocadia sinensis* (CHUNG ET AL., 2009) y ocupan el cuarto lugar en el recuento diferencial leucocitario en *Clemmys muhlenbergii* (BRENNER ET AL., 2002), *Graptemys gibbonsi* (PERPIÑAN ET AL., 2008) y *Trachemys callirostris* (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014).

EN *Ocadia sinensis* las hembras presentan niveles superiores de monocitos que los machos, observándose los mayores recuentos durante el mes de junio (CHUNG ET AL., 2009). Por el contrario, esta célula es más abundante en los machos de *Trachemys callirostris* y en los individuos *in situ* en comparación con los *ex situ*, pero no se aprecian diferencias asociadas al tamaño de los ejemplares (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014).

**-Azurófilo**

De todas las especies de emídidos expuestas en esta revisión sólo se describen azurófilos en *Hieremys annandalii* (CHANSUE ET AL., 2011), si bien en *Clemmys muhlenbergii* se habla de monocitos azurofílicos (BRENNER ET AL., 2002).

En *Hieremys annandalii*, el azurófilo representa el último leucocito en frecuencia del recuento diferencial leucocitario y los machos muestran un mayor número de estas células que las hembras (CHANSUE ET AL., 2011).

**Tabla 2.48** Recuentos diferenciales leucocitarios de varias especies de quelonios emídidos

Especie	Heterófilo (%)	Eosinófilo (%)	Basófilo (%)	Linfocito (%)	Monocito (%)	Azurófilo (%)
<i>Clemmys muhlenbergii</i> <sup>1</sup>	11-54	0-22	2-38	14-71	0-34	
<i>Emys orbicularis</i> <sup>2-5</sup>	2-21	12-89	0-25	45-76	0-1	
<i>Emys orbicularis</i> <sup>6</sup>	2-21	2-89	0-25	45-76	0-1	
<i>Graptemys gibbonsi</i> <sup>7</sup>	13.25	3.25	47.5	25.25	6.25	
<i>Hieremys annandalii</i> <sup>8</sup>	29.4±6.88	23.69±5.30	21.23±1.90	14.81±5.88		10.73±5.29
<i>Ocadia sinensis</i> <sup>9</sup>	2925*	2506M/2011H*	1311*	1148.75*	167.5*	
<i>Pseudemys rubriventris</i> <sup>10</sup>	2457*	686.33*	5109.67*	2965*	38.5*	
<i>Trachemys callirostris</i> <sup>11</sup>	23.64±5.62	22.75±6.22	3.59±1.48	34.83±5.48	15.19±3.89	
<i>Trachemys scripta</i> <sup>6,12</sup>	34		1.5	39.5	1	

\* Leucocito/μL; Macho (M), Hembra (H)

1: BRENNER ET AL., 2002

2: ALDER Y HUBER, 1923

3: BABUDIERY, 1930

4: SALGUES, 1937

5: DUGUY, 1967

6: DESSAUER, 1970

7: PERPIÑAN ET AL., 2008

8: CHANSUE ET AL., 2011

9: CHUNG ET AL., 2009. (Los valores se han obtenido promediando los resultados descritos para varias épocas del año)

10: INNIS ET AL., 2007. (Los valores se han obtenido promediando los resultados descritos)

11: CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014

12: WALLACH Y BOEVER, 1983

## 2.9.- LA BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE LOS EMÍDIDOS (Familia Emydidae)

### 2.9.1.- Las Proteínas Totales (Sólidos Totales)

BRENNER *ET AL.* (2002) no describieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de proteínas plasmáticas entre sexos en *Clemmys muhlenbergii*. PERPIÑAN *ET AL.* (2008) estiman la posibilidad de que los valores bioquímicos puedan verse infuidos por la hemodilución secundaria a la contaminación linfática de la sangre, dependiente del sitio de punción venosa.

En la Tabla 2.49 se muestran los niveles de proteínas plasmáticas de varias especies de quelonios de la familia Emydidae.

**Tabla 2.49.** Valores de proteínas totales plasmáticas en algunas especies de quelonios emídidos

Especie	PT (g/dL)
<i>Clemmys muhlenbergii</i> <sup>1</sup>	1.2-4.5
<i>Graptemys gibbonsi</i> <sup>2</sup>	2.65
<i>Mauremys caspica leprosa</i> <sup>3</sup> (silvestres, verano)	3.29
<i>Pseudemys rubriventris</i> <sup>4</sup>	2.73
<i>Trachemys scripta elegans</i> <sup>5</sup>	5.3

1: BRENNER *ET AL.*, 2002

2: PERPIÑAN *ET AL.*, 2008

3: RAPHAEL, 2003

4: INNIS *ET AL.*, 2007. (Los valores se han obtenido promediando los resultados descritos)

5: HEARD *ET AL.*, 2004



### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1.- ESPECÍMENES EN ESTUDIO (TORTUGAS)**

Para este estudio se han empleado 31 adultos clínicamente sanos (sin signos externos de enfermedad y actitud y actividad normales) de la tortuga de vientre amarillo u orejas amarillas (*Trachemys scripta scripta*), 13 machos y 18 hembras, pertenecientes a cuatro colecciones privadas localizadas en la costa sur-sureste de la isla de Gran Canaria, España. En todos los casos, los animales eran alimentados con piensos comerciales para tortugas acuáticas y mantenidos en alojamientos mixtos (charca y zona seca) en condiciones de exterior, con libre acceso a luz solar y sometidos a factores ambientales naturales.

En lo que respecta a las condiciones ambientales, debe destacarse que el clima de Gran Canaria se clasifica como oceánico subtropical, con temperaturas suaves en todas las estaciones. Los valores medios de temperatura que se dan en las áreas costeras oscilan entre los 18 y 21 grados centígrados en la vertiente norte, pero son más altas en la costa sur, llegando a superar en ocasiones el umbral de los 40° C. Debido a su latitud, la radiación solar es muy elevada y la nubosidad en la zona sur es escasa, llegando a registrarse una media de 12 horas de insolación diarias durante el verano. La humedad relativa media en las costas de la vertiente sur es de aproximadamente el 60%. (Fuente: Gobierno de Canarias. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial. Dirección General del Medio Natural).

Según los datos oficiales recogidos en la zona de las Dunas de Maspalomas, localizada en la vertiente sur de la isla, la temperatura media anual es de 23.5° C, con unas temperaturas estivales medias de 30° C e invernales de 21° C. Se registran una media de 259 días soleados al año, frente a 87 días nublados y 13 cubiertos. (Fuente: Informe técnico seguimiento de la charca de Maspalomas. Plan Director RNE de las Dunas de Maspalomas. Cabildo de Gran Canaria).

Debido a las suaves fluctuaciones térmicas entre el invierno y el verano a las que están sometidos los animales en estudio, la mayoría de los años no se desencadenan comportamientos de hibernación propiamente dicha, sino cierto grado de aletargamiento, con disminuciones moderadas de la actividad y del consumo de alimentos. Dicho aletargamiento invernal no suele extenderse durante períodos prolongados.

En la figura 3.1 se muestra la localización geográfica de los cuatro colectivos implicados en el presente estudio y de la estación meteorológica de Maspalomas.

**Figura 3.1.** Localización geográfica de los colectivos en estudio y de la estación meteorológica de Maspalomas en la isla de Gran Canaria.

- 1.- Carrizal de Ingenio. Municipio de Ingenio.
- 2.- Vecindario. Municipio de Santa Lucía de Tirajana.
- 3.- Castillo del Romeral. Municipio de San Bartolomé de Tirajana.
- 4.- Playa del Inglés. Municipio de San Bartolomé de Tirajana.
- B.-** Estación Meteorológica de Maspalomas. M. de San Bartolomé de Tirajana.



En las tablas 3.1 y 3.2 se exponen las características biométricas de las tortugas empleadas en el presente estudio para las dos estaciones en las que se llevaron a cabo los muestreos.

**Tabla 3.1.** Peso, dimensiones, edad, sexo y procedencia de los ejemplares de *Trachemys scripta scripta* durante el invierno de 2012-2013 (de finales de diciembre a principios de febrero)

Tortuga (N°)	Colectivo (N°)	Sexo	Edad (Años)	Peso (Kg)	Alt C (cm)	LRC (cm)	ARC (cm)	LCC (cm)	ACC (cm)
9	3	M	5	0.325	5	13.1	10.5	14.5	13
10	3	M	5	0.235	4.7	10.5	9.4	11.8	11.6
11	3	M	5	0.335	5	12.2	10.3	13.5	13.3
12	3	H	6	0.873	6.9	18.2	14.9	19.2	18.9
13	3	H	5	0.16	4.2	9.4	7.6	10.6	10.2
16	1	H	>10	1.84	9.2	23	15.8	25.5	23
17	1	H	>10	1.64	9.6	21	15.6	23.7	22.1
18*	4	H	6	0.435	5.1	14	11	15.7	15
19	4	M	6	0.355	5.2	12.5	10.1	14.2	13.2
20	4	M	9	0.865	6.9	16.7	13.5	19.2	18.3
21	4	H	12	1.26	7.1	20	14.6	22.1	19.8
24	4	M	10	1.02	7.4	16.8	14.2	20.6	19.8
26	1	H	>10	1.565	8.6	21.7	17	22.5	22.1
27	1	H	7	0.928	6.8	19	14.2	19.5	18.6
28	1	H	5	0.262	5	11.5	9.4	13.5	12.3
29	1	H	>10	1.41	8.1	21.1	16.3	22.2	20.8
31	2	M	5	0.404	5.2	13.2	11	14.5	13.5
32	2	M	5	0.427	5.5	13.8	10.2	14	13.2
33	2	M	5	0.537	5.4	14.8	11.3	15.8	13.8
34	2	H	6	0.735	7.6	15.8	12.1	18.5	16.8
35	2	H	10	1.675	6.7	21.5	15.6	22	21.1
36	2	H	6	0.83	7	15.2	14	16.9	17.9
37	2	H	6	0.805	6.8	16	13.4	19	17
38	2	H	7	0.825	6.5	16	13	18	16.5
39	4	M	5	0.36	3.8	10.4	11.5	11	12.3
40	4	H	>10	1.485	7.5	20.6	16.7	21.7	22
41	4	M	5	0.375	5.5	12.9	10.4	14.3	12.7
43	4	H	>10	1.315	8.1	18.4	15.1	21.8	24
44	4	H	9	1.13	7.7	17.4	14.6	22	19.5
45	4	M	5	0.315	4.8	12.2	10.1	13.4	12.8
46	4	M	5	0.325	5	12	10.2	13.5	12.8
<b>M±SD</b>	-----	-----	-----	<b>0.82 ± 0.51</b>	<b>6.43 ± 1.51</b>	<b>15.9 ± 3.9</b>	<b>12.7 ± 2.6</b>	<b>17.6 ± 4.2</b>	<b>16.7 ± 4.1</b>

\*La tortuga nº 18 no se muestreó nuevamente en verano, debido a manifestar claros signos de enfermedad en ese momento

Alt C: altura del caparazón

LRC: longitud recta del caparazón

ARC: anchura recta del caparazón

LCC: longitud curva del caparazón

ACC: anchura curva del caparazón

M: Macho

H: Hembra

M±SD: Media y desviación estándar

## Material y Métodos

**Tabla 3.2.** Peso, dimensiones, edad, sexo y procedencia de los ejemplares de *Trachemys scripta scripta* durante el verano de 2013 (de finales de junio a finales de agosto)

Tortuga (N°)	Colectivo (N°)	Sexo	Edad (Años)	Peso (Kg)	Alt C (cm)	LRC (cm)	ARC (cm)	LCC (cm)	ACC (cm)
9	3	M	5	0.377	5.1	13.1	10.7	14.9	13.4
10	3	M	5	0.274	4.7	10.9	9.8	12	11.9
11	3	M	6	0.383	5.1	12.4	10.3	13.8	13.8
12	3	H	6	0.93	7.3	18.2	14.9	19.5	19.3
13	3	H	5	0.195	4.5	10	7.9	11	10.6
16	1	H	>10	1.885	9.2	23	15.8	25.5	23
17	1	H	>10	1.56	9.6	21	15.6	23.7	22.1
19	4	M	6	0.395	5.3	12.9	10.2	14.4	13.4
20	4	M	9	0.96	7.3	17	13.6	19.7	18.3
21	4	H	12	1.295	7.1	20	14.7	22.1	19.8
24	4	M	10	1.165	7.8	19	14.5	21.7	20
26	1	H	>10	1.55	8.6	21.7	17	22.5	22.1
27	1	H	7	0.91	6.8	19	14.2	19.5	18.6
28	1	H	5	0.345	5.5	12.6	9.9	14.7	13.2
29	1	H	>10	1.455	8.1	21.1	16.3	22.2	20.8
31	2	M	5	0.47	5.2	13.4	11.1	14.6	13.6
32	2	M	5	0.545	5.9	13.8	10.7	14.8	14
33	2	M	5	0.615	5.6	14.9	11.5	16.7	14
34	2	H	6	0.97	7.7	17	13	19.9	17.7
35	2	H	10	1.8	7	21.5	15.7	22	21.2
36	2	H	6	1.225	7.4	17	15.4	19	19.7
37	2	H	6	0.925	6.8	17	13.5	19.2	17.3
38	2	H	7	0.97	6.6	16.8	13.4	18.5	16.9
39	4	M	5	0.46	4.4	11.9	12.9	12.6	13.4
40	4	H	>10	1.57	7.7	20.6	17	21.8	22
41	4	M	5	0.445	5.6	13.6	10.9	15.2	13.3
43	4	H	>10	1.315	8.1	18.4	15.1	21.8	24
44	4	H	9	1.285	7.8	19	15.1	22.5	20.1
45	4	M	5	0.395	5.2	12.9	10.6	14.4	13.3
46	4	M	5	0.405	5.4	12.9	10.7	14.3	13.2
<b>M±SD</b>	-----	-----	-----	<b>0.9 ± 0.5</b>	<b>6.61 ± 1.44</b>	<b>16.4 ± 3.7</b>	<b>13.1 ± 2.5</b>	<b>18.1 ± 4.0</b>	<b>17.1 ± 3.9</b>

Alt C: altura del caparazón  
 LRC: longitud recta del caparazón  
 ARC: anchura recta del caparazón  
 LCC: longitud curva del caparazón  
 ACC: anchura curva del caparazón  
 M: Macho  
 H: Hembra  
 M±SD: Media y desviación estándar

Tomando como referencia los 30 animales muestreados en las dos estaciones, se evidencia un aumento estadísticamente significativo de los tamaños y pesos en verano en comparación con el invierno anterior para ambos sexos (Tabla 3.3). Esto es normal para animales que aún se encuentran en edad de crecimiento, como es el caso. Asimismo, el tamaño medio de las hembras es superior al de los machos. Esto se explica parcialmente porque la edad media de las hembras en estudio es mayor a la de los machos, pero en esta especie además, se ha descrito que las hembras tienden a alcanzar tamaños superiores a los de los machos en condiciones fisiológicas (BROTÓNS, 2007).

**Tabla 3.3.** Diferencias de tamaño y peso para los ejemplares de *Trachemys scripta scripta* entre las dos estaciones de muestreo para ambos sexos

Estación	Variables	Machos N = 13	Hembras N = 17	P-valor
INVIERNO	Edad, años			.001
	5	10 (76.9%)	2 (11.8%)	
	6 – 9	2 (15.4%)	7 (41.2%)	
	≥ 10	1 (7.7%)	8 (47.1%)	
	Peso, kg	0.45 ± 0.23 *	1.10 ± 0.48 †	< .001
	Altura, cm	5.34 ± 0.92 *	7.26 ± 1.34 †	< .001
	Longitud lineal, cm	13.2 ± 2.0 *	18.0 ± 3.7 †	< .001
	Anchura lineal, cm	11.0 ± 1.4 *	14.1 ± 2.5 †	< .001
VERANO	Edad, años			.004
	5	9 (69.2%)	2 (11.8%)	
	6 – 9	3 (23.1%)	7 (41.2%)	
	≥ 10	1 (7.7%)	8 (47.1%)	
	Peso, kg	0.53 ± 0.25 *	1.19 ± 0.46 †	< .001
	Altura, cm	5.58 ± 0.96 *	7.40 ± 1.24 †	< .001
	Longitud lineal, cm	13.7 ± 2.1 *	18.5 ± 3.3 †	< .001
	Anchura lineal, cm	11.3 ± 1.4 *	14.4 ± 2.3 †	< .001
	Longitud curva, cm	14.6 ± 2.6 *	19.9 ± 3.7 †	< .001
	Anchura curva, cm	13.9 ± 2.4 *	19.0 ± 3.7 †	< .001
	Longitud curva, cm	15.3 ± 2.4 *	20.3 ± 3.4 †	< .001
	Anchura curva, cm	14.3 ± 2.2 *	19.3 ± 3.5 †	< .001

Los datos son medias ± SD

(\*) Indica diferencias significativas en machos entre estaciones ( $p < 0.05$ )

(†) Indica diferencias significativas en hembras entre estaciones ( $p < 0.05$ )

Nótese que todas las medidas biométricas han experimentado un incremento estadísticamente significativo en machos (\*) y en hembras (†) del invierno al verano.

Los datos se analizaron utilizando el paquete R, versión 3.1.0 (R Development Core Team, 2014).



Las medidas del caparazón de los ejemplares en estudio se realizaron con un pie de rey en el caso de la Alt C, la LRC y la ARC, y con una cinta métrica flexible para la LCC y la ACC. Los pesos se obtuvieron mediante el uso de una báscula Blauscal® GRAM PRECISION SL, con una ponderación mínima de 1 gramo.

Para la determinación de las características citoquímicas y morfológicas y de los tamaños de las células sanguíneas de *Trachemys scripta scripta*, se emplearon las muestras de sangre obtenidas durante el invierno de 2012-2013 de 15 de los 31 ejemplares en estudio, 7 machos (Nº identificación: 9, 10, 11, 19, 20, 24, 39) y 8 hembras (Nº identificación: 12, 13, 16, 17, 18, 21, 40, 43).

Para el desarrollo de la descripción ultraestructural de las células sanguíneas de *Trachemys scripta scripta*, se emplearon muestras de sangre obtenidas durante el verano de 2013 de 10 de los 31 ejemplares en estudio, 5 machos (Nº identificación: 9, 10, 11, 32, 33) y 5 hembras (Nº identificación: 12, 13, 16, 27, 28).

Para el establecimiento de los parámetros hematológicos normales de *Trachemys scripta scripta* en dos estaciones diferenciadas (invierno y verano), se empleó la totalidad de los individuos en estudio en ambas estaciones, a excepción del animal Nº 18, que fue descartado para su inclusión en el estudio hematológico debido a que manifestaba claros signos de enfermedad en el momento del muestreo veraniego. Esto no impidió que fuera incluido en el estudio citoquímico y morfológico realizado el invierno anterior, ya que en aquel momento, tras una exhaustiva exploración, se consideró como un individuo clínicamente sano (Tablas 3.1 y 3.2).

### **3.2.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS**

Dependiendo del número de pruebas al que estuviera destinada la sangre de los especímenes, se obtuvo una cantidad mínima de 0.1ml y máxima de 0.5ml de sangre. La extracción se llevó a cabo en la vena coccígea dorsal, evitando la extracción de líquido linfático (los vasos linfáticos de esta región anatómica están muy desarrollados y próximos al sistema venoso) y descartando las muestras contaminadas con dicho líquido (FRYE, 1991; MAUTINO Y PAGE, 1993; CRAWSHAW Y HOLZ, 1996; REDROBE Y MACDONALD, 1999; LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003; INNIS *ET AL.*, 2007). Se optó por este sitio de punción venosa porque, pese a existir mayor riesgo de hemodilución linfática que en la punción yugular (CRAWSHAW Y HOLZ, 1996), el procedimiento resultaba más sencillo, debido a que esta especie de quelonio tiende a mostrarse agresiva ante la manipulación y el uso de la vía yugular para la obtención de sangre resultó virtualmente imposible en la mayoría de los individuos no sedados, y se quería evitar el tener que recurrir al uso de anestésicos. Asimismo, resultó relativamente sencillo detectar el momento en el que se producía una contaminación linfática, procediendo entonces a realizar una nueva extracción en un área más distal o proximal de la cola. Sin embargo, al igual que afirmaron INNIS *ET AL.*, (2007), no se puede descartar por completo la existencia de contaminaciones linfáticas moderadas en algunas de las muestras obtenidas. La punción venosa se realizó con jeringuillas de insulina de 1ml con agujas de 30Gx1/2” estériles.

Acto seguido a la extracción de la sangre, se procedió a la preparación de los frotis sanguíneos. Para el recuento diferencial leucocitario se realizaron 2 frotis por animal y estación. Los frotis de 15 de los animales muestreados en invierno se utilizaron a su vez para la caracterización morfológica y la determinación de las medidas celulares. A partir de la sangre de esos mismos 15 ejemplares se realizaron 2 frotis más para cada una de las 7 técnicas citoquímicas en estudio y sus variantes, es decir, un total de 18 frotis por animal. Por motivos logísticos relacionados con el procesado de los frotis, la obtención de las muestras destinadas a la realización de las técnicas citoquímicas se realizó en 7 días diferentes dentro de la estación invernal.

Para la preparación de las extensiones se emplearon dos portaobjetos (técnica porta-porta) de bordes romos y pulidos para minimizar así el riesgo de rotura celular (HAWKEY Y DENNET, 1989). Las extensiones se realizaron inmediatamente después de la obtención de la muestra sanguínea, evitando así el uso de anticoagulantes (CAMPBELL, 1996B; BRADLEY *ET AL.*, 1998). A este respecto, debe destacarse que se ha descrito que la heparina tiende a generar una coloración azul en los frotis sanguíneos procesados con las tinciones tipo Romanowsky, además de predisponer a la agregación de plaquetas y leucocitos (HAWKEY Y DENNET, 1989).

A continuación se realizaron los hematocritos, dos por cada animal y estación, mediante el método del microhematocrito (CAMPBELL, 1996B).

La sangre remanente se depositó en tubos con heparina de litio y se conservó en refrigeración a unos 4° C, para posteriormente emplearla en la determinación del recuento total de eritrocitos, leucocitos y trombocitos y en la medición del nivel de hemoglobina. Se eligió como anticoagulante la heparina de litio debido a que el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), que es el anticoagulante más usado en mamíferos, tiende a generar hemólisis en las muestras de algunas especies de reptiles, especialmente en quelonios (PALOMEQUE *ET AL.*, 1977; JACOBSON, 1987; HAWKEY Y DENNET, 1989; GRUMBLES *ET AL.*, 1990; FRYE, 1991; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; BOLTEN *ET AL.*, 1992; JACOBSON, 1992; MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; FRYE, 1995; CAMPBELL, 1996B,C; WATSON, 1997; MURO *ET AL.*, 1998; HANLEY *ET AL.*, 2004; HEARD *ET AL.*, 2004).

### **3.3.- MICROSCOPIA ÓPTICA RUTINARIA**

Una vez obtenidas las extensiones sanguíneas se dejaron secar al aire durante aproximadamente una hora, tiempo tras el cual se procedió a su procesado con las tinciones hematológicas correspondientes. Se ha descrito que la morfología celular se preserva mejor cuando los frotis son fijados y teñidos en un corto plazo tras su elaboración (RAPHAEL, 2003).

Las extensiones sanguíneas destinadas al recuento diferencial leucocitario, caracterización morfológica y medidas celulares, fueron procesadas con una tinción rápida tipo Romanowsky (WALLACH Y BOEVER, 1983). Concretamente se empleó el panóptico rápido o Diff quick® (DQ) (Panreac Química S.A.U. Barcelona, España). Este método proporciona la suficiente calidad tintorial a las extensiones sanguíneas como para llevar a cabo una correcta identificación y caracterización celular (BARROWS, *ET AL.*, 2004; LASSEN

Y WEISER, 2004). Además, el Diff quick<sup>®</sup> ha sido empleado por múltiples autores para evaluar las células sanguíneas en quelonios (LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003; GELLI *ET AL.*, 2004; MONTILLA *ET AL.*, 2006; CASAL Y ORÓS, 2007), incluyendo algunas especies de emídidos (INNIS *ET AL.*, 2007; CHANSUE *ET AL.*, 2011). Esta técnica es una modificación de la tinción de Wright, que reduce el tiempo del procedimiento original de cuatro minutos a quince segundos, aproximadamente. La tinción se lleva a cabo en 3 pasos (VIVES Y AGUILAR, 1988A);

1. El frotis sanguíneo se fija introduciéndolo en disolución metálica de triarilmetano durante 5 segundos u 8 inmersiones.
2. Se retira el exceso de fijador sin aclarar y se introduce el frotis en el primer colorante, una solución tamponada de xanteno, que se corresponde con la tinción ácida de eosina (color rojo), durante 5 segundos u 8 inmersiones.
3. Se retira el exceso de colorante sin aclarar y se introduce el frotis en el segundo colorante, una solución tamponada de tiazina, que se corresponde con la tinción alcalina de hematoxicilina (color azul), durante 5 segundos u 8 inmersiones. A continuación, el porta se aclara suavemente con agua corriente hasta que ésta se vuelve cristalina y finalmente la preparación se deja secar al aire.

Una vez secas, las preparaciones se montaron sellándolas con un cubreobjetos unido al porta mediante un adhesivo con base de xilol, para de esta manera evitar el deterioro de la preparación.

Finalmente, los frotis fueron valorados en un microscopio Nikon Eclipse E400 bajo el objetivo de 100 aumentos (1000x), usando aceite de inmersión. En aquellos casos en los que era necesario tomar imágenes de las preparaciones, se empleó una cámara de fotos digital Olympus SC 30 acoplada al microscopio.

### **3.4.- DETERMINACIÓN DE LAS DIMENSIONES CELULARES**

Para establecer el tamaño celular y nuclear de las células sanguíneas de *Trachemys scripta scripta* (eritrocitos, leucocitos y trombocitos), se empleó el programa informático de análisis de imagen Image-Pro<sup>®</sup> Plus Software, Version 4.5 (Media Cybernetics<sup>®</sup>).

Como base para la realización de las medidas, se emplearon imágenes tomadas con la cámara Olympus SC 30 a 100 aumentos, a partir de las preparaciones sanguíneas procesadas con Diff quick<sup>®</sup> de 15 de los individuos muestreados en invierno. Para cada ejemplar se midieron 20 eritrocitos y al menos 10 heterófilos, 10 eosinófilos, 10 basófilos, 10 linfocitos y 10 monocitos. En el caso de los trombocitos, se decidió distinguir entre trombocitos “normales” y trombocitos “pleomórficos”, caracterizados por su morfología irregular, por lo que se midieron al menos 10 células de cada uno de los dos tipos por animal.

La unidad de medida empleada fue el micrómetro ( $\mu\text{m}$ ) y las medidas usadas para establecer el tamaño celular y nuclear fueron el área, el perímetro, el diámetro mayor y el diámetro menor.

### **3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS DIMENSIONES CELULARES**

Las variables se resumieron en medias y desviaciones estándar (SD) para cada uno de los parámetros en estudio. Dado que las medias están anidadas en los animales, la comparación de medias según sexo se realizó utilizando los modelos de efectos mixtos (LAIRD Y WÄRE, 1982). Un contraste de hipótesis se consideró estadísticamente significativo cuando el correspondiente p-valor fue inferior a 0.05. Los datos se analizaron utilizando el paquete R, versión 3.1.0 (R Development Core Team, 2014).

### **3.6.- TÉCNICAS CITOQUÍMICAS**

Para la realización de las técnicas citoquímicas se emplearon las extensiones sanguíneas obtenidas de 15 de los animales muestreados en invierno; 2 preparaciones por animal y técnica, es decir, 18 extensiones por animal, teniendo en cuenta que se llevaron a cabo 7 técnicas citoquímicas, dos de ellas a su vez divididas en dos variantes, necesitando por tanto dos preparaciones para cada una de estas variantes.

Las técnicas citoquímicas realizadas fueron (ALLEMAN *ET AL.*, 1992; WORK *ET AL.*, 1998; CASAL Y ORÓS, 2007):

- **Fosfatasa ácida (ACP)**
  - Con inhibición de tartrato
  - Sin inhibición de tartrato
- **Bencidina peroxidasa (PER)**
- **$\alpha$ -Naftil butirato esterasa (NBE)**
  - Con inhibición de fluoruro
  - Sin inhibición de fluoruro
- **Cloroacetato esterasa (CAE)**
- **Sudán negro B (SBB)**
- **Ácido periódico de Schiff (PAS)**
- **Azul de toluidina (AT)**

Para la elaboración de todas las técnicas citoquímicas, a excepción de las técnicas NBE y AT, se usaron los protocolos del fabricante de los reactivos (SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup> INC) incluidos en los kits comerciales y, como apoyo complementario, los descritos por otros autores (JAIN, 1986A; VIVES Y AGUILAR, 1988B). Como mecanismo de control de la correcta realización de las técnicas citoquímicas, dado que los kits comerciales están estandarizados para su uso en humana, se realizaron preparaciones de sangre humana para todas las tinciones, comprobando que los resultados obtenidos fueran los mismos que los esperados para cada técnica.

### 3.6.1.- Fosfatasa Ácida (ACP)

Esta técnica citoquímica se emplea para la detección a nivel citológico de actividad fosfatasa ácida en los leucocitos.

#### -Principio

Se basa en el uso del naftol AS-BI fosfato y de la sal Fast Garnet GBC. Depende de las sales de diazonio (cloruro de diazonio) que se forman tras hacer reaccionar una arilamina con nitrito sódico en un medio ácido, originando depósitos coloreados altamente insolubles (BURSTONE, 1962). El ácido tartárico se emplea para detectar la existencia de resistencia al tartrato por parte de la fosfatasa ácida.

Los frotis sanguíneos se incuban en una solución que contiene naftol AS-BI ácido fosfórico y sal Fast Garnet GBC. Los frotis se pueden tratar con L(+)-tartrato. El naftol AS-BI, liberado por hidrólisis enzimática, forma complejos rápidamente con la sal Fast Garnet GBC originando depósitos insolubles de color marrón en los lugares de actividad enzimática. Las células que contienen fosfatasa ácida sensible al ácido tartárico no demuestran actividad, mientras que las que poseen fosfatasa resistente al ácido tartárico no se ven afectadas por su uso.

#### -Procedimiento

##### 1.- Fijación:

- Solución fijadora: Se mezclan 25ml de solución citrato, 65ml de acetona y 8ml de formaldehído al 37%
- Los frotis se fijan durante 30 segundos a temperatura ambiente (18-26° C) y posteriormente se aclaran bien con agua desionizada.

##### 2.-Tinción:

- Se toman dos tubos de ensayo y a cada uno se le añaden 0,5ml de solución base de Fast Garnet y 0,5ml de solución de nitrito sódico. Se mezcla cuidadosamente durante 30 segundos y se deja reposar 2 minutos.
- Se toman dos cubetas de 100ml (cubetas A y B) y se introduce, al mismo tiempo que se mezcla;

	Cubeta A (Sin tartrato)	Cubeta B (Con tartrato)
Agua desionizada precalentada a 37° C	45ml	45ml
Solución preparada en paso anterior	1.0ml	1.0ml
Solución Naftol AS-BI fosfato	0.5ml	0.5ml
Solución de acetato	2.0ml	2.0ml
Solución de tartrato	-----	1.0ml

- Etiquetar como A y B dos vasos Coplin y transferir a ellos las soluciones de las cubetas correspondientes. Mantener a 37° C en baño María.
- Introducir los portaobjetos (duplicados para cada variante de la técnica) e

incubar durante 1 hora a 37° C protegidos de la luz. (Cada vez que se vayan a incubar nuevas muestras se debe renovar la solución).

- Aclarar bien los portas con agua desionizada y contrateñir durante 2 minutos en solución de hematoxilina de Gill N° 3.
- Aclarar en agua alcalina del grifo durante varios minutos para azular los núcleos.
- Secar al aire. No se recomienda usar un medio de montaje para evitar que se dañen las características tintoriales.

### **-Observaciones esperadas**

Los portas se evalúan subjetivamente por la presencia o ausencia de la enzima resistente al tartrato.

La actividad fosfatasa ácida se manifiesta como gránulos de color púrpura y/o rojo oscuro en los leucocitos y una reacción se considera positiva en el frotis cuando existen más de dos células con actividad difusa e intensa, es decir, más de 40 gránulos positivos (SUN, 1985). En humana, en ausencia de ácido tartárico, muchos leucocitos muestran zonas granulares de actividad enzimática. En presencia de tartrato, puede observarse algún gránulo ocasional en los linfocitos y en algunos macrófagos especializados (SUN, 1985), pero normalmente son las células polimorfonucleares las que se muestran positivas (VIVES Y AGUILAR, 1988B).

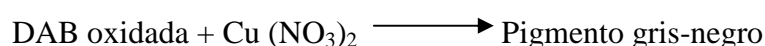
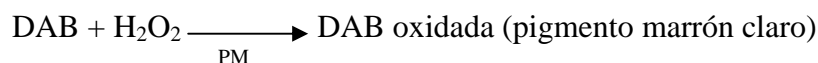
### **3.6.2.- Bencidina Peroxidasa (Mieloperoxidasa) (PER)**

Es un sistema de tinción citoquímica utilizado en humana para caracterizar polimorfonucleares en frotis de sangre o de médula ósea.

#### **-Principio**

La diaminobencidina (DAB) se usa como sustituto de la bencidina para la citoquímica de la peroxidasa (mieloperoxidasa). Tiene menos poder tintorial que la bencidina (GRAHAM Y KARNOVSKY, 1966A, B), lo que hace que sea menos atractiva para las técnicas histoquímicas. Sin embargo, algunos autores han mejorado la metodología DAB haciendo a esta enzima más útil para diferenciar a los granulocitos y sus precursores y a los monocitos de las células de origen linfoide (HANKER *ET AL.*, 1978, 1979, 1980; HANKER Y GIAMMARA, 1991). Acorde a su modificación, el producto de reacción de color marrón se intensifica en primer lugar con las sales de cobre, seguido por la aplicación de la tinción de Papanicolaou modificada por Gill, provocando gránulos de coloración gris-negra intensa en los lugares de actividad mieloperoxidasa en neutrófilos y monocitos (GILL *ET AL.*, 1974).

El procedimiento de SIGMA-ALDRICH® es similar al desarrollado por HANKER *ET AL.* (1978, 1979, 1980) y HANKER Y GIAMMARA (1991), involucrando las siguientes reacciones:



Cuando se usa la tinción de Papanicolaou modificada por Gill el producto de reacción se intensifica y tiñe de un color característico a los neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

### **-Procedimiento**

#### 1.- Fijación:

- Solución fijadora: Se emplea la solución glutaraldehído-acetona. Se obtiene mezclando 25ml de acetona de grado reactivo y 75ml de solución de glutaraldehído.
- Los frotis se fijan durante 1 minuto a una temperatura de 4-8° C y posteriormente se aclaran 30 segundos en agua desionizada

#### 2.- Tinción:

- Incubar durante 45 segundos en **solución Diaminobenzidina/Peróxido<sup>1</sup>** (para cada cambio de muestras se renueva la solución)
  - Aclarar brevemente (30 segundos) con agua desionizada
  - Sumergir en **solución de nitrato cúprico<sup>2</sup>** 2 minutos aplicando una suave agitación (para cada cambio de muestras se renueva la solución)
  - Aclarar brevemente (30 segundos) con agua desionizada
  - Sumergir en solución de hematoxilina de Gill N° 3 durante 8 segundos ó 4 inmersiones. Filtrar previamente la solución
  - Aclarar en agua desionizada 5 segundos, con agitación, cambiándola dos veces
  - Sumergir durante 12 segundos ó 6 inmersiones en la **solución de trabajo de concentrado de Scott sustituto del agua corriente<sup>3</sup>**
  - Aclarar en agua desionizada 5 segundos cambiándola dos veces
  - Sumergir en solución de EA modificada de Gill durante 1 minuto
  - Aclarar en etanol al 95% 3 segundos, cambiando 2 veces
  - Aclarar en etanol absoluto 3 segundos, cambiando 2 veces
  - Aclarar en xilol 3 segundos, cambiando 3 veces
  - Dejar secar y montar con un medio de montaje permanente con base de xilol
- o **Solución Diaminobenzidina/Peróxido<sup>1</sup>**.
    - Se preparan 50ml de solución de trabajo Trizmal, mezclando 5ml de tampón Trizmal y 45ml de agua desionizada
    - Se añade un vial de diaminobenzidina
    - Se añaden 0.5ml de peróxido de hidrógeno al 1% y se mezcla bien
  - o **Solución de nitrato cúprico<sup>2</sup>**.
    - Se disuelve un vial de nitrato cúprico en 250ml de agua desionizada
  - o **Solución de trabajo de concentrado de Scott sustituto del agua corriente<sup>3</sup>**.
    - Se mezclan 5ml de concentrado de Scott y 45ml de agua desionizada

### **-Observaciones esperadas**

En muestras humanas, los neutrófilos y sus precursores presentan una granulación intracelular gris-negra. Los monocitos se tiñen de forma menos intensa, mientras que los eosinófilos se tiñen rojo-naranja. Los basófilos adquieren una coloración azul y los linfocitos son negativos.

### **3.6.3.- $\alpha$ -Naftil Butirato Esterasa (NBE) (ANSLEY Y ORNSTEIN, 1970)**

Esta técnica está orientada a detectar actividad esterasa en algunos linfocitos, principalmente células T maduras, aunque también permite demostrar una actividad esterasa inespecífica en monocitos y macrófagos.

#### **-Principio**

Las esterases no específicas hidrolizan ésteres sintéticos, como el  $\alpha$ -naftil acetato o butirato, liberando  $\alpha$ -naftol, que forma un complejo con las sales diazonio originando un producto coloreado insoluble en el lugar de la actividad enzimática o adyacente al mismo (KASS, 1979).

#### **-Procedimiento**

En su mayor parte se siguieron las pautas del fabricante (SIGMA-ALDRICH®), salvo para el paso de la inhibición por fluoruro (VIVES Y AGUILAR, 1988B).

##### 1.- Fijación:

- Solución fijadora: Se emplea el fijador citrato-acetona-formaldehído. Se mezclan 25ml de solución citrato, 65ml de acetona y 8ml de formol al 37%.
- Se fijan los portas durante 10 segundos a temperatura ambiente (23-26° C) y se aclaran con agua desionizada durante 45 segundos, dejándose secar al aire durante al menos 45 minutos.

##### 2.- Tinción:

- Se prepara una **solución tampón fosfato**; se disuelve el contenido de un bote de tampón fosfato en 500ml de agua desionizada
- Se prepara una **solución de tabletas de nitrito sódico**; se disuelve una tableta en 6.25ml de agua desionizada
- Se añaden 1.5ml de solución de tabletas de nitrito sódico a 1.5ml de solución de pararosalina. Se mezcla cuidadosamente y se deja reposar al menos 5 minutos
- Precalentar 40ml de tampón fosfato a 37° C y añadir a la solución anterior
- Añadir 5ml de solución  $\alpha$ -naftil butirato y mezclar bien. Decantar en un vaso Coplin. La solución deberá tener un color ámbar
- Colocar las muestras en la solución e incubar durante 1 hora a 37° C
- Para realizar la **inhibición con fluoruro**, se añaden a la solución anterior 72mg de fluoruro sódico y se incuban las muestras 1 hora a 37° C. (En



ambos casos se debe preparar una nueva solución de incubación cada vez que se realice un cambio de muestras)

- Aclarar con agua corriente del grifo 2-3 minutos y dejar secar al aire al menos 15 minutos
- Añadir 5ml de azul de metileno a 45ml de agua desionizada y contrateñir durante 5 minutos
- Lavar con agua desionizada y dejar secar. No se recomienda usar un medio de montaje para evitar que se dañen las características tintoriales.

#### **-Observaciones esperadas**

En humana se considera que la reacción es positiva en todos los elementos pertenecientes al sistema mononuclear fagocítico (ANSLEY Y ORNSTEIN, 1970; VIVES Y AGUILAR, 1988B). Así, los monocitos muestran una coloración rojo-marrón y los linfocitos (células T maduras) presentan un patrón de tinción focal (puntos) rojo-marrón. En contraste con los linfocitos, la actividad enzimática en los monocitos es sensible al fluoruro (ANSLEY Y ORNSTEIN, 1970).

### **3.6.4.- Naftol Cloroacetato Esterasa (CAE)**

Esta técnica citoquímica se emplea en humana con la finalidad de demostrar citológicamente la presencia de esterases específicas y no específicas en los leucocitos.

#### **-Principio**

Las esterases celulares son ubicuas, representando una serie de enzimas que actúan sobre ciertos substratos. Bajo determinadas condiciones de reacción es posible diferenciar los tipos celulares usando substratos específicos para esterases. Los métodos descritos otorgan a los leucocitos granulocíticos unas características hematológicas que los hacen discernibles de los monocitos (BURSTONE, 1957; MOLONEY *ET AL.*, 1960; YAM *ET AL.*, 1971; CAWLEY Y HAYHOE, 1972; BEARD Y FAIRLY, 1974; BECKMANN *ET AL.*, 1974, YAM *ET AL.*, 1974; BENNET Y REED, 1975).

Para llevar a cabo la técnica, los frotis de sangre, de médula ósea o las preparaciones tisulares, se incuban con el naftol AS-D cloroacetato (NCAE) y con la presencia de una sal diazonio recién preparada. Como consecuencia, se forma un complejo con la sal diazonio que genera depósitos muy coloreados en los lugares de actividad enzimática.

Los procedimientos más recientes, como el de SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>, incorporan sales diazonio estables. Estas sales se forman al reaccionar una arilamina con nitrito sódico en un medio ácido (BURSTONE, 1962), dando como resultado el cloruro de diazonio (usualmente inestable), que puede tratarse con determinados compuestos (cloruro de zinc, sulfato de zinc o naftaleno-1-6-disulfonato) originando sales estables. Los citados estabilizantes pueden producir una marcada inhibición de algunos sistemas enzimáticos, mientras los cloruros de diazonio son menos inhibitorios (BURSTONE, 1962).

## **-Procedimiento**

### 1.- Fijación:

- Solución fijadora: Se emplea el fijador citrato-acetona-formaldehído. Se mezclan 25ml de solución citrato, 65ml de acetona y 8ml de formaldehído al 37%. Se puede conservar en nevera a 2-8° C
- Los portaobjetos se fijan a temperatura ambiente (23-26° C) durante 30 segundos y se deben aclarar muy bien durante 45-60 segundos con agua desionizada corriente. (Cualquier traza de formaldehído puede inhibir la actividad enzimática durante la incubación)

### 2.- Tinción:

- Precalear a 37° C 40ml de agua desionizada
- Mezclar 1ml de solución de nitrito sódico y 1ml de solución base de Fast Red Violet LB en un tubo de ensayo. Agitar suavemente y dejar reposar 2 minutos
- Añadir la mezcla anterior a los 40ml de agua desionizada a 37° C
- Añadir 5ml de tampón Trizmal
- Añadir 1ml de solución de Naftol ASD Cloroacetato. En este momento, la solución debe volverse roja. Se mezcla bien y se decanta en un vaso Coplin
- Incubar las muestras durante 15 minutos a 37° C protegidas de la luz. (Cada vez que se incuben nuevas muestras debe renovarse la solución de incubación)
- Aclarar bien en agua desionizada durante al menos 2 minutos
- Contrateñir durante 2 minutos en solución de hematoxilina de Gill N° 3
- Aclarar con agua del grifo y dejar secar al aire
- Si fuera necesario cubrir los portas, usar sólo medios acuosos de montaje.

## **-Observaciones esperadas**

Los puntos de actividad se muestran como una granulación roja y son los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) las células que en mayor medida muestran positividad, debido a la especificidad de esta enzima para dichos leucocitos. Los monocitos y linfocitos muestran actividad leve o ausente.

## **-Método de valoración**

Los puntos con actividad naftol AS-D cloroacetato esterasa aparecen como una brillante granulación roja. La puntuación de 0 a 4+ indica la cantidad e intensidad de las tinciones individuales en el citoplasma de los diferentes tipos celulares. Las características de la puntuación se basan en cierto modo en interpretaciones subjetivas. En la Tabla 3.4 se sugiere un formato de puntuación. Las conclusiones se centran en la presencia o ausencia relativa de tinción.

**Tabla 3.4.** Características de la puntuación de la tinción

Puntuación celular	Intensidad de la tinción	Interpretación
0	Ninguna	-
1+	De débil a moderada	±
2+	De moderada a fuerte	+
3+	Fuerte	+
4+	Muy fuerte (brillante)	+

### 3.6.5.- Sudán Negro B (SBB)

Esta técnica se utiliza para la detección histoquímica de los gránulos de los neutrófilos en frotis de sangre y médula ósea.

#### -Principio

Varios lípidos, incluyendo los fosfolípidos, las grasas neutras y los esteroides, se tiñen intensamente con Sudán negro B. La reacción de los gránulos de los neutrófilos con la tinción fue descrita por SHEEHAN Y STOREY (1947). La tinción SBB para leucocitos presenta un patrón tintorial similar al de la técnica de la mieloperoxidasa (DAVEY Y NELSON, 1977; VIVES Y AGUILAR, 1988B). Las células de la línea linfocítica son negativas, mientras que las formas mieloides y monocitoides muestran reacciones positivas. Por ello, el SBB se considera una técnica útil para la identificación de leucemias mielocíticas y mielomonocíticas (DAVEY Y NELSON, 1977).

Los métodos antiguos empleaban la fijación basada en vapor de formaldehído (DAVEY Y NELSON, 1977), lo que frecuentemente ocasionaba pérdidas celulares y artefactos en la tinción. Así, el procedimiento actual se basa en la fijación con glutaraldehído tamponado, que junto con un tiempo de incubación más corto, permite una excelente tinción sin pérdida celular ni distorsión (HANKER *ET AL.*, 1978).

#### -Procedimiento

##### 1.- Fijación:

- Solución fijadora: Se mezclan 25ml de acetona de grado reactivo y 75ml de solución de glutaraldehído y se enfría a 2-8° C
- Las muestras se fijan durante 1 minuto a 2-8° C con una suave agitación. Después se lavan concienzudamente con agua desionizada

##### 2.- Tinción:

- Sumergir las muestras durante 5 minutos en Sudán Black B, con agitación intermitente
- Enjuagar al menos 3 veces en etanol al 70% hasta que no se desprenda tinte y lavar posteriormente con agua destilada
- Contrateñir con solución de hematoxilina de Gill N° 3 durante 5 minutos y seguidamente enjuagar con agua del grifo

- Secar al aire y montar en DPX u otro medio de montaje que sea adecuado.

#### **-Observaciones esperadas**

En las muestras de humana los neutrófilos y sus precursores presentan una granulación intracelular azul-negra. Los monocitos se tiñen menos intensamente, y los linfocitos son negativos (DAVEY Y NELSON, 1977).

### **3.6.6.- Reacción del Ácido Periódico de Schiff (PAS)**

Esta técnica se emplea para la diferenciación de linfocitos y la detección de mucopolisacáridos.

#### **-Principio**

Cuando se tratan con ácido periódico, los glicoles se oxidan en aldehídos. Los aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff (una mezcla de pararosanilina y metabisulfito sódico), liberándose pararosanilina que forma un compuesto de color magenta (HOTCHKISS, 1948).

#### **-Procedimiento**

##### 1.- Fijación:

- Solución fijadora: Se emplea la solución formol-etanol. Se mezclan 5ml de formaldehído al 37% y 45 ml de etanol al 95%. Debe guardarse cerrada
- Los frotis se fijan durante 1 minuto a temperatura ambiente y posteriormente se aclaran 1 minuto en agua corriente del grifo

##### 2.- Tinción:

- Sumergir las muestras en solución de ácido periódico durante 5 minutos a temperatura ambiente
- Aclarar varias veces con agua destilada
- Sumergir en Reactivo Schiff durante 15 minutos a temperatura ambiente. (El reactivo de Schiff debe conservarse tapado y en nevera)
- Aclarar durante 5 minutos en agua corriente del grifo
- Contrateñir con solución de hematoxilina de Gill N° 3 durante 90 segundos
- Aclarar los portaobjetos con agua corriente del grifo durante 15-30 segundos y dejar secar al aire
- Montar con medio basado en xilol o tolueno

#### **-Observaciones esperadas**

Generalmente los leucocitos polimorfonucleares muestran una intensa tinción roja citoplasmática. Los eritrocitos y sus precursores son negativos, mientras que los megacariocitos y las plaquetas son intensamente positivos (DAVEY Y NELSON, 1977; VIVES Y AGUILAR, 1988B). Los monocitos se tiñen moderadamente y pueden mostrar pequeños

gránulos positivos, mientras que los linfocitos aparecen negativos (DAVEY Y NELSON, 1977).

### 3.6.7.- Azul de Toluidina (AT) (WOLMAN, 1971)

Se trata de una tinción específica para los leucocitos granulocíticos basófilos.

#### -Principio

El azul de toluidina es una sustancia que reacciona específicamente con los proteoglicanos sulfatados presentes en algunas células, como es el caso de los gránulos de los basófilos, generando una tinción metacromática de color violeta (VIVES Y AGUILAR, 1988B).

#### -Procedimiento

1.- Fijación:

- Solución fijadora: Se mezcla 1 parte de formaldehído al 37% y 9 partes de etanol absoluto
- Se fijan los portos durante 20 segundos y posteriormente se lavan en agua destilada

2.- Tinción:

- Se sumergen las muestras en **solución de Azul de Toluidina<sup>1</sup>** durante 15 segundos
- Hacer 2 ó 3 inmersiones en etanol al 96%
- Sumergir en etanol absoluto durante 2 minutos y dejar secar
- Sumergir en etanol absoluto durante 2 minutos y dejar secar
- Sumergir en xilol durante 2 minutos y dejar secar
- Sumergir en xilol durante 2 minutos y dejar secar
- Montar con medio de montaje basado en xilol

#### o **Solución de Azul de Toluidina<sup>1</sup>** (CABALLERO *ET AL.*, 1993).

1.- Elaboración del tampón acetato acético a pH 4.2

- **Solución A.** Mezclar 2.7gr de acetato de sodio con 100ml de agua destilada
- **Solución B.** Mezclar 1.1ml de ácido acético 0.5 Molar con 100ml de agua destilada
- Se mezclan 30ml de solución A y 90ml de solución B. Se comprueba que el nivel de pH sea el correcto.

2.- Se mezclan 0.132grs de Azul de Toluidina al 81% SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup> con 66ml del tampón elaborado en el paso anterior y se obtiene la solución de Azul de Toluidina al 0.2%.

### **-Observaciones esperadas**

Al tratarse de un colorante metacromático (cambia de color al contacto con las células), se observan dos colores en las extensiones sanguíneas: los núcleos celulares y el fondo de la extensión de color azul verdoso y los basófilos de color violeta intenso. El resto de las células sanguíneas no presentan metacromasia (VIVES Y AGUILAR, 1988B).

\* Todas las preparaciones citoquímicas elaboradas fueron valoradas en un microscopio Nikon Eclipse E400 con el objetivo de 100 aumentos (1000x) y aceite de inmersión. Cuando fue necesario realizar fotos de las muestras se empleó una cámara Olympus SC30 acoplada al microscopio.

### **3.7.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Con el objetivo de realizar la clasificación ultraestructural de las células sanguíneas de *Trachemys scripta scripta*, se emplearon muestras de sangre provenientes de 10 de los individuos chequeados en verano, 5 machos y 5 hembras. De la sangre de cada ejemplar se obtuvieron 4 capilares de microhematocrito con heparina de amonio (Statspin<sup>®</sup> Iris Sample Processing Chatsworth California), que se centrifugaron inmediatamente a 4000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos en una centrífuga Herolab UniCen<sup>®</sup> M. Tras la centrifugación se descartó el plasma sobrenadante, extrayendo posteriormente la capa blanca remanente (formada por los leucocitos y los trombocitos) y parte de la capa roja (eritrocitos) para su procesado. Estas muestras fueron sometidas al siguiente protocolo:

- Para su fijación inicial, las muestras se depositaron en una solución tamponada de glutaraldehído al 2% (0.1M-pH 7.4), en tubos Eppendorf<sup>®</sup> individuales durante 12 horas a 6 °C.
- Posteriormente, se centrifugaron y lavaron durante 5 minutos usando la misma solución. Este proceso se repitió un total de tres veces.
- Como segundo fijador se empleó el tetróxido de osmio tamponado al 2%, en el que las muestras quedaron depositadas durante 4 horas.
- Seguidamente, se ejecutaron 3 lavados en agua destilada de 5 minutos de duración cada uno.
- Las muestras se depositaron nuevamente en una solución de acetato de uranilo al 1% durante 4 horas.
- A continuación se llevó a cabo la deshidratación de las células mediante series de etanol de graduación progresiva (20°, 40°, 60°, 70° y 100°)
- Óxido de propileno-etanol 100%
- Óxido de propileno
- Propileno óxido-embed812 resina
- Polimerización de las muestras en resina Embed812 fresca a 70° C durante 48 horas.
- Generación de ultrasecciones de 80 nanómetros en un Ultracut S (Leica, Austria).
- Las ultrasecciones se tiñeron con acetato de uranilo (1% metanol) y solución de plomo Stato.

- La observación y microfotografías de las muestras se realizaron mediante un microscopio electrónico JEOL JEM-1400 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

### **3.8.- HEMATOCRITO**

El valor hematocrito se corresponde con la proporción de células por volumen de sangre. Concretamente se emplea para conocer el porcentaje de eritrocitos (LASSEN Y WEISER, 2004), y suele considerarse un buen indicador del estado de salud (HERBST Y JACOBSON, 1997).

Para determinar los valores de hematocrito de los sujetos en estudio, se empleó el método del microhematocrito, que ha sido descrito como una forma rápida y práctica de determinar dicho valor (CAMPBELL, 1996B). Para ello, a partir de muestras de sangre fresca de los 30 ejemplares chequeados tanto en invierno como en verano, se obtuvieron dos capilares de microhematocrito (Statspin<sup>®</sup> Iris Sample Processing Chatsworth California) por animal y estación. Tras su centrifugación a 12000rpm durante 3 minutos en una centrífuga Herolab UniCen<sup>®</sup> M, se pudo realizar la lectura del hematocrito, comprobando la concordancia del resultado entre los dos capilares elaborados por animal en cada estación.

La valoración visual del plasma resultante de la centrifugación de los capilares, permite además la detección de algunas alteraciones como la ictericia, la lipemia o la hemólisis (LASSEN Y WEISER, 2004).

### **3.9.- RECUENTO TOTAL DE ERITROCITOS**

En reptiles, los recuentos totales de eritrocitos y leucocitos deben realizarse mediante métodos manuales, debido a que la existencia de trombocitos y eritrocitos nucleados impide el uso de contadores celulares automáticos (WALLACH Y BOEVER, 1983; CAMPBELL, 1996B, 2004A; WILKINSON, 2004).

El recuento total de eritrocitos (número de eritrocitos por microlito de sangre) se midió en los 30 animales en estudio tanto en invierno como en verano, a partir de la sangre previamente depositada en botes de heparina de litio y mantenida en refrigeración a 4° C.

Para su determinación se empleó un método de medición manual directo, el Natt & Herrick (NATT Y HERRICK, 1952; CAMPBELL, 1988). Este método ha sido utilizado por muchos autores para la obtención de los recuentos totales de eritrocitos y leucocitos en reptiles, incluidos los quelonios (LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003; RASKIN, 2000; HARR *ET AL.*, 2001; CUADRADO *ET AL.*, 2002; FONTENOT *ET AL.*, 2004; GELLI *ET AL.*, 2004; MONTILLA *ET AL.*, 2006; CHANSUE *ET AL.*, 2011; SALAKIJ *ET AL.*, 2014; YANG *ET AL.*, 2014).

Para la realización de la técnica, primero debe elaborarse la solución diluyente-colorante de Natt & Herrick, para lo cual tienen que mezclarse los siguientes reactivos en el orden establecido (NATT Y HERRICK, 1952; CAMPBELL, 1988);

- NaCl: 3.88gr
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2.50gr
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O: 2.91gr
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.25 g.
- Formaldehído al 37%: 7.50ml
- Violeta de metilo 2B: 0.10gr
- Seguidamente se añade agua destilada hasta obtener un volumen de 1000ml.
- La solución se deja reposar unas 12 horas y posteriormente se filtra (papel de filtro Whatman n°2) y queda preparada para su utilización.

Para diluir la sangre a analizar con el Natt & Herrick se utilizó la pipeta hemocitométrica de Thoma con perla roja, que permite la obtención de una dilución 1/200. La sangre se aspira con la pipeta hasta la marca de 0.5 y posteriormente la pipeta se rellena con el diluyente hasta la marca 101, mezclando lentamente la dilución durante unos 5 minutos para obtener una correcta homogeneización de la muestra.

Para llevar a cabo el recuento se empleó la cámara de Neubauer modificada (Neubauer improved. Marienfeld Germany 0,0025 mm<sup>2</sup>), llenándola con la mezcla obtenida y procediendo al conteo de los eritrocitos presentes en los cuadrados de las 4 esquinas y el central del gran cuadrado central de la cámara, empleando el microscopio con el objetivo de 40 (400x). Esta operación se hizo por duplicado, aprovechando los dos pocillos de la cámara, obteniéndose posteriormente la media estadística de las dos medidas. Dicho valor se multiplicó por 10000 obteniéndose el número de eritrocitos por  $\mu$ L de sangre (CAMPBELL, 1996B, 2004A).

### **3.10.- RECUESTO TOTAL DE LEUCOCITOS**

Para la obtención del recuento de leucocitos se empleó el mismo método que para el recuento total de eritrocitos, el Natt & Herrick, por considerarse un sistema más preciso que la otra técnica de medición más empleada (eosinophil unopette) (FONTENOT *ET AL.*, 2004).

El recuento total de leucocitos (número de leucocitos por microlito de sangre) se midió en los 30 animales en estudio tanto en invierno como en verano, a partir de la sangre previamente depositada en botes de heparina de litio y mantenida en refrigeración a 4° C.

Aunque para la elaboración del recuento leucocitario se suele emplear la pipeta hemocitométrica de Thoma con perla blanca, que permite una dilución 1/20 de la muestra, en nuestra experiencia este método no resultó viable, ya que a la hora de la valoración microscópica los campos aparecieron saturados de células sanguíneas, haciendo muy difícil la detección y recuento de los leucocitos. Por este motivo, se decidió emplear la pipeta hemocitométrica de Thoma con perla roja, obteniendo una muestra 10 veces más diluída (dilución 1/200) y más apropiada para el recuento de los glóbulos blancos. Esta variante ha sido empleada por otros autores para el recuento leucocitario en varias especies de reptiles (CHANSUE *ET AL.*, 2011; SALAKIJ *ET AL.*, 2014; YANG *ET AL.*, 2014). De esta manera, se simplificó el proceso ya que con la misma muestra empleada para el recuento de eritrocitos se llevó a cabo el recuento de leucocitos.



Una vez depositada la muestra de sangre diluída con Natt & Herrick en la cámara de Neubauer, se contaron los leucocitos presentes en los cuatro cuadrados grandes de las esquinas de la cámara. Esta operación se realizó por duplicado, aprovechando los dos pocillos de la cámara y calculando posteriormente la media estadística. Este valor se multiplicó por 500 (50x10 considerando que la muestra está 10 veces más diluída), obteniéndose el número de leucocitos por  $\mu\text{L}$  de sangre (CAMPBELL, 1996B).

### **3.11.- RECUESTO DE TROMBOCITOS**

Actualmente no existe un sistema realmente fiable para obtener el recuento de trombocitos en reptiles. Por ese motivo, en este estudio se han empleado los dos métodos más frecuentemente utilizados con el objetivo de aunar y comparar los resultados y conseguir una mayor fiabilidad.

- **Recuento en cámara.-** Se realizó a partir de la misma muestra empleada para el recuento total de eritrocitos y leucocitos a una dilución 1/200. En este caso, el recuento se hizo en la totalidad de la cuadrícula central, en ambos lados de la cámara de Neubauer, empleando el objetivo de 40 (400x). El número obtenido se multiplicó por 1000, resultando en el número total de trombocitos por  $\mu\text{L}$  de sangre. Sin embargo, los resultados desprendidos mediante esta técnica son variables debido a la dificultad de distinguir estas células de los linfocitos pequeños (FRYE 1991; MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2011).
- **Estimación en frotis.-** A partir de las dos preparaciones por estación y animal teñidas con Diff quick<sup>®</sup> que se obtuvieron de los 30 sujetos en estudio, se buscaron al azar, con el microscopio, al menos 10 campos por frotis donde no se observaran agregaciones de trombocitos. El número de trombocitos contados por campo se sumó y se obtuvo la media estadística. Ese valor se multiplicó por el cuadrado del objetivo utilizado, en este caso, el cuadrado de 100 (10000). Con ello se obtuvo el número aproximado de trombocitos por  $\mu\text{L}$  de sangre (RASKIN, 2000; BARROWS *ET AL.*, 2004; WILKINSON, 2004).

### **3.12.- RECUESTO DIFERENCIAL LEUCOCITARIO**

Para realizar el recuento diferencial leucocitario, se emplearon los frotis sanguíneos teñidos con la tinción hematológica Diff quick<sup>®</sup> obtenidos de los 30 animales en estudio en las dos estaciones en las que se realizó el muestreo. Las muestras se valoraron al microscopio óptico usando aceite de inmersión y el objetivo de 100 aumentos (1000x).

Se contaron 100 leucocitos por extensión sanguínea y un total de 200 leucocitos por animal y estación, teniendo en cuenta que las extensiones se realizaron por duplicado. El conteo se llevó a cabo en diferentes áreas del frotis, siguiendo la dirección de la cola a la cabeza, con un movimiento de vaivén (en zigzag), para abarcar la mayor superficie posible. De esta forma se obtuvo el porcentaje relativo de cada tipo celular leucocitario. A este respecto, WILKINSON (2004) destacó la importancia de examinar todas las áreas de la extensión sanguínea para obtener una muestra representativa de los leucocitos, ya que las

células de mayor tamaño tienden a encontrarse con mayor frecuencia en los márgenes de los frotis, pudiéndose obtener resultados erróneos si no se observan todas las áreas de las preparaciones.

### **3.13.- ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE ERITROCITOS INMADUROS**

Para la estimación del porcentaje de eritrocitos inmaduros, se emplearon los frotis sanguíneos teñidos con la tinción hematológica Diff quick<sup>®</sup> obtenidos de los 30 animales en estudio en las dos estaciones en las que se realizó el muestreo. Las muestras se valoraron al microscopio óptico usando aceite de inmersión y el objetivo de 100 aumentos (1000x).

Se revisaron 250 eritrocitos por frotis y un total de 500 eritrocitos por animal y estación, empleando campos al azar en los que las células se distribuyeran en una capa simple. Los eritrocitos con morfología y características tintoriales compatibles con formas inmaduras eran anotados y posteriormente se obtenía su porcentaje con respecto al número total de eritrocitos valorados.

### **3.14.- MEDICIÓN DEL NIVEL DE HEMOGLOBINA**

El nivel de hemoglobina se midió en los 30 animales en estudio tanto en invierno como en verano, a partir de la sangre previamente depositada en botes de heparina de litio y mantenida en refrigeración a 4° C.

Se empleó para este proceso un analizador automático, el Celltac- $\alpha$  NIHON KOHDEN<sup>®</sup> MEK-6450K, cuyo funcionamiento se basa en el método de la cianometahemoglobina, que es el más empleado para la determinación de la hemoglobina en reptiles (SEIDEL, 2003; MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2011). Además de la rapidez y sencillez de la prueba por tratarse de un proceso automático, la principal ventaja que ofreció este sistema fue el escaso volumen de sangre entera requerido, unos 20 $\mu$ L (0,02mL).

### **3.15.- ÍNDICES ERITROCITARIOS**

Los índices eritrocitarios describen el tamaño medio y el contenido en hemoglobina de los eritrocitos. Pueden ser calculados por medio de contadores celulares automáticos o utilizando ecuaciones estándar. En nuestro estudio se emplearon las ecuaciones estándar a partir de los valores de hematocrito, hemoglobina y recuento total de eritrocitos (CAMPBELL, 1995);

**VCM:** Hematocrito x 10/Recuento eritrocitos ( $10^6$ )

**HCM:** Hemoglobina x 10/Recuento eritrocitos ( $10^6$ )

**CHCM:** Hemoglobina x 100/Hematocrito

- El Volumen Corpuscular Medio (VCM) indica el tamaño medio de los eritrocitos. Un valor aumentado, normal o disminuido indica que el eritrocito medio es macrocítico, normocítico o microcítico, respectivamente.
- La Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) indica el contenido medio de hemoglobina por eritrocito. Desde el punto de vista clínico es frecuentemente ignorada.
- La Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) indica la concentración de hemoglobina en un eritrocito medio. Una CHCM normal o disminuida indica que, morfológicamente, el eritrocito es normocrómico o hipocrómico respectivamente. Un aumento de la CHCM indica un error laboratorial o de muestreo, como puede ocurrir en muestras hemolisadas (WILLARD Y TVEDTEN, 2004).

### **3.16.- MEDICIÓN DE LAS PROTEÍNAS TOTALES (SÓLIDOS TOTALES)**

El valor de los sólidos totales es aproximadamente equivalente a la concentración de proteínas plasmáticas, siempre que el plasma muestre una apariencia clara, ya que la lipemia y la hemólisis producen elevaciones artefactuales de su nivel. Se puede determinar de forma sencilla mediante el uso de un refractómetro y una pequeña cantidad de plasma sanguíneo (AIELLO, 2000). Esta técnica ha sido empleada por algunos autores para la determinación del nivel de proteínas totales en quelonios (PERPIÑÁN *ET AL.*, 2008).

En nuestro estudio, los sólidos totales se determinaron a partir del plasma obtenido de los capilares empleados para la determinación del nivel de hematocrito, por lo que se dispuso de dos capilares por animal y estación. La lectura se realizó en un refractómetro portátil C-6 COMECTA, modelo SZJ-D. Para obtener el plasma, los capilares, una vez centrifugados y realizada la medición del hematocrito, eran fracturados por encima del nivel celular y el contenido en plasma depositado sobre la superficie de lectura del refractómetro. Las muestras de ambos capilares eran analizadas para confirmar la concordancia de los resultados.

### **3.17.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS**

Como objetivo principal se pretendía comparar las variables hematológicas de los sujetos en estudio según sexo y estación. Los datos se analizaron en primer lugar por estación (invierno, verano) y dentro de cada una por grupo de sexo. Se hizo lo mismo según peso y estación (animales de >700grs y <700grs). Las variables se resumieron, según se dieran o no los supuestos de normalidad, en medias y desviaciones estándar o en

medias y rangos intercuartílicos (IQR). Las medias se compararon mediante el t-test para datos independientes. Las variables se resumieron también dentro de cada grupo de sexo y de peso por estaciones. En este caso, las medias se compararon utilizando el t-test para datos emparejados y las medianas, mediante el test de Wilcoxon para datos emparejados.

Considerando que se realizó la determinación del número de trombocitos en ambas estaciones por dos métodos alternativos (recuento en cámara y estimación en frotis), se exploró la concordancia de ambos métodos mediante el análisis de Bland-Altman (BLAND Y ALTMAN, 1986). Este método básicamente consiste en representar la diferencia de las dos determinaciones frente a la media geométrica de ambas. Cuando las determinaciones sean concordantes, las diferencias tenderán a distribuirse alrededor del cero. Se utilizó asimismo la regresión de Passing-Bablok (BABLOK *ET AL.*, 1988). Finalmente se obtuvo el coeficiente de correlación intraclase (ICC), el cual se estimó mediante un intervalo de confianza al 95%. Un valor de ICC próximo a 1 indica concordancia entre ambas determinaciones. Un valor nulo indica falta de concordancia (los procedimientos miden magnitudes diferentes).

En todos los análisis, un test de hipótesis se consideró estadísticamente significativo cuando el correspondiente p-valor fue inferior a 0.05. Los datos se analizaron utilizando el paquete R, versión 3.1.0 (R Development Core Team, 2014).



## **4.- RESULTADOS**

### **4.1.- CÉLULAS SANGUÍNEAS**

En este estudio, mediante las técnicas de microscopía óptica rutinaria (tinción Diff quick<sup>®</sup>), tinciones citoquímicas y microscopía electrónica, se han identificado 7 tipos celulares sanguíneos en la tortuga de vientre amarillo u orejas amarillas (*Trachemys scripta scripta*). Además de eritrocitos y trombocitos, se han descrito 5 tipos de leucocitos; heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos.

### **4.2.- DIMENSIONES Y MORFOLOGÍA CELULAR**

#### **4.2.1.- El Eritrocito**

Mediante el uso de la tinción de Diff quick<sup>®</sup> (DQ) los eritrocitos maduros muestran una morfología que va de oval a bacilar con una coloración citoplasmática azul-violeta débil o rosa pálido y un núcleo de redondo a oval con una tinción basófila mucho más intensa que la del citoplasma. Algunos eritrocitos presentan a su vez inclusiones citoplasmáticas basófilas pequeñas de morfología redondeada. Éstas aparecen frecuentemente de manera individual y con una localización cercana al núcleo (Fig. 4.1). En ocasiones también se detectan eritrocitos inmaduros. Éstos muestran un contorno más redondeado y un núcleo proporcionalmente más grande, además de un mayor nivel de basofilia citoplasmática (Fig. 4.2). En apariencia, estas células tienden a ser de menor tamaño que los eritrocitos maduros, pero esto se ve influenciado por el estado de desarrollo de cada célula y debido a la escasez de las formas inmaduras en los frotis sanguíneos, no se pudo establecer una comparativa estadísticamente significativa.

En la Tabla 4.1 se exponen las dimensiones celulares y nucleares medias observadas en este estudio para el eritrocito de *Trachemys scripta scripta*.

**Tabla 4.1.** Dimensiones citoplasmáticas y nucleares del eritrocito de *Trachemys scripta scripta* y comparativa entre sexos (todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$  salvo el área, en  $\mu\text{m}^2$ ).

	Variable	Global N = 15	Machos N = 7	Hembras N = 8	P
<b>Eritrocitos</b>	Ø Mayor citoplasma	18.42 ± 1.53	18.49 ± 1.53	18.36 ± 1.52	.731
	Ø Mayor núcleo	5.45 ± 0.47	5.52 ± 0.43	5.38 ± 0.49	.329
	Ø Menor citoplasma	11.46 ± 0.95	11.51 ± 0.97	11.78 ± 0.91	.393
	Ø Menor núcleo	4.57 ± 0.39	4.58 ± 0.40	4.55 ± 0.38	.806
	Área citoplasma	176.9 ± 22.47	175.6 ± 22.4	178.2 ± 22.53	.696
	Área núcleo	19.97 ± 2.84	20.35 ± 2.77	19.64 ± 2.87	.498
	Perímetro citoplasma	48.43 ± 3.31	48.42 ± 3.25	48.45 ± 3.38	.971
	Perímetro núcleo	15.86 ± 1.22	16.04 ± 1.22	15.70 ± 1.20	.416

Los datos son medias  $\pm$  SD; Los p-valores se obtuvieron de modelos de efectos mixtos. Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$

#### 4.2.2.- El Heterófilo

Los heterófilos de *Trachemys scripta scripta* aparecen como células redondas con un núcleo generalmente periférico redondo u oval de coloración violeta oscuro, con cromatina agrupada. Algunos heterófilos presentan núcleos lobulados. El abundante citoplasma, de coloración débilmente eosinófila, suele encontrarse repleto de gránulos eosinófilos (naranja-fucsia) fusiformes y/o pleomórficos, generalmente muy apretados entre sí, lo que dificulta su distinción. En ocasiones, estos gránulos tienden a protruir contra la membrana citoplasmática y el núcleo (Fig. 4.3).

**Tabla 4.2.** Dimensiones citoplasmáticas y nucleares del heterófilo de *Trachemys scripta scripta* y comparativa entre sexos (todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$  salvo el área, en  $\mu\text{m}^2$ ).

	Variable	Global N = 15	Machos N = 7	Hembras N = 8	P
<b>Heterófilos</b>	Ø Mayor citoplasma	12.41 ± 1.94	12.26 ± 2.25	12.54 ± 1.63	.751
	Ø Mayor núcleo	7.61 ± 0.9	7.65 ± 0.95	7.58 ± 0.85	.633
	Ø Menor citoplasma	11.36 ± 1.73	11.28 ± 1.94	11.43 ± 1.54	.857
	Ø Menor núcleo	4.95 ± 0.99	4.83 ± 1.13	5.05 ± 0.84	.319
	Área citoplasma	113.2 ± 33.47	111.8 ± 38.21	114.5 ± 28.95	.875
	Área núcleo	29.19 ± 7.59	28.60 ± 8.62	29.71 ± 6.59	.498
	Perímetro citoplasma	37.48 ± 5.66	37.13 ± 6.55	37.79 ± 4.77	.804
	Perímetro núcleo	19.96 ± 2.41	19.83 ± 2.68	20.08 ± 2.16	.619

Los datos son medias  $\pm$  SD; Los p-valores se obtuvieron de modelos de efectos mixtos. Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$

### 4.2.3.- El Eosinófilo

Los eosinófilos son muy similares a los heterófilos en lo que respecta a su forma y tamaño, con un núcleo generalmente excéntrico redondo u ovalado de coloración púrpura, con cromatina agrupada. Dicho núcleo puede aparecer lobulado en algunas ocasiones. El citoplasma presenta una coloración que va del rosa pálido al violeta débil, portando un número moderado de pequeños gránulos perfectamente redondos de coloración rosa-roja brillante (eosinófilos) (Fig. 4.4).

**Tabla 4.3.** Dimensiones citoplasmáticas y nucleares del eosinófilo de *Trachemys scripta scripta* y comparativa entre sexos (todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$  salvo el área, en  $\mu\text{m}^2$ ).

	Variable	Global N = 15	Machos N = 7	Hembras N = 8	P
<b>Eosinófilos</b>	Ø Mayor citoplasma	13.56 ± 1.54	13.28 ± 1.34	13.80 ± 1.66	.412
	Ø Mayor núcleo	7.57 ± 1.11	7.62 ± 1.16	7.53 ± 1.07	.757
	Ø Menor citoplasma	11.62 ± 1.32	11.92 ± 1.41	11.36 ± 1.18	.251
	Ø Menor núcleo	4.76 ± 1.12	4.55 ± 1.09	4.95 ± 1.11	.413
	Área citoplasma	123.8 ± 22.5	126.6 ± 25.34	121.3 ± 19.46	.531
	Área núcleo	28.39 ± 8.1	27.53 ± 8.09	29.15 ± 8.09	.648
	Perímetro citoplasma	39.9 ± 3.66	40.04 ± 3.85	39.78 ± 3.49	.856
	Perímetro núcleo	20.0 ± 2.99	19.77 ± 3.19	20.21 ± 2.80	.738

Los datos son medias  $\pm$  SD; Los p-valores se obtuvieron de modelos de efectos mixtos. Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$

### 4.2.4.- El Basófilo

Los basófilos son, por lo general, células más pequeñas que los heterófilos y eosinófilos. Muestran una morfología redondeada con un núcleo redondo central o en ocasiones periférico. Su escaso citoplasma contiene numerosos gránulos redondos basófilos de diferentes tamaños, que frecuentemente enmascaran el núcleo e impiden su valoración morfológica. En ocasiones se observan áreas citoplasmáticas degranuladas con un aspecto apolillado (Fig. 4.5).

En la Tabla 4.4 se exponen las dimensiones celulares y nucleares medias observadas en este estudio para el basófilo de *Trachemys scripta scripta*.



**Tabla 4.4.** Dimensiones citoplasmáticas y nucleares del basófilo de *Trachemys scripta scripta* y comparativa entre sexos (todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$  salvo el área, en  $\mu\text{m}^2$ ).

	Variable	Global N = 15	Machos N = 7	Hembras N = 8	P
<b>Basófilos</b>	Ø Mayor citoplasma	8.69 ± 0.98	8.68 ± 1.03	8.70 ± 0.93	.942
	Ø Mayor núcleo	6.33 ± 0.88	6.29 ± 0.84	6.36 ± 0.91	.804
	Ø Menor citoplasma	7.89 ± 0.84	7.86 ± 0.88	7.92 ± 0.82	.820
	Ø Menor núcleo	5.63 ± 0.88	5.62 ± 0.85	5.65 ± 0.90	.933
	Área citoplasma	54.39 ± 11.54	54.51 ± 11.90	54.28 ± 11.27	.965
	Área núcleo	29.06 ± 8.03	28.72 ± 7.79	29.37 ± 8.27	.804
	Perímetro citoplasma	26.16 ± 2.81	26.16 ± 2.94	26.15 ± 2.71	.987
	Perímetro núcleo	18.82 ± 2.64	18.73 ± 2.53	18.90 ± 2.74	.864

Los datos son medias ± SD; Los p-valores se obtuvieron de modelos de efectos mixtos. Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$

#### 4.2.5.- El Linfocito

Los linfocitos muestran cierta variabilidad de tamaño, lo que hace que se encuentren tanto células pequeñas como medianas-grandes, aunque es más frecuente localizar células de tamaño moderado. La morfología es generalmente redondeada, con un núcleo redondo, a veces dentado, de coloración azul-violeta oscura y cromatina densamente agrupada. El escaso citoplasma tiende a rodear el núcleo mostrando una coloración débilmente azulada y en ocasiones finamente granular (Fig. 4.6). El ratio núcleo/citoplasma suele ser 0,75.

Como puede observarse en la Tabla 4.5, algunas de las medidas de los linfocitos en hembras son mayores que en machos.

**Tabla 4.5.** Dimensiones citoplasmáticas y nucleares del linfocito de *Trachemys scripta scripta* y comparativa entre sexos (todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$  salvo el área, en  $\mu\text{m}^2$ ).

	Variable	Global N = 15	Machos N = 7	Hembras N = 8	P
<b>Linfocitos</b>	Ø Mayor citoplasma	9.25 ± 1.33	9.00 ± 1.21	9.47 ± 1.39	<b>.032</b>
	Ø Mayor núcleo	8.05 ± 0.95	7.83 ± 0.94	8.24 ± 0.92	.062
	Ø Menor citoplasma	8.04 ± 0.99	7.97 ± 0.96	8.11 ± 1.01	.501
	Ø Menor núcleo	6.84 ± 0.83	6.74 ± 0.89	6.93 ± 0.76	.226
	Área citoplasma	58.21 ± 13.62	55.99 ± 13.06	60.20 ± 13.87	.109
	Área núcleo	43.89 ± 9.58	42.08 ± 10.13	45.50 ± 8.81	.107
	Perímetro citoplasma	27.67 ± 3.42	26.67 ± 3.24	27.80 ± 3.50	<b>.046</b>
	Perímetro núcleo	23.62 ± 2.64	23.03 ± 2.66	24.15 ± 2.53	.055

Los datos son medias ± SD; Los p-valores se obtuvieron de modelos de efectos mixtos. Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$

#### 4.2.6.- El Monocito

Los monocitos de *Trachemys scripta scripta* son por lo general de mayor tamaño que los linfocitos, con un contorno habitualmente redondeado. El núcleo es de color azul-violeta, con un patrón de cromatina menos denso que el de los linfocitos y una morfología variable, que puede ser fusiforme, arriñonada, oval o dentada. El citoplasma, más abundante que el de los linfocitos, es de color azul pálido, apreciándose ocasionalmente diminutos gránulos basófilos y/o eosinófilos que le otorgan una apariencia arenosa (Fig. 4.7). El ratio núcleo/citoplasma suele ser 0.5.

**Tabla 4.6.** Dimensiones citoplasmáticas y nucleares del monocito de *Trachemys scripta scripta* y comparativa entre sexos (todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$  salvo el área, en  $\mu\text{m}^2$ ).

	Variable	Global N = 15	Machos N = 7	Hembras N = 8	P
<b>Monocitos</b>	Ø Mayor citoplasma	12.57 ± 1.63	12.48 ± 1.54	12.65 ± 1.70	.558
	Ø Mayor núcleo	9.58 ± 1.04	9.39 ± 0.95	9.74 ± 1.10	.252
	Ø Menor citoplasma	10.59 ± 1.23	10.51 ± 1.16	10.66 ± 1.29	.494
	Ø Menor núcleo	7.08 ± 0.82	6.92 ± 0.82	7.22 ± 0.81	.101
	Área citoplasma	104.3 ± 21.87	103.65 ± 20.99	104.87 ± 22.72	.796
	Área núcleo	53.64 ± 8.97	51.84 ± 8.78	55.21 ± 8.89	.153
	Perímetro citoplasma	36.57 ± 4.0	36.23 ± 3.67	36.96 ± 4.27	.427
	Perímetro núcleo	27.04 ± 2.73	26.43 ± 2.30	27.57 ± 2.98	.187

Los datos son medias ± SD; Los p-valores se obtuvieron de modelos de efectos mixtos. Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$

#### 4.2.7.- El Trombocito

En este estudio se ha distinguido entre trombocitos “normales” y trombocitos “pleomórficos” o reactivos, en función de su morfología. Ambas variantes fueron detectadas en todos los individuos en estudio y se consideraron la misma célula pero en etapas diferentes de actividad o activación.

Los trombocitos normales presentan generalmente una forma oval o más frecuentemente bacilar, con un núcleo oval o bacilar de color azul-violeta oscuro y cromatina agrupada. El citoplasma suele estar localizado en los polos nucleares y en ocasiones pueden apreciarse estructuras redondas refractarias a ambos lados del núcleo compatibles con vacuolas (Fig. 4.8). Por su parte, los trombocitos pleomórficos suelen ser pequeños y redondeados aunque pueden mostrar una morfología irregular. El núcleo, generalmente redondo, es más basófilo que el de los trombocitos normales y el citoplasma, muy escaso, rodea al núcleo a modo de halo (Fig. 4.9). En ambos casos, el citoplasma presenta una coloración azul muy pálida y llega a ser transparente en la mayoría de las células, lo que permite distinguir a los trombocitos pleomórficos de los linfocitos. En muchas preparaciones sanguíneas los trombocitos pleomórficos tienden a aparecer formando agregados.

## Resultados

Las medidas celulares y nucleares de los trombocitos normales y de los trombocitos pleomórficos han sido tomadas y estudiadas por separado (Tablas 4.7 y 4.8).

**Tabla 4.7.** Dimensiones citoplasmáticas y nucleares del trombocito “normal” de *Trachemys scripta scripta* y comparativa entre sexos (todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$  salvo el área, en  $\mu\text{m}^2$ ).

	Variable	Global N = 15	Machos N = 7	Hembras N = 8	P
<b>Trombocitos Normales</b>	Ø Mayor citoplasma	15.08 ± 2.31	14.80 ± 2.33	15.43 ± 2.26	.479
	Ø Mayor núcleo	8.96 ± 0.9	9.08 ± 0.79	8.82 ± 1.02	.305
	Ø Menor citoplasma	5.76 ± 0.82	5.76 ± 0.83	5.76 ± 0.82	.971
	Ø Menor núcleo	4.43 ± 0.53	4.44 ± 0.57	4.42 ± 0.48	.870
	Área citoplasma	71.15 ± 16.55	70.62 ± 17.93	71.79 ± 14.89	.889
	Área núcleo	32.97 ± 5.47	33.57 ± 5.67	32.25 ± 5.20	.513
	Perímetro citoplasma	35.4 ± 4.91	34.75 ± 4.97	36.19 ± 4.78	.449
	Perímetro núcleo	22.23 ± 1.89	22.46 ± 1.72	21.95 ± 2.05	.416

Los datos son medias ± SD; Los p-valores se obtuvieron de modelos de efectos mixtos. Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$

**Tabla 4.8.** Dimensiones citoplasmáticas y nucleares del trombocito “pleomórfico” de *Trachemys scripta scripta* y comparativa entre sexos (todas las medidas están expresadas en  $\mu\text{m}$  salvo el área, en  $\mu\text{m}^2$ ).

	Variable	Global N = 15	Machos N = 7	Hembras N = 8	P
<b>Trombocitos Pleomórficos</b>	Ø Mayor citoplasma	7.31 ± 1.02	7.28 ± 1.05	7.33 ± 1.00	.829
	Ø Mayor núcleo	6.30 ± 0.76	6.30 ± 0.80	6.29 ± 0.73	.929
	Ø Menor citoplasma	5.82 ± .830	5.72 ± 0.72	5.90 ± 0.91	.449
	Ø Menor núcleo	5.01 ± 0.67	4.96 ± 0.66	5.04 ± 0.68	.723
	Área citoplasma	33.19 ± 7.66	32.36 ± 7.08	33.91 ± 8.11	.473
	Área núcleo	24.94 ± 5.13	24.64 ± 5.08	25.20 5.19	.759
	Perímetro citoplasma	20.83 ± 2.54	20.61 ± 2.46	21.02 ± 2.61	.579
	Perímetro núcleo	17.97 ± 1.92	17.88 ± 1.99	18.04 ± 1.86	.836

Los datos son medias ± SD; Los p-valores se obtuvieron de modelos de efectos mixtos. Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$

## **4.3.- ULTRAESTRUCTURA CELULAR**

### **4.3.1.- El Eritrocito**

Mediante el uso del microscopio electrónico, los eritrocitos de *Trachemys scripta scripta* muestran un contorno oval o fusiforme, con un núcleo redondo u oval con heterocromatina densa. En el citoplasma de algunos eritrocitos se detectó la presencia de ribosomas e incluso de alguna mitocondria (Fig. 4.10). También se describe la existencia en algunas células de pequeñas inclusiones citoplasmáticas redondas electrodensas, localizadas cerca del núcleo y habitualmente individuales (Fig. 4.11). Dichas estructuras no presentan orgánulos reconocibles ni membrana celular o pili.

### **4.3.2.- El Heterófilo**

Los heterófilos se muestran como células redondeadas con abundante citoplasma. El núcleo aparece oval, fusiforme o arriñonado, habitualmente excéntrico y con acúmulos variables pero moderados de heterocromatina. El citoplasma presenta multitud de gránulos con una morfología que va de oval a fusiforme y una electrodensidad homogénea pero moderada. También se describen algunos gránulos redondeados más pequeños (Fig. 4.12). Los orgánulos más comúnmente detectados son las mitocondrias y el retículo endoplasmático liso, aunque también se puede encontrar retículo endoplasmático rugoso y complejos de Golgi. Los gránulos de Beta-glucógeno son escasos.

### **4.3.3.- El Eosinófilo**

La morfología externa de los eosinófilos de *Trachemys scripta scripta* es muy similar a la descrita para los heterófilos. El núcleo, de localización periférica, aparece oval o fusiforme, con acúmulos variables de heterocromatina. Los gránulos citoplasmáticos muestran un contorno que va de redondo a oval y una electrodensidad superior a la de los gránulos de los heterófilos y sin estructuras cristalinas surcando su interior (Fig. 4.13). También se suelen observar pequeñas inclusiones granulares y cierta cantidad de Beta-glucógeno. Las mitocondrias y el retículo endoplasmático liso y rugoso son fáciles de detectar, mientras que los complejos de Golgi y las vacuolas son raros.

### **4.3.4.- El Basófilo**

Los basófilos son células redondas, más pequeñas que los heterófilos y los eosinófilos, con un gran núcleo redondo y excéntrico que muestra acúmulos moderados de heterocromatina y una baja electrodensidad (Fig. 4.14). El citoplasma suele ser escaso, lleno de gránulos redondos, aunque algunas veces aparecen gránulos pleomórficos. La mayoría de estos gránulos presenta una elevada electrodensidad y una forma bien definida, mientras que otros parecen estar sufriendo un proceso de degeneración. Un pequeño número de gránulos puede exhibir una baja electrodensidad, con una estructura interna rica

en microtúbulos (Fig. 4.15). Las mitocondrias, el retículo endoplasmático liso y rugoso y los complejos de Golgi son habituales en estas células y los gránulos de Beta-glucógeno son abundantes.

#### **4.3.5.- El Linfocito**

El núcleo de los linfocitos es redondo, aunque habitualmente se presenta dentado o segmentado, con abundantes acúmulos de heterocromatina. El escaso citoplasma tiene una forma redondeada, pero frecuentemente se aprecian márgenes irregulares y proyecciones citoplasmáticas (Fig. 4.16). Las mitocondrias y los polirribosomas y también el retículo endoplasmático rugoso, son abundantes, pero también se describe la presencia de retículo endoplasmático liso y complejos de Golgi, además de algunos pequeños gránulos electrodensos.

#### **4.3.6.- El Monocito**

Los monocitos aparecen, mediante el uso del microscopio electrónico, como células de gran tamaño, de aspecto redondeado, fusiforme o ameboide, con un núcleo proporcionalmente pequeño, de contorno bacilar/fusiforme, frecuentemente dentado y con una menor cantidad de heterocromatina que en el caso de los linfocitos (Fig. 4.17). Los orgánulos más frecuentes son las mitocondrias, el retículo endoplasmático liso y rugoso y algunas vacuolas de pequeño tamaño. También se observan gránulos pleomórficos pequeños de electrodensidad variable.

#### **4.3.7.- El Trombocito**

Los trombocitos de *Trachemys scripta scripta*, ultraestructuralmente se muestran como células pequeñas redondas u ovals con escaso citoplasma (Fig. 4.17). El núcleo suele ser redondo, aunque en ocasiones aparece irregularmente lobulado. La heterocromatina nuclear es de localización periférica y su electrodensidad mayor que la del núcleo de los linfocitos. El citoplasma puede presentar proyecciones digitiformes en su superficie y los polirribosomas suponen el orgánulo más frecuente, aunque también se detectan mitocondrias y retículo endoplasmático liso y rugoso. Cuando el complejo de Golgi está presente, suele aparecer adyacente al centrosoma. Algunos trombocitos desarrollan estructuras canaliculares claras que recuerdan a pequeñas vacuolas y también gránulos pequeños de apariencia heterogénea (Fig. 4.18). La agregación celular se observa con frecuencia en las preparaciones.

#### 4.4.- TINCIONES CITOQUÍMICAS

En la Tabla 4.9 se resumen las características tintoriales de las células sanguíneas de *Trachemys scripta scripta* con respecto a las 7 técnicas citoquímicas, y sus variantes, empleadas en este estudio para obtener la caracterización citoquímica de dichas células.

Se debe resaltar que las preparaciones de sangre humana empleadas como controles de las tinciones citoquímicas mostraron resultados similares a los esperados, por lo que se considera que el desarrollo y elaboración de las técnicas fue el adecuado.

**Tabla 4.9.** Resumen de las características citoquímicas de las células sanguíneas de *Trachemys scripta scripta*.

Tipo celular	TINCIONES CITOQUÍMICAS								
	ACP <sup>1</sup>		PER	NBE <sup>2</sup>		CAE	SBB	PAS	AT
	T	NT		F	NF				
<b>Eritrocito</b>	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	-
<b>Heterófilo</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Eosinófilo</b>	+	+	-	-	+	+	±	+	-
<b>Basófilo</b>	±	±	-	+	+	+	-	+	+
<b>Linfocito</b>	+	+	-	±	±	±	-	±	-
<b>Monocito</b>	+	+	-	-	+	+	-	+	-
<b>Trombocito</b>	-	-	-	+	+	-	-	+	-

ACP: fosfatasa ácida; PER: bencidina peroxidasa; NBE: alfa-Naftil butirato esterasa;

CAE: cloroacetato esterasa; SBB: Sudan negro B; PAS: ácido periódico de Schiff; AT: azul de toluidina.

<sup>1</sup> Se llevaron a cabo dos variantes de la ACP. (T): con ácido tartárico y (NT): sin ácido tartárico.

<sup>2</sup> Se llevaron a cabo dos variantes de la NBE. (F): con fluoruro sódico y (NF): sin fluoruro sódico.

(+) Positivo; (-) Negativo; (±) Moderadamente positivo; (+/-) Algunos positivos, algunos negativos.

##### 4.4.1.- Fosfatasa Ácida (ACP)

###### ○ Sin Tartrato.-

- Algunos **eritrocitos** de *Trachemys scripta scripta* mostraron positividad a esta técnica en forma de estructuras circulares únicas localizadas cerca del núcleo y con una coloración rojo-marrón (Fig. 4.19).
- El **heterófilo** reaccionó de forma positiva, observándose gránulos eosinófilos infiltrados en el citoplasma (Fig. 4.20).
- El **eosinófilo** mostró una coloración positiva intensamente eosinófila (fucsia) en algunos puntos del citoplasma. El resto de áreas citoplasmáticas fueron refractarias a la tinción (Fig. 4.21).
- Los **basófilos** aparecen como células moderadamente positivas a esta técnica, ya que pueden portar escasos gránulos eosinófilos positivos en su citoplasma, mientras que el resto de su superficie es refractaria a la tinción (Fig. 4.22).

- Los **linfocitos** contienen gránulos citoplasmáticos positivos de coloración rojo-fucsia, más abundantes en las células de mayor tamaño y mayor porcentaje de citoplasma (Fig. 4.23).
- El **monocito** muestra múltiples gránulos positivos eosinófilos de pequeño tamaño en su citoplasma (Fig. 4.24).
- Por su parte los **trombocitos**, tanto normales como pleomórficos, no reaccionan en respuesta a esta tinción (Fig. 4.25).

○ **Con Tartrato.-**

- El uso del ácido tartárico no ha inhibido la respuesta a la fosfatasa ácida en ninguno de los tipos celulares estudiados en *Trachemys scripta scripta* que fueron positivos para la ACPNT, por lo que la actividad fosfatasa ácida de estas células es resistente a dicha inhibición (Fig. 4.26-4.32). Sólo en algunas ocasiones se ha apreciado cierto grado de disminución de la intensidad tintorial, como es el caso de los basófilos (Fig. 4.29).

#### 4.4.2.- Bencidina Peroxidasa (Mieloperoxidasa) (PER)

- La única célula que reaccionó de forma positiva a esta tinción citoquímica fue el **heterófilo**, que mostró una coloración marrón oscuro-negra en sus gránulos citoplasmáticos (Fig. 4.33). El resto de las células sanguíneas fueron negativas y no pudieron ser valoradas adecuadamente debido a la dificultad de su identificación.

#### 4.4.3.- $\alpha$ -Naftil Butirato Esterasa (NBE)

○ **Sin Fluoruro.-**

- Al igual que se observó en la técnica de la ACP, algunos **eritrocitos** de *Trachemys scripta scripta* mostraron estructuras circulares positivas de color marrón rojizo cercanas al núcleo e individuales (Fig. 4.34).
- El **heterófilo** presenta múltiples gránulos citoplasmáticos positivos de coloración rojiza-anaranjada (Fig. 4.35).
- El **eosinófilo** muestra una coloración citoplasmática difusa positiva que va del rojo oscuro al rosado (Fig. 4.34).
- Los gránulos de los **basófilos** reaccionan positivamente manifestando una coloración violeta intenso o fucsia (Fig. 4.36).
- Los **linfocitos** muestran por lo general una coloración marrón débilmente positiva en su citoplasma (Fig. 4.37).
- El citoplasma de los **monocitos** desarrolla una coloración positiva marrón-rojiza más intensa que la de los linfocitos (Fig. 4.38).
- En el caso de los **trombocitos**, tanto los normales como los pleomórficos, muestran en su citoplasma estructuras granulares intensamente positivas de color rojo oscuro (Fig. 4.39 y 4.40).

○ **Con Fluoruro.-**

- Con la excepción de los eosinófilos y los monocitos, la actividad butirato esterasa de las células sanguíneas de *Trachemys scripta scripta* no se vio inhibida por la acción del fluoruro sódico, por lo que la actividad esterasa de estas células se considera resistente a dicha inhibición. Sin embargo, sí se detectó cierto grado de disminución de la intensidad tintorial en la mayoría de los casos (Fig. 4.41, 4.42, 4.44, 4.45, 4.47 y 4.48).
- Los **eosinófilos** desarrollaron una respuesta negativa frente a la tinción de NBEF, que se manifestó con un citoplasma completamente refractario (Fig. 4.43).
- Los **monocitos** también resultaron negativos, perdiendo la coloración marrón intensa que manifestaba su citoplasma mediante el uso de la NBENF (Fig. 4.46).

#### 4.4.4.- Naftol Cloroacetato Esterasa (CAE)

- Con esta técnica citoquímica los **eritrocitos** reaccionaron de forma negativa, no manifestando actividad cloroacetato esterasa (Fig. 4.49).
- El **heterófilo** presenta en su citoplasma multitud de gránulos positivos eosinófilos de color rosado sobre un fondo gris (Fig. 4.50).
- El **eosinófilo** también reacciona positivamente, mostrando pequeños gránulos rosa-violeta en un citoplasma sin coloración (Fig. 4.51).
- El **basófilo** manifiesta su positividad con una coloración rosa difusa de todo el citoplasma (Fig. 4.52).
- Los **linfocitos** suelen aparecer como células débilmente positivas, portadoras de un suave punteado eosinófilo en un citoplasma mayoritariamente basófilo (Fig. 4.53).
- Los **monocitos** son más intensamente positivos que los linfocitos, mostrando un citoplasma con mayor cantidad de gránulos eosinófilos (Fig. 4.54).
- En el caso de los **trombocitos**, al igual que sucede con los eritrocitos, no se ha detectado actividad cloroacetato esterasa (Fig. 4.55).

#### 4.4.5.- Sudán Negro B (SBB)

- Los **eritrocitos** no muestran ningún tipo de respuesta positiva frente a esta técnica de tinción citoquímica (Fig. 4.56).
- Los **heterófilos**, que suponen la célula que más fuertemente reacciona frente a esta técnica, presentan un citoplasma gris oscuro salpicado por gránulos pleomórficos de color negro y algunos pequeños gránulos eosinófilos, además de un núcleo basófilo (Fig. 4.57).
- Los **eosinófilos** se tiñen de forma débilmente positiva con el SBB, mostrando un citoplasma de coloración gris difusa, además de pequeños gránulos eosinófilos (Fig. 4.58).



- Los **basófilos** resultaron negativos para esta técnica, lo cual dificultó su detección y valoración morfológica. El citoplasma apareció completamente refractario alrededor de un núcleo basófilo (Fig. 4.59).
- El **linfocito**, negativo, se caracteriza por un núcleo intensamente basófilo y un escaso citoplasma débilmente basófilo que lo rodea (Fig. 4.60).
- El **monocito**, al igual que el linfocito, se asemeja mucho a la imagen que tienen estas células cuando se someten a la tinción de Diff quick®; con núcleo basófilo y citoplasma de coloración azul pálida (Fig. 4.61).
- De igual manera, los **trombocitos** aparecen negativos para la tinción SBB (Fig. 4.57).

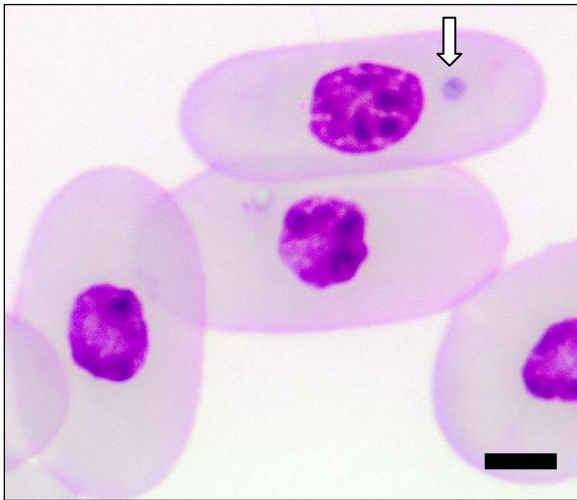
#### 4.4.6.- Reacción del Ácido Periódico de Schiff (PAS)

- Algunos **eritrocitos** de *Trachemys scripta scripta* manifiestan una respuesta positiva para el PAS con el mismo patrón observado para la ACP y NBE, es decir, en forma de estructuras circulares únicas y adyacentes al núcleo. En este caso dichas estructuras mostraron una coloración eosinófila (rosa-fucsia) (Fig. 4.62).
- Los **heterófilos** reaccionan de forma positiva, mostrando una granulación intensamente eosinófila (fucsia) sobre un fondo citoplasmático débilmente basófilo (Fig. 4.63).
- Los **eosinófilos** se caracterizan por presentar una coloración rosa débil, en ocasiones puntiforme, sobre un citoplasma generalmente incoloro (Fig. 4.64).
- Los **basófilos** muestran un citoplasma de coloración rosa con un patrón difuso y un núcleo basófilo que generalmente ocupa una posición central (Fig. 4.65).
- Los **linfocitos** suelen tener un citoplasma moderadamente positivo, con una coloración rosa pálido y un núcleo basófilo (Fig. 4.66).
- El **monocito** muestra una coloración citoplasmática más intensamente positiva que la de los linfocitos, con mayor eosinofilia (Fig. 4.67).
- Tanto los **trombocitos** normales como los pleomórficos reaccionan intensamente con el PAS, observándose un granulado y punteado de color fucsia brillante (Fig. 4.68 y 4.69).

#### 4.4.7.- Azul de Toluidina

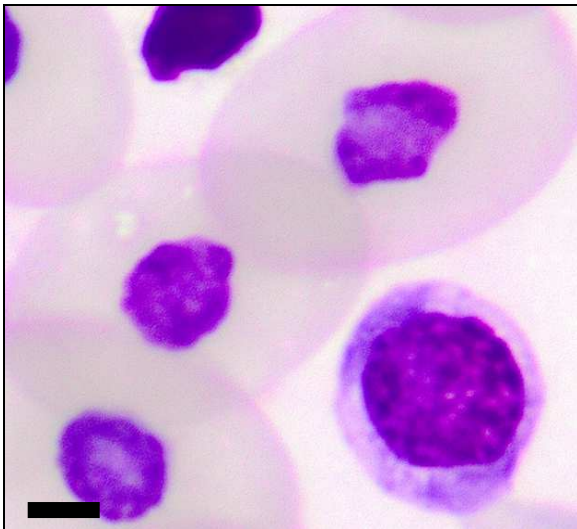
- La única célula sanguínea de *Trachemys scripta scripta* que ha reaccionado de forma positiva con el uso del azul de toluidina ha sido el **basófilo**. Esta célula manifiesta una reacción metacromática que se corresponde con una coloración fucsia muy intensa en el citoplasma. Los núcleos aparecen débilmente basófilos (Fig. 4.70).
- El citoplasma de los **heterófilos** y **eosinófilos** resulta refractario para esta tinción, por lo que no se han podido identificar (Fig. 4.71).
- Los **linfocitos** y **monocitos**, también negativos, presentan un núcleo y citoplasma fuertemente basófilos (Fig. 4.72 y 4.73).
- Algo similar sucede con los **trombocitos** (Fig. 4.74).

#### 4.5.- RECOPIACIÓN DE IMÁGENES



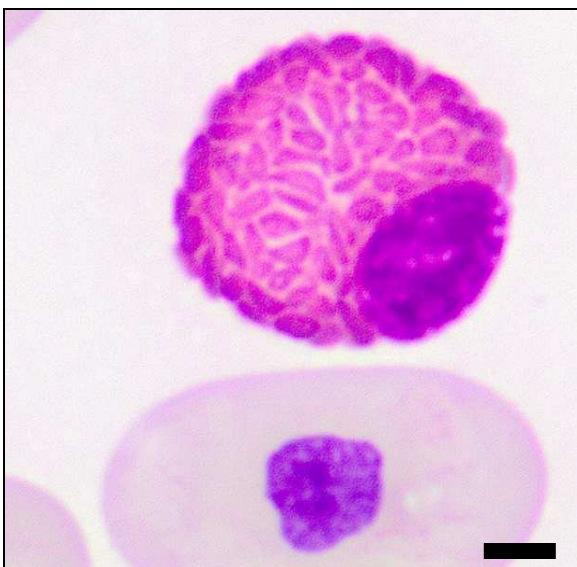
**Figura 4.1.** Eritrocitos de *Trachemys s. s.* Nótese la presencia de una inclusión citoplasmática (flecha). DQ. Barra: 3.2 $\mu$ m

---



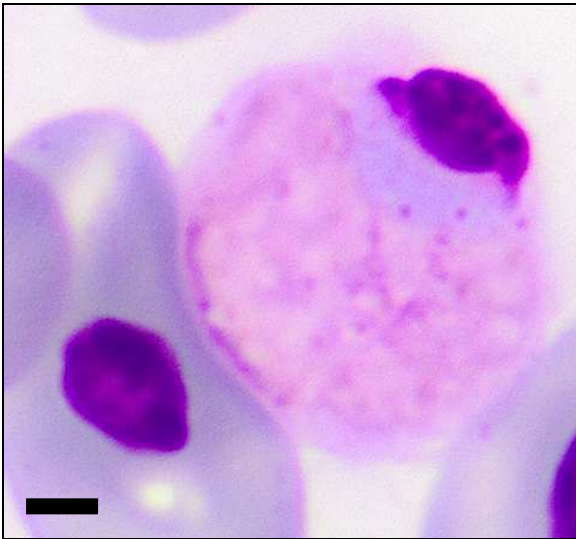
**Figura 4.2.** Eritrocito inmaduro y varios eritrocitos maduros de *Trachemys s. s.* DQ. Barra: 2.6 $\mu$ m

---



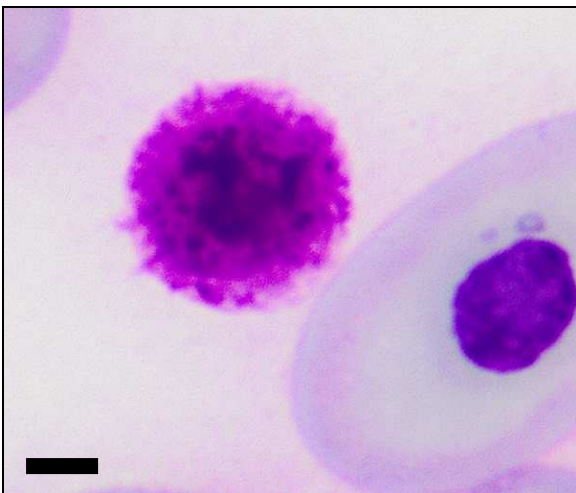
**Figura 4.3.** Heterófilo de *Trachemys s. s.* junto a un eritrocito. DQ. Barra: 2.6 $\mu$ m

---



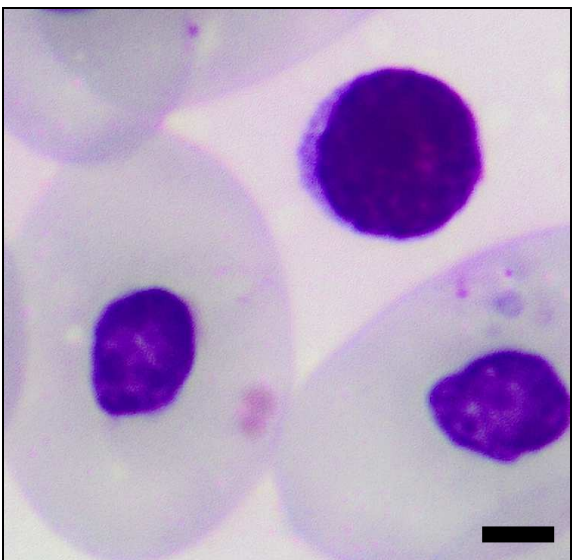
**Figura 4.4.** Eosinófilo de *Trachemys s. s.* junto a un eritrocito. DQ. Barra: 2.3 $\mu$ m

---



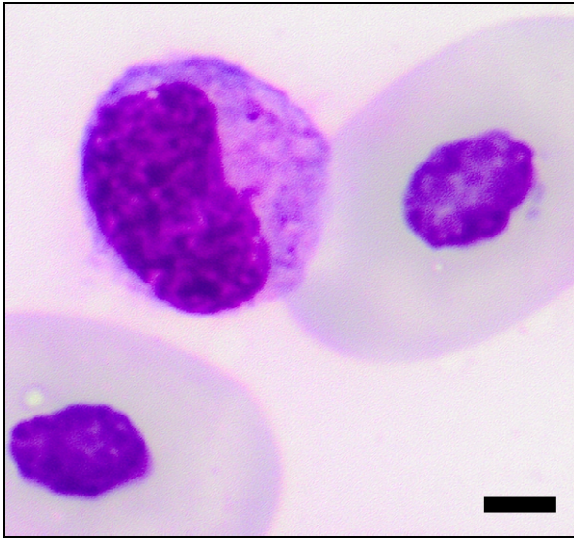
**Figura 4.5.** Basófilo de *Trachemys s. s.* junto a un eritrocito. DQ. Barra: 2.6 $\mu$ m

---



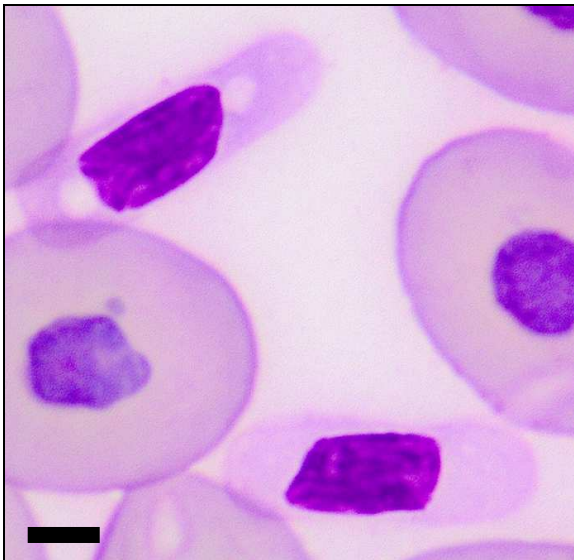
**Figura 4.6.** Linfocito de *Trachemys s. s.* junto a varios eritrocitos. DQ. Barra: 2.7 $\mu$ m

---



**Figura 4.7.** Monocito de *Trachemys s. s.* junto a varios eritrocitos. DQ. Barra: 2.8 $\mu$ m

---



**Figura 4.8.** Dos trombocitos “normales” de *Trachemys s. s.* junto a varios eritrocitos. Nótese la presencia de estructuras refractarias a ambos lados del núcleo del trombocito de la esquina superior izquierda. DQ. Barra: 3.5 $\mu$ m

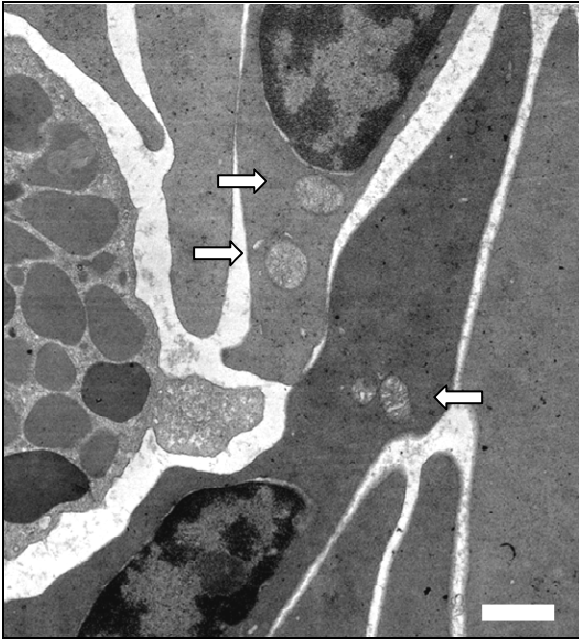
---



**Figura 4.9.** Tres trombocitos reactivos o “pleomórficos” de *Trachemys s. s.* junto a varios eritrocitos. DQ. Barra: 3.0 $\mu$ m

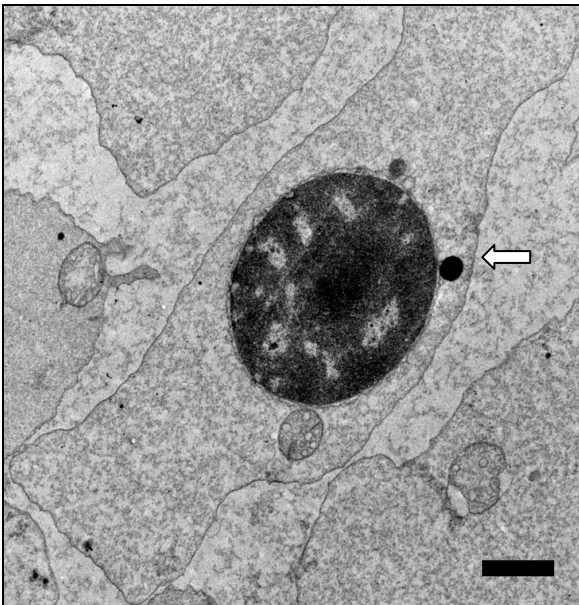
---





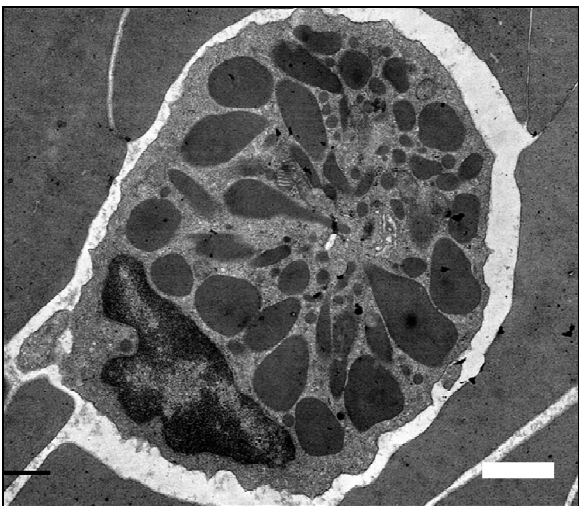
**Figura 4.10.** Ultraestructura de dos eritrocitos de *Trachemys s. s.* portadores de mitocondrias en sus citoplasmas (flechas). Barra: 1.0 $\mu$ m

---



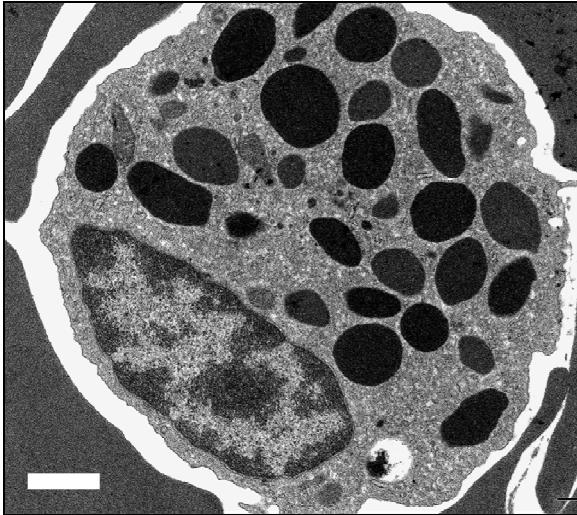
**Figura 4.11.** Ultraestructura de un eritrocito de *Trachemys s. s.* portador de una inclusión citoplasmática (flecha). Barra: 1.2 $\mu$ m

---



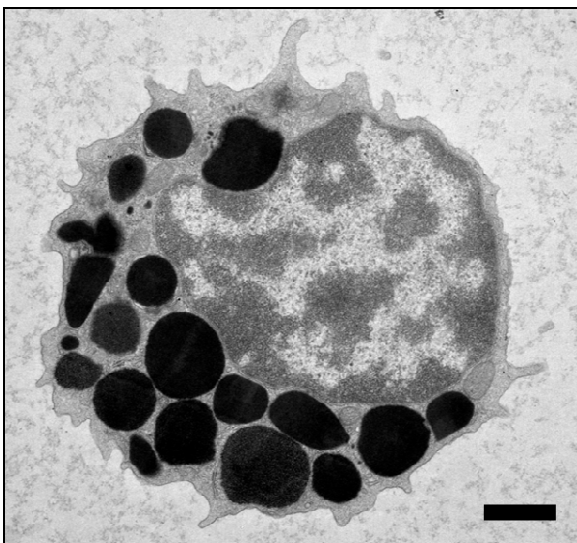
**Figura 4.12.** Ultraestructura de un heterófilo de *Trachemys s. s.* Barra: 1.1 $\mu$ m

---



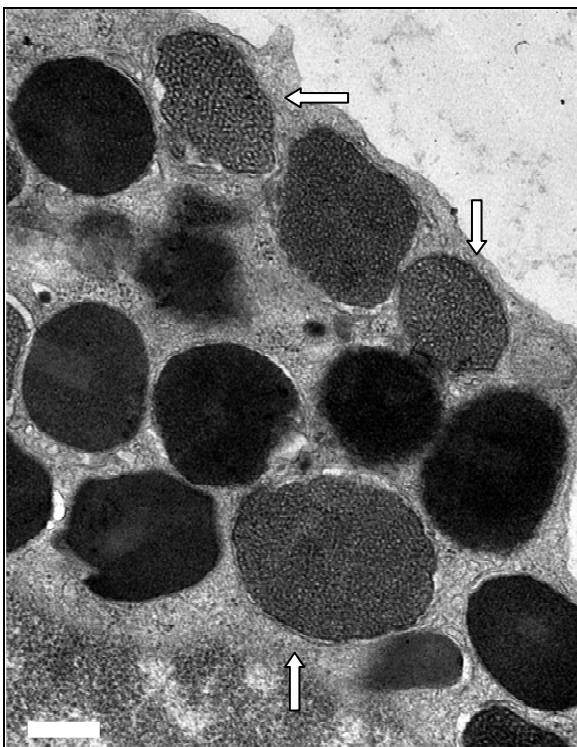
**Figura 4.13.** Ultraestructura de un eosinófilo de *Trachemys s. s.* Barra: 1.2 $\mu$ m

---



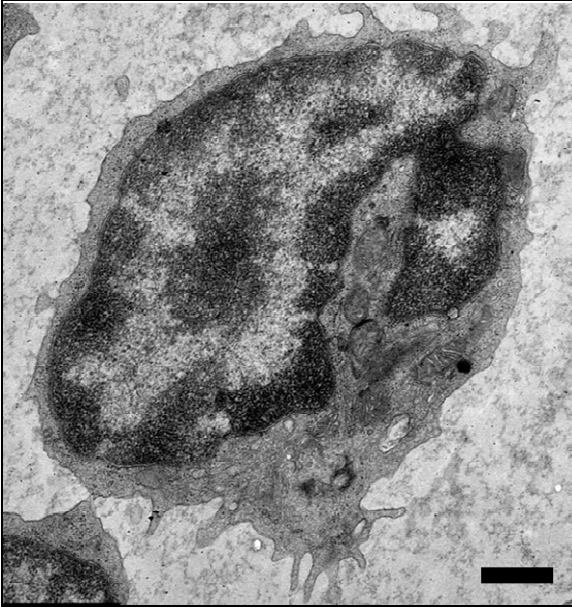
**Figura 4.14.** Ultraestructura de un basófilo de *Trachemys s. s.* Barra: 1.0 $\mu$ m

---



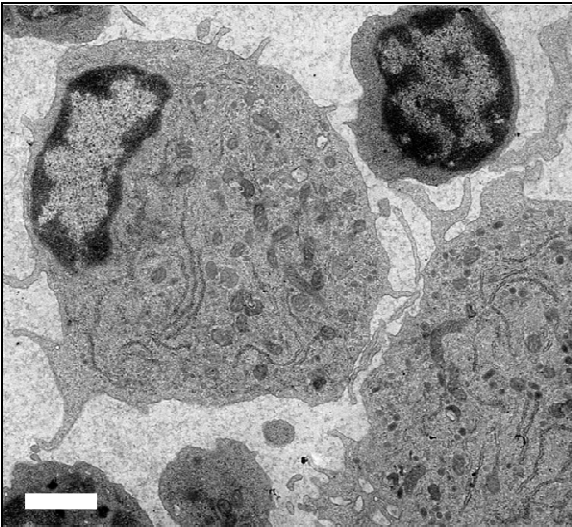
**Figura 4.15.** Detalle de la ultraestructura de los gránulos de un basófilo de *Trachemys s. s.* Nótese la presencia en algunos gránulos de una estructura interna rica en microtúbulos (flechas) Barra: 0.33 $\mu$ m

---



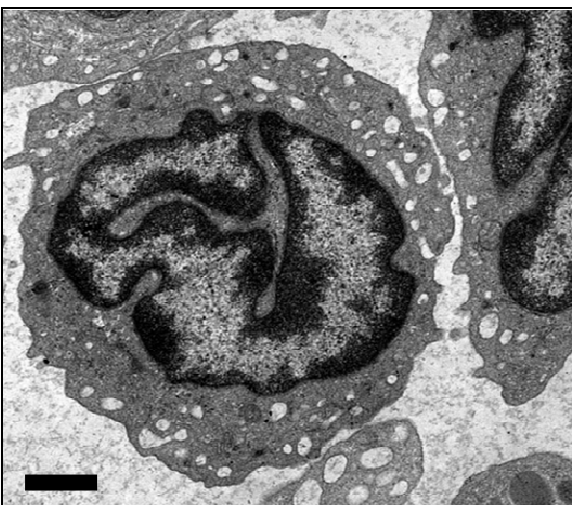
**Figura 4.16.** Ultraestructura de un linfocito de *Trachemys s. s.* Barra: 0.66 $\mu$ m

---



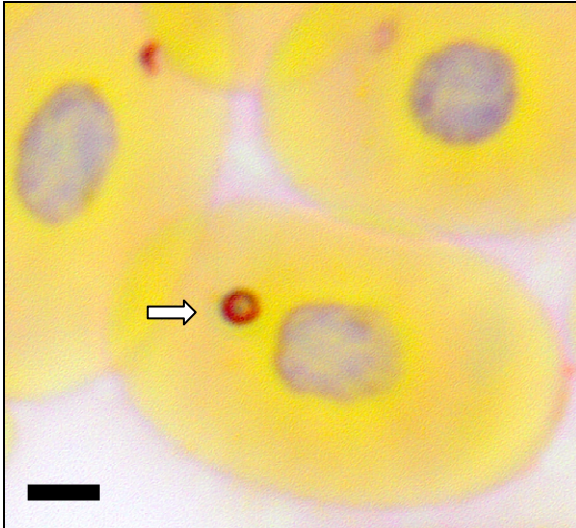
**Figura 4.17.** Ultraestructura de dos monocitos (lado izquierdo de la imagen y esquina inferior derecha) y un trombocito (esquina superior derecha) de *Trachemys s. s.* Barra: 1.35 $\mu$ m

---



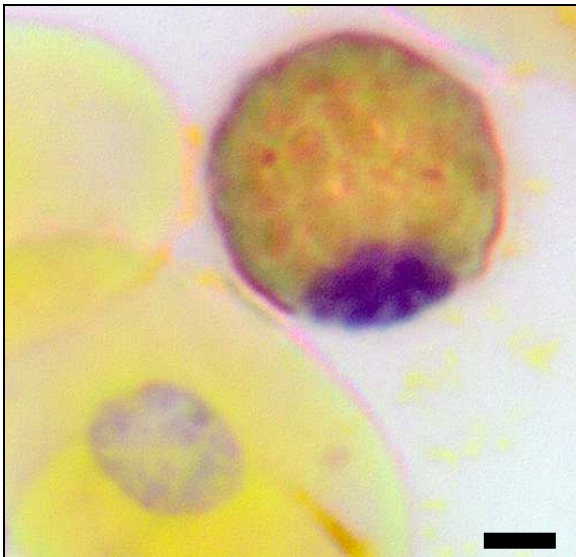
**Figura 4.18.** Ultraestructura de un trombocito de *Trachemys s. s.* con un núcleo irregularmente lobulado y estructuras canaliculares claras en el citoplasma. Barra: 1.15 $\mu$ m

---



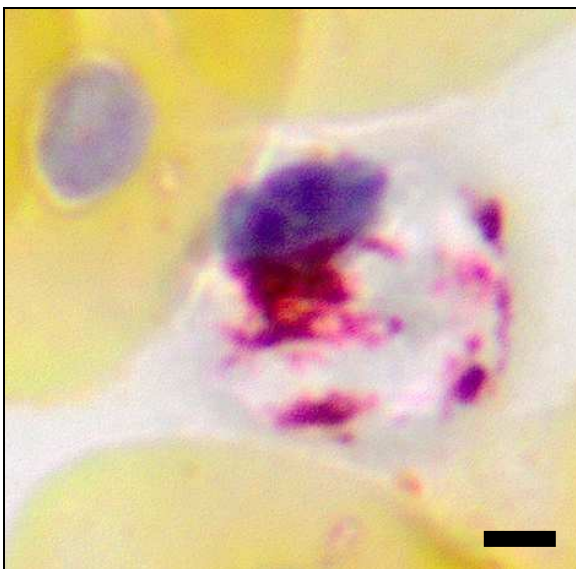
**Figura 4.19.** Eritrocito de *Trachemys s. s.* manifestando tinción positiva para la ACPNT. Nótese la inclusión circular positiva en el citoplasma (flecha). Barra: 2.9 $\mu$ m

---



**Figura 4.20.** Heterófilo de *Trachemys s. s.* manifestando tinción positiva para la ACPNT en forma de gránulos eosinófilos. Barra: 2.5 $\mu$ m

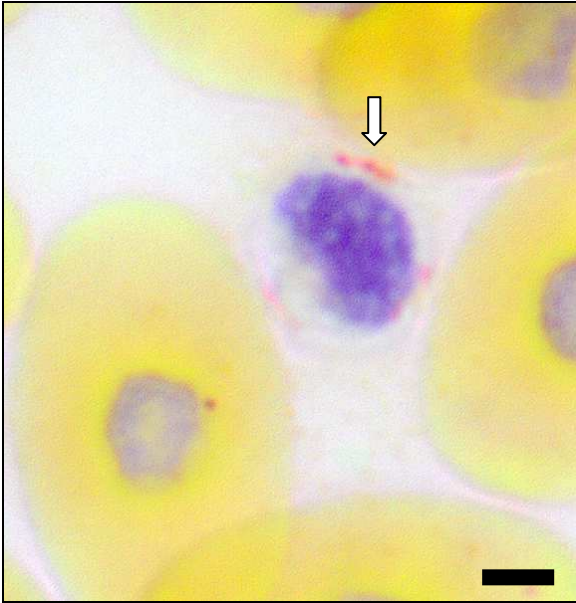
---



**Figura 4.21.** Eosinófilo de *Trachemys s. s.* manifestando tinción positiva para la ACPNT. Barra: 2.7 $\mu$ m

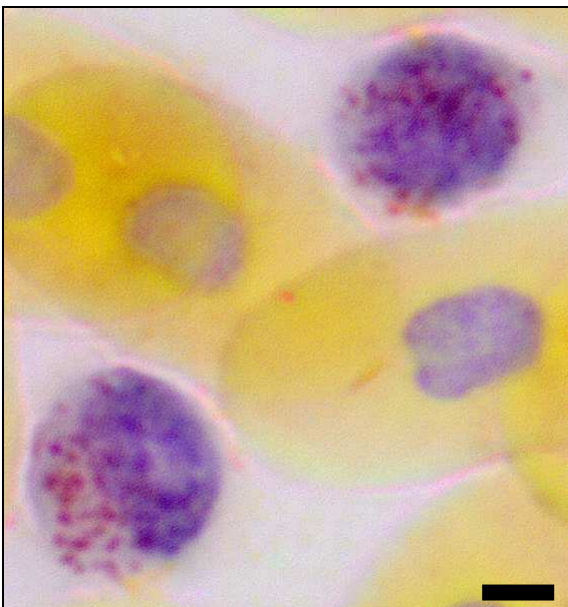
---





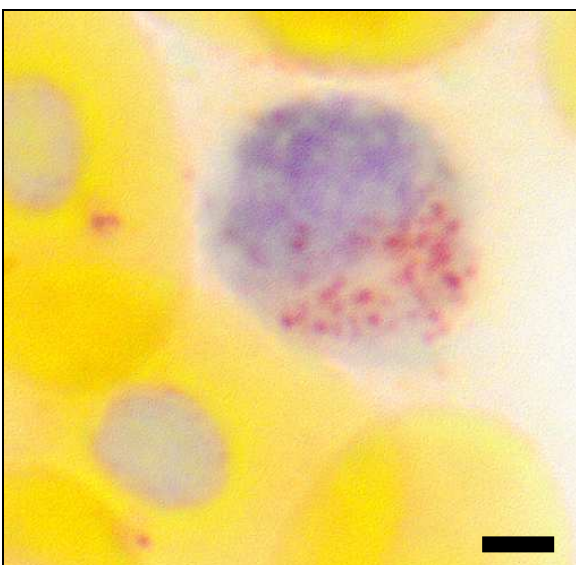
**Figura 4.22.** Basófilo de *Trachemys s. s.* moderadamente positivo a la ACPNT. Nótese la presencia de gránulos eosinófilos en el citoplasma (flecha) Barra: 3.2 $\mu$ m

---



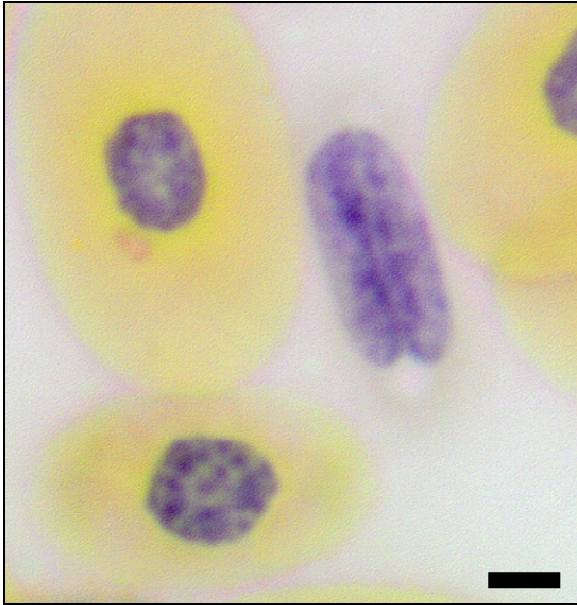
**Figura 4.23.** Dos linfocitos de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la ACPNT. Barra: 2.7 $\mu$ m

---



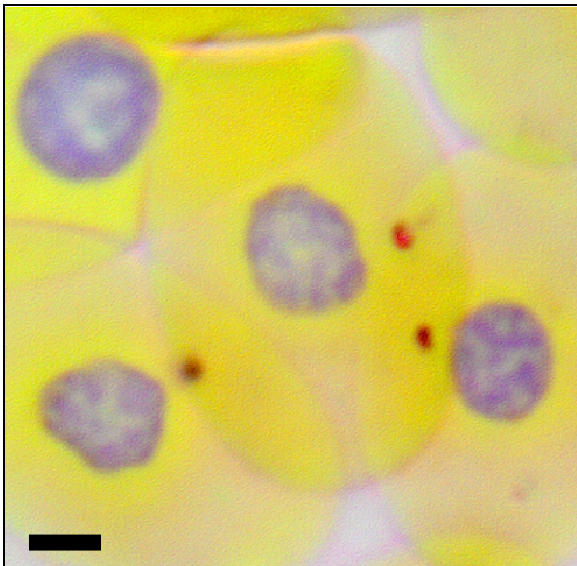
**Figura 4.24.** Monocito de *Trachemys s. s.* manifestando tinción positiva para la ACPNT. Barra: 2.7 $\mu$ m

---



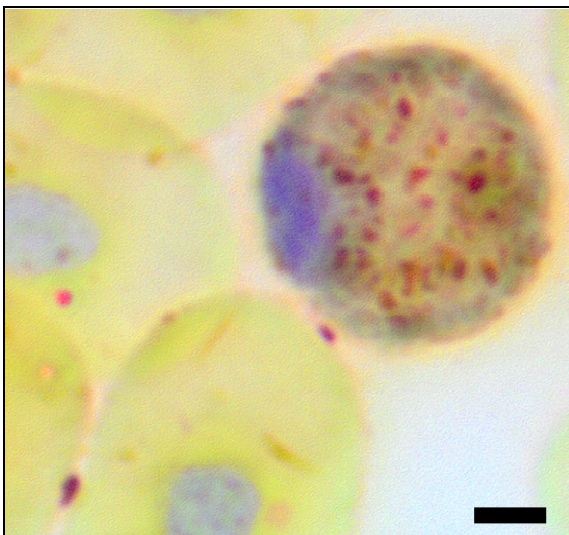
**Figura 4.25.** Trombocito “normal” de *Trachemys s. s.* manifestando respuesta negativa a la ACPNT. Barra: 3.3  $\mu\text{m}$

---



**Figura 4.26.** Varios eritrocitos de *Trachemys s. s.* mostrando tinción positiva para la ACPNT en forma de inclusiones citoplasmáticas de color rojo. Barra: 2.6  $\mu\text{m}$

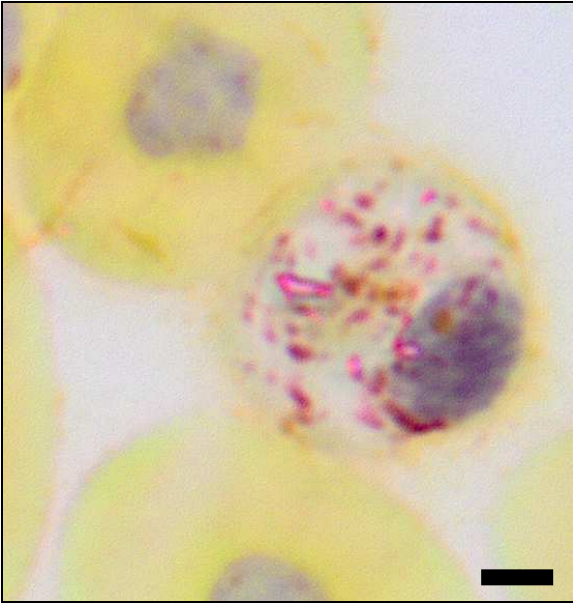
---



**Figura 4.27.** Heterófilo de *Trachemys s. s.* manifestando tinción positiva para la ACPNT. Barra: 2.8  $\mu\text{m}$

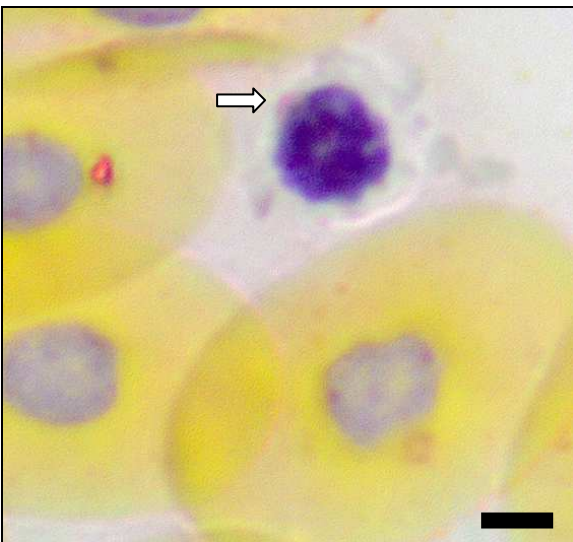
---





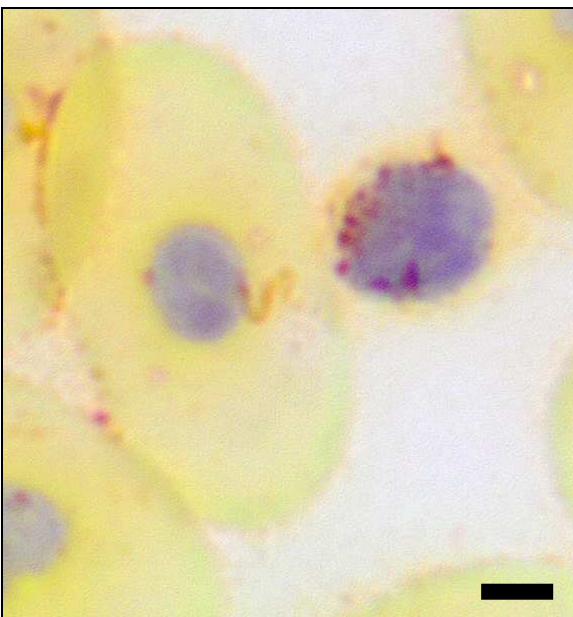
**Figura 4.28.** Eosinófilo de *Trachemys s. s.* manifestando tinción positiva para la ACPT. Barra: 2.7 $\mu$ m

---



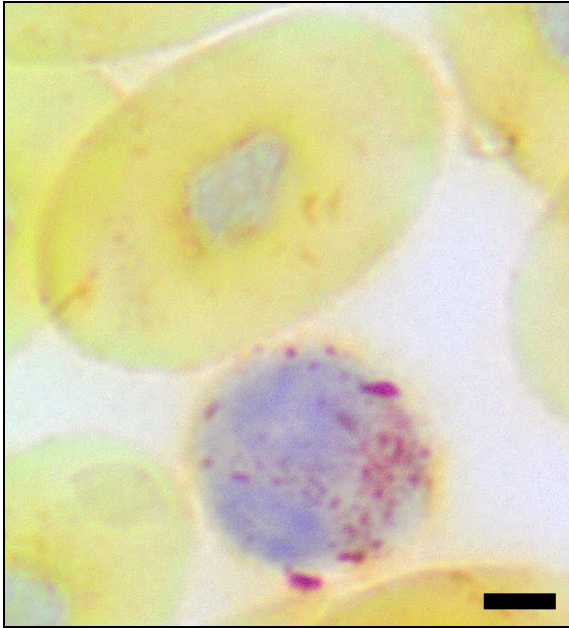
**Figura 4.29.** Basófilo de *Trachemys s. s.* mostrando tinción débilmente positiva para la ACPT en forma de algunos gránulos eosinófilos en su citoplasma (flecha). Barra: 3.2 $\mu$ m

---



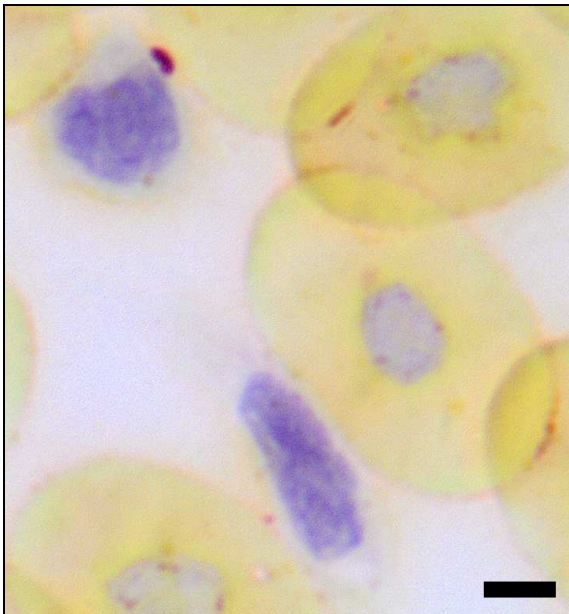
**Figura 4.30.** Linfocito de *Trachemys s. s.* manifestando positividad para la ACPT. Barra: 3.3 $\mu$ m

---



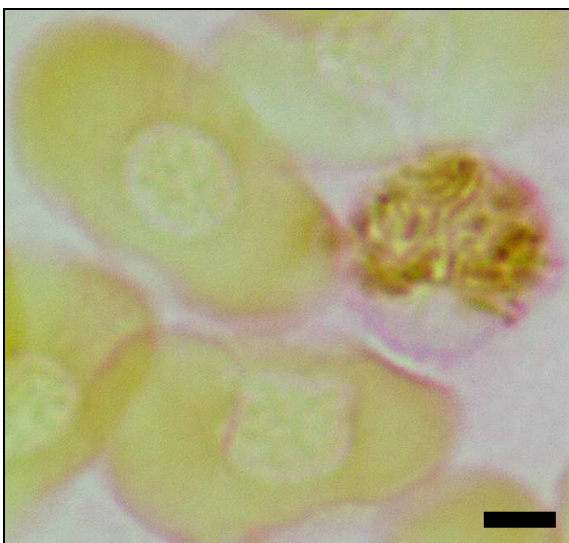
**Figura 4.31.** Monocito de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la ACPT. Barra: 2.8 $\mu$ m

---



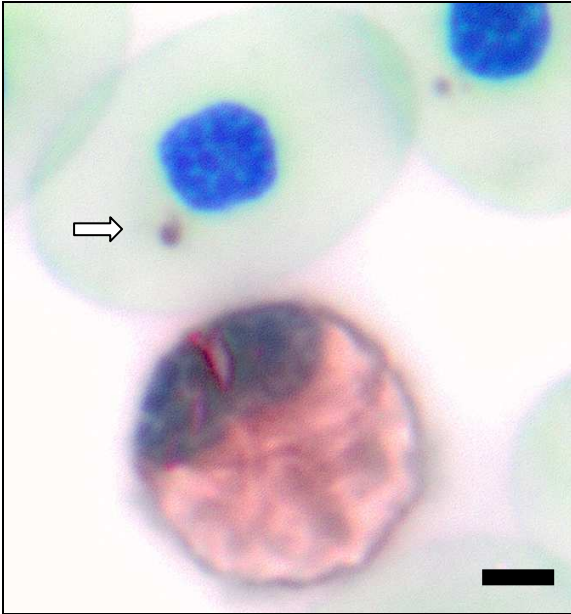
**Figura 4.32.** Dos trombocitos de *Trachemys s. s.*, uno "normal" y otro "pleomórfico" (parte inferior de la imagen y esquina superior izquierda respectivamente), manifestando respuesta negativa a la ACPT. Barra: 3.6 $\mu$ m

---

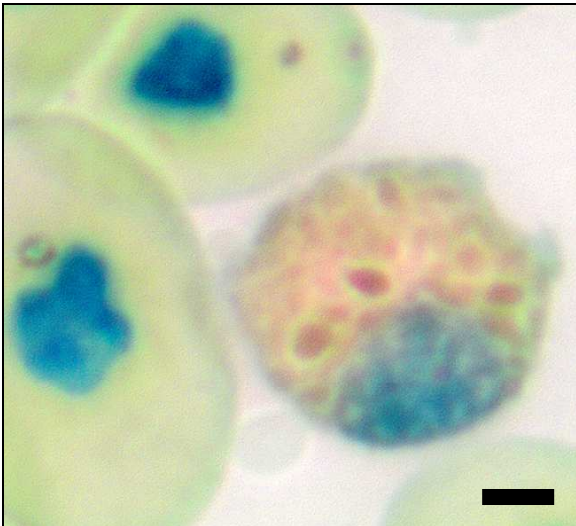


**Figura 4.33.** Heterófilo de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la PER a modo de gránulos citoplasmáticos marrón oscuro. Se observan también varios eritrocitos negativos. Barra: 3.0 $\mu$ m

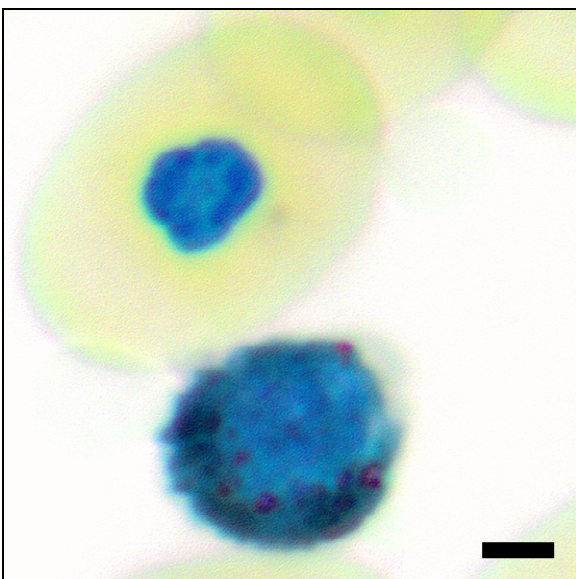
---



**Figura 4.34.** Eritrocito de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la NBENF en forma de una inclusión citoplasmática de color marrón/roja (flecha) y eosinófilo con coloración positiva en su citoplasma Barra: 3.4 $\mu$ m

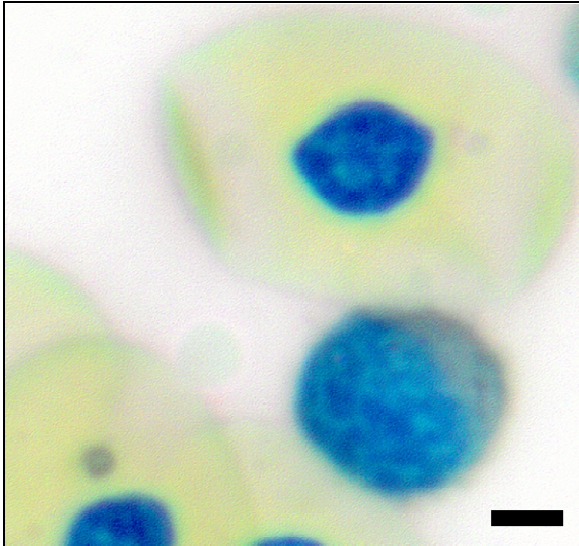


**Figura 4.35.** Heterófilo de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la NBENF. Barra: 2.6 $\mu$ m



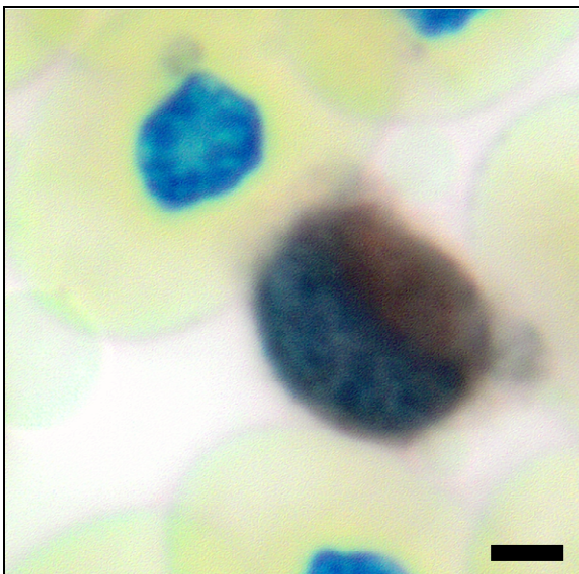
**Figura 4.36.** Basófilo de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la NBENF en forma de gránulos violetas. Barra: 3.1 $\mu$ m





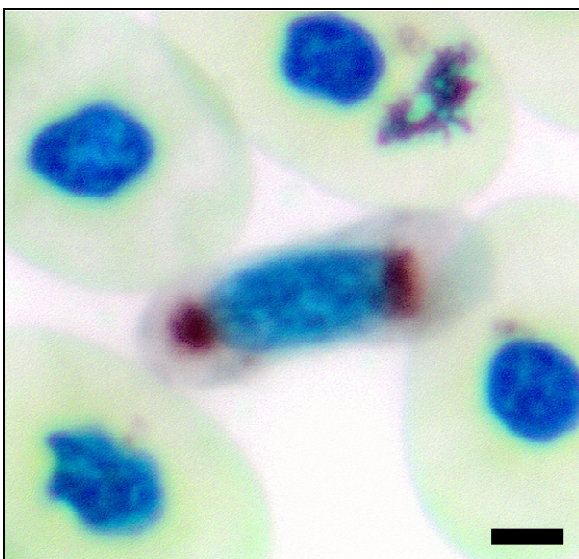
**Figura 4.37.** Linfocito de *Trachemys s. s.* débilmente positivo para la NBENF. Nótese la ligera coloración marrón rojiza de su citoplasma. Barra: 2.7 $\mu$ m

---



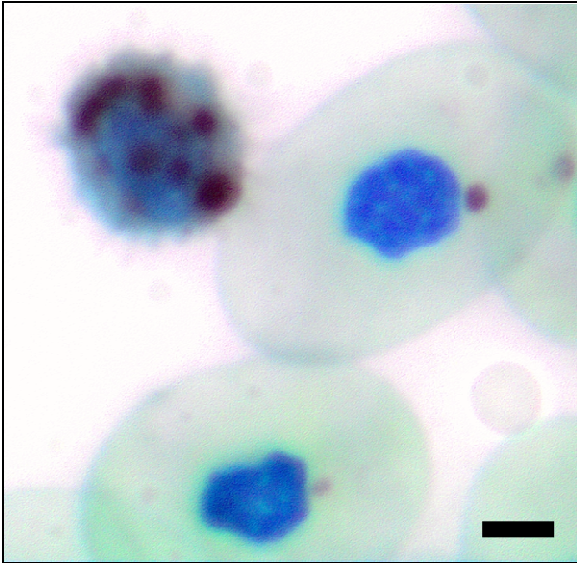
**Figura 4.38.** Monocito de *Trachemys s. s.* mostrando coloración citoplasmática intensamente positiva para la NBENF. Barra: 2.8 $\mu$ m

---



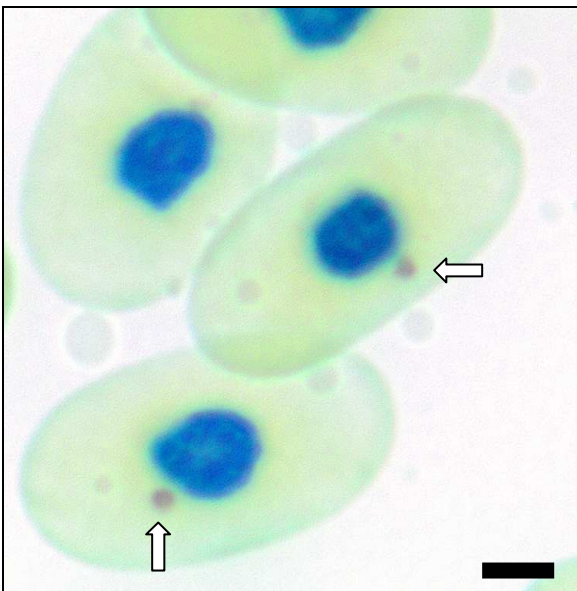
**Figura 4.39.** Trombocito "normal" de *Trachemys s. s.* mostrando positividad localizada para la NBENF en su citoplasma. Nótese que los puntos de positividad coinciden con las áreas citoplasmáticas refractarias observadas con la técnica DQ (Figura 4.8). Barra: 3.5 $\mu$ m

---



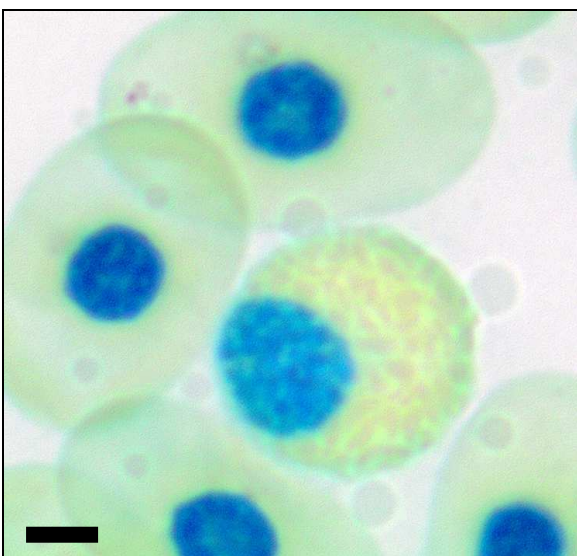
**Figura 4.40.** Trombocito “pleomórfico” de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la NBENF, junto a un eritrocito positivo. Barra: 3.2 $\mu$ m

---



**Figura 4.41.** Dos eritrocitos de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la NBENF en forma de inclusiones citoplasmáticas (flechas). Barra: 3.8 $\mu$ m

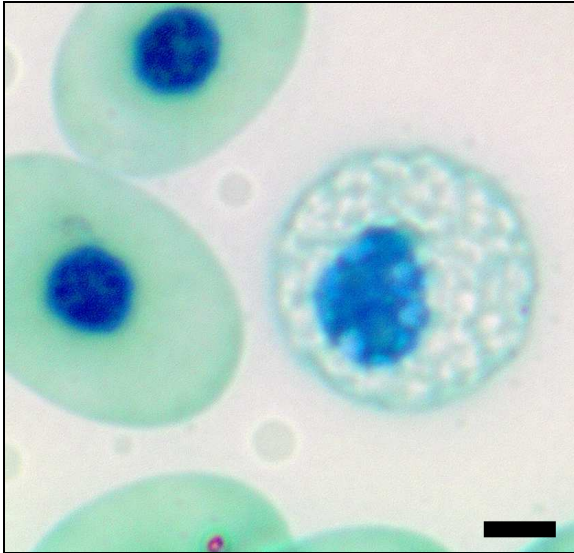
---



**Figura 4.42.** Heterófilo de *Trachemys s. s.* manifestando positividad para la NBENF. Barra: 3.9 $\mu$ m

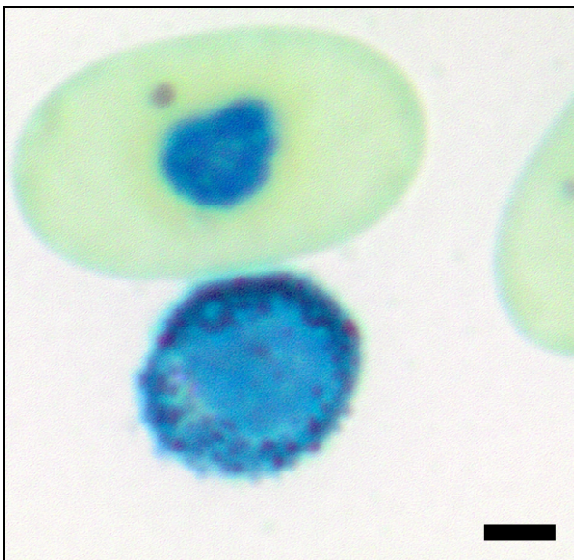
---





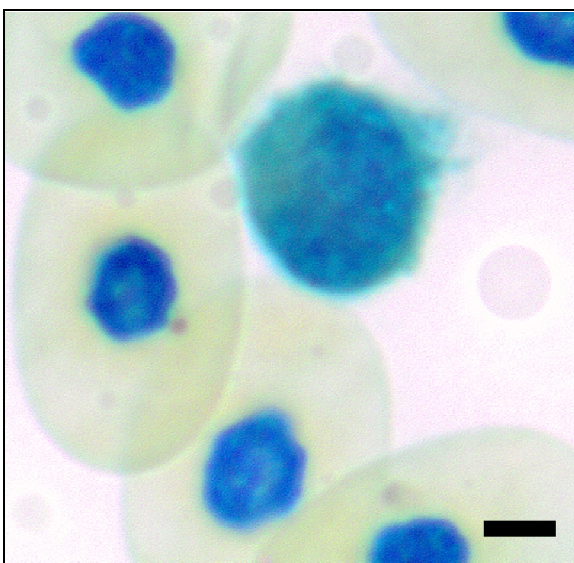
**Figura 4.43.** Eosinófilo de *Trachemys s. s.* mostrando una respuesta tintorial negativa a la NBEF. Nótese el aspecto refractario del citoplasma celular. Barra: 4.1 $\mu$ m

---



**Figura 4.44.** Basófilo de *Trachemys s. s.* manifestando positividad para la NBEF en forma de pequeños gránulos color violeta. También se observa un eritrocito positivo. Barra: 3.1 $\mu$ m

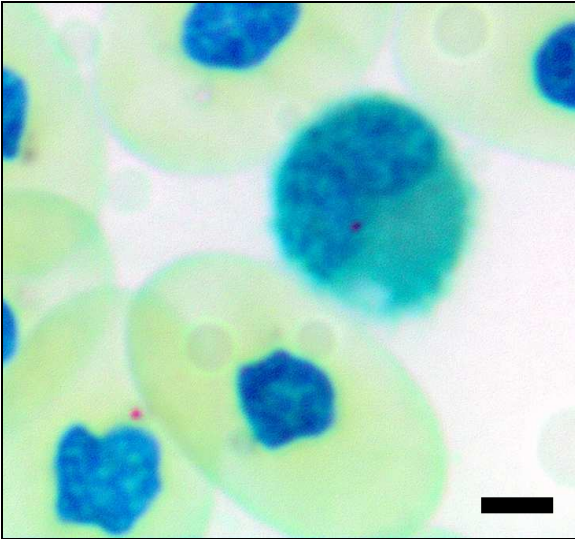
---



**Figura 4.45.** Linfocito de *Trachemys s. s.* mostrando positividad moderada para la NBEF. Nótese el leve tono rojo-marrón oscuro en algunas áreas del citoplasma. Barra: 3.4 $\mu$ m

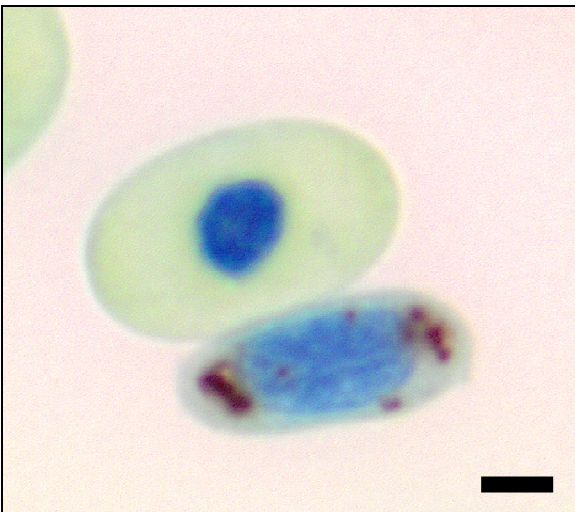
---





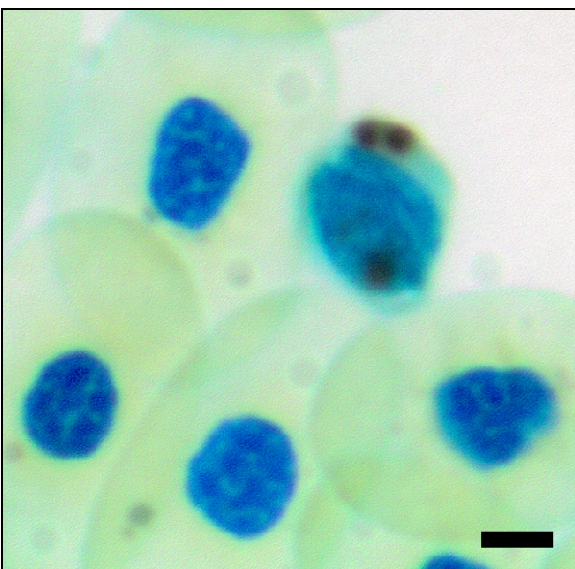
**Figura 4.46.** Monocito de *Trachemys s. s.* manifestando respuesta negativa para la NBEF. Barra: 3.6 $\mu$ m

---



**Figura 4.47.** Trombocito "normal" de *Trachemys s. s.* manifestando positividad para la NBEF. Barra: 4.1 $\mu$ m

---



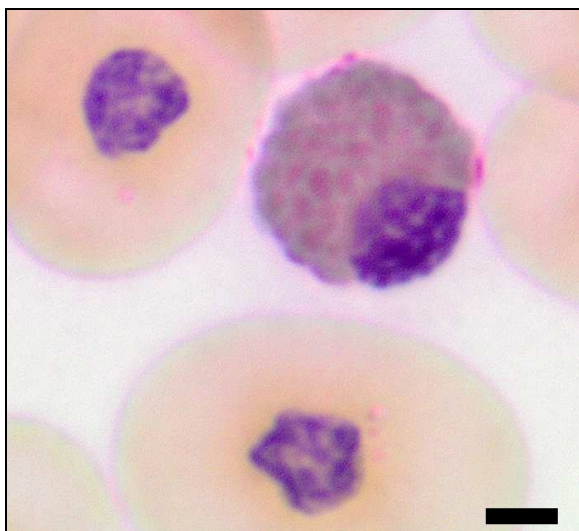
**Figura 4.48.** Trombocito "pleomórfico" de *Trachemys s. s.* mostrando respuesta positiva para la NBEF. Barra: 3.2 $\mu$ m

---



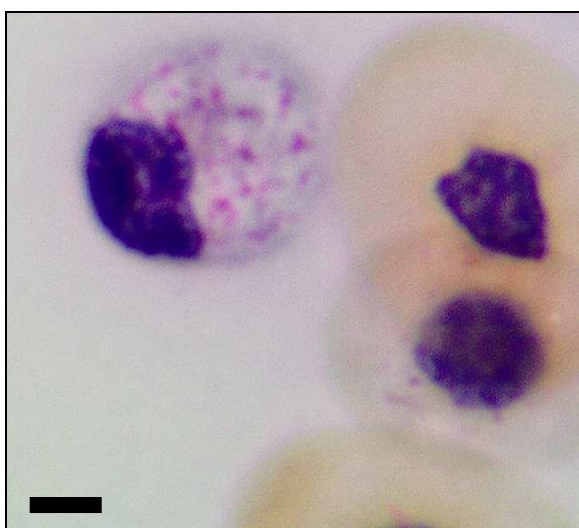
**Figura 4.49.** Eritrocitos de *Trachemys s. s.* manifestando respuesta negativa para la CAE. Barra: 5.2 $\mu$ m

---



**Figura 4.50.** Heterófilo de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la CAE. Nótese la presencia de gránulos eosinófilos en el citoplasma. Barra: 3.5 $\mu$ m

---

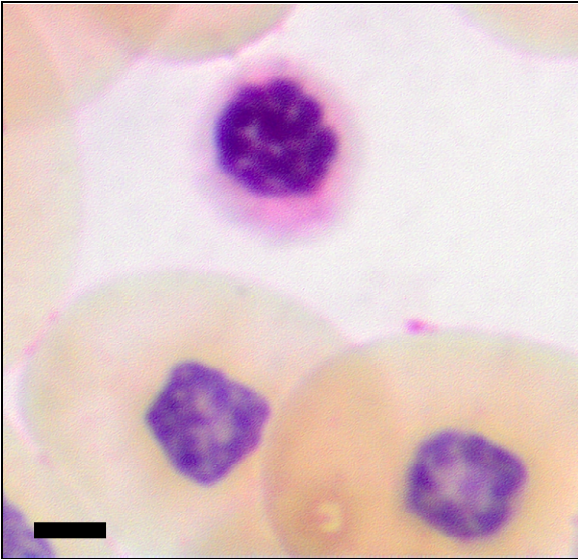


**Figura 4.51.** Eosinófilo de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la CAE. Barra: 3.0 $\mu$ m

---

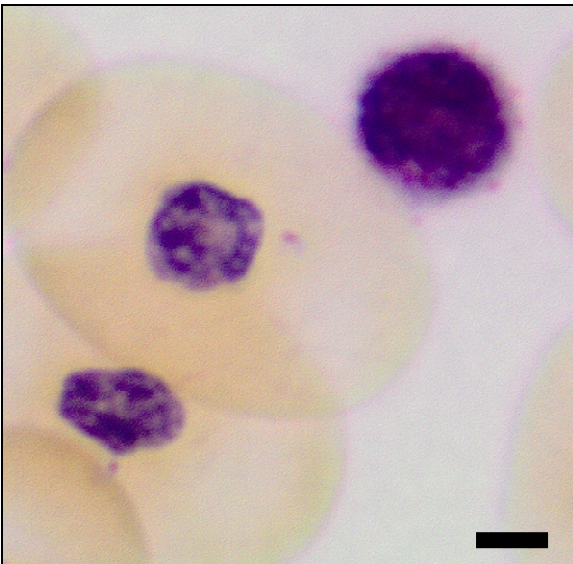


Resultados



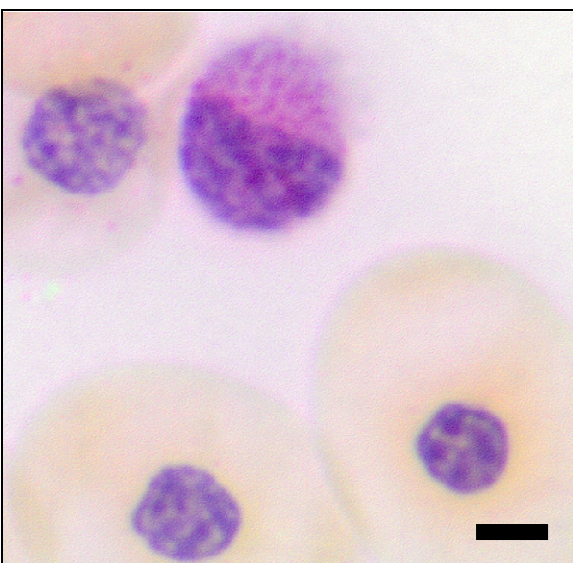
**Figura 4.52.** Basófilo de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la CAE en forma de coloración eosinófila difusa en su citoplasma. Barra: 3.4 $\mu$ m

---



**Figura 4.53.** Linfocito de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para la CAE. Barra: 3.0 $\mu$ m

---



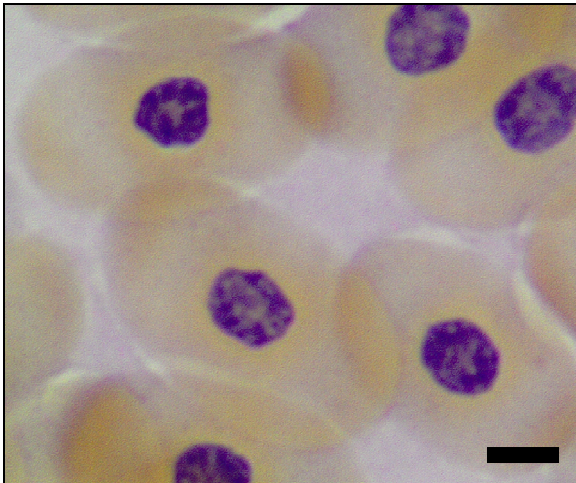
**Figura 4.54.** Monocito de *Trachemys s. s.* manifestando positividad para la CAE. Barra: 3.9 $\mu$ m

---



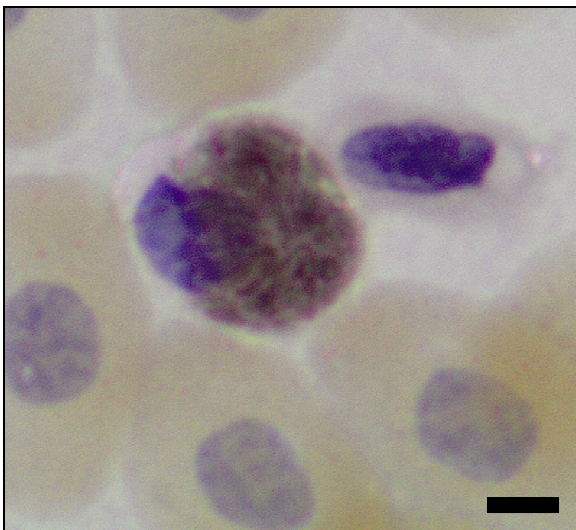
**Figura 4.55.** Varios trombocitos “pleomórficos” de *Trachemys s. s.* manifestando respuesta negativa para la CAE. Barra: 3.2 $\mu$ m

---



**Figura 4.56.** Eritrocitos de *Trachemys s. s.* mostrando respuesta negativa para el SBB. Barra: 4.5 $\mu$ m

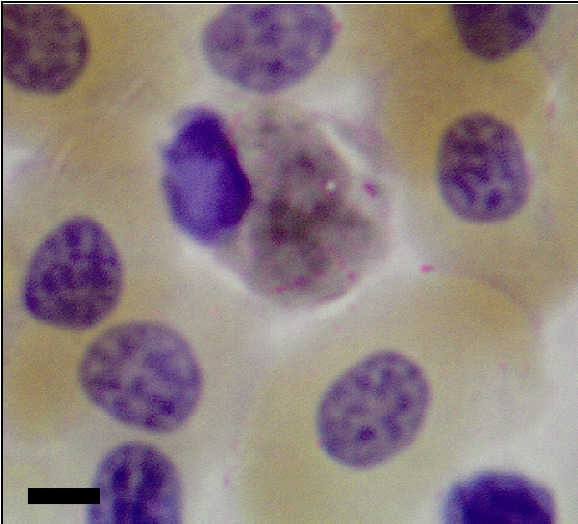
---



**Figura 4.57.** Heterófilo de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para el SBB. A su derecha puede observarse un trombocito “normal” negativo para esta técnica. Barra: 3.1 $\mu$ m

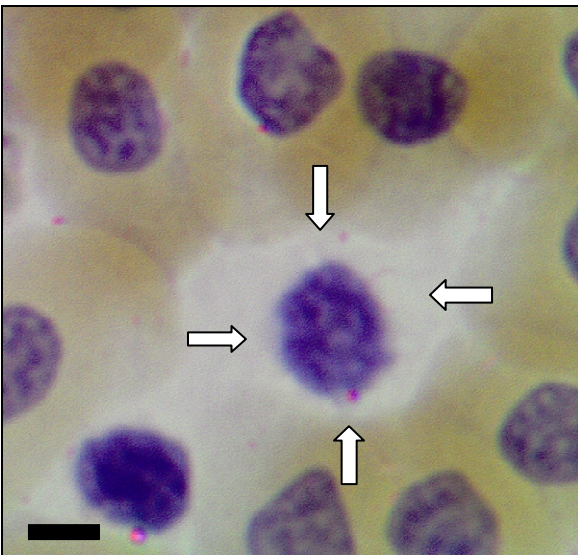
---





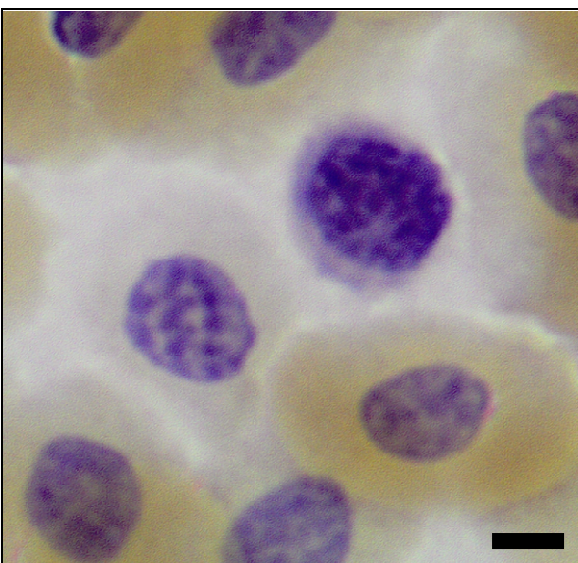
**Figura 4.58.** Eosinófilo de *Trachemys s. s.* manifestando positividad moderada para el SBB. Barra: 3.2 $\mu$ m

---



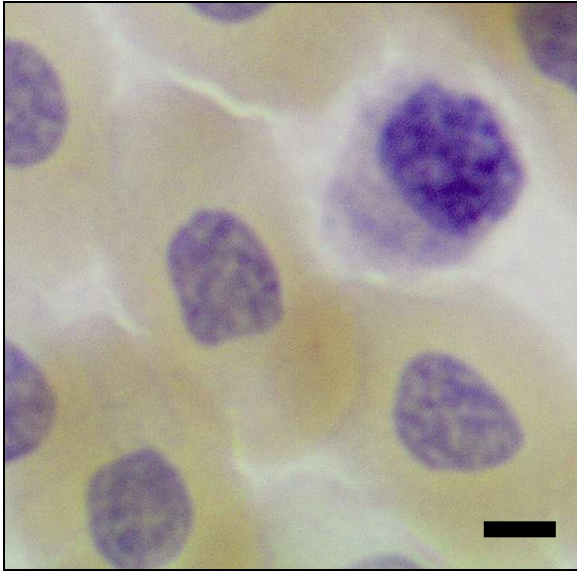
**Figura 4.59.** Basófilo de *Trachemys s. s.* manifestando respuesta tintorial negativa para el SBB. Nótese la ausencia total de coloración del citoplasma que dificulta la identificación de la célula (flechas). Barra: 3.4 $\mu$ m

---



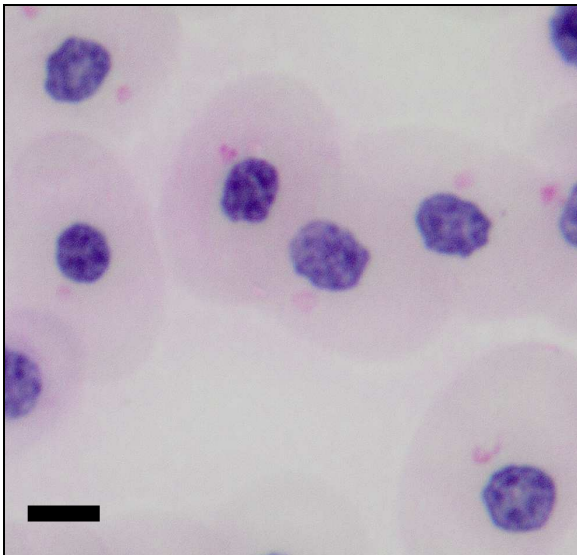
**Figura 4.60.** Linfocito de *Trachemys s. s.* manifestando respuesta negativa para el SBB. Barra: 2.8 $\mu$ m

---



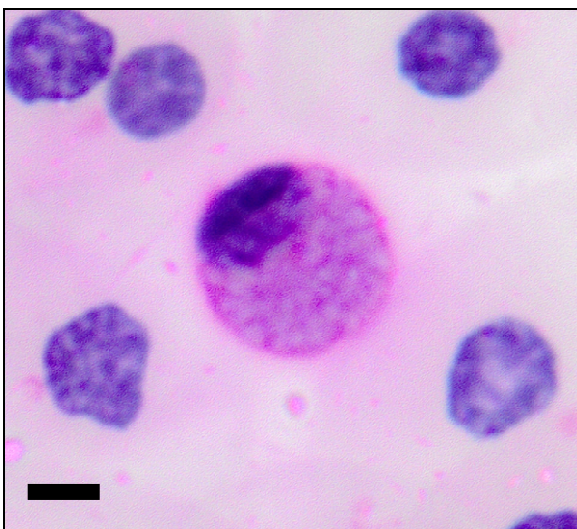
**Figura 4.61.** Monocito de *Trachemys s. s.* manifestando respuesta negativa para el SBB. Barra: 2.9 $\mu$ m

---



**Figura 4.62.** Varios eritrocitos de *Trachemys s. s.* manifestando respuesta tintorial positiva para el PAS. Nótese la presencia de estructuras circulares individuales cercanas al núcleo y eosinófilas. Barra: 5.4 $\mu$ m

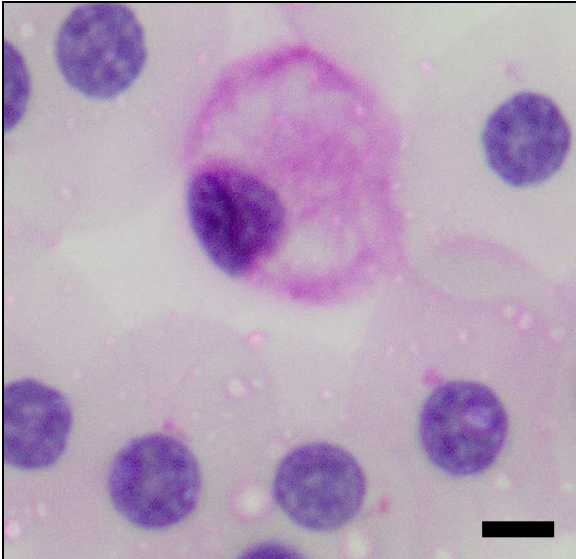
---



**Figura 4.63.** Heterófilo de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para el PAS. Barra: 3.1 $\mu$ m

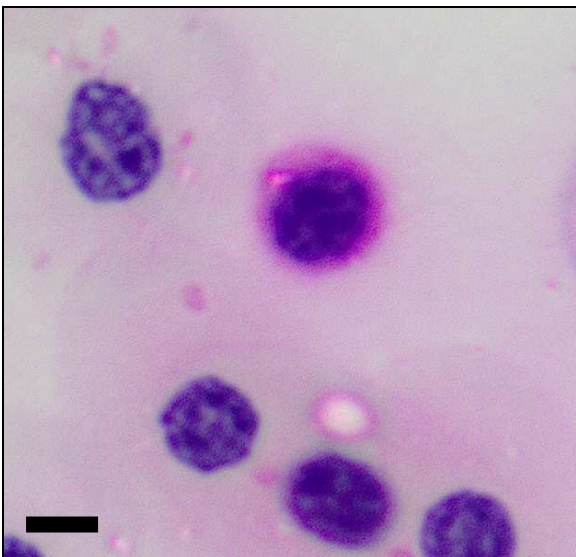
---





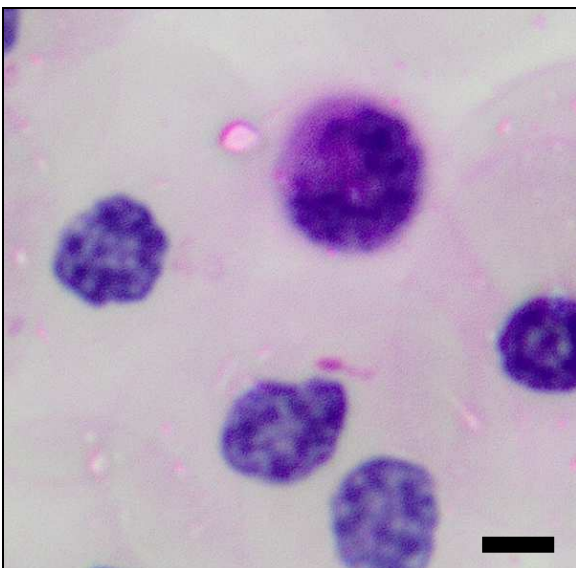
**Figura 4.64.** Eosinófilo de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para el PAS. Barra: 4.15 $\mu$ m

---



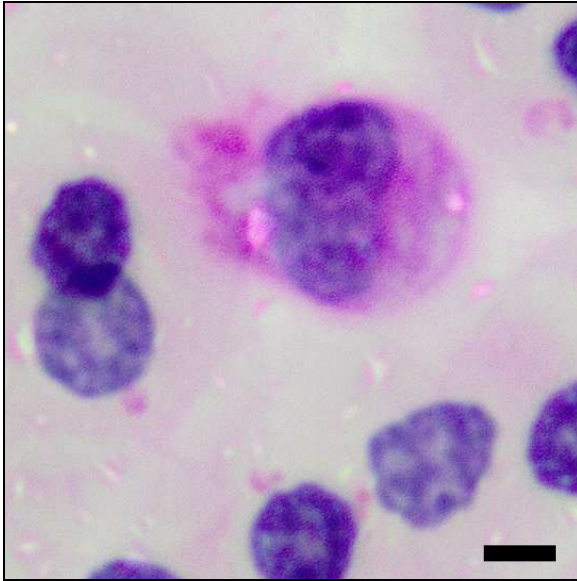
**Figura 4.65.** Basófilo de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para el PAS. Barra: 3.6 $\mu$ m

---



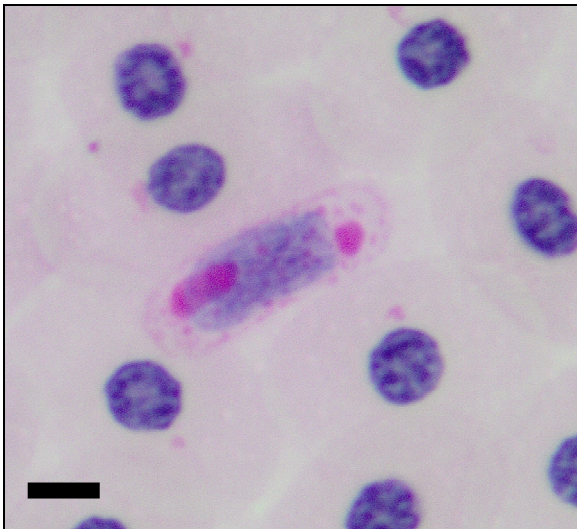
**Figura 4.66.** Linfocito de *Trachemys s. s.* mostrando positividad moderada para el PAS. Barra: 3.0 $\mu$ m

---



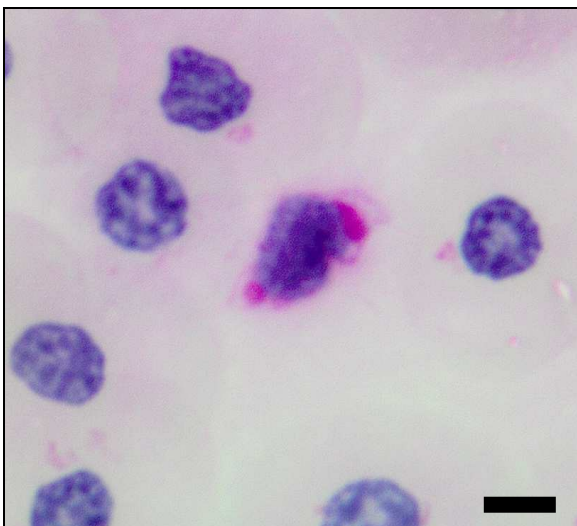
**Figura 4.67.** Monocito de *Trachemys s. s.* manifestando respuesta positiva para el PAS. Barra: 3.1 $\mu$ m

---



**Figura 4.68.** Trombocito "normal" de *Trachemys s. s.* manifestando respuesta positiva para el PAS. Nótese que los puntos de mayor actividad tintorial coinciden con las áreas citoplasmáticas refractarias observadas con la técnica DQ (Figura 4.8). Barra: 5.0 $\mu$ m

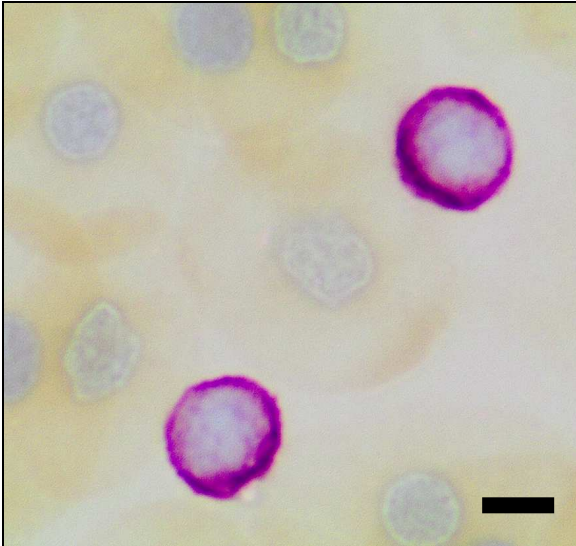
---



**Figura 4.69.** Trombocito "pleomórfico" de *Trachemys s. s.* manifestando respuesta positiva para el PAS. Barra: 4.0 $\mu$ m

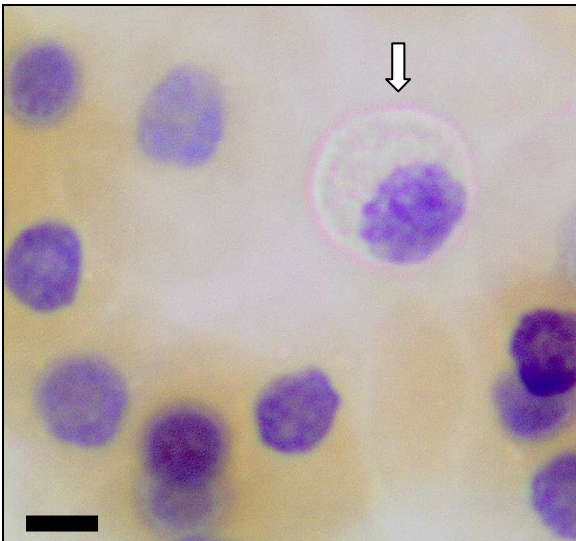
---





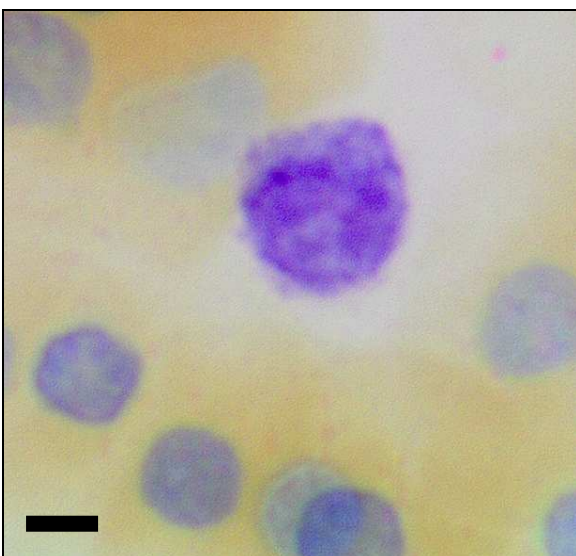
**Figura 4.70.** Dos basófilos de *Trachemys s. s.* mostrando positividad para el AT en forma de coloración metacromática en sus citoplasmas. Nótese la presencia de eritrocitos negativos. Barra: 4.15 $\mu$ m

---



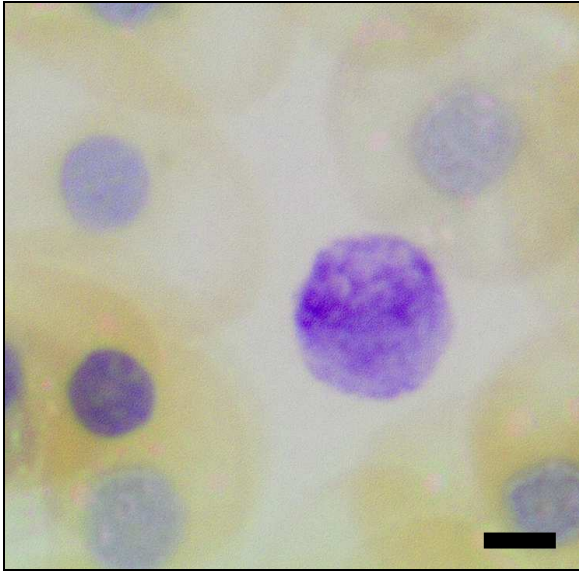
**Figura 4.71.** Leucocito granulocítico no identificado de *Trachemys s. s.* mostrando respuesta negativa para el AT (flecha). Barra: 4.1 $\mu$ m

---



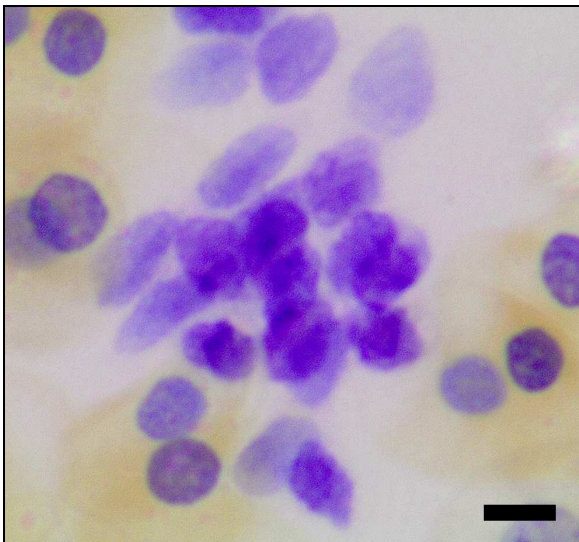
**Figura 4.72.** Linfocito de *Trachemys s. s.* mostrando respuesta negativa para el AT. Barra: 3.3 $\mu$ m

---



**Figura 4.73.** Monocito de *Trachemys s. s.* mostrando respuesta negativa para el AT. Barra: 4.2 $\mu$ m

---



**Figura 4.74.** Agregado de trombocitos de *Trachemys s. s.* manifestando negatividad para el AT. Barra: 5.4 $\mu$ m

---

## 4.6.- VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

### 4.6.1.- El Hematocrito

En las Tablas 4.10 y 4.11 se exponen los valores de hematocrito registrados en los individuos de *Trachemys scripta scripta* durante las dos estaciones en estudio y separados por sexos.

**Tabla 4.10.** Valores de hematocrito de *Trachemys scripta scripta* registrados en invierno y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	Hematocrito (%)
9	MACHO	21
10	MACHO	17
11	MACHO	18
19	MACHO	28
20	MACHO	28
24	MACHO	22
31	MACHO	23
32	MACHO	28
33	MACHO	24
39	MACHO	18
41	MACHO	24
45	MACHO	35
46	MACHO	19
12	HEMBRA	20
13	HEMBRA	19
16	HEMBRA	26
17	HEMBRA	25
21	HEMBRA	28
26	HEMBRA	23
27	HEMBRA	28
28	HEMBRA	23
29	HEMBRA	22
34	HEMBRA	20
35	HEMBRA	18
36	HEMBRA	17
37	HEMBRA	17
38	HEMBRA	23
40	HEMBRA	18
43	HEMBRA	32
44	HEMBRA	22

**Tabla 4.11.** Valores de hematocrito de *Trachemys scripta scripta* registrados en verano y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	Hematocrito (%)
9	MACHO	22
10	MACHO	24
11	MACHO	30
19	MACHO	18
20	MACHO	18
24	MACHO	24
31	MACHO	27
32	MACHO	26
33	MACHO	20
39	MACHO	22
41	MACHO	24
45	MACHO	28
46	MACHO	22
12	HEMBRA	26
13	HEMBRA	27
16	HEMBRA	36
17	HEMBRA	24
21	HEMBRA	26
26	HEMBRA	29
27	HEMBRA	22
28	HEMBRA	26
29	HEMBRA	29
34	HEMBRA	24
35	HEMBRA	34
36	HEMBRA	25
37	HEMBRA	18
38	HEMBRA	19
40	HEMBRA	24
43	HEMBRA	22
44	HEMBRA	17

#### 4.6.2.- Los Sólidos Totales (Proteínas Totales)

En las Tablas 4.12 y 4.13 se exponen los valores de sólidos totales registrados en los individuos de *Trachemys scripta scripta* durante las dos estaciones en estudio y separados por sexos.

**Tabla 4.12.** Valores de sólidos totales de *Trachemys scripta scripta* registrados en invierno y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	Sólidos totales (gr/dL)
9	MACHO	4.4
10	MACHO	3.0
11	MACHO	2.3
19	MACHO	4.4
20	MACHO	4.4
24	MACHO	3.4
31	MACHO	3.8
32	MACHO	5.2
33	MACHO	3.0
39	MACHO	2.2
41	MACHO	3.2
45	MACHO	3.8
46	MACHO	2.4
12	HEMBRA	3.2
13	HEMBRA	2.8
16	HEMBRA	3.6
17	HEMBRA	4.6
21	HEMBRA	4.8
26	HEMBRA	4.9
27	HEMBRA	6.6
28	HEMBRA	6.0
29	HEMBRA	4.2
34	HEMBRA	3.2
35	HEMBRA	2.2
36	HEMBRA	2.2
37	HEMBRA	2.2
38	HEMBRA	4.8
40	HEMBRA	2.2
43	HEMBRA	6.0
44	HEMBRA	4.0

**Tabla 4.13.** Valores de sólidos totales de *Trachemys scripta scripta* registrados en verano y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	Sólidos totales (gr/dL)
9	MACHO	4.2
10	MACHO	4.8
11	MACHO	5.4
19	MACHO	2.6
20	MACHO	2.8
24	MACHO	4.3
31	MACHO	5.0
32	MACHO	4.7
33	MACHO	2.8
39	MACHO	2.9
41	MACHO	2.6
45	MACHO	3.3
46	MACHO	2.7
12	HEMBRA	4.2
13	HEMBRA	5.0
16	HEMBRA	4.8
17	HEMBRA	3.6
21	HEMBRA	5.3
26	HEMBRA	4.7
27	HEMBRA	3.2
28	HEMBRA	5.1
29	HEMBRA	5.4
34	HEMBRA	5.6
35	HEMBRA	7.7
36	HEMBRA	6.9
37	HEMBRA	3.1
38	HEMBRA	4.0
40	HEMBRA	4.1
43	HEMBRA	3.5
44	HEMBRA	2.6

#### 4.6.3.- La Hemoglobina

En las Tablas 4.14 y 4.15 se exponen los valores de hemoglobina registrados en los individuos de *Trachemys scripta scripta* durante las dos estaciones en estudio y separados por sexos.

**Tabla 4.14.** Valores de hemoglobina de *Trachemys scripta scripta* registrados en invierno y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	Hemoglobina (gr/dL)
9	MACHO	11.1
10	MACHO	9.8
11	MACHO	9.2
19	MACHO	12.6
20	MACHO	13.6
24	MACHO	11.2
31	MACHO	9.4
32	MACHO	12.6
33	MACHO	9.2
39	MACHO	8.3
41	MACHO	11.1
45	MACHO	15.9
46	MACHO	9.9
12	HEMBRA	13.2
13	HEMBRA	10.7
16	HEMBRA	12.0
17	HEMBRA	9.6
21	HEMBRA	12.1
26	HEMBRA	10.4
27	HEMBRA	11.3
28	HEMBRA	11.6
29	HEMBRA	10.7
34	HEMBRA	8.1
35	HEMBRA	6.9
36	HEMBRA	8.3
37	HEMBRA	7.7
38	HEMBRA	9.9
40	HEMBRA	9.3
43	HEMBRA	13.9
44	HEMBRA	10.2

**Tabla 4.15.** Valores de hemoglobina de *Trachemys scripta scripta* registrados en verano y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	Hemoglobina (gr/dL)
9	MACHO	9.0
10	MACHO	10.5
11	MACHO	12.5
19	MACHO	8.1
20	MACHO	8.1
24	MACHO	10.1
31	MACHO	12.7
32	MACHO	11.0
33	MACHO	8.2
39	MACHO	9.3
41	MACHO	9.5
45	MACHO	11.4
46	MACHO	9.4
12	HEMBRA	10.5
13	HEMBRA	10.9
16	HEMBRA	14.0
17	HEMBRA	10.5
21	HEMBRA	11.2
26	HEMBRA	11,5
27	HEMBRA	9.7
28	HEMBRA	12.0
29	HEMBRA	12.3
34	HEMBRA	10.6
35	HEMBRA	14.9
36	HEMBRA	14.3
37	HEMBRA	8.3
38	HEMBRA	7.1
40	HEMBRA	10.0
43	HEMBRA	9.8
44	HEMBRA	7.0

#### 4.6.4.- Recuento Total de Eritrocitos y Leucocitos

En las Tablas 4.16 y 4.17 se exponen los valores del recuento total de eritrocitos (RBC) y del recuento total de leucocitos (WBC) registrados en los individuos de *Trachemys scripta scripta* durante las dos estaciones en estudio y separados por sexos.



**Tabla 4.16.** Valores de RBC y WBC de *Trachemys scripta scripta* registrados en invierno y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	RBC (N°/ $\mu$ L)	WBC (N°/ $\mu$ L)
9	MACHO	0.62 x10 <sup>6</sup>	10.5 x10 <sup>3</sup>
10	MACHO	0.55 x10 <sup>6</sup>	7.5 x10 <sup>3</sup>
11	MACHO	0.495 x10 <sup>6</sup>	8.5 x10 <sup>3</sup>
19	MACHO	0.52 x10 <sup>6</sup>	7.25 x10 <sup>3</sup>
20	MACHO	0.65 x10 <sup>6</sup>	7.75 x10 <sup>3</sup>
24	MACHO	0.51 x10 <sup>6</sup>	3.75 x10 <sup>3</sup>
31	MACHO	0.475 x10 <sup>6</sup>	4.25 x10 <sup>3</sup>
32	MACHO	0.55 x10 <sup>6</sup>	5 x10 <sup>3</sup>
33	MACHO	0.52 x10 <sup>6</sup>	4.75 x10 <sup>3</sup>
39	MACHO	0.505 x10 <sup>6</sup>	4.75 x10 <sup>3</sup>
41	MACHO	0.495 x10 <sup>6</sup>	3.5 x10 <sup>3</sup>
45	MACHO	0.57 x10 <sup>6</sup>	5.5 x10 <sup>3</sup>
46	MACHO	0.545 x10 <sup>6</sup>	5.25 x10 <sup>3</sup>
12	HEMBRA	0.52 x10 <sup>6</sup>	8 x10 <sup>3</sup>
13	HEMBRA	0.485 x10 <sup>6</sup>	8.5 x10 <sup>3</sup>
16	HEMBRA	0.78 x10 <sup>6</sup>	6 x10 <sup>3</sup>
17	HEMBRA	0.44 x10 <sup>6</sup>	6.5 x10 <sup>3</sup>
21	HEMBRA	0.555 x10 <sup>6</sup>	7 x10 <sup>3</sup>
26	HEMBRA	0.6 x10 <sup>6</sup>	10 x10 <sup>3</sup>
27	HEMBRA	0.54 x10 <sup>6</sup>	5 x10 <sup>3</sup>
28	HEMBRA	0.54 x10 <sup>6</sup>	8 x10 <sup>3</sup>
29	HEMBRA	0.64 x10 <sup>6</sup>	6.5 x10 <sup>3</sup>
34	HEMBRA	0.365 x10 <sup>6</sup>	4.25 x10 <sup>3</sup>
35	HEMBRA	0.345 x10 <sup>6</sup>	3.5 x10 <sup>3</sup>
36	HEMBRA	0.36 x10 <sup>6</sup>	3.5 x10 <sup>3</sup>
37	HEMBRA	0.4 x10 <sup>6</sup>	3 x10 <sup>3</sup>
38	HEMBRA	0.555 x10 <sup>6</sup>	8.25 x10 <sup>3</sup>
40	HEMBRA	0.49 x10 <sup>6</sup>	4.25 x10 <sup>3</sup>
43	HEMBRA	0.645 x10 <sup>6</sup>	3.75 x10 <sup>3</sup>
44	HEMBRA	0.47 x10 <sup>6</sup>	5 x10 <sup>3</sup>

**Tabla 4.17.** Valores de RBC y WBC de *Trachemys scripta scripta* registrados en verano y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	RBC (N°/ $\mu$ L)	WBC (N°/ $\mu$ L)
9	MACHO	0.545x10 <sup>6</sup>	7.5 x10 <sup>3</sup>
10	MACHO	0.6x10 <sup>6</sup>	9.5 x10 <sup>3</sup>
11	MACHO	0.75x10 <sup>6</sup>	7.75 x10 <sup>3</sup>
19	MACHO	0.44x10 <sup>6</sup>	6 x10 <sup>3</sup>
20	MACHO	0.505x10 <sup>6</sup>	4.75 x10 <sup>3</sup>
24	MACHO	0.515x10 <sup>6</sup>	6.75 x10 <sup>3</sup>
31	MACHO	0.685x10 <sup>6</sup>	7.5 x10 <sup>3</sup>
32	MACHO	0.505x10 <sup>6</sup>	3.75 x10 <sup>3</sup>
33	MACHO	0.465x10 <sup>6</sup>	4.25 x10 <sup>3</sup>
39	MACHO	0.485x10 <sup>6</sup>	9.75 x10 <sup>3</sup>
41	MACHO	0.48x10 <sup>6</sup>	3.75 x10 <sup>3</sup>
45	MACHO	0.66x10 <sup>6</sup>	5 x10 <sup>3</sup>
46	MACHO	0.48x10 <sup>6</sup>	4.25 x10 <sup>3</sup>
12	HEMBRA	0.635x10 <sup>6</sup>	7.5 x10 <sup>3</sup>
13	HEMBRA	0.635x10 <sup>6</sup>	8.75 x10 <sup>3</sup>
16	HEMBRA	0.73x10 <sup>6</sup>	4.25 x10 <sup>3</sup>
17	HEMBRA	0.43x10 <sup>6</sup>	6.5 x10 <sup>3</sup>
21	HEMBRA	0.655x10 <sup>6</sup>	4 x10 <sup>3</sup>
26	HEMBRA	0.545x10 <sup>6</sup>	6.25 x10 <sup>3</sup>
27	HEMBRA	0.465x10 <sup>6</sup>	5 x10 <sup>3</sup>
28	HEMBRA	0.6x10 <sup>6</sup>	11.5 x10 <sup>3</sup>
29	HEMBRA	0.62x10 <sup>6</sup>	7.75 x10 <sup>3</sup>
34	HEMBRA	0.465x10 <sup>6</sup>	3 x10 <sup>3</sup>
35	HEMBRA	0.665x10 <sup>6</sup>	4.5 x10 <sup>3</sup>
36	HEMBRA	0.410x10 <sup>6</sup>	3 x10 <sup>3</sup>
37	HEMBRA	0.320x10 <sup>6</sup>	4.25 x10 <sup>3</sup>
38	HEMBRA	0.325x10 <sup>6</sup>	2.25 x10 <sup>3</sup>
40	HEMBRA	0.61x10 <sup>6</sup>	7.25 x10 <sup>3</sup>
43	HEMBRA	0.48x10 <sup>6</sup>	4 x10 <sup>3</sup>
44	HEMBRA	0.36x10 <sup>6</sup>	3.5 x10 <sup>3</sup>

#### 4.6.5.- Recuento de Trombocitos

En las Tablas 4.18 y 4.19 se exponen los valores del recuento de trombocitos obtenidos mediante las técnicas del recuento en cámara (CAM) y la estimación en frotis (FROT), en los individuos de *Trachemys scripta scripta* durante las dos estaciones en estudio y separados por sexos.

**Tabla 4.18.** Valores del recuento de trombocitos, obtenidos mediante CAM y FROT, de *Trachemys scripta scripta* registrados en invierno y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	Trombocitos/ $\mu$ L (CAM)	Trombocitos/ $\mu$ L (FROT)
9	MACHO	20 x10 <sup>3</sup>	47.5 x10 <sup>3</sup>
10	MACHO	22 x10 <sup>3</sup>	52.5 x10 <sup>3</sup>
11	MACHO	24 x10 <sup>3</sup>	39.5 x10 <sup>3</sup>
19	MACHO	42 x10 <sup>3</sup>	41 x10 <sup>3</sup>
20	MACHO	32 x10 <sup>3</sup>	40 x10 <sup>3</sup>
24	MACHO	28 x10 <sup>3</sup>	42 x10 <sup>3</sup>
31	MACHO	30 x10 <sup>3</sup>	45 x10 <sup>3</sup>
32	MACHO	32 x10 <sup>3</sup>	53 x10 <sup>3</sup>
33	MACHO	36 x10 <sup>3</sup>	33.5 x10 <sup>3</sup>
39	MACHO	24 x10 <sup>3</sup>	42 x10 <sup>3</sup>
41	MACHO	28 x10 <sup>3</sup>	35 x10 <sup>3</sup>
45	MACHO	28 x10 <sup>3</sup>	45 x10 <sup>3</sup>
46	MACHO	32 x10 <sup>3</sup>	47 x10 <sup>3</sup>
12	HEMBRA	28 x10 <sup>3</sup>	31.25 x10 <sup>3</sup>
13	HEMBRA	30 x10 <sup>3</sup>	38 x10 <sup>3</sup>
16	HEMBRA	16 x10 <sup>3</sup>	29.35 x10 <sup>3</sup>
17	HEMBRA	14 x10 <sup>3</sup>	44.95 x10 <sup>3</sup>
21	HEMBRA	24 x10 <sup>3</sup>	56 x10 <sup>3</sup>
26	HEMBRA	24 x10 <sup>3</sup>	68 x10 <sup>3</sup>
27	HEMBRA	28 x10 <sup>3</sup>	32.5 x10 <sup>3</sup>
28	HEMBRA	28 x10 <sup>3</sup>	56.5 x10 <sup>3</sup>
29	HEMBRA	20 x10 <sup>3</sup>	29.65 0 x10 <sup>3</sup>
34	HEMBRA	18 x10 <sup>3</sup>	34 x10 <sup>3</sup>
35	HEMBRA	26 x10 <sup>3</sup>	23 x10 <sup>3</sup>
36	HEMBRA	20 x10 <sup>3</sup>	28.5 x10 <sup>3</sup>
37	HEMBRA	22 x10 <sup>3</sup>	38.5 x10 <sup>3</sup>
38	HEMBRA	22 x10 <sup>3</sup>	44.5 x10 <sup>3</sup>
40	HEMBRA	26 x10 <sup>3</sup>	44 x10 <sup>3</sup>
43	HEMBRA	62 x10 <sup>3</sup>	66 x10 <sup>3</sup>
44	HEMBRA	48 x10 <sup>3</sup>	44 x10 <sup>3</sup>

**Tabla 4.19.** Valores del recuento de trombocitos, obtenidos mediante CAM y FROT, de *Trachemys scripta scripta* registrados en verano y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	Trombocitos/ $\mu$ L (CAM)	Trombocitos/ $\mu$ L (FROT)
9	MACHO	26 x10 <sup>3</sup>	26 x10 <sup>3</sup>
10	MACHO	42 x10 <sup>3</sup>	27 x10 <sup>3</sup>
11	MACHO	40 x10 <sup>3</sup>	32 x10 <sup>3</sup>
19	MACHO	44 x10 <sup>3</sup>	49.5 x10 <sup>3</sup>
20	MACHO	30 x10 <sup>3</sup>	39 x10 <sup>3</sup>
24	MACHO	36 x10 <sup>3</sup>	48.5 x10 <sup>3</sup>
31	MACHO	46 x10 <sup>3</sup>	39 x10 <sup>3</sup>
32	MACHO	56 x10 <sup>3</sup>	33 x10 <sup>3</sup>
33	MACHO	42 x10 <sup>3</sup>	28 x10 <sup>3</sup>
39	MACHO	58 x10 <sup>3</sup>	52 x10 <sup>3</sup>
41	MACHO	40 x10 <sup>3</sup>	54.5 x10 <sup>3</sup>
45	MACHO	48 x10 <sup>3</sup>	52.5 x10 <sup>3</sup>
46	MACHO	40 x10 <sup>3</sup>	51 x10 <sup>3</sup>
12	HEMBRA	30 x10 <sup>3</sup>	20.5 x10 <sup>3</sup>
13	HEMBRA	42 x10 <sup>3</sup>	35.5 x10 <sup>3</sup>
16	HEMBRA	20 x10 <sup>3</sup>	19 x10 <sup>3</sup>
17	HEMBRA	18 x10 <sup>3</sup>	20 x10 <sup>3</sup>
21	HEMBRA	30 x10 <sup>3</sup>	50 x10 <sup>3</sup>
26	HEMBRA	18 x10 <sup>3</sup>	30 x10 <sup>3</sup>
27	HEMBRA	34 x10 <sup>3</sup>	24 x10 <sup>3</sup>
28	HEMBRA	36 x10 <sup>3</sup>	36.5 x10 <sup>3</sup>
29	HEMBRA	26 x10 <sup>3</sup>	34.5 x10 <sup>3</sup>
34	HEMBRA	30 x10 <sup>3</sup>	63 x10 <sup>3</sup>
35	HEMBRA	18 x10 <sup>3</sup>	19 x10 <sup>3</sup>
36	HEMBRA	30 x10 <sup>3</sup>	40.5 x10 <sup>3</sup>
37	HEMBRA	18 x10 <sup>3</sup>	29 x10 <sup>3</sup>
38	HEMBRA	18 x10 <sup>3</sup>	26 x10 <sup>3</sup>
40	HEMBRA	46 x10 <sup>3</sup>	59.5 x10 <sup>3</sup>
43	HEMBRA	68 x10 <sup>3</sup>	82 x10 <sup>3</sup>
44	HEMBRA	30 x10 <sup>3</sup>	52.5 x10 <sup>3</sup>

#### 4.6.6.- Los Índices Eritrocitarios

En las Tablas 4.20 y 4.21 se exponen los valores de los índices eritrocitarios registrados en los individuos de *Trachemys scripta scripta* durante las dos estaciones en estudio y separados por sexos.

**Tabla 4.20.** Valores de los índices eritrocitarios de *Trachemys scripta scripta* registrados en invierno y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	VCM fl	HCM pg	CHCM g/dL
9	MACHO	338.71	179.03	52.85
10	MACHO	309.09	178.18	57.65
11	MACHO	363.64	185.86	51.11
19	MACHO	538.46	242.31	45.0
20	MACHO	430.77	209.23	48.57
24	MACHO	431.37	219.61	50.91
31	MACHO	484.21	197.89	40.87
32	MACHO	509.09	229.09	45.0
33	MACHO	461.54	176.92	38.33
39	MACHO	356.44	164.35	46.11
41	MACHO	484.85	224.24	46.25
45	MACHO	614.03	278.95	45.43
46	MACHO	348.62	181.65	52.11
12	HEMBRA	384.62	219.23	57.0
13	HEMBRA	391.75	220.62	56.32
16	HEMBRA	333.33	153.85	46.15
17	HEMBRA	568.18	218.18	38.4
21	HEMBRA	504.5	218.02	43.21
26	HEMBRA	383.33	173.33	45.22
27	HEMBRA	518.52	209.26	40.36
28	HEMBRA	425.93	214.81	46.4
29	HEMBRA	343.75	167.19	48.63
34	HEMBRA	547.94	221.92	40.5
35	HEMBRA	521.74	200.0	38.33
36	HEMBRA	472.22	230.55	48.82
37	HEMBRA	425.0	192.5	45.29
38	HEMBRA	414.41	178.38	43.04
40	HEMBRA	367.35	189.8	51.67
43	HEMBRA	496.12	215.5	43.44
44	HEMBRA	468.08	217.02	46.36

**Tabla 4.21.** Valores de los índices eritrocitarios de *Trachemys scripta scripta* registrados en verano y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	VCM fl	HCM pg	CHCM g/dL
9	MACHO	403.67	165.14	40.91
10	MACHO	400.0	175.0	43.75
11	MACHO	400.0	166.67	41.67
19	MACHO	409.09	184.09	45.0
20	MACHO	356.44	160.4	45.0
24	MACHO	466.02	196.12	42.08
31	MACHO	394.16	185.4	47.04
32	MACHO	514.85	217.82	42.31
33	MACHO	430.11	176.34	41.0
39	MACHO	453.61	191.75	42.27
41	MACHO	500.0	197.92	39.58
45	MACHO	424.24	172.73	40.71
46	MACHO	458.33	195.83	42.73
12	HEMBRA	409.45	165.35	40.38
13	HEMBRA	425.2	171.65	40.37
16	HEMBRA	493.15	191.78	38.89
17	HEMBRA	558.14	244.18	43.75
21	HEMBRA	396.95	170.99	43.08
26	HEMBRA	532.11	211.01	39.65
27	HEMBRA	473.12	208.6	44.09
28	HEMBRA	433.33	200.0	46.15
29	HEMBRA	467.74	198.39	42.41
34	HEMBRA	516.13	227.96	44.17
35	HEMBRA	511.28	224.06	43.82
36	HEMBRA	609.76	348.78	57.2
37	HEMBRA	562.5	259.37	46.11
38	HEMBRA	584.62	218.46	37.37
40	HEMBRA	393.44	163.93	41.67
43	HEMBRA	458.33	204.17	44.54
44	HEMBRA	472.22	194.44	41.17

#### 4.6.7.- Recuento Diferencial Leucocitario

En las Tablas 4.22 y 4.23 se exponen los valores del recuento diferencial leucocitario [porcentajes de heterófilos (H), linfocitos (L), monocitos (M), eosinófilos (E) y basófilos (B)] en los individuos de *Trachemys scripta scripta* durante las dos estaciones en estudio y separados por sexos.

**Tabla 4.22.** Valores del recuento diferencial leucocitario de *Trachemys scripta scripta* registrados en invierno y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	H%	L%	M%	E%	B%
9	MACHO	42	14	6	13.5	24.5
10	MACHO	30	9	3	11.5	46.5
11	MACHO	33.5	15	5	11.5	35
19	MACHO	37	10.5	7.5	8	37
20	MACHO	42.5	12	1.5	11.5	32.5
24	MACHO	37	11.5	8.5	2	41
31	MACHO	25	15	8	20	32
32	MACHO	15.5	12	3.5	17	52
33	MACHO	32,5	13	7	27.5	20
39	MACHO	41	13	4.5	3	38.5
41	MACHO	36	9.5	2	6	46.5
45	MACHO	15.5	14	5	29	36.5
46	MACHO	25.5	11	3.5	7.5	52.5
12	HEMBRA	43.5	10	2	6	38.5
13	HEMBRA	38.5	7.5	1.5	14.5	38
16	HEMBRA	28.5	18	2.5	10.5	40.5
17	HEMBRA	48.5	12.5	4.5	10	24.5
21	HEMBRA	47.5	10.5	6	9	27
26	HEMBRA	18	9	2.5	4	66.5
27	HEMBRA	31.5	13	6	13.5	36
28	HEMBRA	30	15	3.5	15.5	36
29	HEMBRA	35	17.5	7.5	12	28
34	HEMBRA	23	16	4	16	41
35	HEMBRA	30.5	10.5	2	28.5	28.5
36	HEMBRA	24	14	4	3	55
37	HEMBRA	17	23.5	10	12	37.5
38	HEMBRA	47	10	4	11.5	27.5
40	HEMBRA	54	14	5	5	22
43	HEMBRA	48.5	13.5	5	10	23
44	HEMBRA	38.5	12.5	3	7	39

**Tabla 4.23.** Valores del recuento diferencial leucocitario de *Trachemys scripta scripta* registrados en verano y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	H%	L%	M%	E%	B%
9	MACHO	56	9.5	6	14	14.5
10	MACHO	39	9.5	4	20	27.5
11	MACHO	50.5	9.5	3	11.5	25.5
19	MACHO	46.5	8	3.5	13.5	28.5
20	MACHO	45	6	3	9.5	36.5
24	MACHO	53	7.5	1	11.5	27
31	MACHO	58	7.5	2	13	19.5
32	MACHO	36.5	12.5	4	10	37
33	MACHO	50.5	7.5	3	20	19
39	MACHO	50.5	8.5	4.5	6.5	30
41	MACHO	46.5	9	3.5	14	27
45	MACHO	37.5	15	6.5	26.5	14.5
46	MACHO	49	8	2.5	5.5	35
12	HEMBRA	57	9	2.5	16.5	15
13	HEMBRA	55.5	8.5	6	15.5	14.5
16	HEMBRA	53	9	4.5	4	29.5
17	HEMBRA	49	11.5	9	12.5	18
21	HEMBRA	55	7.5	3.5	10.5	23.5
26	HEMBRA	45.5	10	4	6	34.5
27	HEMBRA	60.5	8.5	6.5	9.5	15
28	HEMBRA	35	10	4.5	19	31.5
29	HEMBRA	47	9	6.5	12.5	25
34	HEMBRA	44.5	9	2	17.5	27
35	HEMBRA	34.5	12	1.5	23	29
36	HEMBRA	55	8.5	1.5	3.5	31.5
37	HEMBRA	31.5	12	2.5	19.5	34.5
38	HEMBRA	55	9	1.5	11.5	23
40	HEMBRA	58.5	8.5	1.5	7	24.5
43	HEMBRA	52	11.5	1.5	11.5	23.5
44	HEMBRA	50	10.5	1	10.5	28

#### 4.6.8.- Porcentaje de Eritrocitos Inmaduros

En las Tablas 4.24 y 4.25 se exponen los porcentajes de eritrocitos inmaduros registrados en los individuos de *Trachemys scripta scripta* durante las dos estaciones en estudio y separados por sexos.



**Tabla 4.24.** Porcentajes de eritrocitos inmaduros de *Trachemys scripta scripta* registrados en invierno y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	Eritrocitos inmaduros (%)
9	MACHO	0.2
10	MACHO	0.2
11	MACHO	0.2
19	MACHO	0.0
20	MACHO	0.4
24	MACHO	0.6
31	MACHO	1.0
32	MACHO	1.0
33	MACHO	0.8
39	MACHO	0.2
41	MACHO	0.2
45	MACHO	0.8
46	MACHO	1.0
12	HEMBRA	0.0
13	HEMBRA	0.4
16	HEMBRA	0.6
17	HEMBRA	0.2
21	HEMBRA	0.4
26	HEMBRA	0.6
27	HEMBRA	1.4
28	HEMBRA	0.2
29	HEMBRA	0.4
34	HEMBRA	1.0
35	HEMBRA	0.2
36	HEMBRA	1.0
37	HEMBRA	0.2
38	HEMBRA	0.8
40	HEMBRA	0.2
43	HEMBRA	0.0
44	HEMBRA	0.2

**Tabla 4.25.** Porcentajes de eritrocitos inmaduros de *Trachemys scripta scripta* registrados en verano y separados por sexos

Tortuga (N°)	Sexo	Eritrocitos inmaduros (%)
9	MACHO	0.4
10	MACHO	1.0
11	MACHO	0.2
19	MACHO	0.2
20	MACHO	0.2
24	MACHO	0.4
31	MACHO	2.6
32	MACHO	1.0
33	MACHO	0.6
39	MACHO	0.2
41	MACHO	0.2
45	MACHO	0.6
46	MACHO	0.8
12	HEMBRA	0.4
13	HEMBRA	0.2
16	HEMBRA	0.8
17	HEMBRA	0.4
21	HEMBRA	0.4
26	HEMBRA	0.6
27	HEMBRA	0.6
28	HEMBRA	0.4
29	HEMBRA	0.0
34	HEMBRA	1.0
35	HEMBRA	0.2
36	HEMBRA	3.6
37	HEMBRA	0.0
38	HEMBRA	0.2
40	HEMBRA	0.4
43	HEMBRA	1.2
44	HEMBRA	0.2

## 4.7.- ESTUDIO ESTADÍSTICO

### 4.7.1.- Valores Hematológicos y Bioquímicos

En las Tablas 4.26 y 4.27 se exponen los datos del estudio estadístico relativo a los valores de los parámetros hematológicos y bioquímicos para los individuos de *Trachemys scripta scripta* en estudio. Se ha desarrollado una comparativa entre sexos dentro de la misma estación de estudio (columna “P”) y una comparativa entre estaciones dentro del mismo sexo.

**Tabla 4.26.** Estudio estadístico de los parámetros hematológicos y bioquímicos de *Trachemys s. s.* en invierno segregando por sexos.

INVIERNO	Total N = 30	Machos N = 13	Hembras N = 17	P <0.05
Hematocrito%	22.8 ± 4.7	23.5 ± 5.2	22.4 ± 4.3	.561
Sólidos totales, g/dL	3.77 ± 1.25	3.50 ± 0.93	3.97 ± 1.44	.288
Hemoglobina, g/dL	10.7 ± 2.0	11.1 ± 2.1	10.3 ± 1.9	.348
Log <sub>10</sub> -RBC, µl	5.71 ± 0.08	5.73 ± 0.04	5.70 ± 0.10	.270
VCM, fl	441 ± 80	436 ± 90	445 ± 73	.775
HCM, pg	203 ± 27	<b>205 ± 33 *</b>	202 ± 23	.793
CHCM, g/dL	46.6 ± 5.3	<b>47.7 ± 5.2 *</b>	45.8 ± 5.5	.348
WBC/µl	6000 ± 2036	6019 ± 2095	5985 ± 2055	.965
H, %	33.9 ± 10.5	<b>31.8 ± 9.1 *</b>	<b>35.5 ± 11.4 †</b>	.329
L, %	12.9 ± 3.2	<b>12.3 ± 1.9 *</b>	<b>13.3 ± 3.9 †</b>	.332
M, %	4.60 ± 2.22	5.00 ± 2.28	4.29 ± 2.19	.401
E, %	11.9 ± 7.09	12.9 ± 8.5	11.1 ± 6.0	.507
B, %	36.8 ± 10.7	<b>38.0 ± 9.8 *</b>	<b>35.8 ± 11.5 †</b>	.569
Trombocitos/µl × 10 <sup>3</sup> (CAM)	27.8 ± 9.6	<b>29.1 ± 6.0 *</b>	26.8 ± 11.9	.501
Trombocitos/µl × 10 <sup>3</sup> (FROT)	42.4 ± 10.6	43.3 ± 5.9	41.7 ± 13.3	.965
Eritrocitos inmaduros (%)	0.4 (0.2 ; 0.8)	0.4 (0.2 ; 0.8)	0.4 (0.2 ; 0.6)	.711

Los datos son medias ± SD y medianas (IQR)

(\*) Indica diferencias significativas en machos entre estaciones (p < 0.05);

(†) Indica diferencias significativas en hembras entre estaciones (p < 0.05).

**Tabla 4.27.** Estudio estadístico de los parámetros hematológicos y bioquímicos de *Trachemys s. s.* en verano segregando por sexos.

VERANO	Total N = 30	Machos N = 13	Hembras N = 17	P <0.05
Hematocrito%	24.4 ± 4.5	23.5 ± 3.7	25.2 ± 5.1	.291
Sólidos totales, g/dL	4.23 ± 1.29	3.70 ± 1.05	4.64 ± 1.34	<b>.041</b>
Hemoglobina, g/dL	10.5 ± 2.0	10.0 ± 1.6	10.9 ± 2.2	.220
Log <sub>10</sub> -RBC, µl	5.72 ± 0.10	5.73 ± 0.07	5.71 ± 0.11	.478
VCM, fl	464 ± 64	432 ± 45	488 ± 66	<b>.010</b>
HCM, pg	200 ± 37	<b>183 ± 16 *</b>	212 ± 44	<b>.023</b>
CHCM, g/dL	43.0 ± 3.5	<b>42.6 ± 2.1 *</b>	43.2 ± 4.4	.620
WBC/µl	5792 ± 2294	6192 ± 2097	5485 ± 2452	.403
H, %	48.6 ± 7.8	<b>47.6 ± 6.7 *</b>	<b>49.3 ± 8.7 †</b>	.540
L, %	9.4 ± 1.9	<b>9.1 ± 2.4 *</b>	<b>9.6 ± 1.4 †</b>	.449
M, %	3.55 ± 1.98	3.58 ± 1.50	3.53 ± 2.33	.947
E, %	12.8 ± 5.6	13.5 ± 5.8	12.3 ± 5.6	.590
B, %	25.6 ± 6.9	<b>26.3 ± 7.6 *</b>	<b>25.1 ± 6.53 †</b>	.674
Trombocitos/µl × 10 <sup>3</sup> (CAM)	35.3 ± 12.8	<b>42.2 ± 8.9 *</b>	30.1 ± 13.1	<b>.006</b>
Trombocitos/µl × 10 <sup>3</sup> (FROT)	39.1 ± 15.2	40.9 ± 10.8	37.7 ± 18.1	.554
Eritrocitos inmaduros (%)	0.4 (0.2 ; 0.8)	0.4 (0.2 ; 0.8)	0.4 (0.2 ; 0.6)	.711

Los datos son medias ± SD y medianas (IQR)

(\*) Indica diferencias significativas en machos entre estaciones ( $p < 0.05$ );

(†) Indica diferencias significativas en hembras entre estaciones ( $p < 0.05$ ).

En las Tablas 4.28 y 4.29 se exponen los datos del estudio estadístico relativo a los valores de los parámetros hematológicos y bioquímicos para los individuos de *Trachemys scripta scripta* en estudio. Se ha desarrollado una comparativa entre pesos (animales de <700grs y >700grs) dentro de la misma estación de estudio (columna "P") y una comparativa entre estaciones dentro del mismo grupo de peso.

Resultados

**Tabla 4.28.** Estudio estadístico de los parámetros hematológicos y bioquímicos de *Trachemys s. s.* en invierno segregando por pesos.

INVIERNO	Total N = 30	< 700 gr n = 13	> 700 gr n = 17	P <0.05
Hematocrito%	22.8 ± 4.7	22.8 ± 5.1	22.9 ± 4.4	.984
Sólidos totales, g/dL	3.77 ± 1.25	3.58 ± 1.16	3.91 ± 1.32	.469
Hemoglobina, g/dL	10.7 ± 2.0	10.9 ± 2.0	10.5 ± 2.0	.614
Log <sub>10</sub> -RBC, µl	5.71 ± 0.08	5.72 ± 0.03	5.71 ± 0.10	.557
VCM, fl	441 ± 80	433 ± 91	448 ± 72	.631
HCM, pg	203 ± 27	<b>205.7 ± 32.8 *</b>	202.0 ± 22.4	.730
CHCM, g/dL	46.6 ± 5.3	<b>48.0 ± 5.7 *</b>	45.6 ± 5.0	.257
WBC/µl	6000 ± 2036	6404 ± 2095	5691 ± 1997	.355
H, %	33.9 ± 10.5	<b>30.9 ± 8.6 *</b>	<b>36.1 ± 11.5 †</b>	.166
L, %	12.9 ± 3.2	<b>12.2 ± 2.5 *</b>	<b>13.4 ± 3.7 †</b>	.288
M, %	4.60 ± 2.22	4.62 ± 2.05	4.59 ± 2.41	.974
E, %	11.9 ± 7.09	14.2 ± 7.8	10.1 ± 6.1	.132
B, %	36.8 ± 10.7	<b>38.1 ± 10.1 *</b>	<b>35.8 ± 11.6 †</b>	.556
Trombocitos/µl × 10 <sup>3</sup> (CAM)	27.8 ± 9.6	<b>28.9 ± 5.9 *</b>	26.9 ± 11.8	.554
Trombocitos/µl × 10 <sup>3</sup> (FROT)	42.4 ± 10.6	44.3 ± 7.0	41.0 ± 12.7	.372
Eritrocitos inmaduros (%)	0.4 (0.2 ; 0.8)	0.2 (0.2 ; 0.8)	0.4 (0.2; 0.6)	.948

Los datos son medias ± SD y medianas (IQR)

(\*) Indica diferencias significativas en animales <700grs entre estaciones (p < 0.05);

(†) Indica diferencias significativas en animales >700grs entre estaciones (p < 0.05).

**Tabla 4.29.** Estudio estadístico de los parámetros hematológicos y bioquímicos de *Trachemys s. s.* en verano segregando por pesos.

VERANO	Total N = 30	< 700 gr n = 13	> 700 gr n = 17	P <0.05
Hematocrito%	24.4 ± 4.5	24.3 ± 3.4	24.5 ± 5.3	.891
Sólidos totales, g/dL	4.23 ± 1.29	3.93 ± 1.12	4.46 ± 1.40	.260
Hemoglobina, g/dL	10.5 ± 2.0	10.3 ± 1.5	10.6 ± 2.3	.742
Log <sub>10</sub> -RBC, µl	5.72 ± 0.10	5.75 ± 0.07	5.70 ± 0.11	.173
VCM, fl	464 ± 64	434 ± 38	486 ± 71	<b>.017</b>
HCM, pg	200 ± 37	<b>184.6 ± 15.4 *</b>	211.1 ± 45.0	<b>.035</b>
CHCM, g/dL	43.0 ± 3.5	<b>42.6 ± 2.3 *</b>	43.3 ± 4.3	.581
WBC/µl	5792 ± 2294	6865 ± 2569	4971 ± 1714	<b>.033</b>
H, %	48.6 ± 7.8	<b>47.0 ± 7.8 *</b>	<b>49.8 ± 7.9 †</b>	.346
L, %	9.4 ± 1.9	<b>9.46 ± 2.13 *</b>	<b>9.35 ± 1.69 †</b>	.881
M, %	3.55 ± 1.98	4.08 ± 1.40	3.15 ± 2.30	.182
E, %	12.8 ± 5.6	14.5 ± 5.8	11.6 ± 5.2	.159
B, %	25.6 ± 6.9	<b>24.9 ± 7.8 *</b>	<b>26.2 ± 6.3 †</b>	.641
Trombocitos/µl × 10 <sup>3</sup> (CAM)	35.3 ± 12.8	<b>43.1 ± 8.1 *</b>	29.4 ± 12.7	<b>.001</b>
Trombocitos/µl × 10 <sup>3</sup> (FROT)	39.1 ± 15.2	39.7 ± 10.7	38.6 ± 18.3	.841
Eritrocitos inmaduros (%)	0.4 (0.2 ; 0.8)	0.4 (0.2 ; 0.8)	0.4 (0.2 ; 0.6)	.716

Los datos son medias ± SD y medianas (IQR)

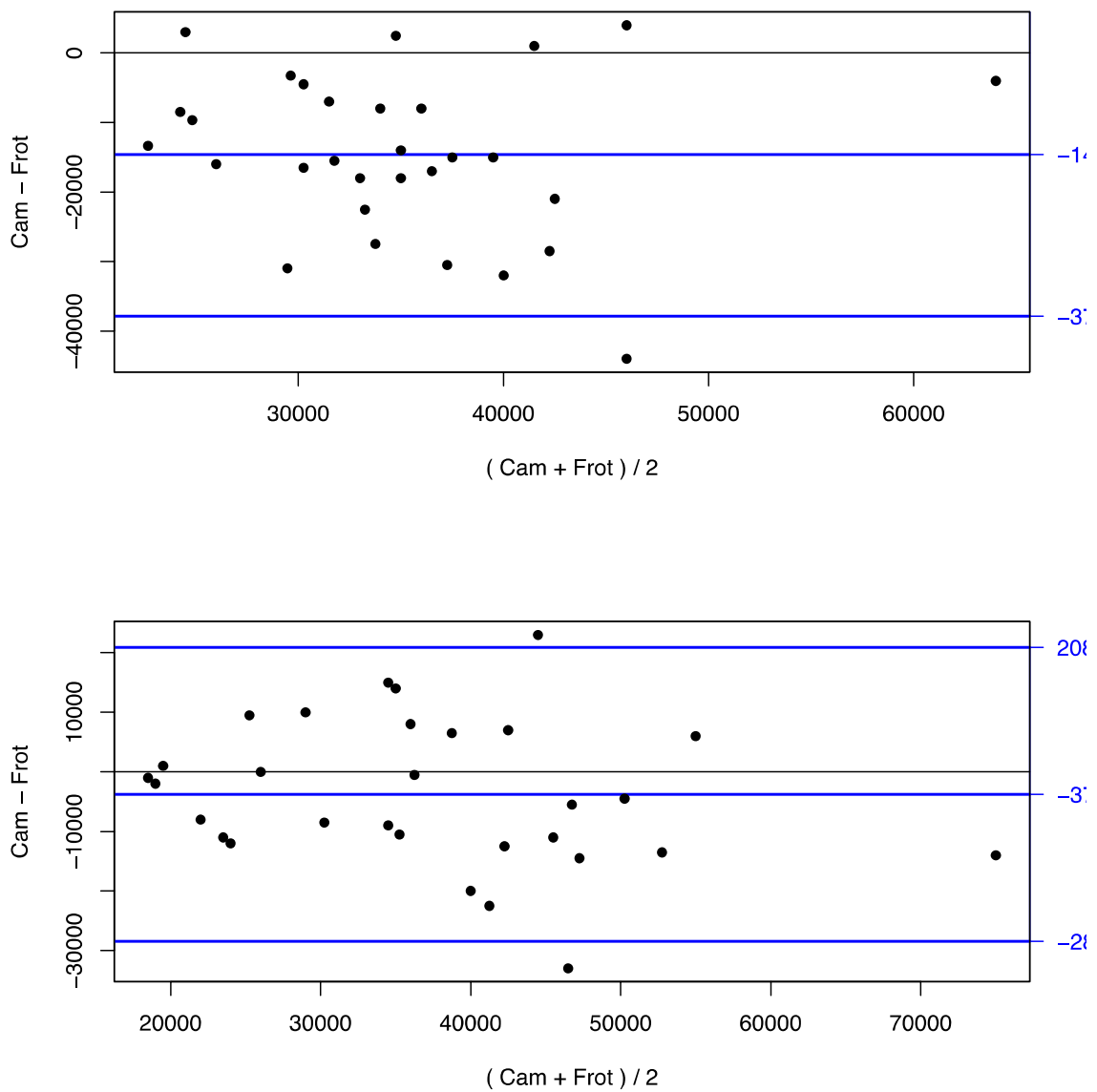
(\*) Indica diferencias significativas en animales <700grs entre estaciones (p < 0.05);

(†) Indica diferencias significativas en animales >700grs entre estaciones (p < 0.05).

### 4.7.2.- Concordancia entre las Determinaciones de Trombocitos por los Métodos CAM y FROT

En la Figura 4.75 se resume al análisis de Bland y Altman. De éste se desprende que en invierno, las determinaciones obtenidas por los dos métodos de recuento de trombocitos son claramente discordantes, siendo la media de las diferencias CAM – FROT de -14500, con una desviación estándar de 1639, que se corresponde con una diferencia significativamente negativa ( $p < .001$ ). Sin embargo, en verano la diferencia es notablemente menor ( $-3783 \pm 12334$ ).

Figura 4.75. Análisis de Bland-Altman



**Figura 4.75.**

Variable de estudio: recuento de trombocitos ( $\mu\text{L}$ ); métodos de medición: Cam y Frot

En eje x: Media aritmética:  $(\text{Cam} + \text{Frot})/2$

En eje y: Diferencia. Cam - Frot

Diferencia de valores pareados: invierno:  $-14500 \pm 11639$  ( $p < .001$ ); verano:  $-3783 \pm 12334$  ( $p = 104$ )

El gráfico muestra las diferencias entre los recuentos de trombocitos por ambos métodos en cada tortuga (eje y) en relación con los valores medios obtenidos con los dos métodos (eje x). Las líneas azules representan la diferencia media entre los dos métodos (IC-95%)

En la Tabla 4.30 se muestran los coeficientes de correlación intraclase (ICC) estimados mediante intervalos de confianza al 95% en cada una de las estaciones consideradas. Hay una moderada concordancia de ambos métodos en verano, pero en invierno las determinaciones carecen de concordancia. Nótese que el ICC no es significativamente distinto de cero.

**Tabla 4.30.** Coeficientes de correlación intraclase (ICC) para evaluar la concordancia entre los dos métodos de medición de los trombocitos

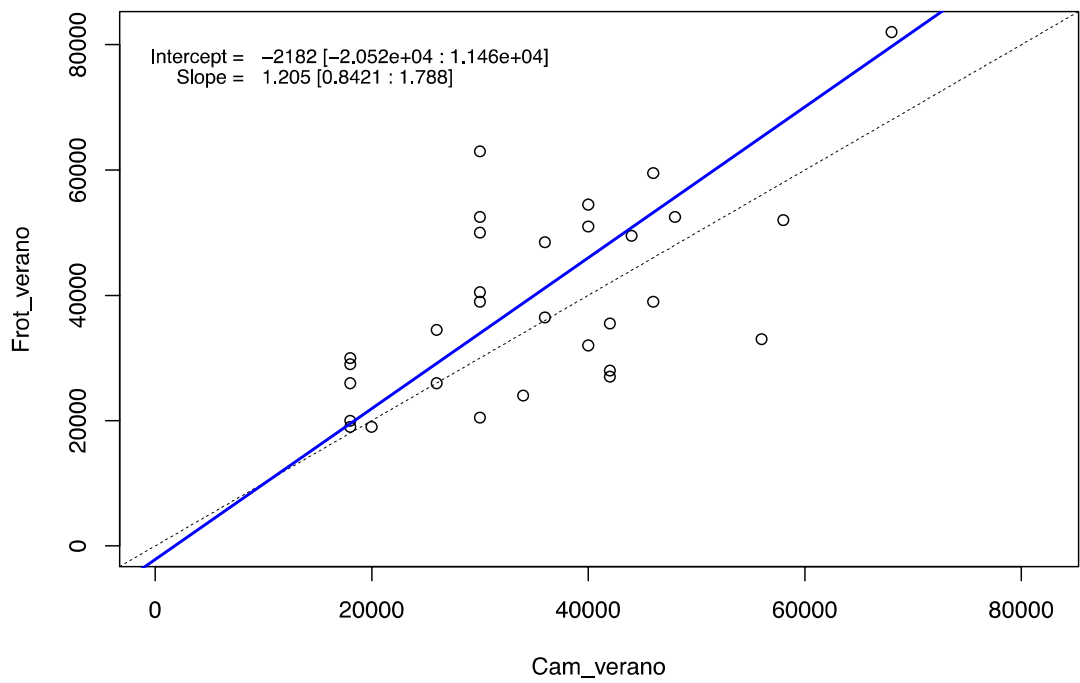
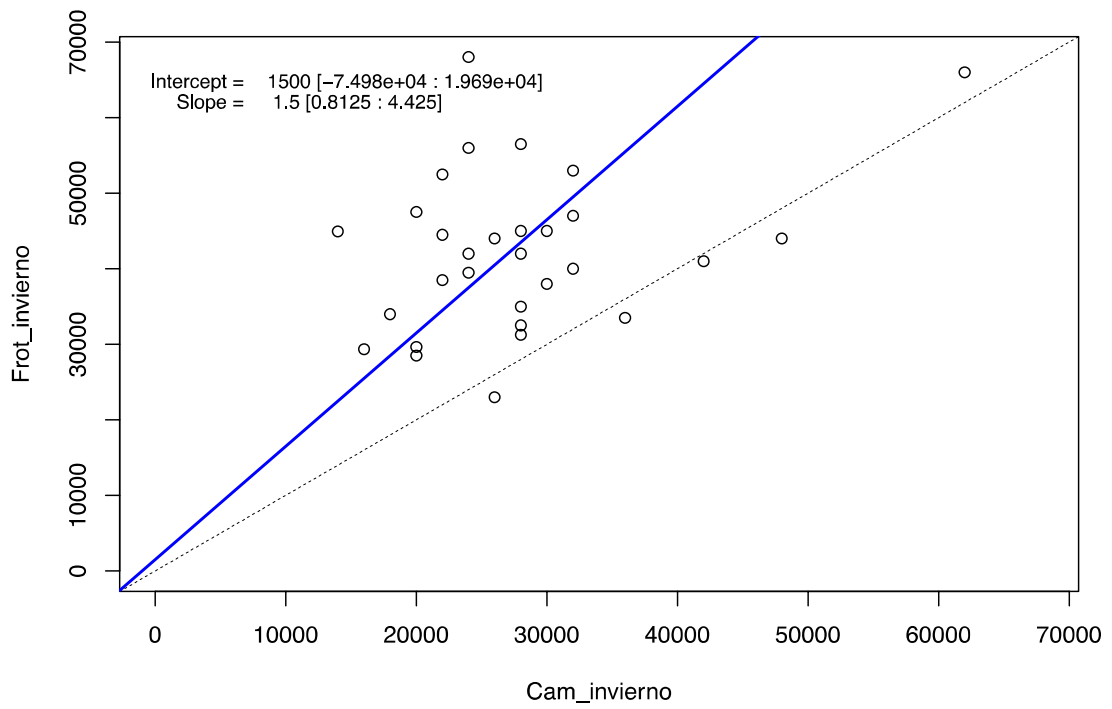
Estación	Coefficiente de correlación intraclase (IC-95%)	P*
Invierno	-0.111 (-0.445 ; 0.252)	.726
Verano	0.597 (0.311 ; 0.785)	< .001

(\*)  $H_0$ : ICC = 0;  $H_1$ : ICC > 0

En la Figura 4.76 se muestra la regresión de Passing-Bablok. Las líneas de puntos negras son las bisectrices del primer cuadrante. Los puntos que caen sobre esta línea corresponden a pares de determinaciones en las que ambos métodos coinciden. Para la estación invernal, la línea de regresión diverge fuertemente de la bisectriz, lo que indica que los métodos no son coincidentes. Sin embargo, en verano ambas líneas muestran una razonable coincidencia.



Figura 4.76. Regresión de Passing-Bablok



## 5.- DISCUSIÓN

### 5.1.- MORFOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

La valoración morfológica llevada a cabo mediante tinción de Diff quick<sup>®</sup>, microscopía electrónica y caracterización citoquímica, nos ha permitido identificar además de eritrocitos y trombocitos, 5 tipos de leucocitos; tres leucocitos granulocíticos (heterófilo, eosinófilo y basófilo) y 2 leucocitos mononucleares (linfocito y monocito). Esto coincide con lo descrito por SYPEK Y BORYSENKO (1988) en muchos reptiles y por WORK ET AL. (1998) y CASAL Y ORÓS (2007) en tortugas marinas. De igual manera, la mayoría de los quelonios emídidos en los que se han realizado estudios morfológicos presenta los mismos tipos celulares que la tortuga de vientre amarillo u orejas amarillas (*Trachemys scripta scripta*) y al igual que esta especie, carecen en su fórmula leucocitaria de neutrófilos y azurófilos (INNIS ET AL., 2007; CHUNG ET AL., 2009; ARIZZA ET AL., 2014; CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014). No así en la tortuga del templo de cabeza amarilla (*Hieremys annandalii*), especie en la que CHANSUE ET AL. (2011) describieron azurófilos en lugar de monocitos.

El **eritrocito** de *Trachemys scripta scripta* representa la célula sanguínea de mayor tamaño en esta especie, con una superficie media de 176.9 $\mu\text{m}^2$ . Sus dimensiones, con unos diámetros mayor y menor aproximados de 18.42 $\mu\text{m}$  y 11.46 $\mu\text{m}$  respectivamente, son muy similares a las descritas por otros autores en varias especies de quelonios (FRYE 1981; 1991), incluidas las tortugas marinas como la tortuga verde (*Chelonia mydas*) (WORK ET AL., 1998) y la tortuga boba (*Caretta caretta*) (CASAL Y ORÓS, 2007). Con respecto a otras especies de emídidos, los tamaños celulares también se acercan mucho a los de *Trachemys scripta scripta* (FRYE 1991; INNIS ET AL., 2007; CHUNG ET AL., 2009; CHANSUE ET AL., 2011; ARIZZA ET AL., 2014), aunque CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL. (2014) describieron el eritrocito de la hicotea (*Trachemys callirostris*) como una célula bastante más grande, con un diámetro mayor de unos 24.2 $\mu\text{m}$  y un diámetro menor de 14.0 $\mu\text{m}$ .

En cuanto a las características morfológicas que se observan mediante microscopía óptica rutinaria, el eritrocito de *Trachemys scripta scripta* aparece muy similar al de otros quelonios, con forma ovalada y núcleo redondeado y basófilo (WORK ET AL., 1998; CASAL Y ORÓS, 2007; INNIS ET AL., 2007; CHUNG ET AL., 2009; CHANSUE ET AL., 2011; ARIZZA ET AL., 2014; CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014). También se caracteriza por la presencia en algunas células de inclusiones citoplasmáticas redondas, individuales y basófilas y cercanas al núcleo. Este hallazgo también se ha descrito en otros emídidos, como la tortuga pintada (*Chrysemys picta picta*), en la que un 17.5% de los eritrocitos es portador de dichas inclusiones (DAVIS Y HOLCOMB, 2008), o *Hieremys annandalii* en la que dicho porcentaje llega a superar el 50% (CHANSUE ET AL., 2011). En la tortuga asiática amarilla de charca

(*Ocadia sinensis*) también se observan inclusiones en hasta un 1% de los eritrocitos, pero éstas suelen asociarse a una vacuola y muestran remanentes de membrana, considerándose orgánulos degenerados (CHUNG ET AL., 2009), por lo que difieren sustancialmente del aspecto homogéneo que muestran estas estructuras en *Trachemys scripta scripta*. DAVIS Y HOLCOMB (2008) asociaron la presencia de estas inclusiones en *Chrysemys picta picta* al proceso de maduración celular, ya que eran más frecuentes en los eritrocitos más alargados y por tanto más maduros. En otras especies de quelonios y reptiles también se han descrito inclusiones citoplasmáticas similares, generalmente asociadas a orgánulos degenerados, no considerándose un hallazgo patológico (SIMPSON Y HARVEY, 1980; ALLEMAN ET AL., 1992; WORK ET AL., 1998; HARR ET AL., 2001; CAMPBELL, 2004A; WILKINSON, 2004; CASAL Y ORÓS, 2007).

Los eritrocitos inmaduros observados en *Trachemys scripta scripta* son muy similares a los descritos en otros reptiles, con un núcleo de tamaño superior al de las células maduras, morfología más redondeada y mayor basofilia citoplasmática (ALLEMAN ET AL., 1992; CHANSUE ET AL., 2011; MARTÍNEZ-SILVESTRE ET AL., 2011).

Ultraestructuralmente, el eritrocito de *Trachemys scripta scripta* es muy similar al descrito en otros reptiles, con una característica forma elíptica (DESSER Y WELLER, 1979B; WORK ET AL., 1998; SALAKIJ ET AL., 2002; MARTÍNEZ-SILVESTRE ET AL., 2005; CASAL ET AL., 2007; CHUNG ET AL., 2009; CHANSUE ET AL., 2011; SALAKIJ ET AL., 2014). En algunos eritrocitos pueden detectarse ribosomas e incluso mitocondrias. Ello ha sido descrito también en otras especies como el varano de agua asiático (*Varanus salvator*) (SALAKIJ ET AL., 2014) e *Hieremys annandalii* (CHANSUE ET AL., 2011), y existen autores que lo asocian a la inmadurez de las células portadoras (STEINGBERG Y OLVER, 2005).

Los cuerpos de inclusión previamente descritos mediante microscopía óptica rutinaria también han sido detectados mediante el uso del microscopio electrónico en *Trachemys scripta scripta*. El hecho de que éstos carezcan de orgánulos reconocibles y de membrana celular o pili descarta su origen bacteriano, siendo demasiado grandes para ser partículas víricas. La mayoría de los autores que han detectado ultraestructuralmente estas inclusiones en eritrocitos de reptiles, las han descrito con un aspecto pleomórfico y las han asociado con orgánulos degenerados (ALLEMAN ET AL., 1992; WORK ET AL., 1998; CASAL ET AL., 2007). Sin embargo, el contorno de estas inclusiones en *T. scripta scripta* tiende a mostrarse generalmente circular, con una electrodensidad homogénea. Estudios más recientes en *Caretta caretta* han asociado este tipo de inclusiones con precipitados de hemoglobina inestable (BASILE ET AL., 2011).

En cualquier caso, la ausencia de signos de enfermedad en los sujetos empleados en el presente estudio y la morfología normal mostrada por los eritrocitos portadores de inclusiones tanto bajo el microscopio óptico como el microscopio electrónico, hacen pensar que el hallazgo de estas inclusiones no está asociado a ningún proceso patológico.

La respuesta positiva de algunos eritrocitos de *T. scripta scripta* para las técnicas citoquímicas de la ACP, NBE y PAS es un hallazgo poco frecuente en reptiles ya que la mayoría de los quelonios en los que se han realizado pruebas citoquímicas similares no manifiestan positividad en sus eritrocitos (WORK ET AL., 1998; CASAL Y ORÓS, 2007; CHUNG ET AL., 2009), con la excepción de *Hieremys annandalii*, cuyos eritrocitos reaccionaron positivamente para la peroxidasa y para el nuevo azul de metileno (CHANSUE ET AL., 2011). Se ha descrito una respuesta positiva para el PAS con una reacción puntiforme similar a la observada en *T. scripta scripta* en boas (RASKIN, 2010). También

se ha descrito positividad focal para la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa en eritrocitos de *Varanus salvator* (SALAKIJ ET AL., 2014).

Las estructuras citoplasmáticas circulares que reaccionan positivamente para las tinciones citoquímicas en los eritrocitos de *T. scripta scripta* probablemente se corresponden con las inclusiones basófilas observadas mediante la tinción de Diff quick<sup>®</sup>, ya que comparten la misma forma y localización en el citoplasma celular.

El **heterófilo** de los reptiles se corresponde funcional y bioquímicamente con el neutrófilo de los mamíferos (TAYLOR Y KAPLAN, 1961; EFRATI ET AL., 1970). En *Trachemys scripta scripta* aparece como una célula de tamaño grande, aunque su superficie media (113.2 $\mu\text{m}^2$ ) es ligeramente inferior a la del eosinófilo de esta especie. Se trata de una célula redondeada con un diámetro mayor medio de 12.41 $\mu\text{m}$  y un diámetro menor de unos 11.36 $\mu\text{m}$ . Estas medidas están dentro del rango establecido para los heterófilos de muchas especies de reptiles (10-23 $\mu\text{m}$ ) (ATLAND Y PARKER, 1955; ATLAND Y THOMPSON, 1958; ANDERSEN, 1961; AGID ET AL., 1961; BERKSON, 1966; SAINT GIRONS, 1970; RASKIN, 2000), aunque es inferior al tamaño descrito para *Caretta caretta* por CASAL Y ORÓS (2007), con un diámetro mayor medio de 17.8 $\mu\text{m}$ . En otras especies de emídidos los tamaños celulares se acercan mucho a los observados en *T. scripta scripta* (INNIS ET AL., 2007; CHANSUE ET AL., 2011; ARIZZA ET AL., 2014), aunque el heterófilo de *Ocadia sinensis* alcanza una media de 16.8 $\mu\text{m}$  de largo y representa el leucocito de mayor tamaño para esta especie (CHUNG ET AL., 2009). Por otro lado ARIZZA ET AL. (2014), al igual que sucede con *T. scripta scripta*, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tamaños de los heterófilos de machos y hembras de la tortuga siciliana de estanque (*Emys trinacris*).

En cuanto a sus características tintoriales y morfológicas, la presencia de gránulos citoplasmáticos eosinófilos fusiformes y/o pleomórficos es un rasgo característico de los heterófilos de la mayoría de las especies de reptiles (RYERSON, 1943; TAYLOR Y KAPLAN, 1961; FRYE, 1976, 1991; MURO ET AL., 1994; CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997; SALAKIJ ET AL., 2002; WILKINSON, 2004; SALAKIJ ET AL., 2014). En general, los heterófilos de *T. scripta scripta* son muy similares a los descritos en algunas especies de tortugas marinas (WORK ET AL., 1998; CASAL Y ORÓS, 2007) y comparten la mayoría de sus características morfológicas con los heterófilos del resto de las especies de emídidos estudiadas (AZEVEDO Y LUNARDI, 2003; INNIS ET AL., 2007; CHUNG ET AL., 2009; CHANSUE ET AL., 2011; CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014). Sin embargo, es de destacar que los gránulos de *Hieremys annandalii* no muestran tinción alguna cuando son procesados con Diff quick<sup>®</sup> (CHANSUE ET AL., 2011) y que el núcleo del heterófilo de *Emys trinacris* tiende a aparecer siempre segmentado (ARIZZA ET AL., 2014), algo que sólo acontece en algunas ocasiones en *T. scripta scripta*.

Ultraestructuralmente, el heterófilo de *T. scripta scripta* presenta muchas similitudes con el descrito por AZEVEDO Y LUNARDI (2003) para *Chrysemys dorbignii*. De igual manera, los heterófilos de *Chelonia mydas* (WORK ET AL., 1998) y de *Caretta caretta* (CASAL Y ORÓS, 2007) muestran una ultraestructura muy similar a la observada en el presente estudio. Si bien en estas dos especies de tortugas marinas pueden aparecer heterófilos con algunos gránulos citoplasmáticos de mayor electrodensidad de lo habitual, sugiriendo diferentes estadios de desarrollo, los autores no identificaron dos tipos morfológicos diferenciados para esta célula. Sin embargo, otros estudios realizados en el tuátara (*Sphenodon punctatus*) (DESSER Y WELLER, 1979A) y en varias especies de serpientes (BOUNOUS ET AL. 1996; ALLEMAN ET AL. 1999; SALAKIJ ET AL. 2002), han

establecido la presencia de dos variantes morfológicas para este leucocito. En *Hieremys annandalii*, a pesar de que la morfología celular y de los gránulos citoplasmáticos recuerda a la de *T. scripta scripta*, dichos gránulos se diferencian sustancialmente debido a la presencia de un núcleo central de matriz heterogénea electrodensa, que contrasta con la electrodensidad homogénea que exhiben en *T. scripta scripta* (CHANSUE ET AL., 2011).

Desde el punto de vista citoquímico, el heterófilo de *T. scripta scripta* ha reaccionado de forma positiva para todas las tinciones con la excepción del azul de toluidina, no viéndose afectada la actividad fosfatasa ácida por la inhibición con tartrato, ni la actividad  $\alpha$ -naftil butirato esterasa por la inhibición con fluoruro. Sin embargo, se ha descrito que los heterófilos de los reptiles son muy variables en cuanto a sus características citoquímicas (SYPEK Y BORYSENKO, 1988). Así, hay autores que han negado la existencia de actividad peroxidasa en los heterófilos de los quelonios (MATEO ET AL., 1984; MONTALI, 1988; ALLEMAN ET AL., 1992; WORK ET AL., 1998), mientras que CASAL Y ORÓS (2007) observaron en *Caretta caretta* respuesta positiva para la bencidina peroxidasa, además de para la ACP, la CAE, el SBB y el PAS. De igual manera, se ha detectado actividad peroxidasa en todas las especies de emídidos en las que se han realizado estudios citoquímicos. En el caso de *Chrysemys dorbignih*, se detecta dicha actividad enzimática en los heterófilos cuando las preparaciones son incubadas a pH neutro, pero tiende a disminuir cuando se realizan a pH alcalino. En esta especie también se ha detectado actividad para la trimetafosfatasa, la fosfatasa alcalina y para esterases no específicas. También hay detección de proteínas básicas en gránulos citoplasmáticos y núcleo (AZEVEDO Y LUNARDI, 2003). En *Ocadia sinensis*, por su parte, sólo se detectó actividad peroxidasa, localizándose en los gránulos citoplasmáticos (CHUNG ET AL., 2009), mientras que en *Hieremys annandalii*, los gránulos también muestran positividad muy débil a la peroxidasa y el citoplasma es positivo para el Sudán negro B, la fosfatasa ácida y alcalina, la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa y el PAS (CHANSUE ET AL., 2011). Estas diferencias entre especies implican dotaciones enzimáticas variables, que en el caso de *T. scripta scripta* hacen que la caracterización citoquímica de sus heterófilos difiera de la de la mayoría de los quelonios.

Debe destacarse que en la cobra real (*Ophiophagus hannah*) se ha establecido la hipótesis de la existencia de diferentes estadios de desarrollo en los heterófilos circulantes, en base a los diferentes patrones de tinción citoquímica de las células al ser tratadas con la fosfatasa ácida y la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa, mostrando cantidades diferentes de ácido hidrolasa (SALAKIJ ET AL., 2002).

El **eosinófilo** de *T. scripta scripta*, con una superficie media de  $123.8\mu\text{m}^2$ , es el leucocito de mayor tamaño de esta especie. Muestra una morfología redondeada, con un diámetro mayor aproximado de  $13.56\mu\text{m}$  y un diámetro menor de  $11.62\mu\text{m}$ , por lo que está dentro de los rangos establecidos para esta célula en reptiles ( $9\text{-}20\mu\text{m}$ ) (ALDER Y HUBER, 1923; AUSTIN ET AL., 1927; RYERSON, 1943; ATLAND Y PARKER, 1955; ATLAND Y THOMPSON, 1958; ANDERSEN, 1961; AGID ET AL., 1961; PIENAAR, 1962; KÉLENYI Y NEMETH, 1969; EFRATI ET AL., 1970; SAINT GIRONS, 1970; DESSER Y WELLER, 1979A; MEAD Y BORYSENKO, 1984A; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; WORK ET AL., 1998). Los tamaños de los eosinófilos de algunas especies de quelonios son muy similares a los de *T. scripta scripta* (SAINT GIRONS Y DUGUY, 1963; FRYE, 1991; KNOTKOVA ET AL., 2002), aunque en *Caretta caretta* estas células alcanzan un tamaño sustancialmente superior, con un diámetro mayor de unos  $20\mu\text{m}$  (CASAL Y ORÓS, 2007). Sin embargo, a diferencia de lo observado en el presente estudio, hay autores que han descrito en tortugas marinas la presencia de dos tipos de eosinófilos en función de su tamaño, los grandes y los pequeños

(WORK *ET AL.*, 1998; CANNON, 1992), con características morfológicas diferentes. Este hecho ha sido también documentado en la tortuga india de caparazón blando (*Lissemys punctata*) (DE Y MAITI, 1981, 1982). En el caso de los quelonios emídidos no se han detectado dos tipos celulares diferenciados en función de su tamaño. Así, en los juveniles de la tortuga de vientre rojo americana (*Pseudemys rubriventris*) el eosinófilo muestra un tamaño de entre 14-18 $\mu$ m, representando el mayor leucocito en esta especie (INNIS *ET AL.*, 2007), lo que contrasta con los eosinófilos de *Hieremys annandalii*, que representan el granulocito más pequeño, con un diámetro de 10.61 $\mu$ m (CHANSUE *ET AL.*, 2011). En *Ocadia sinensis* estas células muestran un buen tamaño (15.1 $\mu$ m de media), pero representan el segundo leucocito en dimensiones tras el heterófilo (CHUNG *ET AL.*, 2009). Lo mismo sucede en *Trachemys callirostris* (CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014) y en *Emys trinacris*, especie en la que al igual que en *T. scripta scripta* no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño de los eosinófilos de machos y hembras (ARIZZA *ET AL.*, 2014).

Morfológicamente el eosinófilo de *T. scripta scripta* se asemeja al heterófilo, aunque la principal diferencia está en la ausencia de gránulos espiculados, que son sustituidos por un escaso número de pequeños gránulos redondos eosinófilos que permiten la visualización del citoplasma. Esto se aproxima a la descripción general para los eosinófilos de los reptiles (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; HAWKEY Y DENNET, 1989; FRYE, 1991; WATSON, 1997), que coincide con las características de los eosinófilos de los quelonios (MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; MURO *ET AL.*, 1994) y en especial con el eosinófilo descrito por CASAL Y ORÓS (2007) en *Caretta caretta*. En el caso de los emídidos la mayoría de las especies estudiadas presentan eosinófilos de morfología y características tintoriales estándar (AZEVEDO Y LUNARDI, 2003; INNIS *ET AL.*, 2007; CHUNG *ET AL.*, 2009; CHANSUE *ET AL.*, 2011; ARIZZA *ET AL.*, 2014; CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014), aunque al contrario de lo que sucede en *T. scripta scripta*, sus gránulos citoplasmáticos suelen ser de gran tamaño y abundantes. Debe destacarse que el núcleo del eosinófilo de *Pseudemys rubriventris* tiende a aparecer bilobulado (INNIS *ET AL.*, 2007), algo que sucede con mucha menos frecuencia en el caso de *T. scripta scripta*.

En cuanto a su ultraestructura, los eosinófilos de *T. scripta scripta* se asemejan mucho a los de *Caretta caretta* (CASAL *ET AL.*, 2007) y a los del lagarto gigante de El Hierro (*Gallotia simonyi*) (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005), especialmente en lo que respecta a la morfología y elevada electrodensidad de sus gránulos citoplasmáticos. También existen similitudes con los eosinófilos pequeños de *Chelonia mydas* (WORK *ET AL.*, 1998), aunque en *T. scripta scripta* los gránulos no presentan estructuras cristalinas en su interior. En el caso de los eosinófilos de los quelonios emídidos, las similitudes con los hallazgos descritos en el presente estudio son aún más marcadas (AZEVEDO Y LUNARDI, 2003; CHANSUE *ET AL.*, 2011).

Desde el punto de vista citoquímico el eosinófilo de *T. scripta scripta* resulta positivo para la ACP (con y sin tartrato), la CAE y el PAS, mostrando positividad moderada para el SBB. Con respecto a la NBE, el eosinófilo muestra una respuesta positiva sólo cuando no se emplea la inhibición con fluoruro, lo cual implica que la actividad  $\alpha$ -naftil butirato esterasa del eosinófilo se ve inhibida en presencia del fluoruro sódico. A diferencia de lo que sucede con el heterófilo, el eosinófilo no manifiesta actividad peroxidasa. Estas características citoquímicas coinciden con las descritas por CASAL Y ORÓS (2007) en *Caretta caretta*, a excepción de la respuesta a la NBE, ya que en esta especie de tortuga marina la respuesta positiva se manifiesta con el uso del fluoruro. De forma opuesta, muchos autores han afirmado que los eosinófilos de los reptiles son

peroxidasa positivos (KÉLENYI Y NEMETH, 1969; MATEO *ET AL.*, 1984; MAXWELL, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988). Sin embargo, esto no se cumple en el lagarto agama negro (*Agama stellio*) (EFRATI *ET AL.*, 1970), en *Gallotia simonyi* (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005), en la iguana verde (*Iguana iguana*) (HARR *ET AL.*, 2001) o en la cobra real (*Ophiophagus hannah*) (SALAKIJ *ET AL.*, 2002). Sí se describen varias especies de quelonios que manifiestan actividad peroxidasa, como es el caso de la tortuga del desierto (*Gopherus agassizii*) (ALLEMAN *ET AL.*, 1992) o la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) (CANNON, 1992). Todas las especies de quelonios emídidos estudiadas manifiestan positividad para la peroxidasa. Así, en *Chrysemys dorbignii*, además de la reacción positiva a esta técnica, se detecta actividad esterasa no específica y proteínas básicas (AZEVEDO Y LUNARDI, 2003). Los eosinófilos de *Ocadia sinensis* sólo muestran positividad para la peroxidasa (CHUNG *ET AL.*, 2009), mientras que en *Hieremys annandalii* reaccionan positivamente para la peroxidasa, el Sudán negro B, las fosfatasas ácida y alcalina, la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa, el PAS y el nuevo azul de metileno (CHANSUE *ET AL.*, 2011). Por tanto, los eosinófilos de *T. scripta scripta* se diferencian de los del resto de emídidos por la ausencia de actividad enzimática peroxidasa en sus gránulos.

El **basófilo** de *T. scripta scripta*, con una superficie media de  $54.39\mu\text{m}^2$ , no sólo es más pequeño que el heterófilo y el eosinófilo, sino que representa el leucocito de menor tamaño para esta especie. Se trata de una célula redondeada, con un diámetro mayor medio de  $8.69\mu\text{m}$  y un diámetro menor de  $7.89\mu\text{m}$ . Esto concuerda con muchas de las descripciones realizadas en reptiles, aunque dependiendo de las especies los rangos pueden variar entre  $7$  y  $20\mu\text{m}$  (ALDER Y HUBER, 1923; AUSTIN *ET AL.*, 1927; ATLAND Y PARKER, 1955; ATLAND Y THOMPSON, 1958; MONTALI, 1988). Así, de forma similar a lo descrito en *T. scripta scripta*, el basófilo de *Ophiophagus hannah* muestra un diámetro de  $8-12\mu\text{m}$  (SALAKIJ *ET AL.*, 2002) y el de *Varanus salvator* de  $6$  a  $9\mu\text{m}$  (SALAKIJ *ET AL.*, 2014). En quelonios se han descrito tamaños celulares ligeramente superiores a los observados en el presente estudio (SAINT GIRONS Y DUGUY, 1963; FRYE, 1991; KNOTKOVA *ET AL.*, 2002), mientras que WOOD Y EBANKS (1984) establecieron un tamaño significativamente inferior para los basófilos de *Chelonia mydas* ( $5.8\mu\text{m}$ ). En la mayoría de las especies de quelonios emídidos el tamaño de los basófilos es notablemente superior a lo observado en *T. scripta scripta* (INNIS *ET AL.*, 2007; CHUNG *ET AL.*, 2009; CHANSUE *ET AL.*, 2011), aunque las dimensiones celulares y nucleares de este leucocito en *Emys trinacris* se acercan mucho a las de *T. scripta scripta* y tampoco se observan diferencias significativas en los tamaños entre machos y hembras (ARIZZA *ET AL.*, 2014).

La morfología y las características tintoriales del basófilo de *T. scripta scripta* son muy similares a las descritas para la mayoría de los reptiles estudiados (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996B), con gránulos citoplasmáticos redondos de fuerte coloración basófila que tienden a enmascarar el núcleo. La misma morfología se ha observado en muchas especies de quelonios (CANNON, 1992; MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; MURO *ET AL.*, 1994; WORK *ET AL.*, 1998; WILKINSON, 2004; CASAL Y ORÓS, 2007). Los emídidos no suponen una excepción para esta regla (INNIS *ET AL.*, 2007; CHUNG *ET AL.*, 2009; ARIZZA *ET AL.*, 2014). En *Pseudemys rubriventris*, cuando se emplea la tinción Diff quick<sup>®</sup>, pueden aparecer células con un citoplasma vacuolizado o apolillado debido a fenómenos de degranulación (INNIS *ET AL.*, 2007), algo que también se observó en algunas ocasiones en *T. scripta scripta*. Hay que destacar que en el caso de *Hieremys annandalii*, cuando se empleó la tinción Diff quick<sup>®</sup>, ni los gránulos ni el núcleo de esta célula mostraron tinción alguna (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

Ultraestructuralmente, el basófilo de *T. scripta scripta* se asemeja mucho al descrito por DESSER Y WELLER (1979A) en *Sphenodon punctatus*, especialmente en lo que respecta a sus gránulos citoplasmáticos, que suelen ser ovoides y homogéneamente electrodensos, aunque algunos de éstos aparecen alterados y conteniendo una estructura interna de microtúbulos. Esto es similar a lo descrito en *Ophiophagus hannah* (SALAKIJ ET AL., 2002) y *Varanus salvator* (SALAKIJ ET AL., 2014), salvo por la ausencia de gránulos degenerados. En muchas especies de quelonios no se ha podido determinar la ultraestructura del basófilo debido a la escasez de esta célula en sangre circulante (WORK ET AL., 1998; CASAL Y ORÓS, 2007). Esto no sucede en el caso de los quelonios emídidos. Así, en *Hieremys annandalii*, la principal característica que diferencia estas células de las observadas en *T. scripta scripta*, es la presencia de grandes vacuolas citoplasmáticas que contienen en algunos casos gránulos densos en su interior (CHANSUE ET AL., 2011).

Desde el punto de vista citoquímico el basófilo de *T. scripta scripta* se muestra positivo para la NBE con y sin fluoruro, la CAE, el PAS y es la única célula sanguínea de esta especie en manifestar positividad para el azul de toluidina. También aparece débilmente positivo para la ACP con y sin tartrato. Aunque la actividad fosfatasa ácida y  $\alpha$ -naftil butirato esterasa no desaparecieron bajo la inhibición del tartrato y el fluoruro, respectivamente, sí se detectó cierto grado de disminución de la intensidad tintorial. De forma opuesta a lo observado en *T. scripta scripta*, hay autores que han descrito negatividad de los basófilos para el azul de toluidina en varias especies de reptiles (ALLEMAN ET AL., 1999; HARR ET AL., 2001; SALAKIJ ET AL., 2002). Esto contrasta con los hallazgos realizados en muchas otras especies en las que se ha detectado positividad para esta técnica en los basófilos (MATEO ET AL., 1984; MONTALI, 1988; FUENTES ET AL., 2000). De hecho, para algunas especies de quelonios, esta fue la única técnica para la que hubo respuesta positiva por parte de los basófilos (ALLEMAN ET AL., 1992; WORK ET AL., 1998; CASAL Y ORÓS, 2007). En el caso de los quelonios emídidos en los que se han realizado estudios citoquímicos, encontramos que en *Hieremys annandalii* no se produce respuesta positiva para el azul de toluidina, pero sí para la peroxidasa, el PAS y el nuevo azul de metileno (CHANSUE ET AL., 2011). Los basófilos de *Ocadia sinensis* reaccionan fuertemente frente a la peroxidasa, pero no para el PAS. Sin embargo, no se estudió su respuesta para el azul de toluidina (CHUNG ET AL., 2009).

El **linfocito** de *T. scripta scripta*, con una superficie media de  $58.21\mu\text{m}^2$ , es el penúltimo leucocito en tamaño, por delante sólo del basófilo, aunque se ha detectado cierta variabilidad en sus dimensiones. Así, en los frotis sanguíneos dominan las células más pequeñas y con citoplasma menos abundante, pero también aparecen algunos linfocitos de mayores dimensiones y mayor porcentaje citoplasmático. Este hecho se ha observado en otras especies de reptiles (RYERSON, 1949; PIENAAR, 1962; SAINT GIRONS, 1970; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; ALLEMAN ET AL., 1999) y los linfocitos de mayor tamaño y mayor porcentaje citoplasmático suelen asociarse con células más inmaduras (WILKINSON, 2004). Por lo general, los linfocitos de *T. scripta scripta* muestran un tamaño inferior y menor porcentaje de citoplasma que los monocitos, lo que ayuda a su diferenciación. Se trata de una célula redondeada, con un diámetro mayor medio de  $9.25\mu\text{m}$  y un diámetro menor de unos  $8.04\mu\text{m}$ , muy similar a lo descrito para *Varanus salvator* (SALAKIJ ET AL., 2014). En quelonios también se describe una gran variabilidad del tamaño de los linfocitos (MARTÍNEZ-SILVESTRE, 1994; MURO ET AL., 1994; WILKINSON, 2004): se pueden encontrar especies en las que predominan las células muy pequeñas, como es el caso de la tortuga rusa (*Testudo horsfieldi*) con un diámetro de aproximadamente  $5.7\mu\text{m}$  (KNOTKOVA, ET AL., 2002), y otras en las que su tamaño puede fluctuar de 6 a  $14\mu\text{m}$  (WORK ET AL., 1998). Los linfocitos de todas las especies de quelonios emídidos estudiadas han representado el



leucocito más pequeño, aunque existe cierta variabilidad de tamaño entre especies (INNIS ET AL., 2007; CHUNG ET AL., 2009; CHANSUE ET AL., 2011; ARIZZA ET AL., 2014; CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014). Es de destacar que ARIZZA ET AL. (2014) no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tamaños de los linfocitos de machos y hembras de *Emys trinacris*, mientras que en *T. scripta scripta* algunas de las medidas tomadas han resultado ser mayores en hembras que en machos.

Desde el punto de vista morfológico, los linfocitos pequeños de *T. scripta scripta* pueden confundirse con los trombocitos pleomórficos y los linfocitos de mayor tamaño pueden llegar a clasificarse como monocitos. En el primer caso, la clave para la diferenciación está principalmente en la coloración citoplasmática, mucho más débil en el caso de los trombocitos, llegando a ser transparente. El núcleo suele ser más basófilo en los trombocitos y además tienen tendencia a encontrarse formando agregados, lo cual puede ayudar en la diferenciación. Esta confusión entre linfocitos y trombocitos ha sido descrita en otras especies de reptiles (HAWKEY Y DENNET, 1989; WATSON, 1997; ELIMAN, 1997; ALLEMAN ET AL., 1992, 1999; HARR ET AL., 2001). Con respecto a los monocitos, la principal diferencia hallada es que la coloración nuclear de estas células tiende a ser menos basófila que la de los linfocitos, con un patrón de cromatina menos denso. Lo mismo sucede con el citoplasma, que es más claro en el caso de los monocitos.

Las características generales de los linfocitos de *T. scripta scripta* observadas mediante microscopía óptica rutinaria son muy similares a las de otros quelonios (WORK ET AL., 1998; ALLEMAN ET AL., 1992; CANNON, 1992; CASAL Y ORÓS, 2007). En el caso de los quelonios emídidos también se mantienen las mismas características tintoriales observadas para *T. scripta scripta* (INNIS ET AL., 2007; CHUNGET AL., 2009; CHANSUE ET AL., 2011; ARIZZA ET AL., 2014; CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014). En *Emys trinacris*, ARIZZA ET AL. (2014) no tuvieron problemas para distinguir entre linfocitos y trombocitos, ya que morfológicamente ambos tipos celulares resultaron muy diferentes.

Ultraestructuralmente el linfocito de *T. scripta scripta* se asemeja mucho a las descripciones realizadas de esta célula en varias especies de reptiles del orden Squamata (ALLEMAN ET AL., 1999; SALAKIJ ET AL., 2002; MARTÍNEZ-SILVESTRE ET AL., 2005; SALAKIJ ET AL., 2014) y en varias especies de quelonios (WORK ET AL., 1998; CASAL ET AL., 2007), destacando por la presencia de pequeños gránulos electrodensos en su citoplasma y un núcleo rico en heterocromatina habitualmente dentado o segmentado. En *Hieremys annandalii*, al igual que sucede con *T. scripta scripta*, son frecuentes las proyecciones citoplasmáticas y los orgánulos más habituales son las mitocondrias, el retículo endoplasmático rugoso y los ribosomas libres. La morfología nuclear también es similar (CHANSUE ET AL., 2011).

A nivel citoquímico los linfocitos de *T. scripta scripta* se muestran positivos para la ACP (con y sin tartrato) y moderadamente positivos para la NBE (con y sin fluoruro), la CAE y el PAS. La principal diferencia con respecto a los monocitos es que la actividad  $\alpha$ -naftil butirato esterasa del linfocito no desapareció con el uso del fluoruro sódico, por lo que se considera resistente a esa inhibición, mientras que el monocito fue negativo para la NBEF. De forma opuesta, hay especies de reptiles en las que no se ha detectado respuesta para ninguna de las técnicas citoquímicas estudiadas (ALLEMAN ET AL., 1992, 1999; WORK ET AL., 1998; FUENTES ET AL., 2000; HARR ET AL., 2001), aunque esta no es la tónica general. Así, en algunas especies sólo se ha detectado positividad para el PAS (MATEO ET AL., 1984; EGAMI Y SASSA, 1988; BOUNOUS ET AL., 1996) o para la fosfatasa ácida (MARTÍNEZ-SILVESTRE ET AL., 2005), mientras que otras pueden presentar linfocitos con

diferente respuesta para una misma técnica citoquímica, apareciendo células negativas, otras con un patrón granular y otras con un patrón focal (SALAKIJ *ET AL.*, 2002; SALAKIJ *ET AL.*, 2014). Algunas tortugas marinas muestran positividad para el PAS y esterases no específicas (CANNON, 1992), mientras que otras sólo manifiestan actividad moderada para la  $\alpha$ -naphthil butirato esterasa sin inhibición de fluoruro sódico (CASAL Y ORÓS, 2007). En cuanto a los emídidos, encontramos que los linfocitos de *Ocadia sinensis* no reaccionaron para ninguna de las técnicas citoquímicas empleadas para su caracterización (CHUNG *ET AL.*, 2009), mientras que la caracterización citoquímica de *Hieremys annandalii* se asemejó más a la de *T. scripta scripta*, mostrando positividad para la fosfatasa ácida, la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa y el PAS, pero sólo a nivel de los gránulos citoplasmáticos (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

El **monocito** de *T. scripta scripta*, con una superficie media de  $104.3\mu\text{m}^2$ , se aproxima mucho a las dimensiones del heterófilo, pero representa el tercer leucocito en tamaño. Suele presentar un contorno redondeado, con un diámetro mayor de  $12.57\mu\text{m}$  y un diámetro menor de  $10.59\mu\text{m}$ , dentro del rango descrito en reptiles ( $8\text{-}20\mu\text{m}$ ) (SYPEK Y BORYSENKO, 1988), aunque al contrario de lo que sucede en *T. scripta scripta*, en la mayoría de las especies el monocito se suele considerar el leucocito de mayor tamaño (HAWKEY Y DENNETT, 1989; FRYE, 1991; RASKIN, 2000; ROSSKOPF, 2000). En los quelonios, se suele aceptar que los monocitos son de tamaño superior a los linfocitos (MURO *ET AL.*, 1994; WORK *ET AL.*, 1998; CASAL Y ORÓS, 2007) y en *Caretta caretta*, al igual que en *T. scripta scripta*, representan el tercer leucocito en tamaño después del eosinófilo y el heterófilo (CASAL Y ORÓS, 2007). En los emídidos, las dimensiones del monocito están muy próximas a las establecidas para *T. scripta scripta* (INNIS *ET AL.*, 2007; CHUNG *ET AL.*, 2009; ARIZZA *ET AL.*, 2014; CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014) y en el caso de *Emys trinacris* y *Trachemys callirostris*, al igual que sucede con *T. scripta scripta*, esta célula ocupa el tercer puesto en tamaño tras eosinófilos y heterófilos (ARIZZA *ET AL.*, 2014; CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014). De igual manera, en *Emys trinacris* no se aprecian diferencias significativas entre los tamaños celulares de machos y hembras (ARIZZA *ET AL.*, 2014).

Morfológicamente, en el monocito de *T. scripta scripta* destaca la variedad de formas que puede presentar su desarrollado núcleo, lo que es bastante habitual en reptiles (FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996B). El citoplasma de algunos monocitos puede aparecer con una fina granulación que le da un aspecto arenoso, al igual que se ha observado en otras especies de reptiles (FRYE, 1991; RASKIN, 2000). Sin embargo, dicha granulación puede teñirse en ocasiones de forma simultánea con una coloración eosinófila y basófila, recordando a los azurófilos (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; WATSON, 1997). La presencia de algunas células con esas peculiaridades citoplasmáticas no ha hecho que en el presente estudio se haya considerado la existencia de azurófilos, sino que se ha clasificado a todas estas células como monocitos, debido a que no se han encontrado diferencias ultraestructurales ni citoquímicas que hagan pensar en dos poblaciones celulares separadas. HARR *ET AL.* (2001) llegaron a esta misma conclusión en sus estudios. Por lo general, los monocitos de los quelonios se asemejan mucho a lo descrito para *T. scripta scripta*, salvo por la presencia de vacuolas citoplasmáticas, que no son observadas frecuentemente en esta especie (MURO *ET AL.*, 1994; WORK *ET AL.*, 1998; KNOTKOVA, *ET AL.*, 2002; WILKINSON, 2004; CASAL Y ORÓS, 2007). En los quelonios emídidos la morfología celular es también muy similar a la observada en *T. scripta scripta* (INNIS *ET AL.*, 2007; CHUNG *ET AL.*, 2009; ARIZZA *ET AL.*, 2014; CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014), aunque la única especie en la que se ha descrito un citoplasma finamente granular es *Emys trinacris*

(ARIZZA *ET AL.*, 2014). Por otro lado, y como contrapunto, CHANSUE *ET AL.* (2011) no identificaron monocitos en la sangre de *Hieremys annandalii*, sino azurófilos.

La ultraestructura del monocito de *T. scripta scripta* se diferencia de la de los linfocitos en que el porcentaje de citoplasma es mucho mayor y el núcleo aparece proporcionalmente más pequeño, con heterocromatina menos densa. El citoplasma presenta pequeños gránulos pleomórficos de electrodensidad variable que pueden corresponderse con la fina granulación observada con la microscopía óptica rutinaria. También aparecen pequeñas vacuolas en bajo número, algo no observado habitualmente con la tinción Diff quick<sup>®</sup>. Las descripciones ultraestructurales de monocitos en reptiles no quelonios son escasas. MARTINEZ-SILVESTRE *ET AL.* (2005) describen esta célula en *Gallotia simonyi* ligeramente diferente a la de *T. scripta scripta*, ya que describen la presencia de algunos gránulos citoplasmáticos de gran tamaño y vacuolas de diferentes tallas. Sin embargo, las características ultraestructurales de *T. scripta scripta* son muy similares a las observadas en tortugas marinas (WORK *ET AL.*, 1998; CASAL *ET AL.*, 2007). Esta célula no se ha podido comparar, a nivel ultraestructural, con los monocitos de otros emídidos debido a la falta de estudios ultraestructurales en estas especies.

A nivel citoquímico los monocitos de *T. scripta scripta* son positivos para la ACP (con y sin tartrato), la NBE sin fluoruro, la CAE y el PAS. HARR *ET AL.* (2001) observaron una respuesta citoquímica similar en *Iguana iguana*, mientras que SALAKIJ *ET AL.* (2014) describieron respuesta positiva a la peroxidasa y la  $\alpha$ -naftil acetato esterasa para los monocitos de *Varanus salvator*. De forma opuesta, los monocitos de *Gallotia simonyi* no reaccionaron para ninguna de las técnicas citoquímicas estudiadas (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2005). Los monocitos de *Chelonia mydas* son los que responden de una manera más parecida a los de *T. scripta scripta* (WORK *ET AL.*, 1998), mientras que los de *Caretta caretta* sólo muestran positividad moderada para la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa sin inhibición de fluoruro sódico (CASAL Y ORÓS, 2007). En *Ocacia sinensis* sólo se detectó actividad para el PAS (CHUNG *ET AL.*, 2009).

Los **trombocitos** de *T. scripta scripta* se han clasificado, en función de la morfología y tamaño que manifiestan bajo microscopía óptica rutinaria, como trombocitos “normales” y trombocitos “pleomórficos”. En principio, los trombocitos normales se han considerado como células que mantienen su anatomía original no habiendo sufrido modificaciones. Por el contrario, los pleomórficos se han considerado formas reactivas o activadas. Este fenómeno puede asociarse a estados patológicos (HAWKEY Y DENNET, 1989; CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997) o cuando se emplean muestras poco frescas o refrigeradas (WORK *ET AL.*, 1998). Sin embargo, las muestras usadas en el presente estudio se procesaron inmediatamente tras su obtención y teniendo en cuenta que los animales no manifestaron signos de enfermedad y que todos los individuos eran portadores de ambos tipos de trombocitos, se ha llegado a la conclusión de que la aparición de las células pleomórficas está asociada a la activación que sufren éstas al entrar en contacto con superficies extrañas (material de extracción y superficie del cristal de los porta-objetos) y que también predispone a la aparición de agregaciones celulares (HAWKEY Y DENNET, 1989; CAMPBELL, 1996B; HEARD *ET AL.*, 2004).

Los trombocitos normales de *T. scripta scripta* tienen una superficie de aproximadamente  $71.15\mu\text{m}^2$ , mientras que los pleomórficos representan la célula sanguínea más pequeña de esta especie con unos  $33.19\mu\text{m}^2$  de superficie. Los normales muestran un contorno alargado, con un diámetro mayor de  $15.08\mu\text{m}$  y menor de  $5.76\mu\text{m}$  y

un núcleo también alargado, mientras que los pleomórficos tienden a ser redondeados, con un diámetro mayor de 7.31  $\mu\text{m}$  y menor de 5.82 $\mu\text{m}$ . Las medidas de los trombocitos normales están dentro del rango establecido en reptiles (8-16  $\mu\text{m}$  x 5-9  $\mu\text{m}$ ) (BERNSTEIN, 1938; RYERSON, 1949; TAYLOR Y KAPLAN, 1961; PIENAAR, 1962; DESSER, 1978; WOOD Y EBANKS, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988). SALAKIJ ET AL. (2002) observaron en *Ophiophagus hannah* que los trombocitos que aparecían agrupados y por tanto activados en los frotis tendían a ser más pequeños, con el tamaño aproximado de un linfocito. De igual manera, en algunas especies de tortugas marinas, el tamaño y por tanto la morfología de los trombocitos aparecen muy próximos a los del trombocito normal de *T. scripta scripta* (WOOD Y EBANKS, 1984; WORK ET AL., 1998; CASAL Y ORÓS, 2007), aunque CASAL Y ORÓS (2007) también describieron la presencia de trombocitos redondos en *Caretta caretta*. El tamaño de los trombocitos de muchos emídidos es muy similar al de los trombocitos normales de *T. scripta scripta* (INNIS ET AL., 2007; CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014), aunque los más grandes han sido descritos en *Emys trinacris*, pudiendo alcanzar 25.0 $\mu\text{m}$  x 5.0 $\mu\text{m}$  (ARIZZA ET AL., 2014). Por su parte, CHANSUE ET AL. (2011) no establecieron un tamaño para los trombocitos de *Hieremys annandalii*, pero de forma análoga a lo descrito en el presente estudio, describieron tres tipos morfológicos para esta célula; esférico, ovoide y fusiforme.

Desde el punto de vista tintorial, al igual que en otras especies de reptiles, el núcleo de los trombocitos de *T. scripta scripta* aparece basófilo, con cromatina densa (CAMPBELL, 1996B; FRYE, 1991), aunque se tiñe más intensamente en las células pleomórficas. El citoplasma tiende a mostrar una coloración azul débil e incluso llega a ser incoloro, característica compartida por otros reptiles (FRYE, 1991). Se ha descrito que los trombocitos activados desarrollan vacuolización citoplasmática (CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997; CAMPBELL, 2004A). Sin embargo, en el presente estudio mediante microscopía óptica rutinaria sólo se han detectado estructuras citoplasmáticas compatibles con vacuolas en los trombocitos normales. Las características tintoriales generales de los trombocitos de *T. scripta scripta* se asemejan a las descritas para muchas especies de quelonios, entre ellas algunas especies de tortugas marinas (WOOD Y EBANKS, 1984; WORK ET AL., 1998; CASAL Y ORÓS, 2007). Lo mismo sucede con los quelonios emídidos (INNIS ET AL., 2007; CHUNGET AL., 2009; ARIZZA ET AL., 2014; CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

Mediante el uso de microscopía electrónica sólo se han detectado trombocitos de morfología redondeada u ovalada, pero no fusiforme. Esto puede deberse al propio procesado de las muestras (extracción, centrifugado, etc.), que induce a la activación de estas células y a la alteración de su morfología, como ya se ha comentado anteriormente y tal y como PELLIZZON ET AL. (2002) describieron en sus estudios ultraestructurales. Sin embargo, DE MOURA ET AL. (1997) describieron ultraestructuralmente el trombocito del yacaré (*Caiman crocodilus yacare*) con una forma elíptica característica y en *Chelonia mydas* estas células también se mostraron ovaladas o fusiformes (WORK ET AL., 1998). En *Caretta caretta* dominan las formas ovaladas y redondeadas (CASAL ET AL., 2007). En otros emídidos también se han descrito frecuentemente trombocitos de forma alargada, aunque pueden aparecer células más ovaladas y/o redondeadas (DAIMON ET AL., 1987; CHANSUE ET AL., 2011). El núcleo del trombocito de *T. scripta scripta* puede mostrarse redondeado o irregularmente lobulado y con heterocromatina de una electrodensidad mayor a la del núcleo del linfocito, lo que ayuda a su diferenciación. En reptiles, la morfología nuclear lobulada representa el hallazgo más frecuente, al igual que la presencia de heterocromatina densa (FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996B; RASKIN, 2000). Lo mismo se cumple también en muchos quelonios (DAIMON ET AL., 1987; WORK ET AL., 1998; PELLIZZON ET AL., 2002). En

el citoplasma de algunos trombocitos de *T. scripta scripta* pueden aparecer estructuras canaliculares claras que se asemejan a vacuolas. Este es un fenómeno frecuente en reptiles (SYPEK Y BORYSENKO, 1988) y se ha descrito en quelonios (DAIMON ET AL., 1987; WORK ET AL., 1998; PELLIZZON ET AL., 2002; CASAL ET AL., 2007). DAIMON ET AL. (1987) observaron que dichas vesículas y canaliculos citoplasmáticos aparecen ramificados y relacionados entre sí y que pueden extenderse hasta el plasmalema, lo cual podría significar que esas estructuras constituyen un sistema conectado de superficie, asociado con el proceso de agregación. A grandes rasgos, el trombocito de *T. scripta scripta* a nivel ultraestructural es muy similar al descrito por CASAL ET AL. (2007) en juveniles de *Caretta caretta*.

Citoquímicamente los trombocitos de *T. scripta scripta*, tanto normales como pleomórficos, sólo se muestran positivos para el PAS y la NBE (con y sin fluoruro), por lo que la actividad  $\alpha$ -naftil butirato esterasa de estas células es resistente a la inhibición con fluoruro sódico. El hecho de que los dos tipos morfológicos de trombocito respondan de igual manera a las técnicas citoquímicas estudiadas confirma que se trata de la misma célula manifestando morfologías diferentes. Por lo general se acepta que los trombocitos de los reptiles son positivos para el PAS (HEARD ET AL., 2004). En el caso de esta tinción, se ha descrito que la positividad se localiza en vacuolas citoplasmáticas portadoras de glucógeno (HEARD ET AL., 2004). Esto coincide con las observaciones realizadas en el presente estudio en *T. scripta scripta*, ya que en los trombocitos normales, tanto la respuesta para el PAS como la actividad  $\alpha$ -naftil butirato esterasa, se han localizado principalmente a ambos lados del núcleo, coincidiendo con áreas identificadas como vacuolas con la técnica Diff quick<sup>®</sup>. Es de destacar que los trombocitos de algunas especies de reptiles presentan las mismas características citoquímicas que los de *T. scripta scripta*, como es el caso de la serpiente de cascabel adamantina (*Crotalus adamanteus*) (ALLEMAN ET AL., 1999), *Iguana iguana* (HARR ET AL., 2001) o *Chelonia mydas* (WORK ET AL., 1998). Sin embargo, en *Gallotia simonyi* no se ha detectado positividad de los trombocitos para ninguna técnica citoquímica (MARTÍNEZ-SILVESTRE ET AL., 2005). En el caso de los quelonios emídidos, existen especies que manifiestan actividad peroxidasa y fosfatasa ácida (DAIMON ET AL., 1987), mientras que otras son positivas para el Sudán negro B y el PAS (CHANSUE ET AL., 2011). Por su parte, los trombocitos de *Ocadia sinensis* sólo resultaron positivos para el PAS (CHUNG ET AL., 2009).

## 5.2.- VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

Se ha establecido para los valores hematológicos y bioquímicos una comparativa entre sexos dentro de la misma estación y entre estaciones dentro del mismo sexo. De igual manera se ha procedido con los pesos, segregando entre animales de menos y de más de 700grs. Se eligió este peso en concreto porque se encontraba cerca de la media y porque usando esa línea de corte todos los animales se mantuvieron dentro de su rango de peso tanto en invierno como en verano. Es de destacar que los resultados estadísticos obtenidos segregando por sexos fueron muy similares a los observados en la segregación por pesos. Esto puede deberse a que sólo hubo un intercambio de cuatro animales cuando se segregó por pesos en comparación de cuando se hizo por sexos, es decir, dos individuos machos pasaron al grupo de las hembras y dos hembras se contabilizaron en el grupo de los machos.

La media del **hematocrito** de *T. scripta scripta* en invierno es de  $22.8 \pm 4.7$  % y de  $24.4 \pm 4.5$  % en verano, por lo que coincide con los rangos normales establecidos para reptiles que van del 20% al 40% (WALLACH Y BOEVER, 1983; MARKS Y CITINO, 1990; FRYE, 1991). Sin embargo, no se han detectado diferencias estadísticamente significativas de este valor entre sexos o entre rango de pesos, ni tampoco entre estaciones, por lo que el porcentaje de hematocrito no estaría influenciado por esas variables. Esto contrasta con los hallazgos descritos en algunas especies. Así, HARR ET AL. (2001) observaron que las hembras de *Iguana iguana* tienden a presentar un hematocrito significativamente superior al de los machos, mientras que en la tortuga caja de bordes amarillos (*Cuora flavomarginata*) ocurre justo lo contrario. En esta especie además, el valor hematocrito fue superior en verano para ambos sexos (YANG ET AL. 2014). Contrariamente, SALAKIJ ET AL. (2014) no observaron diferencias significativas para este parámetro entre machos y hembras de *Varanus salvator*. Por su parte, MCARTHUR (1996) postuló que el hematocrito de los quelonios hibernantes tiende a ser mayor en la época posthibernación y menor justo antes de la hibernación, pero hay que destacar que debido a las condiciones ambientales a las que estaban sometidos los individuos empleados en el presente estudio, éstos no llegaban a realizar una verdadera hibernación, sino que sufrían cierto grado de aletargamiento. En el caso de los quelonios emídidos, hay especies en las que también se describen niveles de hematocrito significativamente superiores en hembras, como es el caso de *Ocadia sinensis*, en la que además los registros máximos se detectan durante el mes de junio y los mínimos en noviembre (CHUNG ET AL. 2009). En *Trachemys callirostris*, CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL. (2014) observaron que las hembras de esta especie también manifestaban niveles mayores de hematocrito que los machos y también se encontraron variaciones asociadas al tamaño y origen de los especímenes. Otros autores no detectaron diferencias significativas de este valor entre sexos en sus estudios (CHANSUE ET AL., 2011). Asimismo, la temperatura no pareció interferir en el hematocrito de tortugas de Florida de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*) mantenidas a 5 °C, 25 °C y 35 °C durante 18-24 horas (FRANKEL ET AL., 1966).

Los niveles de hematocrito de *T. scripta scripta* fueron muy próximos a los descritos en otras especies de emídidos (MARKS Y CITINO, 1990; JACKSON, 1991; FRYE, 1994; WANG ET AL., 1999; PERPIÑAN ET AL., 2008; INNIS ET AL., 2007; CHUNG ET AL. 2009; CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014).

En cuanto a los **sólidos totales (proteínas totales)**, el valor medio de este parámetro en *T. scripta scripta* durante el invierno fue de  $3.77 \pm 1.25$  g/dL y de  $4.23 \pm 1.29$  g/dL durante el verano, coincidiendo con los rangos establecidos en reptiles sanos de 3-8

g/dL (DAWSON, 1960; DESSAUER, 1970; CHIODINI Y SUNBERG, 1982; ROSSKOPF, 1982; TAYLOR Y JACOBSON, 1982; WALLACH Y BOEVER, 1983; SAMOUR *ET AL.*, 1986; LAWRENCE, 1987; JACOBSON *ET AL.*, 1990; MARKS Y CITINO, 1990; FRYE, 1991; BOLTEN *ET AL.*, 1992; WRIGHT Y SKEBA, 1992; CAMPBELL, 1996B; 2004B) y en quelonios de 2.9-6.1 g/dL (DESSAUER, 1970). En este caso, cuando se segregó por pesos, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para este valor en *T. scripta scripta* comparando entre grupos de peso en la misma estación y entre estaciones dentro del mismo grupo. Sin embargo, cuando se segregó por sexos, sí se detectó en verano una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de machos y hembras, apareciendo que el nivel de sólidos totales era superior en estas últimas, aunque no era significativamente mayor que el observado en invierno para dicho sexo. El hecho de que esta diferencia sólo se detecte entre sexos y sólo en la época de verano puede estar relacionado con el aumento de proteínas plasmáticas que sufren las hembras de reptil durante la foliculogénesis (MARKS Y CITINO, 1990; JACOBSON, 1993; CAMPBELL, 2004B), asociado al incremento de los niveles de albúmina (MITCHELL, 2001) y a la liberación a la sangre de la vitelogenina y otras lipoproteínas que son movilizadas para crear la yema de los huevos (LUMEIJ, 1997). De forma similar, HARR *ET AL.* (2001) observaron en *Iguana iguana* que los niveles de proteínas plasmáticas eran notablemente superiores en hembras grávidas en comparación con los machos. Este fenómeno también ha sido descrito en quelonios (DICKINSON *ET AL.*, 2002; MCARTHUR *ET AL.*, 2002; RAPHAEL, 2003). En *Cuora flavomarginata* también se detectaron niveles mayores de proteínas en las hembras, pero no se apreciaron diferencias estacionales significativas (YANG *ET AL.* 2014). Sin embargo, BRENNER *ET AL.* (2002) no describieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de proteínas plasmáticas entre sexos en el galápagos de Muhlenberg (*Clemmys muhlenbergii*), aun teniendo en cuenta que las muestras se tomaron a finales de primavera y principios de verano. Lo mismo sucedió con *Varanus salvator* (SALAKIJ *ET AL.*, 2014).

Los niveles de proteínas totales observados en *T. scripta scripta* fueron muy similares a los descritos en otras especies de emídidos (BRENNER *ET AL.*, 2002; RAPHAEL, 2003; INNIS *ET AL.*, 2007; PERPIÑAN *ET AL.*, 2008), aunque en *Trachemys scripta elegans* este valor fue ligeramente superior al establecido en el presente estudio (HEARD *ET AL.*, 2004).

La **hemoglobina** de *T. scripta scripta* mostró un valor medio en invierno de  $10.7 \pm 2.0$  g/dL y de  $10.5 \pm 2.0$  g/dL en verano. Esto coincide con los valores de muchas especies de reptiles, que varían entre los 6 y 12 g/dL, aunque con frecuencia son inferiores a 10g/dL (MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2011). En este caso, al igual que sucedió con el hematocrito, tampoco se han detectado diferencias significativas de este valor en relación al sexo, tamaño o estación. Sin embargo, en *Iguana iguana*, las hembras mostraron niveles de hemoglobina significativamente mayores a los de los machos (HARR *ET AL.*, 2001). Opuestamente, en *Cuora flavomarginata* son los machos los que muestran mayores niveles. Además, se describe también una influencia estacional en esta especie, ya que es en verano donde este parámetro alcanza rangos superiores (YANG *ET AL.* 2014). Esto contrasta con lo observado en algunas especies de tortugas de tierra hibernantes, ya que los mayores niveles de hemoglobina se describen en invierno-primavera y no en verano (JACKSON, 1991; HEARD *ET AL.*, 2004). Por su parte, SALAKIJ *ET AL.* (2014) no observaron diferencias estadísticamente significativas para este parámetro entre sexos en *Varanus salvator*. En el caso de los quelonios emídidos, encontramos que en *Ocadia sinensis* no se han observado diferencias entre machos y hembras, pero sí entre estaciones, con niveles más altos de hemoglobina en los muestreos realizados durante el mes de junio (CHUNG *ET AL.*, 2009). En *Trachemys callirostris* se detectan valores superiores en las hembras con

respecto a los machos y en los individuos silvestres en comparación con los mantenidos en cautiverio. También existen diferencias cuando se compara entre grupos de diferentes pesos (CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014).

Es de destacar que en comparación con la mayoría de los registros establecidos en quelonios de la familia *Emydidae*, los niveles de hemoglobina detectados en *T. scripta scripta* son por lo general superiores. Esto puede corresponderse con niveles efectivamente mayores de hemoglobina en esta especie o deberse a diferencias en los resultados asociadas al sistema de medición (método íntegramente automático frente a método parcialmente manual) (JACKSON, 1991; RAPHAEL, 2003; HEARD *ET AL.*, 2004; CHUNG *ET AL.*, 2009; CHANSUE *ET AL.*, 2011; CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014).

El **recuento total de eritrocitos (RBC)** de *T. scripta scripta* en invierno es de media  $5.71 (\pm 0.08) \times 10^5/\mu\text{L}$  y de  $5.72 (\pm 0.10) \times 10^5/\mu\text{L}$  en verano. Esto coincide con los rangos generales establecidos para los quelonios, que son de  $1.54\text{-}9.80 \times 10^5/\mu\text{L}$ , dependiendo de la especie y de la época del año (RAPHAEL, 2003). En *T. scripta scripta* no se han evidenciado diferencias estadísticamente significativas entre sexos, pesos o estaciones para este parámetro. Sin embargo, en muchos quelonios, al igual que en algunos reptiles, se han descrito variaciones estacionales en el recuento de eritrocitos (KAPLAN, 1960; PIENAAR, 1962; SHEELER Y BARBER, 1964; STENROSS Y BOWMAN, 1968; DUGUY, 1970; SEMPLE *ET AL.*, 1970; ROSSKOPF, 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; HART *ET AL.*, 1991). En el período invernal suelen observarse los mayores recuentos totales de eritrocitos, en el período postinvernal (marzo-abril) se aprecia una disminución y en el período preinvernal (principios de septiembre a finales de octubre) se experimenta un aumento (DUGUY, 1970). Contrariamente, en *Cuora flavomarginata* dichos valores son superiores en verano y son los machos los que presentan un mayor RBC (YANG *ET AL.*, 2014). En la tortuga del desierto (*Gopherus agassizii*) el RBC fue también mayor durante la época estival y dichas variaciones estacionales fueron más acentuadas en las hembras (CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999). En *Varanus salvator*, son las hembras las que manifiestan mayores valores de RBC (SALAKIJ *ET AL.*, 2014). En el caso de los quelonios emídidos, hay autores que han descrito en varias especies hibernantes, entre ellas *Trachemys scripta elegans*, una evolución estacional del RBC caracterizada por mayores niveles en otoño, niveles mínimos en diciembre y cierto aumento hacia la primavera, para mantenerse más o menos estables hasta principios de otoño (KAPLAN, 1960; RAPHAEL, 2003). Esto difiere de lo observado en *T. scripta scripta*, pero debe recordarse que los sujetos empleados en el presente estudio no llegaban a realizar verdaderas hibernaciones. En el caso de *Ocadia sinensis*, contrariamente, el RBC muestra mayores rangos en verano (CHUNG *ET AL.*, 2009). En cuanto a las diferencias asociadas al sexo, hay especies en las que se describe un mayor número de estas células en el macho, como sucede en el galápagos europeo (*Emys orbicularis*) (DUGUY, 1970), mientras que en otras se ha descrito justo lo contrario, como es el caso de *Trachemys callirostris* (CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014). Otros autores no han hallado diferencias estadísticamente significativas entre sexos, como CHANSUE *ET AL.* (2011) en *Hieremys annandalii*. En *Trachemys callirostris* también se han descrito diferencias entre animales de distinto origen y entre diferentes grupos de peso (CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014).

En líneas generales, los valores de RBC de *T. scripta scripta* son similares a los observados en otras especies de emídidos (PERPIÑAN *ET AL.*, 2008; CHUNG *ET AL.*, 2009; CHANSUE *ET AL.*, 2011; CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014) y están muy próximos a los valores registrados en la subespecie *Trachemys scripta elegans* (WALLACH Y BOEVER, 1983).



El **porcentaje de eritrocitos inmaduros** en *T. scripta scripta* tanto en invierno como en verano ha sido del 0.4% de media. Esto concuerda con los pequeños porcentajes descritos en reptiles bajo condiciones normales por otros autores (ALLEMAN *ET AL.*, 1999; HEARD *ET AL.*, 2004). Tal es el caso de algunos quelonios como *Gopherus agassizii*, especie en la que ALLEMAN *ET AL.* (1992) observaron un porcentaje de eritrocitos policromatófilos (inmaduros) inferior al 1%. Asimismo, en el presente estudio no se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre estaciones, sexos o tamaños, lo cual es consistente con los otros hallazgos hematológicos en los que tampoco se han apreciado tales diferencias (hematocrito, hemoglobina, RBC). Si no se observan cambios significativos en el número de eritrocitos entre estaciones, no es de esperar que el porcentaje de células inmaduras varíe, puesto que no se está respondiendo con un proceso regenerativo a un estado de anemia (HAWKEY Y DENNET, 1989). Así, el porcentaje de eritrocitos inmaduros establecido en *T. scripta scripta* se ha asociado al nivel basal fisiológico para esta especie.

Los **índices eritrocitarios** establecidos en *T. scripta scripta* fueron de media; VCM:  $441 \pm 80$  en invierno y  $464 \pm 64$  en verano, HCM:  $203 \pm 27$  en invierno y  $200 \pm 37$  en verano y CHCM:  $46.6 \pm 5.3$  en invierno y  $43.0 \pm 3.5$  en verano. Estos valores fueron por lo general superiores a los descritos en otras especies de reptiles (MILLAN *ET AL.*, 1997; HARR *ET AL.*, 2001; HEARD *ET AL.*, 2004; SALAKIJ *ET AL.*, 2014), aunque concordaban parcialmente con los rangos establecidos por WRIGHT Y SKEBA (1992) en el escinco arborícola de las islas Salomón (*Corucia zebrata*), salvo para el valor de la HCM. En el caso de los quelonios, los valores descritos en tortugas terrestres fueron los más aproximados a los observados en *T. scripta scripta* (WALLACH Y BOEVER, 1983; MURO *ET AL.*, 1998; HEARD *ET AL.*, 2004). En los quelonios emídidos, las especies en las que más similitudes se han detectado para estos índices con respecto a *T. scripta scripta*, han sido *Trachemys scripta elegans* (HEARD *ET AL.*, 2004), *Ocadia sinensis* (CHUNG *ET AL.*, 2009) y *Hieremys annandalii* (CHANSUE *ET AL.*, 2011).

En el caso del **VCM** de *T. scripta scripta*, encontramos que en invierno no se aprecian diferencias estadísticamente significativas para este valor entre sexos o entre grupos de peso, pero en verano sí es mayor para las hembras con respecto a los machos y para los animales de  $>700$ grs frente a los de  $<700$ grs. No obstante, no se han detectado diferencias entre estaciones para un mismo sexo o grupo de tamaño. Las citadas diferencias entre sexos no se apreciaron cuando se realizó el estudio morfométrico de los eritrocitos, ya que las medidas de las células de machos y hembras resultaron muy similares, aunque hay que destacar que no se llevaron a cabo mediciones en verano, época en la que el VCM divergió entre sexos.

Cuando analizamos la **HCM** de *T. scripta scripta* descubrimos que en invierno no existen diferencias para este parámetro entre sexos o entre pesos, mientras que en verano muestran mayores valores las hembras en comparación con los machos y los individuos de  $>700$ grs frente a los de  $<700$ grs. En este caso sí se han observado diferencias estacionales dentro del grupo de los machos y de los animales de  $<700$ grs, ya que los valores de HCM fueron mayores para ambos grupos en invierno en comparación con el verano.

Para la **CHCM** de *T. scripta scripta* no se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre sexos o entre grupos de peso ni en invierno ni en verano, aunque sí se han registrado valores superiores para este valor en machos y en animales de  $<700$ grs durante la estación invernal en comparación con la estival.

Hay que destacar que SALAKIJ *ET AL.* (2014) no observaron diferencias entre los valores de los índices eritrocitarios de machos y hembras de *Varanus salvator*, mientras que HARR *ET AL.* (2001) descubrieron que las hembras de *Iguana iguana* presentan una CHCM superior a la de los machos. En algunas especies de quelonios hibernantes se han detectado diferencias estacionales en los índices eritrocitarios, siendo generalmente superiores en verano (HEARD *ET AL.*, 2004). En *Cuora flavomarginata* también se han constatado diferencias estacionales, registrándose los mayores niveles de CHCM en verano, siendo además en los machos donde se observaron los valores más elevados (YANG *ET AL.* 2014). En los quelonios emídidos, encontramos que en especies como *Ocadia sinensis* no existen diferencias entre sexos para los índices eritrocitarios, pero sí se detectan los mayores niveles de VCM en junio y los menores en noviembre, mientras que los mayores registros de CHCM aparecen en noviembre (CHUNG *ET AL.*, 2009). En *Hieremys annandalii* se detectaron mayores niveles de CHCM en los machos (CHANSUE *ET AL.*, 2011). En *Trachemys callirostris* también se han apreciado diferencias entre sexos para los índices eritrocitarios. Así, el VCM fue significativamente superior en hembras en comparación con los machos. Todos los índices mostraron diferencias en función del grupo de peso estudiado y también se apreciaron variaciones entre los animales muestreados *in situ* y *ex situ* (CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014).

El recuento total de glóbulos blancos (WBC) de *T. scripta scripta* en invierno es de media 6000/ $\mu$ L ( $\pm$  2036) y de 5792/ $\mu$ L ( $\pm$  2294) en verano, dentro del rango normal establecido para los quelonios (University of Miami, Avian and Wildlife Laboratory. 1996. In: Exotic companion medicine handbook for veterinarians, 2: 6), similar a lo descrito en *Chelonia mydas* por MONTILLA *ET AL.* (2006) y dentro del rango establecido para la tortuga lora (*Lepidochelys kempfi*) (TURNBULL *ET AL.*, 2000). En *T. scripta scripta*, cuando se segregó por sexos no se observaron diferencias estadísticamente significativas para este valor dentro de la misma estación o entre estaciones. Cuando se segregó por pesos, en invierno tampoco hubo diferencias, pero en verano, los individuos de <700grs mostraron niveles superiores de WBC que los de >700grs. Sin embargo, no se apreciaron diferencias entre estaciones dentro de un mismo grupo de peso. De manera similar, SALAKIJ *ET AL.* (2014) no observaron diferencias entre los valores de WBC de machos y hembras de *Varanus salvator*, mientras que en *Iguana iguana*, los machos presentaron mayores registros que las hembras (JACOBSON, 2003). En quelonios, la tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*) muestra los mayores recuentos de leucocitos en invierno y los menores en primavera (HEARD *ET AL.*, 2004), mientras que en *Cuora flavomarginata* no se detectaron diferencias estacionales ni intersexuales para este valor (YANG *ET AL.*, 2014). En los quelonios de la familia *Emydidae* se ha podido comprobar que el WBC puede verse influido por múltiples factores. Así, en *Ocadia sinensis* los mayores recuentos se observan en junio y los menores en noviembre, pero no se han apreciado diferencias entre sexos (CHUNG *ET AL.*, 2009). Por su parte, en *Hieremys annandalii* los machos muestran niveles de leucocitos superiores a los de las hembras (CHANSUE *ET AL.*, 2011), ocurriendo justo lo contrario en *Trachemys callirostris* (CARRASCAL-VELÁSQUEZ *ET AL.*, 2014). Tanto en *Clemmys muhlenbergii* como en *Trachemys callirostris*, el recuento total de leucocitos en los individuos cautivos fue superior al de los silvestres (BRENNER *ET AL.*, 2002; CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014). En esta última especie también se ha comprobado que los sujetos de <500grs presentan los niveles leucocitarios más bajos (CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014).

En líneas generales, el WBC de *T. scripta scripta* se ha alejado en mayor o menor medida de los niveles observados en otros emídidos (INNIS *ET AL.*, 2007; PERPIÑAN *ET AL.*, 2008; CHUNG *ET AL.*, 2009; CHANSUE *ET AL.*, 2011; CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014),

incluidos los de *Trachemys scripta elegans*, que resultaron superiores a los del presente estudio (WALLACH Y BOEVER, 1983), aunque coinciden con los rangos establecidos por BRENNER ET AL. (2002) en *Clemmys muhlenbergii*.

El **recuento diferencial leucocitario** de *T. scripta scripta*, como ya se ha comentado, incluye 5 leucocitos: Heterófilos, con un porcentaje medio en invierno del 33.9% ( $\pm 10.5$ ) y del 48.6% ( $\pm 7.8$ ) en verano; Linfocitos, con un 12.9% ( $\pm 3.2$ ) en invierno y un 9.4% ( $\pm 1.9$ ) en verano; Monocitos, con un 4.6% ( $\pm 2.22$ ) en invierno y un 3.55% ( $\pm 1.98$ ) en verano; Eosinófilos, con un 11.9% ( $\pm 7.09$ ) en invierno y un 12.8% ( $\pm 5.6$ ) en verano y Basófilos, con un 36.8% ( $\pm 10.7$ ) en invierno y un 25.6% ( $\pm 6.9$ ) en verano. Los datos fueron concordantes entre sexos y entre grupos de peso dentro de cada estación, y se observó el mismo comportamiento segregando por sexos y por pesos. Las diferencias se detectaron cuando se comparó entre estaciones. Esta influencia estacional sobre los leucocitos de los reptiles es algo que ha sido observado por varios autores (PIENAAR, 1962; SHEELER Y BARBER, 1964; STENROSS Y BOWMAN, 1968; SEMPLE ET AL., 1970; DUGUY, 1970; ROSSKOPF ET AL., 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; FRYE, 1991; HART ET AL., 1991; ANDERSON, 1996; TROIANO Y SILVA, 1998).

El **heterófilo** de *T. scripta scripta* muestra un porcentaje significativamente mayor en verano en comparación con el invierno, lo que hace que en verano sea el leucocito más abundante, mientras que en invierno ocupa la segunda posición. De forma similar, muchos autores han clasificado a esta célula como la más frecuente en cocodrilianos y quelonios (FRYE, 1973; HEARD ET AL., 2004) y en otros estudios, al igual que sucede con *T. scripta scripta*, se han detectado recuentos superiores de heterófilos en verano (DUGUY, 1970; LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; WATSON, 1997; RASKIN, 2000). En cuanto a las influencias sexuales, en *Varanus salvador* SALAKIJ ET AL. (2014) no encontraron diferencias entre machos y hembras para el porcentaje de heterófilos. Algo similar describieron YANG ET AL. (2014) para *Cuora flavomarginata*, no detectándose tampoco influencias estacionales para el número de heterófilos en esta especie. En los emídidos, encontramos especies en las que el heterófilo representa el leucocito más abundante o uno de los más abundantes (CHUNG ET AL., 2009; CHANSUE ET AL., 2011) y otras en las que ocupa un segundo puesto (DESSAUER, 1970; WALLACH Y BOEVER, 1983; BRENNER ET AL., 2002; CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014). Sin embargo, en algunas especies de emídidos el heterófilo puede ocupar un tercer lugar o incluso tener una relevancia menor en el recuento diferencial (DESSAUER, 1970; INNIS ET AL., 2007; PERPIÑAN ET AL., 2008). Por otro lado, hay que destacar que en *Ocadia sinensis* los registros de heterófilos en hembras son superiores a los de los machos, observándose los mayores recuentos en junio (CHUNG ET AL., 2009). Lo mismo ocurre con las hembras de *Trachemys callirostris*. En esta especie además, el tamaño de los individuos influyó en el porcentaje de heterófilos, pero no así su origen (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014). Todo lo contrario ocurre en *Clemmys muhlenbergii*, especie en la que BRENNER ET AL. (2002) describen un mayor número de heterófilos en los animales salvajes en comparación con los cautivos.

El **linfocito** de *T. scripta scripta*, de forma opuesta al heterófilo, muestra mayores porcentajes en invierno y menores en verano, por lo que en invierno ocupa el tercer puesto del recuento diferencial y el cuarto en verano. Esto contrasta con los hallazgos de muchos autores que consideran a este leucocito el más numeroso en los reptiles (SAINT GIRONS, 1970; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; CAMPBELL, 1996B). No obstante, se ha descrito que los recuentos linfocitarios pueden ser muy variables y depender de múltiples factores (FRYE, 1991). Así, la influencia estacional parece tener bastante importancia en este parámetro,

aunque en otros estudios los mayores porcentajes de linfocitos se han registrado en verano, no en invierno (DUGUY, 1970; HUSSEIN *ET AL.*, 1978; DESSER Y WELLER, 1979A; WRIGHT Y COOPER, 1981; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996B; WATSON, 1997). El sexo también parece afectar a su valor, siendo las hembras las que muestran los mayores porcentajes (DUGUY, 1970; BORYSENKO Y LEWIS, 1979; GLAZEBROOK *ET AL.*, 1981; BURKE Y RODGERS, 1982; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991; WATSON, 1997; CAMPBELL, 1996B), si bien hay especies en las que no se han detectado diferencias entre sexos, estaciones y/o edad de los individuos (TROIANO *ET AL.*, 1997; SALAKIJ *ET AL.*, 2014). En la mayoría de los quelonios, al contrario de lo observado en el presente estudio, se cumple la norma general de que los linfocitos representan el leucocito más abundante o uno de los más abundantes (JAVOID Y SHARIF, 1972; TAYLOR Y JACOBSON, 1982; LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; ANDERSON *ET AL.*, 1997; LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003; YANG *ET AL.*, 2014) y también se observan mayores niveles en las hembras y durante la época estival (DUGUY, 1970; WILKINSON, 2004). Sin embargo, en especies como *Cuora flavomarginata* no se han apreciado influencias estacionales ni intersexuales para este parámetro (YANG *ET AL.*, 2014). En muchos quelonios emídidos el linfocito también representa el leucocito más abundante o uno de los más numerosos (FRYE, 1976; BRENNER *ET AL.*, 2002; PERPIÑAN *ET AL.*, 2008; CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014), mientras que en otros puede ocupar el segundo o tercer lugar (INNIS *ET AL.*, 2007) o incluso el cuarto (CHUNG *ET AL.*, 2009; CHANSUE *ET AL.*, 2011). También se ha constatado la presencia de influencias sexuales en algunas especies (BRENNER *ET AL.*, 2002; CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014), pero no en todas (CHUNG *ET AL.*, 2009; CHANSUE *ET AL.*, 2011). En *Ocadia sinensis* se aprecian diferencias estacionales, detectándose los mayores niveles de linfocitos durante el período estival (CHUNG *ET AL.*, 2009). En *Trachemys callirostris* también se han descrito fluctuaciones en función del origen de los individuos, pero no en relación a su tamaño (CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014).

El **monocito** de *T. scripta scripta* no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre sus porcentajes invernales y estivales, por lo que su número no parece estar afectado por las influencias estacionales. En esta especie el monocito ocupa el quinto y último lugar del recuento diferencial leucocitario, tanto en invierno como en verano. Esto concuerda con las observaciones de muchos autores, que establecen el rango normal para el porcentaje de monocitos de la mayoría de los reptiles entre el 0-10% (TAYLOR Y KAPLAN, 1961; TAYLOR *ET AL.*, 1963; DUGUY, 1970; OTIS, 1973; ROSSKOPF, 1982; ROSSKOPF *ET AL.*, 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; JACOBSON *ET AL.*, 1990; MARKS Y CITINO, 1990; ALLEMAN *ET AL.*, 1992; WRIGHT Y SKEBA, 1992; CAMPBELL, 1996B) o bien clasifican al monocito como el leucocito menos frecuente (ELIMAN, 1997; LLOYD, 2003; FONTENOT *ET AL.*, 2004; COOPER-BAILEY *ET AL.*, 2011; SALAKIJ *ET AL.*, 2014). De igual manera, el porcentaje de monocitos en reptiles no parece estar influenciado por factores estacionales (DUGUY, 1970; LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; MURO *ET AL.*, 1994; TROIANO *ET AL.*, 1996; TROIANO *ET AL.*, 1997; ANDERSON *ET AL.*, 1997; WATSON, 1997; TROIANO Y SILVA, 1998) y SALAKIJ *ET AL.* (2014) tampoco observaron influencias sexuales para este valor en *Varanus salvator*. En muchas especies de quelonios el monocito tiende a clasificarse también como el leucocito menos abundante (ROSSKOPF, 1982; LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; BOURDEAU, 1989; MARKS Y CITINO, 1990; FRYE, 1991; LÓPEZ-OLVERA *ET AL.*, 2003) y al igual que en otros reptiles, muchos autores consideran que el recuento de monocitos no está influenciado por factores estacionales (DUGUY, 1970; TROIANO Y SILVA, 1998; RASKIN, 2000), aunque en algunas especies se ha observado lo contrario (TAYLOR Y JACOBSON, 1982; CHRISTOPHER *ET AL.*, 1999). Así, en *Cuora flavomarginata* se ha descrito que los niveles de este leucocito disminuyen en verano y también que son más abundantes en las hembras en comparación

con los machos (YANG *ET AL.*, 2014). En la mayoría de los quelonios emídidos, al igual que en *T. scripta scripta*, los monocitos son células poco abundantes (BRENNER *ET AL.*, 2002; INNIS *ET AL.*, 2007; PERPIÑAN *ET AL.*, 2008; CHUNG *ET AL.*, 2009; CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014). En algunas especies, al contrario de lo observado en el presente estudio, se detectan influencias estacionales y/o sexuales sobre su porcentaje. Así, en *Ocadia sinensis*, las hembras presentan niveles superiores de este leucocito y los mayores recuentos se detectan durante el mes de junio (CHUNG *ET AL.*, 2009). En *Trachemys callirostris* son los machos los que ostentan mayores porcentajes, al igual que los individuos *in situ*, pero no se aprecian diferencias asociadas al tamaño de los ejemplares (CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014).

El **eosinófilo** de *T. scripta scripta*, al igual que el monocito, tampoco muestra fluctuaciones significativas de su porcentaje entre el invierno y el verano. Sin embargo, en invierno ocupa el cuarto puesto en el recuento diferencial, mientras que en verano aparece en tercera posición. Esta variación es secundaria a la disminución del porcentaje de linfocitos durante la época estival, que hace que los eosinófilos los superen en número durante ese período. Por lo general, el porcentaje de eosinófilos de *T. scripta scripta* está dentro del rango establecido para reptiles del 7-20% (SYPEK Y BORYSENKO, 1988; FRYE, 1991), aunque en algunos lacértidos, ofidios y cocodrilianos esta célula puede ser muy poco abundante (CHIODINI Y SUNDBERG, 1982; ROSSKOPF *ET AL.*, 1982; ANDERSON, 1992; HARR *ET AL.*, 2001; SALAKIJ *ET AL.*, 2002; LLOYD, 2003; FISSE *ET AL.*, 2004), e incluso hay especies en las que este leucocito no es detectado, como es el caso de *Varanus salvator* (SALAKIJ *ET AL.*, 2014). Por el contrario, algunos quelonios pueden poseer hasta un 20 % de eosinófilos (TAYLOR Y KAPLAN, 1961; DUGUY, 1970; WOOD Y EBANKS, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; JACOBSON *ET AL.*, 1990; MARKS Y CITINO, 1990; WRIGHT Y SKEBA, 1992). Se ha descrito que el número de eosinófilos puede verse influenciado por factores estacionales, contabilizándose números menores en verano y mayores durante el período de hibernación (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; DUGUY, 1970; WATSON, 1997) y en algunas especies de tortugas también se han observado influencias sexuales. Así, en la tortuga negra (*Chelonia mydas agassizii*) el número de eosinófilos del macho es inferior al de la hembra (GRUMBLES *ET AL.*, 1990), mientras que en *Cuora flavomarginata* ocurre justamente lo contrario (YANG *ET AL.*, 2014). De forma opuesta, hay autores que no han detectado variaciones en el recuento de eosinófilos en función de la estación, edad o sexo de los individuos (TROIANO Y SILVA, 1998). En los quelonios emídidos, encontramos que algunos autores no han descrito eosinófilos en *Trachemys scripta*, pero en esos estudios no se emplearon técnicas de caracterización citoquímica o ultraestructural para la identificación celular (DESSAUER, 1970; WALLACH Y BOEVER, 1983). En varias especies de emídidos, este leucocito ocupa el último puesto del recuento diferencial (BRENNER *ET AL.*, 2002; PERPIÑAN *ET AL.*, 2008), mientras que en otras representa uno de los leucocitos más abundantes (DESSAUER, 1970; CHUNG *ET AL.*, 2009; CHANSUE *ET AL.*, 2011). En *Trachemys callirostris* ocupa el tercer puesto (CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.*, 2014) y el cuarto en el caso de *Pseudemys rubriventris* (INNIS *ET AL.*, 2007). CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.* (2014) no observaron diferencias en el recuento de eosinófilos entre machos y hembras de *Trachemys callirostris*, pero describieron influencias asociadas al tamaño y origen de los sujetos. CHANSUE *ET AL.* (2011) tampoco detectaron diferencias intersexuales para este parámetro en *Hieremys annandalii*, mientras que los machos de *Ocadia sinensis* presentaron porcentajes de eosinófilos superiores a los de las hembras. En esta especie además, los niveles más altos de este leucocito se registraron en junio y los más bajos en abril (CHUNG *ET AL.*, 2009). En *Clemmys muhlenbergii*, de forma opuesta a lo descrito en *Ocadia sinensis*, son las hembras las que manifiestan mayores recuentos de eosinófilos (BRENNER *ET AL.*, 2002).

El **basófilo** de *T. scripta scripta* representa, junto con el heterófilo, el leucocito más abundante de esta especie. Su porcentaje es superior en invierno, época en la que ocupa el primer lugar del recuento diferencial, y disminuye en verano, momento en el que queda situado por detrás del heterófilo. Por tanto, existe una relación inversamente proporcional entre los porcentajes de basófilos y heterófilos.

De forma similar a lo observado en el presente estudio, en reptiles se suele establecer un rango para el recuento de basófilos del 0-40% (TAYLOR Y KAPLAN, 1961; DUGUY, 1970; ROSSKOPF, 1982; ROSSKOPF ET AL., 1982; WOOD Y EBANKS, 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; JACOBSON ET AL., 1990; MARKS Y CITINO, 1990; WRIGHT Y SKEBA, 1992; CAMPBELL, 1996B; RASKIN, 2000; ROSSKOPF, 2000) y en algunos quelonios estas células pueden llegar a presentar recuentos superiores al 50% (MICHELS, 1923; MEAD ET AL., 1983; SYPEK ET AL., 1984; SYPEK Y BORYSENKO, 1988), aunque hay que resaltar que en las tortugas marinas rara vez se encuentran basófilos (BACHERE, 1980; SYPEK Y BORYSENKO, 1988; CANNON, 1992; ARNOLD, 1994; WORK ET AL., 1998; RASKIN, 2000; CASAL Y ORÓS, 2007), o que en algunas tortugas terrestres no han llegado a detectarse estas células (LAWRENCE Y HAWKEY, 1986; LÓPEZ-OLVERA ET AL., 2003). Opuestamente a lo descrito en *T. scripta scripta*, en algunos reptiles se observan disminuciones del recuento de basófilos durante la hibernación y aumentos al llegar la época activa del individuo (DUGUY, 1970; SAINT GIRONS, 1970; CHRISTOPHER ET AL., 1999; RASKIN, 2000), aunque hay autores que no han detectado variaciones en función de la época del año, edad o sexo (TROIANO Y SILVA, 1998; YANG ET AL., 2014). En los quelonios emídidos encontramos especies en las que, al igual que puede ocurrir en *T. scripta scripta*, el basófilo supone el leucocito más importante (INNIS ET AL., 2007; PERPIÑAN ET AL., 2008), mientras que en otras ocupa el tercer lugar del recuento diferencial (BRENNER ET AL., 2002; CHUNG ET AL., 2009; CHANSUE ET AL., 2011), o incluso representa el leucocito menos habitual (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014). En los emídidos estudiados no se han detectado diferencias estadísticamente significativas en el recuento de basófilos entre machos y hembras (BRENNER ET AL., 2002; CHUNG ET AL., 2009; CHANSUE ET AL., 2011; CARRASCAL-VELÁSQUEZ ET AL., 2014), pero se han descrito influencias estacionales en *Ocadia sinensis*, observándose los niveles más bajos en abril y los más altos en junio (CHUNG ET AL., 2009). Por su parte, en *Trachemys callirostris* no se han apreciado diferencias entre animales *in situ* y *ex situ*, pero sí en función del tamaño de los sujetos (CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014).

Para el **recuento de trombocitos** de *T. scripta scripta* se emplearon dos métodos diferentes con el objetivo de obtener resultados más fiables y ajustados. Sin embargo, los estudios estadísticos han puesto de manifiesto que los resultados obtenidos por ambos sistemas no son concordantes. Así, en las mediciones realizadas en invierno, encontramos que ambos métodos son claramente discordantes, con un número de trombocitos notablemente inferior mediante el sistema del recuento en cámara, con una media de  $27.8 (\pm 9.6) \times 10^3/\mu\text{L}$ , mientras que con la estimación en frotis fue de  $42.4 (\pm 10.6) \times 10^3/\mu\text{L}$ . En verano, por el contrario, los resultados obtenidos por ambos métodos son moderadamente concordantes, con un recuento en cámara de  $35.3 (\pm 12.8) \times 10^3/\mu\text{L}$  y una estimación en frotis de  $39.1 (\pm 15.2) \times 10^3/\mu\text{L}$ . En cualquier caso, estos resultados son significativamente superiores a los observados en otros reptiles, superando el rango establecido de  $10.5 \times 10^3$ - $19.5 \times 10^3$  trombocitos/ $\mu\text{L}$  (PIENAAR, 1962; FRYE, 1981) y bastante mayores que los de otros emídidos (PERPIÑAN ET AL., 2008; CHUNG ET AL., 2009; CHANSUE ET AL., 2011; CARRASCAL-VELASQUEZ ET AL., 2014), aunque son muy similares a los establecidos por BRADLEY ET AL. (1998) en *Caretta caretta*.

Mediante el método de la estimación en frotis no se observaron diferencias en el número de trombocitos entre machos y hembras, ni entre grupos de peso, en ninguna de las dos estaciones de estudio. De igual manera, tampoco se detectaron fluctuaciones significativas de este valor entre estaciones, por lo que el comportamiento de los trombocitos de *T. scripta scripta* es similar al observado en los eritrocitos (RBC), sin influencias estacionales, sexuales o asociadas al tamaño. Sin embargo, mediante el método del recuento en cámara se detectaron diferencias significativas en el número de trombocitos. Así, en verano, los recuentos fueron superiores en machos en comparación con las hembras y en animales de <700grs en comparación con los de >700grs y en general, en machos y animales de <700grs los valores estivales de trombocitos fueron superiores a los invernales. De forma similar, algunos estudios en reptiles describen la existencia de variaciones estacionales en el número de trombocitos, observando un descenso de estas células en invierno y un aumento durante el período estival (KAPLAN, 1954; PIENAAR, 1962; DUGUY, 1970; TROIANO *ET AL.*, 1997). En otros emíidos también se han detectado influencias sexuales y ambientales. Así, CARRASCAL-VELASQUEZ *ET AL.* (2014) observaron en *Trachemys callirostris* un mayor número de estas células en los animales en cautividad en comparación con los individuos *in situ*. Además, los ejemplares con peso inferior a 500grs mostraron el menor número de trombocitos, mientras que las hembras presentaron recuentos superiores a los de los machos.

Hay que resaltar que en el presente estudio existieron marcadas discrepancias entre los dos métodos de recuento de trombocitos empleados, y que los resultados de la técnica de estimación en frotis fueron estables y homogéneos, haciéndolos más consistentes en relación con el resto de resultados hematológicos que los obtenidos mediante el recuento en cámara. Por consiguiente, se sugiere que los valores desprendidos del recuento en cámara estuvieron sujetos a algún tipo de error de muestreo o laboratorial. Muy probablemente el número de trombocitos fue infravalorado debido a la dificultad de distinguir estas células de los linfocitos pequeños (FRYE 1991; MARTÍNEZ-SILVESTRE *ET AL.*, 2011), más aún teniendo en cuenta que la valoración en la cámara de Neubauer se lleva a cabo a menos aumentos que la del frotis, y sobre todo que el almacenamiento en frío de las muestras antes de su procesado tiende a generar alteraciones morfológicas que dificultan su identificación (WORK *ET AL.*, 1998). Es por todo ello que en el presente estudio hemos considerado que la técnica de estimación en frotis, además de más sencilla, puede considerarse más fiable, aunque el uso de ambos sistemas podría ser complementario.

## 6.- CONCLUSIONES

**Primera.** El estudio morfológico y citoquímico de las células sanguíneas de la tortuga de vientre amarillo u orejas amarillas (*Trachemys scripta scripta*) ha permitido la identificación de siete tipos celulares. Además de eritrocitos y trombocitos, se detectaron cinco poblaciones de leucocitos: heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos.

**Segunda.** Los eritrocitos de *Trachemys scripta scripta* pueden mostrar positividad para las técnicas citoquímicas de la fosfatasa ácida con y sin tartrato, la  $\alpha$ -naftil butirato esterasa con y sin fluoruro y para el ácido periódico de Schiff. Dicha positividad aparece de forma focal a modo de inclusiones que también son observadas con la técnica Diff quick<sup>®</sup> y la microscopía electrónica, y que no se asocian a fenómenos patológicos.

**Tercera.** Los heterófilos de *Trachemys scripta scripta* se distinguen del resto de los granulocitos gracias a su respuesta positiva a la bencidina peroxidasa, mientras que los basófilos son los únicos leucocitos en manifestar positividad para el azul de toluidina. Por su parte, el eosinófilo representa el leucocito de mayor tamaño de esta especie.

**Cuarta.** Los linfocitos de *Trachemys scripta scripta* han mostrado cierta variabilidad de tamaño, predominando las células pequeñas con menor porcentaje citoplasmático, pero observándose también células medianas/grandes con mayor cantidad de citoplasma. Asimismo, algunas de las medidas celulares han sido superiores en las hembras en comparación con los machos.

**Quinta.** Los monocitos de *Trachemys scripta scripta* presentan una morfología nuclear variable, y mediante el uso del Diff quick<sup>®</sup> el citoplasma puede mostrar un aspecto arenoso, con una fina granulación eosinófila y/o basófila.

**Sexta.** Los trombocitos de *Trachemys scripta scripta* han mostrado dos variantes morfológicas, asociadas a células que mantienen su forma original (ovaladas o fusiformes) y a células que han sufrido un proceso de activación (redondeadas/pleomórficas). Ambos tipos han respondido de igual manera frente a las técnicas citoquímicas, aunque mediante microscopía electrónica sólo se han detectado formas redondeadas u ovaladas.

**Séptima.** No se han detectado influencias estacionales, sexuales o asociadas al tamaño en *Trachemys scripta scripta* para los valores de hematocrito, hemoglobina, recuento total de eritrocitos y porcentaje de eritrocitos inmaduros, por lo que dichos factores no afectan a estos parámetros, al menos en las condiciones a las que estaban sometidos los sujetos de estudio.

**Octava.** En verano, los individuos de <700grs muestran mayores recuentos de glóbulos blancos que los de >700grs, mientras que el recuento diferencial leucocitario presenta el



## Conclusiones

mismo comportamiento cuando se segrega por sexos que cuando se hace por pesos, mostrando claras influencias estacionales que hacen que el basófilo sea el leucocito más frecuente en invierno, mientras que en verano lo es el heterófilo. Los eosinófilos y monocitos no sufren variaciones significativas de sus porcentajes entre estaciones y el monocito representa el leucocito menos abundante de esta especie.

**Novena.** La estimación en frotis del número de trombocitos ha resultado ser una técnica más fiable que el recuento en cámara para la obtención de este valor. Mediante dicho sistema, el número de trombocitos de *Trachemys scripta scripta* no ha mostrado influencias estacionales, intersexuales o dependientes del tamaño de los individuos, al menos en las condiciones a las que estaban sometidos los sujetos de estudio.

**Décima.** Las proteínas totales de *Trachemys scripta scripta* no muestran variaciones significativas cuando se segrega por pesos, mientras que cuando se segrega por sexos, el nivel estival de proteínas de las hembras es superior al de los machos, pudiendo estar asociado este hecho a factores reproductivos (foliculogénesis).

## 7.- RESUMEN

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio de identificación morfológica (mediante microscopía óptica y electrónica) y de caracterización citoquímica de las células sanguíneas en individuos adultos sanos de tortuga de vientre amarillo u orejas amarillas (*Trachemys scripta scripta*). Adicionalmente, se han establecido los parámetros hematológicos y los sólidos totales de esta especie en dos estaciones diferenciadas (invierno y verano), realizándose comparativas estadísticas entre sexos, tamaño de los individuos y estaciones. Los sujetos de estudio han estado sometidos a las condiciones ambientales propias de la costa sur-sureste de la isla de Gran Canaria, caracterizadas por suaves fluctuaciones térmicas interestacionales.

Para el análisis rutinario de microscopía óptica se empleó como método de tinción la técnica Diff quick<sup>®</sup> y la caracterización citoquímica se basó en las siguientes técnicas: fosfatasa ácida con tartrato (ACPT) y sin tartrato (ACPNT), bencidina peroxidasa (PER),  $\alpha$ -naftil butirato esterasa con fluoruro (NBEF) y sin fluoruro (NBENF), naftol cloroacetato esterasa (CAE), Sudán negro B (SBB), ácido periódico de Schiff (PAS) y azul de toluidina (AT). El estudio morfológico, ultraestructural y citoquímico permitió la identificación de siete tipos celulares sanguíneos: eritrocitos, trombocitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos.

Algunos eritrocitos de *Trachemys scripta scripta* manifestaron positividad focal en forma de inclusiones citoplasmáticas para la ACP (con y sin tartrato), la NBE (con y sin fluoruro) y el PAS. Los heterófilos resultaron positivos para todas las técnicas citoquímicas a excepción del azul de toluidina, siendo el basófilo la única célula en responder positivamente para dicha tinción. Los linfocitos se presentaron como células de tamaño variable, mientras que los monocitos se caracterizaron por la diversidad de formas de su núcleo. Los trombocitos mostraron bastante variabilidad morfológica en función de su grado de activación, pero siempre manifestaron la misma respuesta citoquímica, es decir, positividad para la NBE (con y sin fluoruro) y para el PAS.

Respecto al estudio hematológico, algunos de los parámetros analizados no mostraron diferencias significativas en función de la estación, sexo o tamaño de los individuos (hematocrito, hemoglobina, recuento total de eritrocitos y porcentaje de eritrocitos inmaduros), mientras que el recuento diferencial leucocitario varió en función de la estación: el leucocito más abundante en invierno fue el basófilo, mientras que en verano lo fue el heterófilo. El monocito ocupó el último puesto del recuento diferencial tanto en invierno como en verano. El recuento de trombocitos varió en función de la técnica diagnóstica empleada, pero mediante el uso de la estimación en frotis no se observaron fluctuaciones asociadas a la estación, sexo o tamaño de los sujetos de estudio. Los sólidos totales presentaron mayores niveles en hembras en comparación con los machos sólo durante la época estival.



## 8.- SUMMARY

In the present work, we studied the morphological, ultrastructural and cytochemical characteristics of the blood cells of healthy adult yellow-bellied slider turtles (*Trachemys scripta scripta*). Hematological parameters and total solids were assessed in two different seasons (winter and summer), generating comparative statistics between sexes, weights, and seasons. Animals were maintained under the environmental conditions of the south-southeastern coast of Gran Canaria island, characterized for its gentle thermal seasonal changes.

Light microscopy study was performed using the Diff quick<sup>®</sup> method. For cytochemical characterization we used the following techniques: acid phosphatase with tartaric acid (ACPT) and without tartaric acid (ACPNT), benzidine peroxidase (PER),  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase with fluoride (NBEF) and without fluoride (NBENF), naphthol chloroacetate esterase (CAE), Sudan black B (SBB), periodic acid-Schiff (PAS) and toluidine blue (TB). Seven cell types were identified: erythrocytes, thrombocytes, heterophils, eosinophils, basophils, lymphocytes and monocytes.

Some erythrocytes showed cytoplasmic inclusions positive for ACP (with and without tartaric acid), NBE (with and without fluoride), and PAS. Heterophils were positive for all the cytochemical stains except for toluidine blue, while the basophil was the only cell type that reacted positively to toluidine blue. Lymphocytes were characterized by their variable sizes, and monocytes' nuclei showed different forms. Thrombocytes showed high morphologic variability depending on their activation level, but all were positive for NBE (with and without fluoride) and PAS.

Hematocrit, hemoglobin, total erythrocyte count, and immature erythrocyte percentage did not show significant differences by season, sex, or size, whereas the leukocyte differential count was highly influenced by season. During winter, the most abundant leukocyte was the basophil, whereas in summer it was the heterophil. Monocytes were the least common cell of the differential count in both winter and summer. The thrombocyte count depended on the measurement technique, but smear estimation did not show fluctuations by season, sex, or size. Total solids were higher in females than in males during the summer.

## *Summary*

## **9.- AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar debo darle las gracias a mi director, el Dr. Jorge Orós Montón, no sólo por haber aceptado mi propuesta de tesis y hacerla suya, invirtiendo su valioso tiempo y dedicación, sino por ser un gran profesional y un trabajador impecable, además de un buen amigo.

A Patricia Ramírez Perdomo, la que además de haber tenido que asumir importantes sacrificios personales y que representar el principal punto de apoyo moral para este doctorando, ha sido parte fundamental durante el proceso de obtención de las muestras sanguíneas, sujetando a las “rebeldes” tortugas empleadas en este estudio.

Al Dr. Pedro Castro Alonso, por su infinita paciencia, su apoyo e inestimable ayuda durante las largas horas de trabajo en el Laboratorio de Histología Veterinaria. Su colaboración fue fundamental para que el estudio citoquímico y la realización de las medidas celulares llegaran a buen puerto.

Al Dr. Pedro Saavedra Santana, Catedrático del Departamento de Matemáticas de la ULPGC, por su rapidez y diligencia en el desarrollo del estudio estadístico y por hacernos un hueco en su apretada agenda.

Al Dr. Alfonso Blanco Rodríguez, Catedrático del área de Anatomía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, por su magnífico trabajo en la obtención de las imágenes de microscopía electrónica.

A Minerva Artiles Castellano, por estar ahí cada vez que la necesité.

A todas las personas que cedieron de forma desinteresada sus animales para la realización de este estudio, en especial a Nayara y a Nayra.

A todos los compañeros de la Clínica Veterinaria Atlántico y del Hospital Veterinario Benartemi, por haberme permitido realizar parte del trabajo en sus instalaciones y por las molestias que les haya podido ocasionar.

A los trabajadores del Servicio de Microscopía Electrónica del CULP, por su complicidad.

Al Dr. Juan Andrés Ramírez González, Catedrático de Anatomía Humana de la ULPGC, por sus inestimables consejos y apoyo.

Por último, pero no menos importante, quiero darle las gracias a todas aquellas personas, familiares y amigos, que en algún momento me dedicaron alguna palabra de

## *Agradecimientos*

aliento o me mostraron su apoyo incondicional, haciendo esta ardua labor un poco más llevadera.

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

- ADNYANA, W., LADDS, P. W. Y BLAIR, D. 1997. Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. *Australian Veterinary Journal*, 10: 737-742.
- AGID, R., SAINT GIRONS, H., MARTOJA, M. Y DUGUY, R. 1961. Influence de la temperature et des facteurs endocrines dans la glucoregulation chez *Vipera aspis*. Role de l'adrenaline. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L Academie des Sciences*, Paris, 252: 2007-2009.
- AGUIRRE, A. A. 1996. Plasma biochemistry values of green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas in the Hawaiian Islands. Southwest Fisheries Science Center. Administrative Report H-96-10C.
- AGUIRRE, A. A. , BALAZS, G. H. , SPRAKER, T. R. Y GROSS, T. S. 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiological zoology*, 68(5): 831-854.
- AIELLO, S. E. 2000. Patología Clínica y Procedimientos. En: Aiello (Ed.), El Manual Merck de Veterinaria, 5ª Edición. Merck & Co., INC. USA. 1334-1418.
- ALDER, A. Y HUBER, E. 1923. Untersuchungen über blutzellen und zellbildung bei amphibien und reptilien. *Folia Hematologica*, 29: 1-22.
- ALLEMAN, A. R. JACOBSON, E. R. Y RASKIN, R. E. 1992. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *American Journal of Veterinary Research*, 53(9): 1645-1651.
- ALLEMAN, A. R., JACOBSON, E. R. Y RASKIN, R. E. 1999. Morphologic, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). *American Journal of Veterinary Research*, 60(4): 507-514.
- ALTMAN, P. L. Y DITTMER, D. S. 1964. Biological data book. Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington, District of Columbia: 633.
- ALTMAN, P. L. Y BRACE, K. C. 1962. Red cell life span in the turtle and toad. *American Journal of Physiology*, 203: 1188-1190.
- ANDERSEN, H. T. 1961. Physiological adjustments to prolonged diving in the american alligator, *Alligator mississippiensis*. *Acta Physiologica Scandinavica*, 55: 23-45.
- ANDERSON, N. L. 1992. Diseases of *Iguana iguana*. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 14(10): 1335-1342 (hematology); and Southwest Veterinary Diagnostic Laboratories, normal blood values (biochemistries).
- ANDERSON, N. L. 1996. Effects of temperature, sex and sample type on hematology and serum/plasma chemistries of captive New Guinea snapping turtles (*Elseya novaeguineae*). *Proceedings of the Third Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*: 43-49.



## Bibliografía

- ANDERSON, N. L., WACK, R. F. Y HATCHER, R. 1997. Hematology and clinical chemistry reference ranges for clinically normal, captive New Guinea snapping turtle (*Elseya novaeguineae*) and the effects of temperature, sex and sample type. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 28(4): 394-403.
- ANDREASEN, C. B. Y LATIMER, K. S. 1990. Cytochemical staining characteristics of chicken heterophils and eosinophils. *Veterinary Clinical Pathology*, 19: 51-54.
- ANDREW, W. 1965. Comparative hematology. New York, NY; 1 edition, Grune and Stratton Inc.: 1-188.
- ANSLEY, H. Y ORNSTEIN, L. 1970. Enzyme histochemistry and differential white cell counts on the technicon hemalog D: Advances in automate analysis. *Technicon International Congress*, 1: 437.
- ARIZZA, V., RUSSO, D., MARRONE, F., SACCO, F. Y ARCULEO, M. 2014. Morphological characterization of the blood cells in the endangered Sicilian endemic pond turtle, *Emys trinacris*. (Testudines: Emydidae). *Italian Journal of Zoology*, 81: 3, 344-353.
- ARNOLD, J. 1994. White blood cell count discrepancies in Atlantic loggerhead sea turtles: Natt-Herrick vs. Eosinophil Unopette. *Proceedings of the 14<sup>th</sup> Annual Conference of the Association of Zoo Veterinary Technicians*, Cleveland, Ohio, Septiembre: 15-22.
- ATLAND, P. D. Y PARKER, M. 1955. Effects of hipoxia upon the box turtle. *American Journal of Physiology*, 180: 421-427.
- ATLAND, P. D. Y THOMPSON, E. C. 1958. Some factors affecting blood formation in turtles. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*, 99: 456-459.
- AUSTIN, J. H., SUNDERMAN, F. W. Y CAMACK, J. G. 1927. Studies in serum electrolytes. II. The electrolyte composition and the pH of serum of a poikilothermous animal at different temperatures. *Journal of Biological Chemistry*, 27: 677-685.
- AZEVEDO, A. Y LUNARDI, L. O. 2003. Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of the turtle (*Chrysemys dorbignih*). *Acta Histochemica*, 105 (1): 99-105.
- BABLOK, W., PASSING, H., BENDER, R. Y SCHNEIDER, B. 1988. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part III. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 26: 783-790.
- BABUDIERI, B. 1930. Studi di Ematologica Comparata. Richerche sui Pesci, Sugli Anfibi, e sui Rettili. *Haematologica*, 2 : 199-255.
- BACHERE, E. 1980. Recherches hematalogiques chez la tortue marine, *Chelonia mydas* (L.). Qàla Réunion. Ph. D. Dissertation, L'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- BAGGIOLINI, M. 1972. The enzymes of the granules of polymorphonuclear leukocytes and their functions. *Enzyme*, 13:132-160.
- BARROWS, M., MCARTHUR, S. Y WILKINSON, R. 2004. Diagnosis. En: S. McArthur, R. Winkinson & J. Meyer (Eds.). *Medicine and surgery of tortoises and turtles*. Blackwell Publishing Ltd.: 109-140.
- BARTEN, S. L. 1993. The medical care of iguanas and other common pet lizards. *Veterinary clinics of North America, Small Animal Practice*, 23: 1213-1244.
- BASILE, F., DI SANTI, A., CALDORA, M., FERRETTI, L., BENTIVEGMA, F. Y PICA, A. 2011. Inclusion bodies in loggerhead erythrocytes are associated with unstable hemoglobin and resemble Human Heinz bodies. *Journal of Experimental Zoology. Part A: Ecological Genetics and Physiology*, Aug 1; 315 (7): 416-423.
- BEARD, M. E. J. Y FAIRLY, G. H. 1974. Acute leukemia in adults. *Seminars in Hematology*, 11: 5-24.
- BECKMANN, J., NETH, R., GAEDICKE, G., LANDBECK, G, SCHOCH, G., WIEGERS, U. Y WINKLER, K. 1974. Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. *Hamatologie und Bluttransfusion*, 14: 26-35.

- BENEDICT, A. A. Y POLLARD, L. W. 1972. Three classes of immunoglobulins found in the sea turtle, *Chelonia mydas*. *Folia Microbiologica*, 17 (1): 75-78.
- BENNETT, J. M. Y REED, C. E. 1975. Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. *Blood Cells*, 1: 101.
- BERKSON, H. 1966. Physiological adjustments to prolonged diving in the pacific green turtle (*Chelonia mydas agassizi*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 18: 101-119.
- BERNSTEIN, R. E. 1938. Blood cytology of the tortoise, *Testudo geometrica*, *South. African Journal of Science*, 35: 327-331.
- BLAND, J. M. Y ALTMAN D. G. 1986. Statistical method for assesing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*, 1: 307-310.
- BOLTEN, A. B. Y BJORN DAL, K. A. 1992. Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationships. *Journal of Wildlife Diseases*, 28(3): 407-413.
- BOLTEN, A. B., JACOBSON, E. R. Y BJORN DAL, K. A. 1992. Effects of anticoagulant and autoanalyzer on blood biochemical values of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *American Journal of Veterinary Research*, 53(12): 2224-2227.
- BORYSENKO, M. Y LEWIS, S. 1979. The effect of malnutrition on immunocompetence and whole body resistance to infection in *Chelydra serpentina*. *Developmental and Comparative Immunology*, 3: 89-100.
- BOUNOUS, D. I., DOTSON, T. K., BROOKS, R. L. Y RAMSAY, E. C. 1996. Cytochemical staining and ultrastructural characteristics of peripheral blood leucocytes from the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). *Comparative Haematology International*, 6: 86-91.
- BOURDEAU, P. 1989. Pathologie des tortues. *Point Veterinaire*, 2: 52.
- BOYER, T. H. 1995. Reptilian hematology. *Proceedings of North American Veterinarians Conference*, Orlando, Florida: 640-641.
- BOYER, T. H. Y BOYER, D. M. 2006. Turtles, tortoises and terrapins. En: Mader D. (Ed.): *Reptile Medicine and Surgery*. 2nd Edition. St. Louis, Missouri. USA. 78-99.
- BOZDECH, M. J. Y BAIN TON, D. F. 1981. Identification of  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase as a plasma membrane ectoenzyme of monocytes and as a discrete intracellular membrane-bounded organelle in lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 153: 182-195.
- BRACE, K. C. Y ATLAND, P. D. 1955. Effects of hypoxia upon the box turtle and toad. *American Journal of Physiology*, 180: 421-427.
- BRACE, K. C. Y ATLAND, P. D. 1962. Red cell life span in the turtle and toad. *American Journal of Physiology*, 203:1188-1190.
- BRADLEY, B. 1937. Observations on the comparative anatomy of the blood. *Medical Journal*, Australia, 24, 992-999.
- BRADLEY, T. A., NORTON, T. M. Y LATIMER, K. S. 1998. Hemogram values, morphological characteristics of blood cells and morphometric study of loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, in the first year of life. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 8(3): 8-16.
- BRENNER, D., LEWBART, G., STEBBINS, M. Y HERMAN, D. W. 2002. Health survey of wild and captive bog turtles (*Clemmys muhlenbergii*) in North Carolina and Virginia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 33(4): 311-316.
- BROTÓNS, N. 2007. Especies más frecuentes en cautividad. En: Brotóns N. (Ed.): *Las Tortugas como animales de compañía*. Consulta de difusión veterinaria S.L. Castellón, España. 105-176.

## Bibliografía

- BURKE, J. B. Y RODGERS, L. J. 1982. Gastric ulceration associated with larval nematodes (*Anisakis* sp. Type I) in pen reared green turtles (*Chelonia mydas*) from Torres Strait. *Journal of Wildlife Diseases*, 18:41-46.
- BURSTONE, M. S. 1957. The cytochemical localization of esterase. *Journal of the National Cancer Institute*, 18: 167.
- BURSTONE, M. S. 1962. Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms. Academic Press, New York and London: 88-113.
- CABALLERO, T., MEDINA, M. T. Y CABALLERO M. A. 1993. Histoquímica de hidratos de carbono o glúcidos. En: García del Moral R. (Ed.). Laboratorio de Anatomía Patológica. Interamericana. Mc Graw Hill. 241-242.
- CAMPBELL, T. W. 1988. Avian Hematology and Cytology. Iowa State University Press/Ames: 3-17.
- CAMPBELL, T. W. 1991. Hematology of exotic animals. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 13(6): 950-957
- CAMPBELL, T. W. 1994. Hematology. En: G. J. Harrison & L. R. Harrison (Eds.). Avian medicine: Principles and application. Wingers Publications, Inc., Florida: 176-198.
- CAMPBELL, T. W. 1995. Hematology of birds, reptiles, and fish. En: Exotic animals. A veterinary handbook. A collection of articles from Veterinary Technician. Veterinary Learning Systems Co., Inc.: 196-199.
- CAMPBELL, T. W. 1996A. Hemoparasites. En: D. R. Mader, (Ed.). Reptile medicine and surgery. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 379-381.
- CAMPBELL, T. W. 1996B. Clinical pathology. En: D. R. Mader, (Ed.). Reptile medicine and surgery. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 248-252.
- CAMPBELL, T. W. 1996C. Sea turtle rehabilitation. En: D. R. Mader, (Ed.). Reptile medicine and surgery. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 427-436.
- CAMPBELL, T. W. 2004A. Hematology of reptiles. En: M. A. Thrall, D. L. Baker, T. W. Campbell, D. Denicola, M. J. Fettman, E. D. Lassen, A. Rebar & G. Weiser (Eds.). Veterinary hematology and clinical chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 259-276.
- CAMPBELL, T. W. 2004B. Clinical Chemistry of reptiles. En: M. A. Thrall, D. L. Baker, T. W. Campbell, D. Denicola, M. J. Fettman, E. D. Lassen, A. Rebar & G. Weiser (Eds.). Veterinary hematology and clinical chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 493-498.
- CANFIELD, P. J. 1985. Characterization of the blood cells of Australian crocodiles (*Crocodilus porosus*, Schneider, and *C. johnstoni*, Krefft). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 14: 269-288.
- CANFIELD, P. J. Y SHEA, G. M. 1988. Morphological observations on the erythrocytes, leukocytes and thrombocytes of blue tongue lizards (Lactertilia: *Scincidae*, Tiliqua). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 17: 328-342.
- CANNON, M. S. 1992. The morphology and cytochemistry of the blood leukocytes of Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempi*). *Canadian Journal of Zoology*, 70: 1336-1340.
- CARRASCAL-VELASQUEZ, J., NEGRETE-CARTAGENA, H., ROJANO-BOLAÑO, C., ÁLVAREZ-OTERO G., CHACÓN-PACHECO, J. Y LINARES-ARIAS J. 2014. Caracterización hematológica de hicoteas (*Trachemys callirostris*. Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (28): 43-55.
- CASAL, A. B., FREIRE, F., BAUTISTA-HARRIS, G., ARENCIBIA, A. Y ORÓS, J. 2007. Ultrastructural characteristics of blood cells of juvenile loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Anatomia Histologia Embryologia*, 36, 332-335.
- CASAL, A. B. Y ORÓS, J. 2007. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Research in Veterinary Science*, 82, 158-165.

- CAWLEY, J. C. Y HAYHOE, F. G. J. 1972. Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. *Clinics in Haematology*, 1: 49.
- CAXTON-MARTINS, A. E. 1977. Cytochemistry of blood cells in peripheral smears of some West African reptiles. *Journal of Anatomy*, 124: 393-400.
- CAXTON-MARTINS, A. E. Y NGANWUCHU, A. M. 1978. A cytochemical study of the blood of the rainbow lizard (*Agama agama*). *Journal of Anatomy*, 125: 477-480.
- CHANSUE, N., SAILASUTA, A., TANGTRONGPIROS, J., WANGNAITHAN, S. Y ASSAWAWONGKASEM, N., 2011. Hematology and clinical chemistry of adult yellow-headed temple turtles (*Hieremys annandalii*) in Thailand. *Veterinary Clinical Pathology*, Jun; 40 (2): 174-184.
- CHARIPPER, H. A. Y DAVIS, D. 1932. Studies on the Arneht Count. XX. A study of the blood cells of *Pseudemys elegans* with special reference to the polymorphonuclear leukocytes. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 21: 371-382.
- CHARTRAND, S. L., LITMAN, G. W., LAPOINTE, N., GOOD, R. A. Y FROMMEL, D. 1971. Evolution of immune response. 12 immunoglobulins of turtle. Molecular requirements for biologic activity of 5<sup>7</sup> S Immunoglobulin. *Journal of Immunology*, 107 (1): 1-11.
- CHEVILLE, N. E. 1983. Cell pathology. Ames, Iowa: Iowa State University Press: 451-502.
- CHEYLAN, M. 1981. Biologie et ecologie de la tortue d'Hermann, *Testudo Hermanni*, Gmelin, 1789. *Mémoire Travaux École Pratique des Hautes études*, Montpellier, 13: 1-404.
- CHIODINI, R. J. Y SUNDBERG, J. P. 1982. Blood chemical values of the common *Boa constrictor* (*constrictor constrictor*). *American Journal of Veterinary Research*, 43 (9): 1701-1702.
- CHRISTOPHER, M. M., BERRY, K. H., WALLIS, Y. R., NAGY, K. A., HENEN, B. T. Y PETERSON, C. C. 1999. Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the Mojave Desert. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(2): 212-238.
- CHUNG, C. S., CHENG, C. H., CHIN, S. C., LEE, A. H. Y CHI, C. H. 2009. Morphologic and cytochemical characteristics of Asian yellow pond turtle (*Ocadia sinensis*) blood cells and their hematologic and plasma biochemical reference values. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, Mar; 40 (1): 76-85.
- CLINE, M. J. Y WALDMANN, T. A. 1962. Effect of temperature on red cell survival in the alligator. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111 (3): 716-718.
- COOPER-BAILEY, K., SMITH, S. A., ZIMMERMAN, K., LANE, R., RASKIN, R. E. Y DENARDO D. 2011. Hematology, leukocyte cytochemical analysis, plasma biochemistry and plasma electrophoresis of wild-caught and captive-breed Gila Monsters (*Heloderma suspectum*). *Veterinary Clinical Pathology*, Sept; 40 (3): 316-323.
- COULSON, R. A. Y HERNÁNDEZ, T. 1964. Biochemistry of the alligator. A Study of Metabolism in Slow Motion. Louisiana State University Press, Baton Rouge: 1-138.
- COULSON, R. A., HERNÁNDEZ, T. Y BRAZDA, F. G. 1950. Biochemical studies on the alligator. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 72, 203-206.
- COX, W. R., RAPLEY, A. Y BARKER, Y. J. 1980. Herpes virus-like infection in a painted turtle (*Chrysemys picta*). *Journal of Wildlife Diseases*, 16:445-449.
- CUADRADO, M., DÍAZ-PANIAGUA, C., QUEVEDO, M. A., AGUILAR, J. M. Y PRESCOTT, I.M. 2002. Hematology and clinical chemistry in dystocic and healthy post-reproductive female chameleons. *Journal of Wildlife Diseases*, 38 (2): 395-401.
- CRAWSHAW, G. J. Y HOLZ P. 1996. Comparison of plasma biochemical values in blood and blood-lymph mixtures from red-eared sliders, *Trachemys scripta elegans*. *Bulletin of the association of Reptile and Amphibian Veterinarians*, 6 (2): 7-9.

## Bibliografía

- DAILEY, M. D. Y MORRIS, R. 1995. Relationship of parasites (trematoda: Spirorchidae) and their eggs to the occurrence of fibropapillomas in the green turtle (*Chelonia mydas*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 52: 84-89.
- DAIMON, T., GOTOH, Y. Y UCHIDA, K. 1987. Electron microscopic and cytochemical studies of the thrombocytes of the tortoise (*Geoclemys reevesii*). *Journal of Anatomy*, Aug; 153: 185-190.
- DAVEY, F. R. Y NELSON, D. A. 1977. Sudan black B staining. En: W. J. Willians, E. Beutler, A. J. Erslev & R. W. Rundles (Eds.). *Hematology*. 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill, New York: 1629-1630.
- DAVIS A. Y HOLCOMB K. 2008. Intraerythrocytic inclusion bodies in painted turtles (*Chrysemys picta picta*) with measurements of affected cells. *Comparative Clinical Pathology*, Feb; 17 (1): 51.
- DAWSON, W. R. 1960. Physiological responses to temperature in the lizard *Eumeces obsoletus*. *Physiological Zoology*, 33: 87.
- DE MOURA, W. L., OLIVEIRA, L. W. Y EGAMI, M. I. 1997. Aspectos ultraestructurales de trombocitos, eosinófilos y heterófilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodylia). *Revista Chilena de Anatomía*, 15(2): 201-208.
- DE, T. K. Y MAITI, B. R. 1981. Differential leucocyte count in both sexes of an Indian soft-shelled turtle (*Lyssemys punctata punctata*). *Zeitschrift fur mikroskopisch-anatomische Forschung* (Leipzig), 95: 1065-1069.
- DE, T. K. Y MAITI, B. R. 1982. Diurnal variation in leucocyte count in male soft-shelled turtle, *Lyssemys punctata punctata*. *Zoologischer Anzeiger*, 208: 97-99.
- DESSAUER, H. C. 1970. Blood chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects. En: C. Gans and T.S. Parsons (Eds.). *Biology of the Reptilia*, 3-C, Morphology. New York, Academic Press: 1-72.
- DESSER, S. S. 1978. Morphological, cytochemical and biochemical observations on the blood of the tuatara, *Sphenodon punctatus*. *New Zealand Journal Zoology*, 5: 503-508.
- DESSER, S. S. Y WELLER, I. 1979A. Ultrastructural observations on the granular leukocytes of the tuatara (*Sphenodon punctatus*). *Tissue and Cell*, 11: 703-715.
- DESSER, S. S. Y WELLER, I. 1979B. Ultrastructural observations on the erythrocytes and thrombocytes of the tuatara (*Sphenodon punctatus*). *Tissue and Cell*, 11: 717-726.
- DEUTSCH, H. F. Y MC SHAN, W. H. 1949. Biophysical studies of blood plasma proteins; electrophoretic studies of the blood serum proteins of some lower animals. *Journal of Biological Chemistry*, Aug; 180 (1): 219-234.
- DICKINSON, V. M., JARCHOW, J. L. Y TRUEBLOOD, M. H. 2002. Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1): 143-153.
- DILL, D. B. Y EDWARDS, H. T. 1931A. Physiochemical properties of crocodile blood (*Crocodylus acutus cuvier*). *Journal of Biological Chemistry*: 90, 515-530.
- DILL, D. B. Y EDWARDS, H. T. 1931B. Respiration and metabolism in a young crocodile (*Crocodylus acutus cuvier*). *Copeia*, 1-3.
- DILL, D. B. Y EDWARDS, H. T. 1935. The alligator (*Alligator mississippiensis daudin*). *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 6 (2); 243-254.
- DIVERS, S. J. 2000A. Reptilian renal and reproductive disease diagnosis. En: A. M. Fudge (Ed.). *Laboratory Medicine (Avian and Exotic Pets)*. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 217-222.
- DIVERS, S. J. 2000B. Reptilian liver and gastrointestinal testing. En: A. M. Fudge (Ed.). *Laboratory Medicine (Avian and Exotic Pets)*. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 205-209.

- DIVERS, S. J., REDMAYNE, G. Y AVES, E. K. 1996. Haematological and biochemical values of 10 green iguanas (*Iguana iguana*). *The Veterinary Record*, 138: 203-205.
- DIVERS, S. J., STAHL, S. J., STEDMAN, N. L., HERNANDEZ-DIVERS, S. M., SCHUMACHER, J., HANLEY, C. S., WILSON, H., VIDYASHANKAR, A. N., ZHAO, Y. Y RUMBEIHA, W. K. 2005. Renal evaluation in the healthy green iguana (*Iguana iguana*): assessment of plasma biochemistry, glomerular filtration rate, and endoscopic biopsy. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36(2): 155-168.
- DOTSON, T. K., RAMSAY, E. C. Y BOUNOUS, D. I. 1995. A color atlas of blood cells of the yellow rat snake. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 17: 1013-1026.
- DOTSON, T. K., RAMSAY, E. C. Y BOUNOUS, D. I. 1997. A color atlas of blood cells of the yellow rat snake. En: K. L. Rosenthal (Ed.). *Practical Exotic Animal Medicine. The Compendium Collectium*. Veterinary Learning Systems Co., Inc. USA: 211-222.
- DREW, M. L. 1994. Hypercalcemia and hyperphosphatemia in indigo snakes (*Drymarchon corais*) and serum biochemical reference values. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 25: 48-52
- DUGGAN, R. T. 1981. Plasma corticosteroids in marine, terrestrial and freshwater snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 68: 115-118.
- DUGUY, R. 1967. Le cycle annuel des éléments figurés du sang chez *Emys orbicularis* L., *Lacerta muralis* Laur. et *Natrix maura* L. *Bulletin Société Zoologique de France*, 92 : 23-37.
- DUGUY, R. 1970. Numbers of blood cells and their variation. En: C. Gans & T.C. Parsons (Eds.). *Biology of the Reptilia*, Vol 3-C. Morphology. Academic Press, New York: 93-109.
- EFRATI, P., NIR, E. Y YAARI, A. 1970. Morphological and cytochemical observations on cells of the hemopoietic system of *Agama stellio* (Linnaeus). *Israel Journal of Medicine Science*, 6: 23-31.
- EGAMI, M. I. Y SASSA, W. S. 1988. Cytochemical observations of blood cells *Bothrops jaracaca* (Reptilia, Squamata). *Revista Brasileira do Biologia*, 48: 155-159.
- ELIMAN, M. M. 1997. Hematology and plasma chemistry of the inland bearded dragon, *Pogona vitticeps*. *Bulletin of the Association of Reptile and Amphibian Veterinarians*, 7 (4): 10-12.
- ELKAN, E. Y ZWART, P. 1967. The ocular disease of young terrapins caused by vitamin A deficiency. *Pathologia Veterinaria*, 4 (3): 201-222.
- EL RIDI, R. Y KANDIL, O. 1981. Membrane markers of reptilian lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 5 Suppl. 1: 143-50.
- ERNST, C. H. Y BARBOUR, R. W. 1989. *Turtles of the World*. Washington DC, Smithsonian Institution Press.
- ETTINGER, S. J. 2003. Policitemia. En: S. J. Ettinger (Ed.). *Compendio del Tratado de Medicina Veterinaria*. Tercera edición. Elsevier España, SA, Madrid.: 98-99.
- EVANS, R. H. 1983. Chronic bacterial pneumonia in free-ranging eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of Wildlife Diseases*, 19: 349-352.
- FISSE, A., DRAUD, M., RAPHAEL, B. Y MELKONIAN, K. 2004. Differential Leukocyte Counts of Critically Endangered Grand Cayman Blue Iguanas, *Cyclura nubila lewisi*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 14 (4): 19-21.
- FONTENOT, D. K., LAMBERSKI, N. Y PFAFF, S. 2004. Physical, Hematologic, and Plasma Biochemistry Values of Five Crocodile Monitors, *Varanus salvadorii*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 14 (1): 5-9.
- FRAIR, W. 1972. Sea turtle blood cells parameters correlated with carapace length. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 56: 467-72.

## Bibliografía

- FRAIR, W. Unpublished, 1964. En: D. R. Mader, (Ed.). Reptile medicine and surgery. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 474-483.
- FRAIR, W. 1977. Turtle red blood packed cell volume, sizes and numbers. *Herpetologica*, 33: 167-190.
- FRANK, N. Y RAMUS, E. 1995. A Complete Guide to Common Names of Reptiles and Amphibians of the World. NG. Publishing Inc. Pottsville. P. A. Elsevier.
- FRANKEL, H. M., STEINBERG, G. Y GORDON, J. 1966. Effects of temperature on blood gases, lactate and pyruvate in turtles *Pseudemys scripta elegans*, in vivo. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 19: 279-283.
- FRITZ, U. Y HAVAS, P. 2007. Checklist of Chelonias of the World. *Vertebrate Zoology*, 57 (2): 149-368.
- FRISCHE, S., BRUNO S., FAGO, A., WEBER, R. E. Y MOZZARELLI, A. 2001. Oxygen binding by single red blood cells from the red-eared turtle *Trachemys scripta*. *Journal of Applied Physiology*, may; 90 (5): 1679-1684.
- FRYE, F. L. 1973. Husbandry, medicine and surgery in captive reptiles. Bonner Springs, Kansas; VM Publishing Inc.: 49-55.
- FRYE, F. L. 1976. Hematology of captive reptiles. *Annual Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*. St. Luis. Hills Division, Riviana Foods Publishers, Topeka, Kans: 90-96.
- FRYE, F. L. 1977. Hematology of captive reptiles (with emphasis on normal morphology). En: R. W. Kirk (Ed.). Current Veterinary Therapy VI: Small Animal Practique. Philadelphia, W. B. Saunders Company: 792-798.
- FRYE, F. L. 1978. The hematology of normal reptiles. En: M. E. Fowler (Ed.). Zoo and wild animal medicine. Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company: 146-150.
- FRYE, F. L. 1981. Hematology. En: F. L. Frye (Ed.). Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry. Veterinary Medicine Publishing Company, Edwardsville, Kansas: 61-111.
- FRYE, F. L. 1991. Hematology as applied to clinical reptile medicine. En: Frye, F.L. (Ed.). Biochemical and surgical aspects of captive reptile husbandry. Volume I. Second Enlarged Edition. Krieger Publishing Company: 209-279.
- FRYE, F. L. 1994. Diagnosis and surgical treatment of reptilian neoplasma with a compilation of cases 1966-1993. *In vivo*; 8, 885-892.
- FRYE, F. L. 1995. Appendix A. Normal physiological values of *Iguana iguana*. En: F. L. Frye (Ed.). *Iguana iguana*. Guide for successful captive care. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida: 143.
- FRYE, F. L. Y TOWNSEND, W. 1993. Iguanas: A guide to their biology and captive care. Krieger Publishing Company, Florida: 1-193
- FUDGE, A. M. 1999. California Avian Laboratory (Citrus Heights, California). En: A. M. Fudge, Laboratory Medicine (Avian and Exotic Pets). Philadelphia, W. B. Saunders Company; 375-400.
- FUENTES, G., BYRNE, G. E., CRAY, C., ZAIAS, J., CLARK, K., DECKER, S. Y ALTMAN, N. 2000. Morphologic and cytochemical staining and ultrastructural characteristics of rhinoceros (*Cyclura conutus*) and green iguana (*Iguana iguana*) leukocytes. *Proceedings of the Joint Conference of the American Association of Zoo Veterinarians and International Association of Aquatic Animal Medicine*, New Orleans, 16-21 September: 504.
- GARNER, M.M., HOMER, B.L., JACOBSON, E.R., RASKIN, R. E., HALL, B. J., WEIS, W. A. Y BERRY, K. H. 1996. Staining and morphologic features of bone marrow haematopoietic cells in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). *American Journal of Veterinary Research*, 57 (11).
- GAUMMER, A. H. Y GOODNIGHT, C. J. 1957. Some aspects of the hematology of turtles related to their activity. *The American Midland Naturalist*, 58: 332-340.

- GELLI, D., MORGANTE, M., FERRARI, V., MOLLO, A., FREGGI, D. Y ROMAGNOLI, S. 2004. Hematologic, serum biochemical, and serum electrophoretic patterns in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Proceedings of Eleventh Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, Florida, 8-11 Mayo: 149-152.
- GEORGE, R. H. 1996. Health problems and diseases of sea turtles. En: P. L. Lutz & J. Musick (Eds.). *The biology of sea turtles*. Boca Ratón, Florida, CRC Press: 363-382.
- GERZELI, G. 1954. Osservazioni d'istochimica comparata: i polisaccardi negli elementi ematici circolanti dei vertebrati inferiori. *Archivio Zoologico Italiano*, 39: 1-14.
- GHEBREMESKEL, K., WILLIAMS, G., SPRATT, D. Y SAMOUR, H. J. 1991. Plasma biochemistry of free-living giant tortoises *Geochelone gigantea* on Curieuse Island (Seychelles). *Comparative Biochemistry & Physiology*, 99A, 65-67.
- GIARDINA, B., GALTIERI, A., LANIA, A., ASCENZI, P., DESIDERI, A., CERRONI, L. Y CONDO, S. G. 1992. Reduced sensibility of O<sub>2</sub> transport to allosteric effectors and temperature in loggerhead sea turtle hemoglobin: functional and spectroscopic study. *Biochimica et biophysica acta*, 1159: 129-133.
- GILL, G. W., FROST, J. K. Y MILLER, K. A. 1974. A new formula for a half-oxidized hematoxylin solution that neither overstains nor requires differentiation. *Acta Cytologica*, 18: 300-311.
- GILLES-BAILLIEN, M. 1973. Seasonal variations in weight and hematological data of *Testudo hermanni hermanni gmelin*. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 81, 723-732.
- GLASSMAN, A. B. Y BENNET, C. E. 1978A. Formed elements in the blood of *Alligator mississippiensis*. *Federation Proceedings*, 37 (3): 442.
- GLASSMAN, A. B. Y BENNET, C. E. 1978B. Responses of the alligator to infection and thermal stress. En: H. Thorp & J. W. Gibbons (Eds.). *Energy and environmental stress in aquatic systems*. J. Springfield, VA; Department of Energy Symposium Series, National Technical Information Service: 691-702.
- GLASSMAN, A. B., HOLBROOK, T. W. Y BENNET, C. E. 1979. Correlation of leech infestation and eosinophilia in alligators. *Journal of Parasitology*, 65: 323-324.
- GLAZEBROOK, J. S., CAMPBELL, R. S. F. Y BLAIR, D. 1981. Pathological changes associated with cardiovascular trematodes (Digenea: Spirorchidae) in a green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Journal of Comparative Pathology*, 91: 361-368.
- GÖBEL, T. Y SPÖRLE, H. 1992. Blutentnahmetechnik und serumnormalwerte wichtige parameter bei der griechischen landschilkröte (*Testudo hermanni hermanni*). *Tieraerztliche Praxis*, 20, 231-234.
- GOTTDENKER, N. L. Y JACOBSON, E. R. 1995. Effect of venipuncture sites on hematologic and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). *American Journal of Veterinary Research*, 56: 19-21.
- GRACZYK, T. K., AGUIRRE, A. A. Y BALAZS, G. H. 1995. Detection by ELISA of circulating antibody fluke (*Carettacola*, *Haplotrema*, and *Learedius*) immunoglobulins in hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). *The Journal of Parasitology*, 81: 416-421.
- GRAHAM, R. C. Y KARNOVSKY, M. J. 1966A. Glomerular permeability. Ultrastructural cytochemical studies using peroxidases as protein tracers. *Journal of Experimental Medicine*, 124: 1123-1134.
- GRAHAM, R. C. Y KARNOVSKY, M. J. 1966B. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 14: 291-302.
- GREINER, E. C., FORRESTER, D. J. Y JACOBSON, E. R. 1980. Helminths of mariculture-reared green turtles (*Chelonia mydas*) from Grand Cayman, British West Indies. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 47 (1):142.



## Bibliografía

- GRIONI, A., HO, K. K. Y., KARRAKER, N. E. Y LEUNG, K. M. Y. 2014. Blood clinical biochemistry and packed cell volume of the Chinese three-striped box turtle, *Cuora trifasciata* (Reptilia: Geoemydidae). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45 (2): 228-238.
- GROSS, W B. Y SIEGEL, H. S. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian diseases*, 27: 972-979.
- GRUMBLES, J., ROSTAL, D., ALVARADO, J. Y OWENS, D. 1990. Hematology study on the black turtle, *Chelonia agassizi*, at Playa Colola, Michoacan, Mexico. En: T. H. Richardson, J. I. Richardson & M. Donnelly (compilers). *Proceedings of the Tenth Annual Workshop on Sea Turtle Biology and Conservation*. National Oceanographic and Atmospheric Administration Technical Memorandum NMFS-SEFSC-278, 20-24 Febrero, South Carolina: 235-239.
- HAGGAG, G., RAHEEM, K. A. Y KHALIL, F. 1965. Hibernation in reptiles I. Changes in blood electrolytes. *Compendium Biochemical Physiology*, Dec: 16 (4): 457-465.
- HAGGAG, G., RAHEEM, K. A. Y KHALIL, F. 1966. Hibernation in reptiles II. Changes in blood glucose, hemoglobin, red blood cell count, protein and non-protein nitrogen. *Compendium Biochemical Physiology*, Jan: 17 (1): 335-339.
- HAIGH, S. A. 1991. Characterization of the blood cells and the establishment of haematological and biochemical reference intervals for the eastern longneck tortoise (*Chelodina longicollis*). Thesis, Diploma in Veterinary Studies (Wildlife Medicine and Husbandry, University of Sydney).
- HAJDUK, P., COPLAND, M. D. Y SCHULTZ, D. A. 1992. Effects of capture on hematological values and plasma cortisol levels of free-range koalas (*Phascolarctos cinereus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 28: 502-506.
- HANKER, J. S., LASZLO, J. Y MOORE, J. O. 1978. The light microscopic demonstration of hydroperoxidase-positive phi bodies and rods in leukocytes in acute myeloid leukemia. *Histochemistry*, 58: 241-252.
- HANKER, J. S., AMBROSE, W. W., JAMES, C. J., MANDELKORN, J., YATES, P. E., GALL, S. A., BOSSEN, E. H., FAY, J. W., LASZLO, J. Y MOORE, J. O. 1979. Facilitated light microscopic cytochemical diagnosis of acute myelogenous leukemia. *Cancer Research*, 39: 1635-1669.
- HANKER, J. S., CHANDROSS, R. J., WEATHERLY, N. F., LASZLO, J., MOORE, J. O., BUCKLY, R. H. Y OTTOLENGHI, A. 1980. Medusa cells: The morphology and cytochemistry of common amoeboid variants of eosinophils. *Histochemical Journal*, 12: 701-715.
- HANKER, J. S. Y GIAMMARA, B. L. 1991. Haematology: Some advances and insights from histocytochemical and molecular biological studies of haemoproteins. En: P. J. Stoward & J. M. Polak (Eds.). *Histochemistry: The widening horizons*. John Wiley & Sons Ltd., Sussex.
- HANLEY, C. S., HERNANDEZ-DIVERS, S. J., BUSH, S. Y LATIMER, K. S. 2004. Comparison of the effect of dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid and lithium heparin on hematologic values in the green iguana (*Iguana iguana*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 35(3): 328-332.
- HARCOURT- BROWN, F. 1998. Blood results from *T.hermanni/graeca*: five captive *T.graeca*, seven *T.hermanni*, 6/12 female, tail vein, September. Unpublished data personal communication to SM.
- HARMS, C. A., LEWBART, G., BEASLEY, J., STAMPER, A., CHITTICK, B. Y TROGDON, M. 2000. Clinical implications of hematology and plasma biochemistry values for loggerhead sea turtles undergoing rehabilitation. *Proceedings of the twentieth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Technical Memorandum NMFS - SEFSC - 477: 190-191.
- HARR, K. E., ALLEMAN, A. R., DENNIS, P. M., MAXWELL, L. K., LOCK, B. A., BENNETT, R. A. Y JACOBSON, E. R. 2001. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematological and plasma biochemical reference ranges in green iguanas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(6): 915-921.
- HART, M. G., SAMOUR, H. J., SPRATT, D. M. J., SAVAGE, B. Y HAWKEY, C. N. 1991. An analysis of haematological findings on a feral population of alibaba giant tortoises (*Geochelone gigantea*). *Comparative Haematology International*, 1: 145-149.

- HAWKEY, C. M. 1975. Comparative mammalian haematology. William Heinemann Medical Books Limited, London: 218-227.
- HAWKEY, C. M. Y DENNET, T. B. 1989. Atlas de hematología veterinaria comparada. Grass Ediciones, SA, Barcelona: 7-181.
- HAWKEY, C. M. Y DENNET, T. B. 1994. A colour atlas of comparative hematology. Wolfe Medical, Ipswich, UK: 1-195.
- HEARD, D., HARR, K. Y WELLEHAN, J. 2004. Diagnostic sampling and laboratory tests. En: S. J. Girling & P. Raiti (Eds.). Manual of Reptiles. British Small Animal Veterinary Association, Quedgeley, England, 2<sup>nd</sup> edition: 71-86.
- HERNÁNDEZ T. Y COULSON, R. A. 1951. Biochemical studies of the iguana. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, Jan; 76(1): 175-177.
- HERBST, L. H. Y JACOBSON, E. R. 1997. Practical approaches for studying sea turtle health and disease. En: P. L. Lutz, J. A. Musick & J. Wyneken (Eds.). The Biology of Sea Turtles. Vol. II. CRC Press: 385-410.
- HOPPING, A. 1923. Seasonal changes in the gases and sugar of the blood and the nitrogen distribution in the blood and urine of the alligator. *American Journal of Physiology*. 66; 145-162.
- HORII, L., HAYASHI, S. Y KUMASHIRO, E. 1951. Histochemical studies on phosphatase in blood cells. En: *Kioto Acta Scholae Medicinalis Universitatis*, 29: 9-14.
- HOTCHKISS, R. D. 1948. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Archives of Biochemistry*, 16: 131.
- HUSSEIN, M. F., BADIR, N., EL RIDI, R. Y AKEF, M. 1978. Differential effect of seasonal variation on lymphoid tissue of the lizard, *Chalcides ocellatus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2: 297-309.
- HUSSEIN, M. F., BADIR, N., EL RIDI, R. Y AKEF, M. 1979A. Lymphoid tissues of the snake, *Spalerosophis diadema*, in the different seasons. *Developmental and Comparative Immunology*, 3: 77-88.
- HUSSEIN, M. F., BADIR, N., EL RIDI, R. Y ELDEEB, S. 1979B. Effect of seasonal variation on the immune system of the lizard, *Scinus scinus*. *Journal of Experimental Zoology*, 209: 91.
- HUTTON, K. E. 1958. The blood chemistry of terrestrial and aquatic snakes. *Journal of Cell Physiology*, oct; 52(2): 319-328.
- HUTTON, K. E. Y GOODNIGHT, C. J. 1957. Variations in the blood chemistry of turtles under active and hibernating conditions. *Physiological Zoology*, 30, 198-207.
- HUTTON, K. E. Y ORTMAN, R., 1957. Blood chemistry and parietal eye of *Anolis carolinensis*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 96(3): 842-844.
- INNIS, C. J., TLUSTY, M. Y WUNN, D. 2007. Hematologic and Plasma Biochemical Analysis of Juvenile Head-Started Northern Red-Bellied Cooters (*Pseudemys rubriventris*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38(3): 425-432.
- JACKSON, O. F. 1991. Reptiles. Part one: Chelonians. En: P. H. Beynon & J. E. Cooper (Eds.). Manual of Exotic Pets. British Small Animal Veterinary Association, Iowa State University Press/Ames: 221-243.
- JACOBSON, E. R. 1980. Necrotizing mycotic dermatitis in snakes: Clinical and pathologic features. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 177: 838-841.
- JACOBSON, E. R. 1987. Reptiles. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 17(5): 1203-1225.
- JACOBSON, E. R. 1992. Laboratory investigations. En: P. H. Beynon (Ed.). Manual of reptiles. British Small Animal Veterinary Association., Cheltenham: 50-53.

## Bibliografía

- JACOBSON, E. R. 1993. Blood collection techniques in reptiles: laboratory investigations. En: M. E. Fowler (Ed.). *Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy 3*. Philadelphia, WB Saunders Company: 144-152.
- JACOBSON, E. R. 1999. Reptilian viral diagnosis. En: A. M. Fudge (Ed.). *Laboratory medicine (avian and exotic pets)*. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 229-235.
- JACOBSON, E. R. 2003. *Biology, Husbandry, and Medicine of the Green Iguana*. Krieger Publishing Company. Malabar, Florida: 1-188.
- JACOBSON, E.R., BJORNDALE, K., BOLTON, A., HERREN, R., HARMAN, G. Y WOOD, L. Datos del 2004. Establishing plasma biochemical and hematocrit reference intervals for sea turtles in Florida. [[http://accstr.ufl.edu/blood\\_chem.htm](http://accstr.ufl.edu/blood_chem.htm)].
- JACOBSON, E. R., CLUB, S. Y GREINER, E. 1983. Amebiasis in red footed tortoises. *Journal American Veterinary Medicine Association*, 183: 1292-1294.
- JACOBSON, E. R., GASKIN, J. M., BROWN, M. B., HARRIS, R. K., GARDINER, C. H., LAPOINTE, J. L., ADAMS, H. P. Y REGGIARDO, C. 1990. Chronic upper respiratory tract disease of free-ranging dessert tortoises, *Xerobates agassizii*. *Journal of Wildlife Diseases*, 27: 296-316.
- JACOBSON, E. R; GASKIN, J. M.; SIMPSON, C. F. Y TERREL, T. G. 1980. Paramyxo-like virus infection in a rattlesnake. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 177: 796-799.
- JAIN, N. C. 1986A. Cytochemistry of normal and leukemic leukocytes. En: N. C. Jain (Ed.). *Schalm's veterinary hematology*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Lea & Febiger: 909-939.
- JAIN, N. C. 1986B. The eosinophils. En: N. C. Jain (Ed.). *Schalm's veterinary hematology*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Lea & Febiger: 731-755.
- JAVOID, M. Y. Y SHARIF, M. 1972. Haematology of two species of tortoises of Punjab. *Pakistan Journal of Science and Research*, 24: 95-97.
- JOHNSON, J. H. Y BENSON, P. A. 1996. Laboratory reference values for a group of captive ball pythons (*Python regius*). *American Journal of Veterinary Research*, 57: 1304-1307.
- JORDAN, H. E. 1938. Comparative hematology. En: H. Downey (Ed.). *Handbook of hematology*. Vol. 2. Harper (Hoeber) Publishers, New York: 699-862.
- JORDAN, H. E Y FLIPPIN, J. C. 1913. Hematopoiesis in Chelonia. *Folia Haematology. Blood*, 15: 1-22.
- KAPLAN, H. M. 1954. Sex difference in the packed cell volume of vertebrate blood. *Science*, 120: 1024.
- KAPLAN, H. M. 1960. Electrophoretic analysis of protein changes during growth of *Pseudemys* turtles. *The Anatomical Record*, 138: 359.
- KASS, L. 1979. Cytochemistry of esterases. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 10: 205-223.
- KAWAGUCHI, S., HIRUKI, T., HARADA, T. Y MORIKAWA, S. 1980. Frequencies of cell-surface or cytoplasmic IgM-bearing cells in the spleen, thymus and peripheral blood of the snake, *Elaphe quadrigata*. *Developmental and Comparative Immunology*. 4: 559-564.
- KÉLENYI, G. Y NEMETH, A. 1969. Comparative histochemistry and electron microscopy of the eosinophil leukocytes of vertebrates. I. Study of avian, reptile, amphibian and fish leukocytes. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 20 (4): 405-422.
- KELLER, J. M., KUCKLICK, J. R. Y MCCLELLAN-GREEN, P. D. 2004. Organochlorine contaminants in loggerhead sea turtle blood: Extraction techniques and distribution among plasma and red blood cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46: 254-264.
- KHALIL, F. 1947. Excretion in reptiles. I. Nonproteic nitrogen constituents of the urine of the sea turtle *Chelonia mydas* L. *Journal of Biological Chemistry*, 171: 611-616.

- KHALIL F. Y ABDEL-MESSIEH, G. 1963. Tissue constituents of reptiles in relation to their mode of life. III. Nitrogen content and serum proteins. *Compendium Biochemical Physiology*, May; 34: 75-79.
- KNOTKOVA, Z., DOUBEK, J., KNOTEK, Z. Y HAJKOVA, P. 2002. Blood Cell Morphology and Plasma Biochemistry in Russian Tortoises (*Agrionemys horsfieldi*). *Acta veterinaria Brunensis*, 71: 191-198.
- KOPPLIN, R. P., TARR, R. S. Y IVERSON, C. N. M. 1983. Serum profile of the iguanid lizard (*Dipsosaurus dorsalis*). *Journal of Zoo Animal Medicine*, 14: 30-32.
- KREGER, M. D. Y MENCH, J. A. 1993. Physiological and behavioral effects of handling and restraint in the ball python (*Python regius*) and the blue-tongued skink (*Tiliqua scincoides*). *Applied Animal Behavior Science*, 38: 323-336.
- LAIRD, N. M. Y WÄRE, J. H. 1982. Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics*; 38, 963-974.
- LAMIRANDE, E. W., BRATTHAUER, A. D., FISHER, D. C. Y NICHOLS, D. K. 1999. Reference hematology and plasma chemistry values of brown tree snakes (*Boiga irregularis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 30: 516-520.
- LANCE, V. A. 1990. Stress in reptiles. *Progress in Comparative Endocrinology*, 342: 461-466.
- LASSEN, E. D. Y WEISER, G. 2004. Laboratory technology for veterinary medicine. En: M. A. Thrall, D. L. Baker, T. W. Campbell, D. Denicola, M. J. Fettman, E. D. Lassen, A. Rebar & G. Weiser (Eds.). *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 3-38.
- LAWRENCE, K. 1987. Seasonal variation in blood biochemistry of long term captive Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *T. hermanni*). *Research in Veterinary Science*, 43: 379-383.
- LAWRENCE, K. Y HAWKEY, C. 1986. Seasonal variations in haematological data from mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*) in captivity. *Research in Veterinary Science*, 40: 225-230.
- LAWTON, M. P. C. 1991. Reptiles part two: Lizards and snakes. En: P. H. Beynon & J. E. Cooper (Eds.). *Manual of Exotic Pets*. British Small Animal Veterinary Association, Iowa State University Press/Ames: 244-260.
- LEBLANC, C. J. 2001. Clinical Differentiation of Chinese Water Dragon, *Physignathus* spp., Leukocytes. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 11 (3): 31-32.
- LESLIE, G. A. Y CLEM, L. W. 1972. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. 6. 17S, 75S and 5. 7S anti-DNP of the turtle, *Pseudemys scripta*. *Journal of Immunology*, 108 (6): 1656-1664.
- LEWIS, A. V. 1964. Fisheries report for the period 1962-1964. Annual Report on the Agricultural Department 1962-1964.
- LLOYD, M. L. 2003. Crocodilia (Crocodiles, alligators, gavials and cayman). En: M. E. Fowler & R. E. Miller (Eds.). *Zoo and Wild Animal Medicine*. Saunders, 5<sup>th</sup> edition: 59-70.
- LÓPEZ-OLVERA, J. R., MONTANÉ, J., MARCO, I., MARTÍNEZ-SILVESTRE, A., SOLER, J. Y LAVÍN, S. 2003. Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). *Journal of Wildlife Diseases*, 39(4): 830-836.
- LUCAS, A. J. Y JAMROZ, C. 1961. Atlas of avian hematology. United States Department of Agriculture, Monograph nº 25. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture: 1-181.
- LUMEIJ, J. T. 1997. Avian clinical biochemistry. En: J. J. Kanako, W. J. Harvey & M. L. Bruss (Eds.). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, New York: 857-883.
- LUTZ, P. 1990. Studies on the ingestion of plastic and latex by sea turtles. En: R. S. Shomura & M. L. Godfrey (Eds.). *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Conference on Marine Debris*, National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum NMFS-SWFS-154, 2-7 Abril, Honolulu, Hawaii: 719-735.

## Bibliografía

- LUTZ, P. L. Y DUNBAR-COOPER, A. 1984. Effect of forced submergence and low seawater temperature on the physiology and behavior of sea turtles. *Final report to National Marine Fisheries Service*, Contract FSE 81: 125-160.
- LUTZ, P. L. Y DUNBAR-COOPER, A. 1987. Variations in the blood chemistry of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Fishery Bulletin*, 85(1): 37-43.
- LUTZ, P. L. Y LAPENNAS, G. N. 1982. Effects of pH, CO<sub>2</sub> and organic phosphates on oxygen affinity on sea turtles hemoglobins. *Respiration Physiology*, 48: 75-87.
- MACMAHON, J. A. Y HOMER, A. H. 1975. Hematology of the sidewinder (*Crotalus cerastes*). *Comparative biochemistry and Physiology A*, 51: 53-58.
- MADER, D. R., HORVATH, C. C. Y PAUL-MURPHY, J. 1985. The hematocrit and serum profile of the gopher snake (*Pituophis melanoleucus catenifer*). *Journal of Zoo Animal Medicine*, 16: 139-140.
- MAHAPATRA, M. S., MAHATA, S. K. Y MAITI, B. R. 1991. Effect of stress on serotonin, norepinephrine, epinephrine and corticosterone contents in the soft-shelled turtle. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 18 (10): 719-724.
- MANSOUR, M. H., EL RIDI, R. Y BADIR, N. 1980. Surface markers of lymphocytes in the snake, *Spalerosophis diadema*. I. Investigations of lymphocyte surface markers. *Immunology*, 40: 605-613.
- MARKS, S. K. Y CITINO, S. B. 1990. Hematology and serum chemistry of the radiated tortoise (*Testudo radiata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 21: 342-344.
- MARTIN, D.R. 1972. Distribution of helminth parasites in turtles native to southern Illinois. *Transactions of the Missouri Academy of Science. Missouri Academy of Science*, 65, 1-67.
- MARTÍNEZ-SILVESTRE, A. 1994. Manual Clínico de Reptiles. Grass-Iatros Ediciones, Barcelona: 41-42.
- MARTÍNEZ-SILVESTRE, A., LAVÍN, S. Y CUENCA, R. 2011. Hematology and blood cytology in reptiles. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 31(3); 131-141.
- MARTÍNEZ-SILVESTRE, A., MARCO, I., RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ, M. A., LAVÍN, S. Y CUENCA, R. 2005. Morphology, cytochemical staining and ultrastructural characteristics of the blood cells of the giant lizard of El Hierro (*Gallotia simonyi*). *Research of Veterinary Science*, 78(2): 127-134.
- MATEO, M. R., ROBERTS, E. D. Y ENRIGHT, F. M. 1984. Morphologic, cytochemical and functional studies of peripheral blood cells of young healthy american alligators (*Alligator mississippiensis*). *American Journal of Veterinary Research*, 45: 1046-1053.
- MATHES, K. A., HOLZ, A. Y FEHR, M. 2005. Blood reference values of four species of terrestrial tortoises (*Testudo* spp.) in Germany. *Proceedings of the Twelfth Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, Arizona: 55-59.
- MAUTINO, M. Y PAGE, C. D. 1993. Biology and medicine of turtles and tortoises. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 23(6): 1251-1270.
- MAXWELL, M. H. 1984. Histochemical identification of tissue eosinophils in the inflammatory response of the fowl *Gallus domesticus*. *Research in Veterinary Science*, 37: 7-11.
- MCARTHUR, S. 1996. Laboratory tests and suitable samples. En: S. McArthur (Ed.). *Veterinary management of tortoises and turtles*. Blackwell Science, Ltd.: 116-118.
- MCARTHUR, S., WILKINSON, R. J. Y BARROWS, M. G. 2002. Tortoises and turtles. En: A. Meredith & S. Redrobe (Eds.). *Manual of exotic pets*. British Small Animal Veterinary Association, 4<sup>th</sup> edition: 208-222.
- MCCRACKEN, H. 1993. Avian and reptilian hematology and biochemistry. *Proceedings 207: Clinical pathology*. Post Graduate Committee in Veterinary Science, University of Sidney: 243-305.

- MCGEHEE, M. A. 1979. Factors affecting the hatching success of Loggerhead Sea Turtle eggs (*Caretta caretta caretta*). Masters thesis, University of Central Florida, Orlando.
- MEAD, K. F., BORYSENKO, M. Y FINDLAY, S. R. 1983. Naturally abundant basophils in the snapping turtle possess cytophilic surface antibody with reaginic function. *Journal of Immunology*, 130: 334-340.
- MEAD, K. F. Y BORYSENKO, M. 1984A. Surface immunoglobulins on granular and agranular leukocytes in the thymus and spleen of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Developmental and Comparative Immunology*, 8:109-120.
- MEAD, K. F. Y BORYSENKO, M. 1984B. Turtle lymphocyte surface antigens in *Chelydra serpentina* as characterized by rabbit anti-turtle thymocyte sera. *Developmental and Comparative Immunology*, 1: 217-230.
- MICHELS, N. A. 1923. The mast cell in lower vertebrates. *La Cellule*, 33: 337-462.
- MILLAN, J. M., JANMAAT, A., RICHARDSON, K. C., CHAMBERS, L. K. Y FOMIATTI, K. R. 1997. Reference ranges for biochemical and haematological values in farmed saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) yearlings. *Australian Veterinary Journal*, 75: 814-817.
- MILLER, M. R. Y WURSTER, D. H. 1956. Studies on the blood glucose and pancreatic islets of lizards. *Endocrinology*, Jan; 58(1): 114-120.
- MITCHELL, M. A. 1996. Characteristics of the inflammatory response in the green iguana, *Iguana iguana*. *Proceedings of the Third Annual Conference of Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 125-126.
- MITCHELL, M. A. 2001. Reptile clinical pathology. *The North American Veterinary Conference*, 15: 808-809.
- MOBERG, G. P. 1985. Biological response to stress: key to assessment of animal wellbeing. En: G. P. Moberg (Ed.). *Stress in animals*. American Physiological Society, Bethesda, Md.: 27-51.
- MOHANTY-HEJMADI, P., DIMOND, M. T. Y JANUNGO, J. 1984. Biochemical constituents of serum of young female hatchlings of olive ridley *Lepidochelys olivacea*. *Marine Turtle Newsletter*, 27: 4-5.
- MOLONEY, W. C., MCPHERSSON, K. Y FLIEGERMAN, L. 1960. Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 8: 200.
- MONTALI, R. J. 1988. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of Comparative Pathology*, 99(1): 1-26.
- MONTILLA-FUENMAYOR, A. J., HERNÁNDEZ-RANGEL, J. L. Y ALVARADO-ÁRRAGA, M. C. 2006. Valores hematológicos de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) presente en la Alta Guajira. *Revista científica*, 16(3): 219-226.
- MUNDAY, K. A. Y BLANE, G. F. 1961. Cold stress of the mammal, bird and reptile. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2, 8-21.
- MURO, J., CUENCA, R. Y VIÑAS, L. 1994. Interés del hemograma en la clínica de quelonios. *Veterinaria en praxis*, 9 (3): 24-29.
- MURO, J., CUENCA, R., PASTOR, J., VINAS, L. Y LAVIN, S. 1998. Effects of lithium heparin and tripotassium EDTA on haematologic values of Hermann's tortoises *Testudo hermanni*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 29(1), 40-44.
- MURRAY, M. J. 1996. Cardiology and circulation. En: D. Mader (Ed.). *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 95-104.
- MUSSACHIA, X. J. Y SIEVERS, M. L. 1956. Effects of induced cold torpor on blood of *Chrysemys picta*. *American Journal of Physiology*, 187: 99.
- NAKAMURA, K. 1980. Carotenoids in serum of Pacific green turtle *Chelonia mydas*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 46, 909-910.

## Bibliografía

NATT, M. P. Y HERRICK, C. A. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. *British poultry science*, 31: 735.

NEGM, H. Y MANSOUR, M. H. 1983. Phylogenesis of lymphocyte diversity. II. Characterization of *Agama stellio* Ig-negative lymphocytes by a heterologous anti-thymocyte serum. *Developmental and Comparative Immunology* 7: 507-516.

NEIFFER, D.L., LYDICK, D., BURKS, K. Y DOHERTY, D. 2005. Hematology and plasma biochemical changes associated with fenbendazole administration in Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36(4): 661-672.

NOBLE, G. K. 1931. The biology of the amphibia. New York, NY. McGraw-Hill Book Company: 1-577.

NORTON, T. M., JACOBSON, E. R. Y SUNDBERG, J. P. 1990. Cutaneous fibropapillomas and renal myxofibroma in a green turtle, *Chelonia mydas*. *Journal of Wildlife Diseases*, 26(2): 265-270.

O'CONNOR, M. P., GRUMBLES, J. S., GEORGE, R. H., ZIMMERMAM, L. C. Y SPOTILA, J. 1994. Potential hematological and biochemical indicators of stress in free-ranging desert tortoises exposed to a hydric stress gradient. *Herpetological Monographs*, 8: 5-26.

OTIS, V. S. 1973. Hemocytological and serum chemistry parameters of the african puff adder, *Bitis arietans*. *Herpetologica*, 29:110.

OYEWALE, J. O., EBUTE, C. P., OGUNSANMI, A. O., OLAYEMI, F. O. Y DUROTOYE, L. A. 1998. Weights and blood profiles of the West African Hinge-backed tortoise *Kinixys erosa* and the desert tortoise *Gopherus agassizii*. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A*, 45(10), 599-605.

PALOMEQUE, J., SESE, P. Y PLANAS, J. 1977. Respiratory properties of the blood of turtles. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 57 (4): 479-484.

PELLIZOON, C. H., AZEVEDO, A., CASALETTI, L. Y LUNARDI, L. O. 2002. The thrombocyte aggregation process in the turtle *Phrynops hilarii* (Chelonia). An ultrastructural study. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, Jul; 34(3): 323-327.

PEÑA-ROCHE, H. 1939. Contribuciones a la morfología comparada de la fauna chilena II. Estudios hematólogicos en las especies *Liolaemus nigromaculatus* (Philippi) y *Liolaemus pictus* (Duméril y Bribon). *Boletín Sociedad Biología*, 13, 133-146.

PERPIÑÁN, D., HERNÁNDEZ-DIVERS, S. M., LATIMER, K. S., AKRE, T., HAGEN, C., BUHLMANN, K. A. Y HERNÁNDEZ-DIVERS, S. J., 2008. Hematology of the Pascagoula Map Turtle (*Graptemys gibbonsi*) and the southeast Asian box turtle (*Cuora amboinensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 39(3): 460-463.

PETRUZZELLI, R., AURELI, G., LAMA, A., GALTIERI, A., DESIDERI, A. Y GIARDINA, B. 1996. Diving behavior and hemoglobin function: the primary structure of the  $\alpha$  - and  $\beta$ -chains of the sea turtle (*Caretta caretta*) and its functional implications. *Journal of Biochemistry*, 316: 959-965.

PIENAAR, V. DE V. 1962. Haematology of some South African reptiles. Johannesburg, Witwatersrand, University Press: 1-299.

PITCHAPPAN, R. M. Y MUTHUKKARUPPAN, V. R. 1977. Analysis of the development of the lizard, *Calotes versicolor*. II. Histogenesis of the thymus. *Developmental and Comparative Immunology*, 1: 217-230.

PITOL, D. L., ISSA, J. P. M., CAETANO, F. H. Y LUNARDI, L. O., 2008. Mononuclear phagocytes in the blood of turtles characterized by ultrastructural and cytochemical analyses and by phagocytic activity. *Micron*, 39; 1288-1292.

RAITI, P. 2002. Snakes. En: A. Meredith & S. Redrobe (Eds.). Manual of exotic pets. British Small Animal Veterinary Association. 4<sup>th</sup> edition: 241-256.

- RAITI, P. Y HARAMATI, N. 1997. Magnetic resonance imaging and computerised tomography of a gravid leopard tortoise (*Geochelone pardalis pardalis*) with metabolic bone disease. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 28(2), 189-197.
- RAMSAY, E. C. Y DOTSON, T. K. 1995. Tissue and serum enzyme activities in the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). *American Journal of Veterinary Research*, 56: 423-428.
- RAPHAEL, B. L. 2003. Chelonians (Turtles and Tortoises). En: M. E. Fowler & R. E. Miller (Eds.). *Zoo and Wild Animal Medicine*. Saunders, 5<sup>th</sup> edition: 48-58.
- RAPHAEL, B. L., KLEMENS, M. W., MOEHLMAN, E., DIERENFELD, E. Y KARESH, W. B. 1994. Blood values in free-ranging pancake tortoises (*Malacochersus tornieri*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 25: 63-67.
- RASKIN, R. E. 2000. Reptilian complete blood count. En: A. M. Fudge (Ed.). *Laboratory medicine (avian and exotic pets)*. W.B. Saunders Company: 193-197.
- RASKIN, R. E. 2010. Cytochemical staining. En: D. J. Weiss & K. J. Wardrop (Eds.). *Schalm's Veterinary Hematology* 6th ed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA: 1141-1156.
- REDROBE, S. Y MACDONALD, J. 1999. Sample collection and clinical pathology of reptiles. *Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 2: 709-730.
- RODNAN, G. P., EBAUGH, F. G. JR. Y FOX, M. R. 1957. The life span of the red blood cell and the red blood cell volume in the chicken, pigeon, and duck as estimated by the use of  $\text{Na}_2\text{Cr}_{51}\text{O}_4$  with observations on red cell turnover rate in the mammal, bird and reptile. *Blood*, 12: 355-366.
- ROSENTHAL, K. L. 2002. Clinical pathology of the green iguana. *The North American Veterinary Conference*, 16: 940-942.
- ROSSKOPF, W. J. 1982. Normal haemogram and blood biochemistry values for Californian desert tortoises. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician*, January: 85-87.
- ROSSKOPF, W. J. 2000. Disorders of reptilian leukocytes and erythrocytes. En: A. M. Fudge (Ed.). *Laboratory medicine (avian and exotic pets)*. W.B. Saunders Company: 198-204.
- ROSSKOPF, W. J., WOERPEL, R. W. Y YANOFF, S. R. 1982. Normal hemogram and blood chemistry values for boa constrictors and pythons. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician*, May: 822-823.
- RYERSON, D. L. 1943. Separation of the two acidophilic granulocytes of turtle blood, with suggested phylogenetic relationships. *The Anatomical Record*, 85: 25-48.
- RYERSON, D. L. 1949. A preliminary survey of reptilian blood. *Journal of Entomology & Zoology*, 41: 49-55.
- SAAD, A. H. 1988. Corticosteroids and immune systems of non mammalian vertebrates: A review. *Developmental and Comparative Immunology*, 12 (3): 481-494.
- SAAD, A. H. Y EL RIDI, R. 1988. Endogenous corticosteroids mediate seasonal cyclic changes in immunity of lizards. *Immunobiology*, 177 (4-5): 390-403.
- SAINT GIRONS, M. C. 1970. Morphology of the circulating blood cells. En: C. Gans & T. C. Parsons (Eds.). *Biology of the reptilia*, Vol 3-C, Morphology. New York, NY; Academic Press: 73-91.
- SAINT GIRONS, M. C. Y DUGUY, R. 1963. Notes de cytologie sanguine comparee sur les reptiles de France. *Buletin of Zoology of France*, 88: 613-624.
- SALAKIJ, C., SALAKIJ, J., APIBAL, S., NARKKONG, N-A, CHANHOME, L. Y ROCHANAPAT, N. 2002. Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*). *Veterinary Clinical Pathology*, 31 (3): 116-126.
- SALAKIJ, C., SALAKIJ, J., PRIHIRUNKIT, K., NARKKONG, N. A., SANYATHITISEREE P. Y KRANJANAPITUKKUL K., 2014. Quantitative and qualitative morphologic, cytochemical and ultrastructural characteristics of blood cells in captive Asian water monitors. *Veterinary Clinical Pathology*, Dic; 43(4): 538-546.



## Bibliografía

SALGUES, R. 1937. Faune des ophidiens de Provence. *Bulletin Annual Société Histoire Naturel de Toulon*, 21 :130-150.

SAMOUR, H. J., HAWKEY, C. M., PUGSLEY, S. Y BALL, D. 1986. Clinical and pathological findings related to malnutrition and husbandry in captive giant tortoises (*Geochelone* species). *The Veterinary Record*, 118: 299-301.

SCHUMACHER, J., JACOBSON, E. R., HOMER, B. L. Y GASKIN, J. M. 1994. Inclusion body disease in boid snakes. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 25: 511-524.

SEIDEL, M. E. 1974. Seasonal fluctuation of plasma protein in the spiny softshell turtle *Trionyx spinifera*. *Herpetologica*, 30(3), 283-285.

SEIDEL, M. E. 2003. Hemoglobin variation and comments on systematic relationship in the turtle family Emydidae. *Copeia*, 4: 1118-1121.

SEKIZAWA, A., FUJII, T. Y TOCHINAI, S. 1984. Membrane receptors on *Xenopus* macrophages for two classes of immunoglobulins (IgM and IgY) and the third complement component (C3). *Journal of Immunology*, 133: 1431-1435.

SEMPLE, R. E., SIGSWORTH, D. Y TITT, J. T. 1970. Seasonal observations on the plasma, red blood cells and blood volume of two turtle species natives to Ontario. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 48 (5): 282-290.

SENIOW, A. 1963. Paper electrophoresis of serum proteins of the grass snake *Natrix natrix* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 9: 137-149.

SHEEHAN, H. L. Y STOREY, G. W. 1947. An improved method of staining leukocyte granules with sudan black B. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 59: 336.

SHEELER, P. Y BARBER, A. A. 1964. Comparative hematology of the turtle, rabbit and rat. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 11: 139-45.

SIMPSON, C. F. Y HARVEY, J. W. 1980. Noncrystalline inclusions in erythrocytes of a rhinoceros iguana. *Veterinary Clinical Pathology*, 9: 24-26.

SMITH, C. R., HANCOCK, A. L. Y TURNBULL, B. S. 2000. Comparison of white blood cell counts in cold-stunned and subsequently rehabilitated loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Proceedings of the Joint Conference of the American Association of Zoo Veterinarians and International Association for Aquatic Animal Medicine*: 50-53.

STEIN, G. 1996. Hematologic and blood chemistry values in reptiles. En: D. R. Mader (Ed.). *Reptile medicine and surgery*. W.B. Saunders Company: 473-477.

STEINGBER, J. D. Y OLVER, C. S. 2005. Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 34, 23-27.

STENROSS, O. O. Y BOWMAN, V. M. 1968. Turtle blood. I. Concentrations of various constituents. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 25: 219-22.

SUEDMEYER, W. K. 1991. Iron deficiency in a group of American alligators: diagnosis and treatment. *Journal of Small and Exotic Animal Medicine*, 1: 69-72.

SUN, T. 1985. Atlas of cytochemistry and immunochemistry of hematologic neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago: 264.

SWIMMER, J. Y. 2000. Biochemical responses to fibropapilloma and captivity in the green turtle. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(1): 102-110.

- SYPEK, J. P., BORYSENKO, M. Y FINDLAY, S. R. 1984. Anti-immunoglobulin induced histamine release from naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Developmental and Comparative Immunology*, 8: 359-366.
- SYPEK, J. P. Y BORYSENKO, M. 1988. Reptiles. En: A. F. Rowley & N. A. Ratcliffe (Eds.). *Vertebrate blood cells*. Cambridge, Cambridge University Press: 211-256.
- TAYLOR, K. W. Y JACOBSON, E. R. 1982. Hematology and serum chemistry of the gopher tortoise *Gopherus polyphemus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 72(A): 425-428.
- TAYLOR, K. W. Y KAPLAN, H. M. 1961. Light microscopy of the blood cells of Pseudemyd turtles. *Herpetologica*, 17: 186-192.
- TAYLOR, K. W., KAPLAN, H. M. Y HIRANO, T. 1963. Electron microscopic study of turtle blood cells. *Cytologia*, 28: 248-256.
- TERCAFS, R. R., SCHOFFENIELS, E. Y GOUSSEF, G. 1963. Blood composition of a sea-turtle *Caretta caretta* L., reared in fresh water. *Archives internationales de Physiologie et Biochimie*, 71: 614-615.
- THORSON, T. B. 1968. Body fluid partitioning in fresh water, marine and terrestrial chelonia. *American Zoology*, 3: 529.
- TROIANO, J. C. Y SILVA, M. C. 1998. Valores hematológicos de referencia en tortuga terrestre argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*). *Analecta Veterinaria*, 18, 1/2: 47-51.
- TROIANO, J. C., SILVA, M. C., ESARTE, M., MÁRQUEZ, A. G. Y MIA, G. 1996. Valores hematológicos de las especies argentinas del género Caiman (*Crocodylia-Alligatoridae*). *Facena*, 12: 111-118.
- TROIANO, J. C., VIDAL, J. C., GOULD, J. Y GOULD, E. 1997. Haematological reference intervals of the south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) in captivity. *Comparative Haematology International*, 1: 109-112.
- TSAI, C. Y., YU, J. F., WANG, Y. W., FAN, P. C., CHENG, T. Y. Y WANG, L. C. 2014. An alternative staining method for counting red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*) blood cells using crystal violet in cells diluted with 0,45% sodium chloride. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(5): 610-615.
- TURNBULL, B. S., SMITH, C. R. Y STAMPER, M. A. 2000. Medical implications of hypothermia in threatened loggerhead (*Caretta caretta*) and endangered kemp's ridley (*Lepidochelys kempi*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Proceedings of the Joint Conference of the American Association of Zoo Veterinarians and International Association for Aquatic Animal Medicine*, New Orleans, L.A., 16-21 September: 31-35.
- University of Miami, Avian and Wildlife Laboratory, 1996. En: *Exotic companion medicine handbook for veterinarians*.
- VARELA, R. A. 1997. The immunology of green turtle fibropapillomatosis. M. S. Thesis, Florida Atlantic University, Boca Raton, Florida: 37.
- VERMA, G. K. Y BANERJEE, V. 1980. The leukocytes of a common Indian turtle, *Trionyx gangeticus*. *Annals of Zoology*, 14: 33-46.
- VIVES, J. L Y AGUILAR, J. L 1988A. La sangre, características generales y métodos de extracción sanguínea. Empleo de anticoagulantes. En: J. L. Vives y J. L. Aguilar (Eds.). *Manual de técnicas de laboratorio en hematología*. Salvat Editores, S. A., Barcelona: 1-19.
- VIVES, J. L Y AGUILAR, J. L 1988B. Métodos citoquímicos y otros procedimientos generales de estudio leucocitario. En: J. L. Vives y J. L. Aguilar (Eds.). *Manual de técnicas de laboratorio en hematología*. Salvat Editores, S. A., Barcelona: 141-158.
- WALLACH, J. D. Y BOEVER, W. J. 1983. *Diseases of exotic animals: medical and surgical management*. Philadelphia, W. B. Saunders Company: 979-1047.

## Bibliografía

- WANG, T., BRAUNER, C. J. Y MILSOM, W. K. 1999. The effect of isovolemic anemia on blood and red-cell triphosphate concentrations in the painted turtle (*Chrysemys picta*). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 122: 341-345.
- WATSON, J. 1997. Diagnostic procedures: Hematology. En: L. Ackerman (Ed.). The biology, husbandry and health care of reptiles. Volume III: The health care of reptiles. T.F.H. Publications, INC. United States of America: 703-713.
- WHITAKER, B. R. Y KRUM, H. 1999. Medical management of sea turtles in aquaria. En: M. E. Fowler & R. E. Miller (Eds.). Zoo & Wild Animal Medicine. Current Therapy Vol. IV. W. B. Saunders Company, Philadelphia: 217-231.
- WHITMORE, C. P. 1994. Mitigation of negative impact of tourism on nesting beaches and turtles in Turkey. En: B. A. Schroeder & B. E. Witherington (compilers). *Proceedings of 13<sup>th</sup> Annual Symposium Sea Turtle Biology and Conservation*. National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum NMFS-SEFSC-341, Miami, Florida: 190.
- WILKINSON, R. 2004. Clinical Pathology. En: S. McArthur, R. Wilkinson & J. Meyer (Eds.). *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Blackwell Publishing: 141-186.
- WILL, R. 1978. The structural transformation of phagocytic cells, an old phylogenetic principle-Part 1: The monocyte. En: *Veterinary Medical Review*, N° 2. N. G. Elwert Universitäts und Verlagsbuchhandlung, Marburg-Lahn: 204-211.
- WILL, R. 1979. The structural transformation of phagocytic cells, an old phylogenetic principle-Part I: The heterophil granulocyte [presented with reference to the lizards (reptilia, squamata, lacertidae)]. *Veterinary Medicine Review*, 1: 49-58.
- WILLARD, M. D. Y TVEDTEN, H. 2004. The complete blood count and bone marrow examination: General comments and selected techniques. En: Willard & Tvedten (Eds.). *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 4 th edition. Saunders Company: 14-37.
- WILLIAMS, W. J., BEUTLER, E., ERSLEV, A. J. Y RUNDLES, R. W. 1972. Hematology. McGraw-Hill Book Co., New York.
- WINTROBE, M. M. 1933. Variations in the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematology*, 51: 32-49.
- WOLKE, R. E., BROOKS, D. R. Y GEORGE, A. 1982. Spirochidiasis in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): Pathology. *Journal of Wildlife Diseases*, 18: 175-185.
- WOLMAN, M. 1971. Amyloid its nature and molecular structure: Comparison of a new toluidine blue polarised light method with traditional procedures. *Laboratory Investigation*, 25: 104-110.
- WOOD, F. E. Y EBANKS, G. K. 1984. Blood cytology and hematology of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Herpetologica*, 40: 331-336.
- WORK, T. M. Y BALAZS, G. H. 1998. Causes of sea turtles mortality in Hawaii. S. P. Epperly & J. Braun (comps.). *Proceedings of the seventeenth annual symposium on sea turtle biology and conservation*. U. S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum, NMFS-SEFSC-415, Miami, Florida: 291-292.
- WORK, T. M. Y BALAZS, G. H. 1999. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(4): 804-807.
- WORK, T. M., RAMEYER, R. A., BALAZS, G. H., CRAY, C. Y CHANG, S. P. 2001. Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(3): 574-581.
- WORK, T. M., RASKIN, R. E., BALAZS, G. H. Y WHITTAKER, S. D. 1998. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. *American Journal of Veterinary Research*, 59(10): 1252-1257.

- WRIGHT, A. Y COOPER, E. L. 1981. Temperature effects on ectotherm immune responses. *Developmental and Comparative Immunology*, 5 Suppl. 1: 117-122.
- WRIGHT, K. M. Y SKEBA, S. 1992. Hematology and plasma chemistries of captive prehensile-tailed skinks (*Corucia zebrata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 23: 429-432.
- YAM, L. T., LI, C. Y. Y CROSBY, W. H. 1971. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *American Journal of Clinical Pathology*, 55: 283-290.
- YAM, L. T., LI, C. Y., WOLFE, N. J. Y MOY, P. W. 1974. Histochemical study of acute leukemia. *Archives of Pathology*, 97: 129.
- YANG, P., YU, P., WU, S. Y CHIE, C. 2014. Seasonal hematology and plasma biochemistry reference range values of the yellow-marginated box turtle (*Cuora flavomarginata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45(2): 278-286.
- ZAIN-UL-ABEDIN, M. O. Y QAZI, M. H. 1965. Blood sugar levels of some reptiles found in Pakistan. *Canadian Journal of Biochemistry*, Jun; 43(6): 831-833.
- ZAPATA, A., LECETA, J. Y BARRUTIA, M. G. 1981. Ultrastructure of splenic white pulp of the turtle *Mauremys caspica*. *Cell and Tissue Research*, 220 (4): 845-855.
- ZIMMERMAN, L. M., VOGEL, L. A., EDWARDS, K. A. Y BOWDEN, R. M. 2010. Phagocytic B cells in a reptile. *Biology Letters*, Apr, 23; 6(2): 270-273.

## *Bibliografía*



