

HEMOGRAMA Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE TORTUGA GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*) DE OAXACA, MÉXICO

Hemogram and Morphological Characteristics of Blood Cells in the Olive Ridley Turtle (*Lepidochelys olivacea*) of Oaxaca, México

Luz María Ramírez Acevedo, Selene Soledad Martínez Blas y Gisela Fuentes-Mascorro*

Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal (LIRA), Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. *lirauabjo@gmail.com

RESUMEN

Con la finalidad de conocer los valores del hemograma y las características morfológicas de las células sanguíneas de tortugas Golfinas se obtuvo sangre de 22 tortugas marinas *Lepidochelys olivacea* de vida libre en la playa Barra de la Cruz, municipio de Santiago Astata del estado de Oaxaca, México, que al examen físico no presentaron alteraciones. La toma de muestra se practicó a la mitad del desove, a cada una se le realizó un hemograma, del que se obtuvieron los siguientes resultados: hematocrito ($0,30 \pm 0,04$ L/L), proteínas totales ($47,14 \pm 5,85$ g/L), volumen globular medio VGM ($891,79 \pm 291,93$ fL), eritrocitos totales ($0,37 \pm 0,12 \times 10^{12}$ /L), leucocitos totales ($4,51 \pm 3,03 \times 10^9$ /L), conteo diferencial de leucocitos: heterófilos $2,87 \pm 1,88 \times 10^9$ /L, eosinófilos $0,89 \pm 0,68 \times 10^9$ /L, basófilos $0,08 \times 10^9$ /L, linfocitos $0,64 \pm 0,59 \times 10^9$ /L, monocitos $0,07 \times 10^9$ /L y la estimación del número de trombocitos (127 ± 47). Se describen también las principales características morfológicas como: tamaño, forma y coloración detectándose escasas diferencias morfológicas de las células sanguíneas en comparación con las de otras especies de tortugas marinas.

Palabras clave: Tortugas marinas, hematología, *Lepidochelys olivacea*, sangre.

ABSTRACT

In order to evaluate the hemogram values and the morphological characteristics of blood cells in Olive Ridley turtle, from 22 physically healthy marine turtles *Lepidochelys olivacea* living in

the wild at the beach in Barra de La Cruz, Municipality of Santiago Astata in the State of Oaxaca, Mexico. The sampling was obtained during spawning, and hemogram was performed on each one, from which the following results were obtained: hematocrit (0.30 ± 0.04 L/L), total protein (47.14 ± 5.85 g/L), mean corpuscular volume (MCV) (891.79 ± 291.93 fL), total erythrocytes ($0.37 \pm 0.12 \times 10^{12}$ /L), total leukocytes ($4.51 \pm 3.03 \times 10^9$ /L), differential leukocyte count: heterophils $2.87 \pm 1.88 \times 10^9$ /L, eosinophils $0.89 \pm 0.68 \times 10^9$ /L, basophils 0.08×10^9 /L, lymphocytes $0.64 \pm 0.59 \times 10^9$ /L, and the estimate of the number of thrombocytes (127 ± 47). The main morphological characteristics were also described: size, shape, and color; scarce morphological differences of the blood cells in contrast to other marine turtle specimens were detected.

Key words: Sea turtle, hematology, Olive Ridley, blood.

INTRODUCCIÓN

La tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, se encuentra catalogada como vulnerable en la lista de roja de la Unión internacional para la conservación de la naturaleza [12] y en el apéndice uno de la convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre, lo que la sitúa como una especie en peligro de extinción [10]. Este organismo, fue depredado por la comercialización del caparazón y carne en las décadas de los sesenta, setenta y ochenta, principalmente por la empresa Impulsora de Oaxaca (PIOSA), que sacrificaba un promedio de 80 tortugas por hora [15], actualmente se ha determinado la comercialización ilícita de 12 a 15 toneladas de huevo de tortuga marina, extraído de la playa de anidación de Morro Ayuta en Oaxaca [9].

El ciclo de vida de las tortugas marinas adultas consiste en migrar, de las zonas de alimentación a las de anidación, para la temporada reproductiva. Las costas de Oaxaca, México, son zonas de reproducción de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea*, laúd *Dermochelys coriacea* y en menor proporción de prieta *Chelonia agassizii*. Las tortugas prieta y laúd, pueden ser vistas desovando en las playas de Oaxaca de noviembre a febrero de cada año [15]. La tortuga golfina presenta dos tipos de anidación en Oaxaca, la primera se da durante todo el año, en prácticamente todas las Playas de Oaxaca, sale solo una tortuga golfina a desovar, la otra forma de anidación se presenta de junio a febrero de cada año [1], en las playas de La Escobilla y Morro Ayuta, en Oaxaca, México y se denomina "arribada" o "arribazón" [15], consiste en la salida de cientos a miles de tortugas golfinas, que salen de manera continua e ininterrumpida a desovar en el transcurso de tres a cinco días [16, 26]. Frente a la costa se pueden observar a las hembras y machos apareándose, durante la temporada reproductiva, las hembras salen del mar, buscan en la playa el espacio adecuado para hacer su nido, desovan, tapan el nido y regresan al mar. Para extraer la muestra de sangre, primero se debe obtener el permiso de las autoridades federales, posteriormente se recorre la playa, preferentemente de noche, que es cuando sale un mayor número de hembras, se localiza a la hembra cuando va subiendo en busca de la zona con humedad adecuada para desovar, se espera a que construya el nido e inicie a desovar, durante este espacio de tiempo, la hembra mantiene una conducta de quietud, que es aprovechada para localizar el seno yugular para extraer la muestra de sangre y realizar las mediciones necesarias, se debe esperar a que termine de desovar, tape el nido e inicie su retorno al mar, para proceder a su pesaje, en este punto se coloca sobre su camino un arnés extendido y una vez que la tortuga está sobre él, entre dos personas levantan el arnés, dejando libres las aletas, para evitar lastimarla, se coloca el arnés en el gancho de la báscula y se registra el peso, una vez concluido, se baja el arnés y se deposita en la arena para que la hembra sola continúe su retorno al mar, se debe guardar en todo momento la integridad de la hembra. En las playas de anidación, la población de tortugas que salen a desovar está constituida de hembras adultas en edad reproductiva, rara vez los machos salen a la playa [16].

En especies que se encuentran en peligro de extinción es imprescindible contar con herramientas de diagnóstico que permitan precisar el estado de salud; para las tortugas marinas se emplea la revisión física, se recorre de manera visual al animal y se reporta la integridad del caparacho, el plastrón, y la presencia de parásitos o crecimientos anormales.

Para comparar los valores hematológicos de las tortugas marinas se cuenta con el sistema de información internacional de especies (ISIS), por sus siglas en inglés, sin embargo, debido a que se está hablando de un reptil en una etapa fisiológica específica, los valores hematológicos son diferentes. La san-

gre de las tortugas contiene los siguientes tipos celulares: eritrocitos, leucocitos (granulocitos y agranulocitos) y trombocitos. Dichos elementos son utilizados para evaluar el estado de salud, a su vez se pueden detectar patologías como: anemia, eritrocitosis, inflamación, desordenes hematopoyéticos y alteraciones hemostáticas, entre otras [5, 6].

La evaluación del hemograma, al igual que en el resto de los reptiles, es complicada debido a que leucocitos y eritrocitos son células nucleadas, esto impide el conteo con métodos automatizados de rutina, la evaluación del frotis requiere del conocimiento detallado de los tipos celulares debido a que puede existir confusión entre tipos celulares como linfocitos y trombocitos o entre heterófilos y eosinófilos [4, 5], por tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar los valores del hemograma, las características celulares y el tamaño celular en sangre de tortugas *Lepidochelys olivacea* aparentemente sanas, que anidan en la playa de Barra de la Cruz, en Oaxaca, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la playa de Barra de la Cruz ubicada en el municipio de Santiago Astata del estado de Oaxaca, en la región del Istmo de Tehuantepec al sureste del Estado, con las coordenadas 95° 40' longitud oeste, 15° 59' latitud norte [22]; la playa Barra de la Cruz tiene una extensión de 8,5 km, es una de las playas más importantes en el Estado para la anidación de tortuga Laúd *Dermochelys coriacea*, también anidan otras especies, como la tortuga Golfina *Lepidochelys olivacea* y la tortuga Prieta *Chelonia agassizii*. Se realizaron recorridos nocturnos en la temporada de anidación 2008-2009, para lo cual se obtuvo el permiso: SGPA/DGVS/00898 expedido por la Dirección General De Vida Silvestre en México.

Se eligieron 22 tortugas hembras adultas de la especie *Lepidochelys olivacea* de vida libre, las cuales arribaron por la noche para desovar en esta playa, se incluyeron únicamente las hembras que a la evaluación visual no presentaban lesiones en la piel como úlceras, neoplasias y/o ectoparásitos (sanguijuelas, percebes, gusanos y cangrejos); que no tuvieran lesiones en el caparazón y tuvieran una condición corporal aceptable [17]. Se observó a cada hembra desde su desplazamiento al subir la playa, que elaborara su nido de manera habitual en esta especie, el momento de la toma de muestra fue a mitad de la ovoposición en la que se encuentran totalmente inmóviles. Se realizó la antisepsia correspondiente y utilizando el sistema vacutainer, que consta de un soporte ó camisa, aguja calibre 21 de 1'' y tubo de 3 mililitros (mL) con heparina de litio como anticoagulante, se obtuvo sangre de las tortugas usando la técnica descrita por Dutton [6], en la vena yugular externa que se localiza en ambos lados de la línea media del cuello entre 1/3 y 1/2 de la distancia entre la parte posterior de la cabeza y el borde anterior del caparazón. El seno está apro-

ximadamente 2,5 cm laterales a la línea media, de 2-3 cm debajo de la superficie de la piel, una vez localizadas se inserta la aguja en la vena, la sangre fluyó como consecuencia del vacío, al obtener tres mL de sangre se retiró la aguja de la vena y se cubrió el sitio de venopunción con algodón haciendo presión para evitar la formación de hematomas hasta cerciorarse que no salía más sangre. Utilizando una cinta métrica inextensible (marca Butterfly Brand), se tomaron medidas morfométricas [3], tales como: largo curvo del caparazón (LC), ancho curvo del caparazón (AC), con forcípulas de 50 y 95 cm (marca Haglof, modelo S882 00, Suecia) se midió el largo recto del caparazón (LR), ancho recto del caparazón (AR) y Largo Total (LT), al terminar la ovoposición y una vez que la hembra concluyó de tapar el nido e iniciara su retorno al mar, se procedió a pesar (P) a la tortuga con un arnés de lona y una balanza de reloj (Torrey, SM, México).

Las muestras de sangre fueron transportadas en una hielera de unicel a 4°C al laboratorio del campamento (a 15 minutos (min) de la playa) donde de inmediato fueron procesadas.

A las muestras de sangre se les realizaron las siguientes determinaciones:

Hematocrito

Fue medido utilizando la técnica de microhematocrito, el tubo con la muestra se colocó en un agitador mecánico para mantenerla homogeneizada (marca Clay Adams Brand, modelo nutator, Alemania), se procedió a llenar el tubo capilar $\frac{3}{4}$ partes, introduciendo uno de los extremos en el tubo que contenía la sangre e inclinándolo hacia abajo el otro extremo del tubo capilar, se cerró enseguida el extremo vacío del tubo, sosteniéndolo horizontalmente y colocando en un extremo una llama fina de fuego, el vidrio se fundió y cerró este extremo. Se centrifugó (marca LW Scientific, modelo DSC-024, China, 14.490 × g) el tubo capilar durante cinco min a 11.000 rpm. Se leyó el volumen del paquete celular con un lector especial para microhematocrito.

Proteínas totales

Fueron determinadas utilizando el método del refractómetro de Goldberg [5] (modelo REF312, ATC, China). El diseño de este instrumento se basa en el principio de la refracción. Para realizar esta prueba se colocó una gota de plasma sobre la cara del prisma del refractómetro, a través de la ranura de acceso en la cubierta, o levantando la misma. La cubierta se mantuvo cerrada mientras se observó por el refractómetro y se orientó hacia una fuente de luz. El valor de las proteínas se leyó en gramos por litro.

Conteo de leucocitos y eritrocitos totales

Una vez que la sangre fue sometida a un homogeneizador (APSA, SM, México), se procedió a llenar una pipeta para

dilución de eritrocitos de Thoma (marca superior con precisión $\pm 3\%$, sin modelo, Alemania) (1:200) hasta la marca 0,5 de sangre y posteriormente el líquido diluyente de Natt y Herrick [19] hasta la marca 101, se dejó reposar durante 20 min. La pipeta se agitó de 2 a 3 min en el agitador mecánico (marca Clay Adams Brand, modelo Nutator, Alemania). Se dejaron caer las cuatro primeras gotas para eliminar el líquido de la porción capilar de la pipeta que no se mezcló con la sangre, se llenó de manera habitual el hemocitómetro (marca Brand, modelo CE, Alemania) y se dejó reposar durante 20 min para proceder al conteo. Con el objetivo 40 X (microscopio marca Carl Zeiss modelo Primostar, Alemania), se contaron todos los eritrocitos en cinco de los 25 cuadros pequeños del área central.

Para el cálculo de eritrocitos se sumaron las células de los cinco cuadros pequeños y se dividieron entre 100, el resultado fue el número de eritrocitos $\times 10^{12}$ /L.

Para el conteo de leucocitos se utilizó el objetivo de 40 X, contando en los nueve cuadrantes de toda la cámara, el resultado se multiplicó por 220 y se dividió entre 1000, el resultado final fue el número de leucocitos $\times 10^9$ /L.

Conteo diferencial de leucocitos

Mediante la observación directa del frotis que fue teñido empleando la tinción de Wright, se evaluó primero con el objetivo 10x, para ver la distribución de las células y seleccionar la porción del frotis que estuviese cerca del extremo más delgado, donde los eritrocitos no se superponen. Se puso una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y se cambió al objetivo de inmersión (100x) para realizar el examen. La cuenta diferencial se realizó contando y clasificando 100 leucocitos, se expresó en porcentaje, éste es el número relativo de los diferentes tipos de leucocitos que se encontraron en la sangre. El valor absoluto de cada tipo de leucocitos se obtuvo multiplicando el porcentaje por la cuenta leucocitaria hecha en el hemocitómetro.

Se realizó un recuento de estas células en diferentes campos del frotis bajo el objetivo de inmersión, y se contaron los trombocitos encontrados por cada 100 leucocitos, técnica descrita por Sypek y Borysenko, citados por Campbell and Ellis [5].

El volumen globular medio (VGM), se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{VGM}(\text{millones} / \text{mm}^3) = \frac{\text{Hematocrito} \times 1000}{\text{Recuento total de glóbulos rojos}}$$

Para la toma de microfotografías se utilizó una cámara para microscopio (marca Leica, modelo DC, Alemania) y para la medición las células, se utilizó el programa para medir células (marca Leica, modelo 1M 1000, Alemania) [14]. El número de células a medir se determinó con el método de

Fuentes-Mascorro [8], éste se basa en medir un número de células igual al porcentaje que ese tipo celular representa en el hemograma. Los frotis que se emplearon para estas mediciones, fueron los mismos que se utilizaron para el conteo diferencial. En células aparentemente redondas se tomaron las medidas en los ejes x-y de un plano cartesiano, asignándose como largo, la medida mayor y como ancho la medida menor, que son llamados largo máximo y largo mínimo [7], el cociente de la división entre el largo (largo máximo) y el ancho (largo mínimo) se le denominó índice morfológico IM: un índice más cercano a uno indica una forma redonda y más alejado de uno indica forma elíptica. Para monocitos y basófilos, cuyos núcleos son lobulados o no evidentes, se omitió esta medida.

Los resultados fueron sometidos a estadística descriptiva, empleándose la media como medida de tendencia central, para estadística de dispersión se utilizó la desviación estándar, como estadística de posición los percentiles y estadísticos ordenados el mínimo y máximo, empleándose el programa Excel 97-2003, para Windows [21].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las medidas morfométricas se presentan en la TABLA I. Las 22 tortugas empleadas en el estudio eran adultas y en etapa reproductiva, de acuerdo con los parámetros dados por Márquez [16], para hembras adultas.

Los resultados del hemograma se muestran en la TABLA II, además en la sangre de tortugas Golfinas se detectaron eritrocitos nucleados, cinco tipos diferentes de leucocitos (heterófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos) y trombocitos nucleados.

Eritrocitos

Los eritrocitos son células ovales con núcleo central de forma oval, su cromatina es densa de color púrpura (violeta, morado intenso) con bordes irregulares, el citoplasma presenta un color ortocromático uniforme, con ligera tonalidad azul debida al efecto de la heparina (FIG. 1). Las medidas de la célula y el núcleo se presentan en la TABLA III, el índice morfológico para la célula 1,36 µm y el núcleo 1,50 µm.

TABLA I
MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE LASTORTUGAS GOLFINA *Lepidochelys olivacea* INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

Variables	Hembras (n=22)		
	Media ± DE	Mínimo	Máximo
Largo curvo del caparazón (cm)	66,14 ± 1,66	64	69
Ancho curvo del caparazón (cm)	71,77 ± 1,54	70	74
Largo recto del caparazón (cm)	60,16 ± 3,22	55,5	65
Ancho recto del caparazón (cm)	54,01 ± 2,30	50	57,4
Peso del animal (kg)	33 ± 6,54	28	46

TABLA II
VARIABLES HEMATOLÓGICAS DE TORTUGA *Lepidochelys olivacea* QUE ANIDARON EN LA PLAYA BARRA DE LA CRUZ EN OAXACA, MÉXICO

Variables	Hembras (n=22)				
	Media ± DE	Mínimo	Máximo	Percentil 2,5%	Percentil 97,5%
Hematocrito	0,305 ± 0,04	0,24	0,45	0,25	0,40
Proteínas totales	47,136 ± 5,85	38	64	39,05	58,75
Eritrocitos × 10 ¹² /L	0,375 ± 0,12	0,14	0,74	0,18	0,64
Leucocitos × 10 ⁹ /L	4,510 ± 3,03	0,66	13,86	1,01	11,67
Heterófilos × 10 ⁹ /L	2,870 ± 1,88	0,49	7,9	0,69	7,41
Eosinófilos × 10 ⁹ /L	0,886 ± 0,68	0,09	2,63	0,12	2,24
Basófilos × 10 ⁹ /L	0,076 ± 0,15	0	0,63	0,00	0,49
Linfocitos × 10 ⁹ /L	0,638 ± 0,59	0,07	2,91	0,09	1,95
Monocitos × 10 ⁹ /L	0,067 ± 0,11	0,00	0,45	0,00	0,36
Trombocitos (por cada 100 leucocitos)	127,273 ± 47,39	63	228	63,53	208,05
VGM × 10 ⁶ /mm ³	891,790 ± 291,93	364,86	1714,29	505,45	1514,29

Los eritrocitos inmaduros son células con formas de redonda a oval, su núcleo es heterocromático grande y redondo, el citoplasma es ortocromático, éstos pueden ser más pequeños que los eritrocitos maduros (FIG. 2).

Leucocitos

Los heterófilos (FIG. 3) son de forma redonda a oval y en algunos casos amorfos, el citoplasma contiene gránulos eosinofílicos (color naranja brillante) fusiformes. El citoplasma es incoloro, su núcleo es de redondo a oval y su posición frecuentemente es excéntrica en las células con cromatina moderada-

mente densa. Las medidas celulares y nucleares están indicadas en la TABLA III, los índices morfológicos fueron 1,19 μm y 2 μm , indicando una célula redonda y un núcleo ovalado. La forma celular encontrada en este estudio es la misma reportada por Work y col. [26], para *Chelonia mydas* [20], para *Caretta caretta* y por Fei-Yan y col. [7], para *Lepidochelys olivacea* juvenil.

Los eosinófilos (FIG. 4) son células redondas a ovales, contienen pequeños gránulos citoplasmáticos eosinofílicos de forma esférica. El núcleo es de forma de redonda a oval, éste se localiza en posición central o excéntrico y con bordes irre-



FIGURA 1. ERITROCITOS MADUROS DE *Lepidochelys olivacea* EN UN FROTIS TEÑIDO CON WRIGHT. (100X).

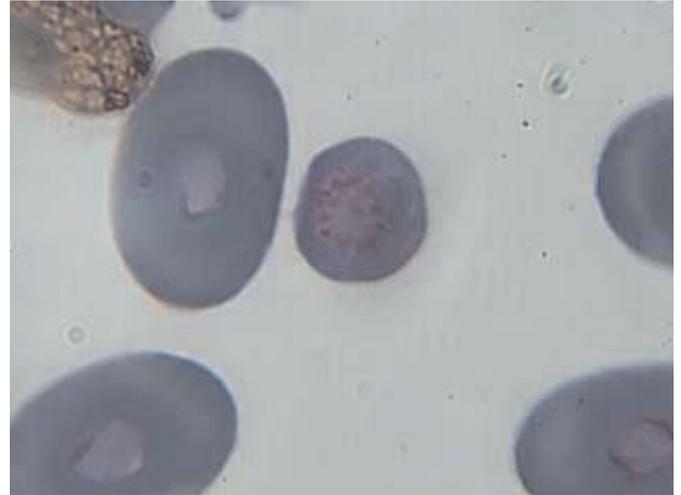


FIGURA 2. ERITROCITO INMADURO SE APRECIA LA DIFERENCIA EN EL TAMAÑO Y FORMA CON RESPECTO AL ERITROCITO MADURO. (100X).

**TABLA III
MEDIDAS OBTENIDAS DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE LAS TORTUGAS GOLFINAS *Lepidochelys olivacea* EN LA PLAYA BARRA DE LA CRUZ**

	Eritrocitos n= 944	Heterófilo n= 631	Eosinófilo n=196	Basófilo n=18	Monocito n=15	Linfocito n=141	Trombocitos N=45
Célula							
Largo (μm)							
Media \pm DE	19,43 \pm 1,57	17 \pm 2,34	18 \pm 3,40	13 \pm 3,43	15 \pm 5,53	10 \pm 2,51	11 \pm 3,14
Mín.-Máx.	12-25	9-26	8 -27	8-20	7-26	7-19	6-19
Ancho(μm)							
Media \pm DE	18,85 \pm 1,24	14 \pm 2,09	14 \pm 2,54	11 \pm 2,59	12 \pm 3,14	7 \pm 1,95	9 \pm 2,04
Mín.-Máx.	6-18	5-19	6-19	7-18	8-18	5-14	5-14
Núcleo							
Largo (μm)							
Media \pm DE	5,79 \pm 0,85	8 \pm 1,80	8 \pm 1,64	-	-	8 \pm 1,69	8 \pm 1,44
Mín.-Máx.	4-9	4-18	5-16	-	-	6-15	5-11
Ancho (μm)							
Media \pm DE	4,32 \pm 0,72	5 \pm 1,29	5 \pm 1,18	-	-	6 \pm 1,52	6 \pm 1,32
Mín.-Máx.	2-7	3-18	3-10	-	-	4-11	3-10



FIGURA 3. HETERÓFILO SE APRECIA EL NÚCLEO EXCÉNTRICO Y LOS GRÁNULOS DE COLOR NARANJA BRILLANTE. (100X).

gulares. Los índices morfológicos fueron 1,40 μm y 1,50 μm , para la célula y el núcleo, respectivamente, las medidas se observan en la TABLA III. Comparado con otras especies de tortuga marina, éste es el único tipo celular que tiene notables diferencias, en el tamaño de los gránulos intracitoplasmáticos [11].

Los basófilos (FIG. 5) son células pequeñas que, en su citoplasma contienen abundantes gránulos de color intensamente basófilo, la membrana citoplasmática presenta muy baja afinidad a la tinción. El núcleo puede o no estar lobulado. Las medidas celulares se encuentran en la TABLA III y el índice morfológico fue 1,17 μm , no pudiéndose determinar el nuclear debido a que en la mayoría de estas células, los gránulos citoplasmáticos no permiten la observación del mismo.

Los Linfocitos (FIG. 6) presentan características morfológicas similares a las descritas en otras especies de reptiles; en las aves y mamíferos, varían en tamaño de (pequeños a gran-

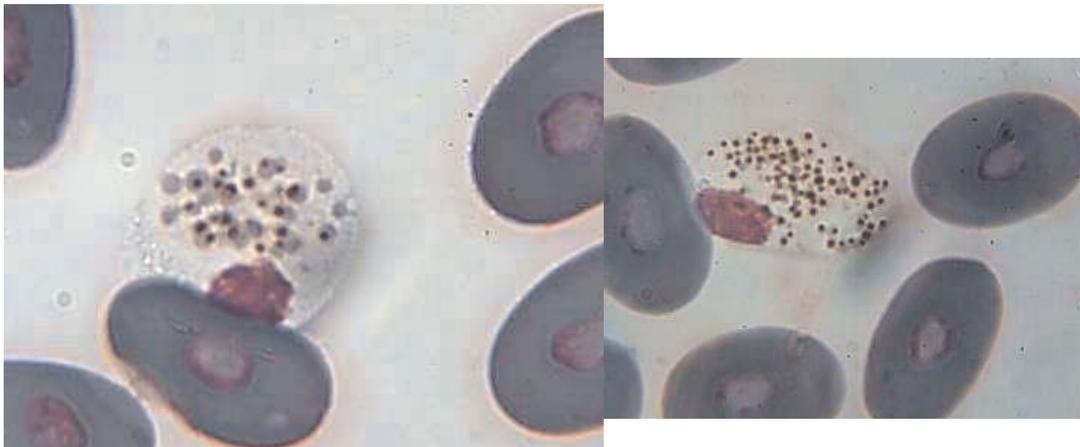


FIGURA 4. EOSINÓFILO CON NÚCLEO EXCÉNTRICO Y PRESENCIA DE PEQUEÑOS GRÁNULOS CITOPASMÁTICOS, LOS GRÁNULOS QUE SE UBICAN AL FONDO DEL FROTIS, REFRIINGEN DE MANERA DIFERENTE LA LUZ Y SE APRECIAN CON UN COLOR DIFERENTE A LOS QUE ESTAN EN LA PARTE SUPERIOR DEL FROTIS. (100X).

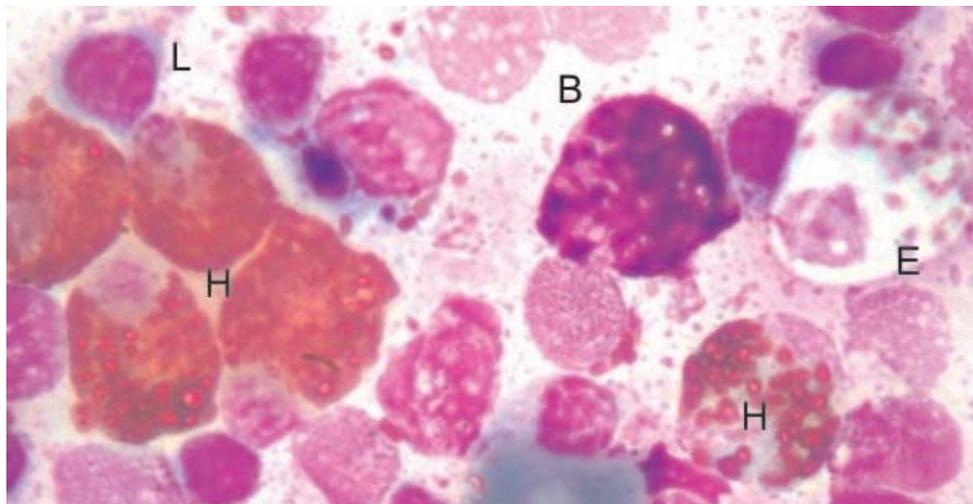


FIGURA 5. BASÓFILO (B), EN UN FROTIS DE CAPA LEUCO TROMBOCITARIA. SE APRECIAN TAMBIÉN LINFOCITO (L), HETERÓFILOS (H) Y EOSINÓFILO (E). (100X).

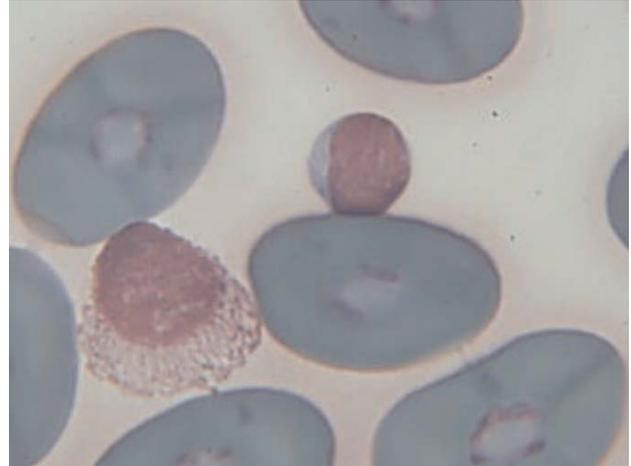


FIGURA 6. LINFOCITO PEQUEÑO, SE APRECIA QUE EL NÚCLEO OCUPA CASI TODO EL VOLUMEN CELULAR, PRESENTANDO POCO CITOPLASMA. EN LA FIGURA DE LA DERECHA EL CITOPLASMA PRESENTA UNA COLORACIÓN MÁS CLARA. (100X).

des), son células redondas con núcleo en posición central. Los linfocitos típicos tienen núcleo grande en proporción al citoplasma. El linfocito pequeño tiene escaso citoplasma ligeramente basofílico (azul pálido). Los linfocitos grandes tienen más volumen citoplasmático en comparación con los pequeños y el núcleo es más pálido. El citoplasma parece ser homogéneo, no tiene vacuolas ni gránulos. El índice morfológico fue de 1,5 μm y 1,33 μm , las medidas se encuentran en la TABLA III.

Los monocitos (FIG. 7) varían en forma, ésta va de redonda a ameboidea, el núcleo también tiene forma variable y puede ser redondo, oval o lobulado; su cromatina es menos condensada y es más pálida, si se le compara con la de los linfocitos. El citoplasma es abundante y se tiñe característicamente de azul-gris, puede presentar algunas vacuolas, que corresponden a restos eosinofílicos o gránulos azurófilos. El índice morfológico fue de 1,11 μm , el índice nuclear no se determinó debido a que los núcleos son de forma irregular.



FIGURA 7. MONOCITO SE APRECIA EN CONTACTO CON CUATRO ERITROCITOS Y EL NÚCLEO SEGMENTADO. (100X).

Trombocitos

Los trombocitos (FIG. 8) son células de forma elíptica. El núcleo tiene posición central con una cromatina densa que se tiñe de color púrpura. El citoplasma es mínimo en relación al núcleo, con escasa afinidad a la tinción y puede contener algunas vacuolas citoplasmáticas poco evidentes. El índice morfológico fue de 1,43 μm y el nuclear de 1,29 μm , en la TABLA III, se encuentra las medidas.

Existe dificultad para establecer intervalos de referencia para los valores sanguíneos de las tortugas marinas, debido a un número de factores intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos incluyen la especie, género, edad y estado fisiológico; y entre los factores extrínsecos están la estacionalidad, temperatura, hábitad, dieta, enfermedades, estrés asociada al cautiverio y el sitio de venipunción [4].

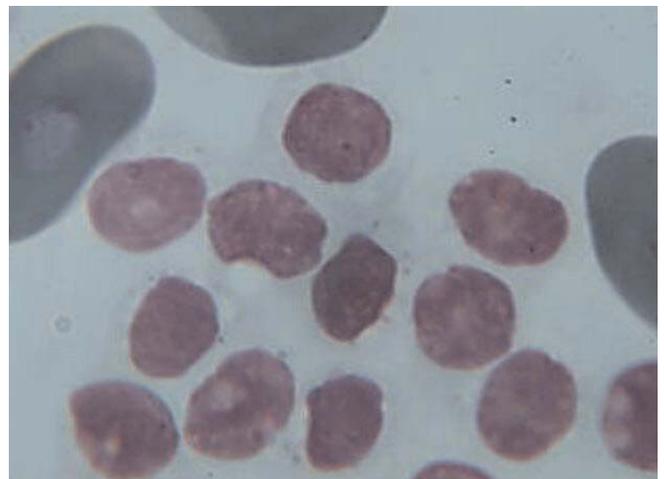


FIGURA 8. CÚMULO DE TROMBOCITOS, LAS CÉLULAS MUESTRAN CITOPLASMA CON Poca AFINIDAD TINTORIAL. (100X).

Comparando los datos obtenidos en esta investigación con los reportados en la literatura, para poder inferir si estas diferencias esperadas (en virtud de que el trabajo se desarrolla con un reptil), efectivamente existen.

En el caso de los valores eritrocíticos: hematocrito, número de eritrocitos y volumen globular medio (VGM) se observó que el valor del hematocrito de tortuga Golfina *Lepidochelys olivacea* ($891,790 \pm 291,93$) fue semejante a los reportados para tortuga verde *Chelonia mydas* ($730,17 \pm 186,5$) [26] a los valores para tortuga Caguama *Caretta caretta* ($564,102 \pm 150,093$) [23] en cautiverio. Los valores de VGM son similares, considerando las desviaciones estándar.

El Volumen Globular Medio (VGM) varía según el orden al que pertenezca cada organismo dentro de la clase *Reptilia*, los eritrocitos con VGM mayor son los del orden *quelonios* seguidos del orden *crocodylia* y los más pequeños se han encontrado en el suborden *lacertilia* [25]. Las tortugas marinas tienen un número de eritrocitos menor que en el resto de los reptiles.

La forma del eritrocito varía poco comparado con las demás especies de reptiles, la variante fue el índice morfológico (largo/ ancho) de los eritrocitos al ser medidos de manera individual, dato que demuestra que tan ovals son las células. Los índices morfológicos eritrocíticos de las tortugas Golfinas (celular y nuclear) fueron $1,36 \mu\text{m}$ y $1,50 \mu\text{m}$, respectivamente, mientras que para *Emys orbicularis*, fue de $1,73 \mu\text{m}$ y $1,32 \mu\text{m}$ [25] y $19,5 \pm 1,2 \mu\text{m} \times 9,2 \pm 1,0 \mu\text{m}$, para *Agrionemys horsfieldi* [13], confirmando la forma clásica de un eritrocito reptiliano.

En algunos casos, los eritrocitos presentaron inclusiones citoplasmáticas, que según Thrall, [24] son frecuentes en reptiles, estas inclusiones en su mayoría representan artefactos de preparación o como menciona Alleman y col. [2], que en imágenes de microscopía electrónica sugieren que son a causa de la degeneración de organelos [26].

En el presente estudio, los valores de leucocitos totales en tortuga Golfina *Lepidochelys olivacea* ($4,510 \pm 3,03 \times 10^9$ /L), fueron menores a los reportados por Work y col. [26], ($13,8 \times 10^9$ /L) en tortuga verde *Chelonia mydas*, juveniles, pero similares a las reportadas por Montilla y col. [18] ($6,16 \pm 2,6 \times 10^9$ /L) en adultos.

Los heterófilos, fueron el leucocito que se encontró en mayor cantidad en la sangre de *Lepidochelys olivacea* ($2,870 \pm 1,88 \times 10^9$ /L), éstos comparados con valores de tortuga verde *Chelonia mydas* ($1,4 \pm 0,8 \times 10^9$ /L) [26] y para *Cheloniamydas* adultas ($5,102 \pm 2,227 \times 10^9$ /L) [18], éste último dato puede estar elevado por el método de captura.

Los heterófilos en este estudio midieron $9 \times 26 \mu\text{m} \times 5$ a $19 \mu\text{m}$, y en el estudio de Fei-Yang y col. [7], fueron de 10 a $19 \mu\text{m} \times 11,40$ a $19,50 \mu\text{m}$, se debe considerar que para este tipo celular el tamaño no es indicativo de actividad alguna.

Los eosinófilos de las tortugas marinas muestran variabilidad en el tamaño de los gránulos citoplasmáticos, siendo

más pequeños en tortugas golfinas, [22] que en *Chelonia agassizii* y *Dermochelys coriacea* [11].

CONCLUSIÓN

Los eritrocitos de las tortugas marinas son los más grandes, en relación con la mayoría de las familias de reptiles, teniendo un VGM mayor, con un número menor de eritrocitos. La morfología de las células de la sangre de las tortugas marinas es similar, presentando variaciones en el tamaño de los gránulos de los eosinófilos. El índice morfológico permite definir la forma de la célula, con una expresión numérica, evitando hacerlo de manera subjetiva. El hemograma y las características celulares de este trabajo, podrán ser tomados como referencia para las tortugas golfinas que desovan de esta zona.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, por el préstamo del equipo y programa para medir las células. Este proyecto recibió financiamiento del Programa de Desarrollo Regional Sustentable, del Gobierno Federal y de la Rectoría de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALBAVERA, P.E. Revisión de la anidación de tortugas marinas en los campamentos del Centro Mexicano de la Tortuga durante el periodo 2001-2005. En: **Visita del Centro Mexicano de la Tortuga a la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca**. Ed. UABJO, Oaxaca, México. Pp 13-39. 2007.
- [2] ALLEMAN, A.R.; JACOBSON, E.R.; RASKIN, R.E. Morphological and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). **Am. J. Vet. Res.** 53(9):1645-1651. 1992.
- [3] BOLTEN, A. Técnicas para la medición de tortugas marinas. En: **Técnicas para la Investigación y Manejo para la Conservación de las tortugas Marinas**. Eckert, K.L.; Bjorndal, K.A.; Abreu-Grobois, F.A.; Donnelly, M. (Eds). UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas. Publicación No. 4. Pp 126-131. 2000.
- [4] CAMPBELL, T.W. Clinical Pathology of Reptiles. In: Mader, D.R. (Ed.) **Reptile Medicine and Surgery**. Saunders Elsevier. 2nd. Ed. Canada. Pp 453-470. 2006.
- [5] CAMPBELL, T.W.; ELLIS, CH.K. Hematology of reptile. In: **Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology**. 3th. Ed. Iowa State Press. Pp 51-91. 2007.
- [6] DUTTON, P. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies. In: B.W. Bowen y

- W.N. Witzell (Eds). **Proceedings of the International Symposium on Sea Turtles Conservation Genetics** NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396 U.S. Dept. Commerce. Miami 09/12-14, 1995. Florida. U.S.A. Pp 14-24. 1996.
- [7] FEI-YAN, A.; PI-PENG, L.; HE-XIANG, G.; MING-BIN, Y. Hematology, Morphology, and Ultrastructure of Blood Cells of Juvenile Olive Ridley sea Turtles (*Lepidochelys olivacea*). **Chelonian. Cons. And Biol.** 10(2):250-256. 2011.
- [8] FUENTES-MASCORRO, G. Metodología desarrollada para determinar el número de células sanguíneas a medir. En: **XXV Aniversario de conservación e investigación en tortugas marinas. Tomo IV Inicio y presente.** Ed. UABJO. Pp 47-49. 2007.
- [9] FUENTES-MASCORRO, G.; LÓPEZ, R.F.A. Conservación y consumo de iguanas y tortugas marinas en la costa de Oaxaca. En: **Memorias del VIII Congreso Latinoamericano de Herpetología.** 11/24-29. Varadero, Cuba. Pp 280. 2008.
- [10] GRUPO ESPECIAL EN TORTUGAS MARINAS. Estrategia mundial para la conservación de las tortugas marinas. **Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales.** Arlington Virginia Estados Unidos de Norteamérica. Pp 1-30. 1995
- [11] HERNÁNDEZ, B.M.T.; RAMÍREZ, A.L.M.; FUENTES-MASCORRO, G. Características morfológicas de las células sanguíneas de Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), prieta (*Chelonia agassizii*) y Laúd (*Dermochelys coriacea*). **Memorias del XXIII Simposio sobre Fauna Silvestre "Gral. M.V. Manuel Cabrera Valtierra"**. Zaca-tecas, 10/11-13. México. Pp 160-166. 2006.
- [12] INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. (IUCN). Red List of Threatened Species. 2011. Version 2011.2 On Line: www.iucnredlist.org.06/05/2012.
- [13] KNOTKOVA, Z.; DOUBEK, J.; KNOTEK, Z.; HÁJKOVA, P. Blood cell morphology and plasma biochemistry. In Russian Tortoise (*Agryonemys horsfield*). **Acta Vet. Brno.** 71:191-198. 2002.
- [14] LEICA COMPANY. Manual del usuario. Leica. 1M 1000 image manager. Germany. Pp 1-30. 2005.
- [15] MÁRQUEZ, M.R.; PEÑAFLORES, S.C.; JIMÉNEZ, M. DEL C. Protección de la tortuga marina en la costa de Oaxaca por el Instituto Nacional de la Pesca. En: **XXV Aniversario de conservación e investigación en tortugas marinas. Tomo II Santuario La Escobilla. Un compromiso con la humanidad.** Ed. UABJO. Pp 108 - 112. 2007.
- [16] MÁRQUEZ, R. La vida de las tortugas marinas. En: **Las tortugas marinas y nuestro tiempo.** 3ª Ed. La ciencia para todos. México Pp 1-10. 2002.
- [17] MCARTUR, S.; WILKINSON, R.; MEYER, J. Diagnosis. In: **Medicine and surgery of tortoise and turtles.** First Rd. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Pp 109-140. 2004.
- [18] MONTILLA, F.J.A.; HERNÁNDEZ, R.J.L.; ALVARADO, A.MC. Valores hematológicos de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) presente en la alta Guajira. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XVI (3):219-226. 2006.
- [19] NATT, P.M.; HERRICK, A.CH. A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poult. Sci.** 31:735-738. 1952.
- [20] ORÓS, J.; CASAL, A.B.; ARENCIBIA, A. Microscopic studies on characterization of blood cells of endangered sea turtles. In: Méndez-Vilas, A. and Díaz, J. (Ed). **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education.** 1(4):75-84. 2010.
- [21] RAMBAL, J.R.; HENAO, L.L.; VÉLEZ, P.I. Medidas de tendencia central y dispersión Manual Básico de Excel. **Universidad Tecnológica de Bolívar.** Pp1-45. 2009.
- [22] RAMÍREZ, A.L.M.; JARDÓN, H.G.S.; FUENTES-MASCORRO, G. Características morfológicas de las células de sangre periférica de tortugas marinas *Lepidochelys olivacea*. **XXII Simposio sobre fauna silvestre Gral. M.V. Manuel Cabrera Valtierra.** F.M.V.Z., UNAM Ciudad de México. 10/ 25-27. México. Pp 188-191.2005.
- [23] RAPHAEL, B.L. Chelonians (turtles, Tortoises). In: Fowler, M.E. (Ed.), **Zoo. Wild. Anim. Med.** 5th. Walter Burns Saunders Company, Philadelphia. Pp. 48-58.2003.
- [24] THRALL, M.A. Hematology of Reptiles. In: Williams Wilkins. **Vet. Hematol. Clin. Chem.** Lippincott, Colorado. Pp 259-275. 2004.
- [25] UGURTAS, H.I.; SEVNIC, M.; YILDIRIMHAN, H.S. Erythrocyte size and morphology of some tortoise and turtles from Turkey. **Zoo. Stud.** 42(1):173-178. 2003.
- [26] WORK, T.M.; RASKIN, R.E.; BALAZS, G.; WHITTAKER, B.S. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. **AJVR.** 59(10): 1252-1257. 1998.