

VALORES HEMATOLÓGICOS DE REFERENCIA EN TORTUGA TERRESTRE ARGENTINA (*Chelonoidis chilensis chilensis*)

J.C. Troiano¹, M.C. Silva²

¹Medico Veterinario. Área de Iología. Museo Argentino de Ciencias Naturales (CONICET)

²Medico Veterinario. Área de Patología Clínica. Departamento de Medicina.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires.

RESUMEN: Se tomaron muestras sanguíneas de 150 ejemplares sanos de tortuga terrestre argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*) por medio de punción de la vena cocígea superior. Las determinaciones que se realizaron incluyeron recuentos de glóbulos rojos, leucocitos y trombocitos, hematocrito, concentración de hemoglobina, índices hematómétricos y fórmulas leucocitarias relativas, las que se compararon con otras especies de Testudinidae. No se observaron cambios estadísticamente significativos en los parámetros sanguíneos como función de la edad o el sexo ($p > 0,01$). En el invierno se observó un aumento de los valores de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina ($p < 0,01$), mientras que en el verano aumentaron los glóbulos blancos y trombocitos ($p < 0,01$). La fórmula leucocitaria no resultó afectada por los factores en estudio.

PALABRAS CLAVE: Tortuga terrestre, parámetros hematológicos, referencia.

REFERENCE HEMATOLOGICAL VALUES IN ARGENTINIAN TERRESTRIAL TURTLE (*Chelonoidis chilensis chilensis*)

ABSTRACT: Blood samples were taken from 150 healthy specimens of Argentine terrestrial turtle (*Chelonoidis chilensis chilensis*) by means of venipuncture of upper coccygeal vein. The determinations red blood cells, leucocyte and thrombocyte count, hematocrit, hemoglobin concentration, hemathimetric index and differential leucocyte count were performed and compared with other Testudinidae species. No statistically significant changes were observed as function as sex and age ($p > 0.01$). In winter were observed high values of red blood cell counts, hematocrit and hemoglobin ($p < 0.01$), while in summer increased leucocyte and thrombocyte counts were observed ($p < 0.01$). The differential leucocyte counts were not affected by the studied factors.

KEY WORDS: terrestrial turtle, hematological parameters, reference.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los indicadores fisiológicos de los animales mantenidos en cautiverio es de importancia, ya que permite contar con una rápida herramienta diagnóstica que ofrece mucha información referida al estado de salud de los animales. Uno de los primeros sistemas que deben ser examinados es el sanguíneo, que cumple importantes funciones como el transporte de gases, nutrientes y eliminación de los desechos metabólicos que resultan de dichos procesos por distintas vías del organismo.

Si se compara el estudio hematológico de los reptiles con los efectuados en otros vertebrados, se encuentran pocas citas en la bibliografía generada en el país, a pesar que existe una metodología analítica aplicada a los mamíferos y aves, las cuales han sido exhaustivamente estudiadas.

En las especies autóctonas, esta falencia de información se hace más evidente, tal el caso de un quelonio autóctono y considerado por CITES como un animal en riesgo de extinción e incluido en el apéndice I de dicha convención. Si bien la bibliografía consultada menciona estudios hematológicos en testudínidos, estas especies estudiadas pertenecen a otros hábitats y las muestras no están bien definidas en cuanto a la cantidad de animales, su estado de salud y otros aspectos igualmente importantes.

Los objetivos del presente trabajo son establecer los parámetros hematológicos de referencia normales para una especie autóctona de tortuga, así como su variación debida a factores tales como sexo, edad y época del año.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante los años 1996 y 1997 se procedió a la toma de muestras de 150 ejemplares de distinta procedencia y clínicamente sanos de tortuga terrestre argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*) pertenecientes a diferentes sexos y edades. La toma de muestras se realizó por medio de la punción de la vena coccígea superior (Richter et al., 1977) utilizando para ese fin, material descartable. La sujeción de los animales fue realizada manualmente evitando el uso de anestésicos o tranquilizantes que pueden hacer variar los componentes cuali o cuantitativos de la sangre. (Duguy, 1982).

De cada animal se tomaron 2 ml de sangre, la cual se depositó en tubos de vidrio con tapón de goma, conteniendo heparina como anticoagulante a razón de 20 μ l/ml de sangre. La muestra se acondicionó en recipientes de poliestireno con hielo molido para una mejor

conservación. Las determinaciones que se realizaron fueron: recuentos de glóbulos rojos, leucocitos y trombocitos por medio de una dilución 1:200 en pipetas para recuento de glóbulos rojos en líquido de Natt & Herrick (Otis, 1974) y recuento en la cámara de Neubauer, multiplicando los glóbulos rojos observados en cinco campos del retículo central por 5.000 y los leucocitos teñidos en los retículos laterales por 1.000 para obtener la cuenta de estas células por mm^3 de sangre. En el caso de los trombocitos, el recuento por mm^3 , se realizó contando estas células observadas en el retículo central de la cámara y multiplicados por 2.000. Las ventajas que tiene este método son las de permitir un rápido conteo de células sanguíneas cargando la cámara y realizando la dilución una sola vez.

El hematocrito se determinó por el método del microhematocrito y la concentración de hemoglobina fue medida mezclando 20 μ l de sangre entera en 5.0 ml de reactivo de Drabkin (Wiener Laboratorios, Argentina). Después de la centrifugación de los núcleos de los eritrocitos se midió espectrofotométricamente la concentración de cianmetahemoglobina a una absorbancia de 1 540 nm comparado con una solución estándar de 15,5 g/dl de hemoglobina (Wiener Laboratorios, Argentina). Los índices hematimétricos (VCM, HCM y CHCM) se calcularon con las formulas de Wintrobe. El recuento diferencial de leucocitos se realizó sobre frotis hechos en el momento de tomar la muestra, secados al aire y teñidos por la técnica pancromática de May-Grünwald & Giemsa, modificada por Rosenfeld (1947). La clasificación de las células de la serie blanca se hizo sobre la base de la terminología tintorial y morfológica propuesta por Hawkey & Dennett (1994).

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con metodología estadística paramétrica utilizando el software Prism 2.1 (Graph Pad Inc.). Los datos de la estadística analítica se expresan como media (\bar{x}) \pm desvío estándar (DS). La diferencia entre grupos fue analizada por medio de un test "t" de Student y la media entre grupos por medio de una Análisis de Varianza utilizando como modelo experimental un ensayo factorial del tipo 2³.

RESULTADOS

Los resultados se expresan en las tablas N°1 a 3, referidos como valores de referencia en función de la estación del año (Tabla N°1), edad (Tabla N°2) y sexo de los animales (Tabla N°3).

El análisis estadístico demuestra que la época del año es el factor que causa variaciones en los componentes sanguíneos. Durante

el invierno se observa un aumento de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina ($p < 0.01$). Durante el verano, descienden estos valores aumentan proporcionalmente los recuentos de glóbulos blancos y trombocitos ($p < 0.01$). La edad y el sexo no tienen una influencia significativa en la variación de los parámetros sanguíneos ($p > 0.01$). Las fórmulas leucocitarias relativas no resultan alteradas por ninguna de las variables en estudio ($p > 0.01$).

Tabla N°1. *Chelonoidis chilensis chilensis*
Parámetros Hematológicos Analizados en Función de la Variable Época del año

Determinación	Invierno (n:75)	Verano (n:75)
Recuento de Glóbulos Rojos ($10^9/l$)	700 \pm 74	599 \pm 25
Hematocrito (%)	25,2 \pm 8	21,35 \pm 3,5
Hemoglobina (g/dl)	11 \pm 3,7	9,4 \pm 1,3
V.C.M. (pg)	360 \pm 36	356 \pm 23
H.C.M. (pg)	157 \pm 62	156 \pm 63
C.H.C.M. (%)	43,6 \pm 32	44,6 \pm 5,7
Recuento de Glóbulos Blancos ($10^9/l$)	9,2 \pm 1,9	11,2 \pm 2,5
Recuento de Trombocitos ($10^9/l$)	4,2 \pm 1,3	6,2 \pm 2,5
Linfocitos (%)	26 \pm 8,6	25 \pm 2,3
Monocitos (%)	5 \pm 2,1	4 \pm 2,5
Azurófilos (%)	9 \pm 5	8 \pm 2
Heterófilos (%)	28 \pm 2	29 \pm 2,3
Eosinófilos (%)	32 \pm 8	32 \pm 5
Basófilos (%)	0	1 \pm 1,3

V.C.M. (Volumen Corpuscular Medio) H.C.M. (Hemoglobina Corpuscular Media) C.H.C.M. (Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media)

Tabla N°2. *Chelonoidis chilensis chilensis*
Parámetros Hematológicos Analizados en Función de la Variable Edad

Determinación	Juveniles (n:75)	Adultos (n:75)
Recuento de Glóbulos Rojos ($10^9/l$)	660 \pm 34	658 \pm 32
Hematocrito (%)	22,3 \pm 1,26	23 \pm 3,98
Hemoglobina (g/dl)	10,1 \pm 1,65	10 \pm 1,84
V.C.M. (pg)	337 \pm 32	349 \pm 43
H.C.M. (pg)	152 \pm 67	151 \pm 63
C.H.C.M. (%)	45 \pm 4	42,3 \pm 3,4
Recuento de Glóbulos Blancos ($10^9/l$)	8,9 \pm 2,5	9 \pm 2,6
Recuento de Trombocitos ($10^9/l$)	4,25 \pm 1,7	4,3 \pm 1,5
Linfocitos (%)	26 \pm 11	25 \pm 2,6
Monocitos (%)	5 \pm 2,3	5 \pm 1,5
Azurófilos (%)	8 \pm 2,4	7,2 \pm 3,32
Heterófilos (%)	28 \pm 4	29 \pm 2,4
Eosinófilos (%)	31 \pm 12	32,7 \pm 3,78
Basófilos (%)	1 \pm 0,5	0,9 \pm 0,2

V.C.M. (Volumen Corpuscular Medio) H.C.M. (Hemoglobina Corpuscular Media) C.H.C.M. (Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media)

Tabla N°3. *Chelonoidis chilensis chilensis*
Parámetros Hematológicos Analizados en Función de la Variable Sexo

Determinación	Machos (n:75)	Hembras (n:75)
Recuento de Glóbulos Rojos ($10^9/l$)	689 \pm 34	688 \pm 24
Hematocrito (%)	22 \pm 1,8	23 \pm 3,8
Hemoglobina (g/dl)	10 \pm 1,54	10,4 \pm 1,49
V.C.M. (pg)	319 \pm 42	334 \pm 35
H.C.M. (pg)	145 \pm 21	151 \pm 23
C.H.C.M. (%)	45,4 \pm 4	45,2 \pm 6
Recuento de Glóbulos Blancos ($10^9/l$)	8,8 \pm 2,3	8,9 \pm 2,3
Recuento de Trombocitos ($10^9/l$)	4,2 \pm 9	4,2 \pm 1,3
Linfocitos (%)	26 \pm 11	26 \pm 2,36
Monocitos (%)	5,5 \pm 1,4	5 \pm 1,5
Azurófilos (%)	7,8 \pm 1,9	8 \pm 3
Heterófilos (%)	27,5 \pm 5	28 \pm 2,1
Eosinófilos (%)	32 \pm 14	31 \pm 9,5
Basófilos (%)	1 \pm 0,8	2 \pm 0,2

V.C.M. (Volumen Corpuscular Medio) H.C.M. (Hemoglobina Corpuscular Media) C.H.C.M. (Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media)

DISCUSIÓN

Los valores hallados en el recuento de glóbulos rojos de *Chelonoidis chilensis chilensis* son menores a los descriptos para otros testudínidos como *Gopherus agasizii* (Roszkopf, 1982), *Testudo hermanni* (Muro et al., 1994) y *Xerobates spp* (Jacobson et al., 1991) con recuentos de glóbulos rojos que superan 1.000.000 glóbulos rojos/ mm^3 , mientras que nuestra cuenta de estos elementos no supera las 700.000 células/ mm^3 . Otras citas para especies similares como *Geochelone gigantea* (Hart et al., 1991), *Geochelone geometrica* (Pienaar, 1962), *Testudo hermanni* y *Testudo graeca iberica* (Lawrence & Hawkey, 1986; Muro et al., 1994).

Los valores de hemoglobina y hematocrito se encuentran dentro del rango de variación descripto para *Gopherus agasizii* (Roszkopf, 1982) y *Xerobates spp* (Jacobson et al., 1991), pero son mayores a aquellos descriptos para *Geochelone gigantea* (Hart et al., 1991) *Geochelone geometrica* (Pienaar, 1962), *Testudo hermanni* y *Testudo graeca iberica* (Lawrence & Hawkey, 1986; Muro et al., 1994).

Con respecto a los valores de glóbulos blancos y trombocitos, estos datos se asemejan a los reportados para algunos testudínidos como *Testudo hermanni* y *Testudo graeca iberica* (Lawrence & Hawkey, 1986; Muro et al., 1994), pero son menores a los descriptos para *Geochelone gigantea* (Hart et al., 1991).

En *Gopherus agasizii* (Rosskopp, 1982) se reportan valores mas altos en el recuento de glóbulos blancos, pero esta diferencia podría ser debida a que este autor cuenta los trombocitos cada 100 leucocitos y no por la técnica de Natt y Herrick que utilizamos en el presente trabajo. Los reportes de varios autores (Pienaar, 1962; Hart et al., 1991; Rosskopf, 1982; Wood & Ebanks, 1984; Frair, 1972; Sheeler & Barber, 1964; Semple et al., 1970; Stenross & Bowman, 1968) indican que la fórmula leucocitaria de los quelonios tiene un alto porcentaje de eosinófilos (31-33%) tal como lo muestran las tablas N°1 a 3, le siguen los heterófilos en un porcentaje de 26 a 29%, luego los linfocitos 24 a 26%, los azurófilos, monocitos y finalmente los basófilos que no superan el 2% de la cuenta de leucocitos. En este punto Pienaar (1962) refiere en *Geochelone pardalis* de Sudáfrica un recuento de 20% de basófilos.

La variación de los parámetros hematológicos en función de la época del año se ha reportado por varios autores que trabajan con reptiles y dentro de ellos especialmente los quelonios (Pienaar, 1962; Hart et al., 1991; Roskopff, 1982; Wood & Ebanks, 1984; Lawrence & Hawkey; Sheeler&Barber, 1964; Semple et al., 1970; Stenross&Bowman, 1968). De acuerdo a los datos encontrados en nuestro trabajo, es posible observar un aumento de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito en el invierno y un aumento proporcional de glóbulos blancos y trombocitos en el verano.

Las causas de este fenómeno aún se encuentran en el ámbito de conjeturas, pero dos teorías pretenden explicar este hecho. Por un lado se menciona que la deshidratación resultante de la hibernación y el menor consumo de alimentos y agua determina una disminución del plasma, con secuestro de líquidos en el intersticio y un aumento del recuento de glóbulos rojos y hematocrito. Frair (1977) y Stenross & Bowman (1984) mencionan un hecho similar a nuestros hallazgos en varias especies de tortugas como *Chelydra serpentina*, *Lysemmys punctata*, *Chrysemys scripta* y *Emydoidea blandingii*. Por otro lado, otra teoría propone que

el aumento de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina en la época invernal se debería a un estímulo de la eritropoyetina por caída en la tensión de oxígeno cuando el animal hiberna (Gaummer&Goodnigh, 1957; Duguy, 1982). Gilles-Baillen& Schoffeniles (1965) y Lawrence & Hawkey (1986), por el contrario, mencionan en *Testudo hermannii* una situación diferente, con disminución de los valores de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina en el invierno, por secuestro de líquidos al intersticio y retención de agua en la vejiga. Finalmente O'Connor et al (1994) mencionan que la variación de los parámetros sanguíneos debido a la época del año no existe, trabajando con *Gopherus agasizii*, especie similar a nuestra tortuga terrestre.

La edad y el sexo no tienen una influencia significativa sobre los parámetros sanguíneos, a pesar de los reportes de Wood & Ebanks (1984), que mencionan diferencias en el recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito en los adultos de *Chelonia mydas* comparados con los juveniles ($p < 0.01$). Hart (1991) menciona una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre los valores hematológicos de machos y hembras de *Geochelone gigantea*, mientras que Frair (1977) menciona variaciones referidas al tamaño de los animales en *Malayemys spixii*; en los animales de mayor tamaño aumentan los valores de glóbulos rojos, blancos y hematocrito comparados con animales de tamaño menor.

Las fórmulas leucocitarias no resultan alteradas por ninguna de las variables en estudio, en contraste con la opinión de otros autores (Duguy, 1982) que mencionan un leucograma de invierno con aumento de linfocitos y un hemograma de verano con aumento de los eosinófilos.

Los valores de referencia presentados en el presente trabajo constituyen en primer reporte para el país y representan el primer escalón de trabajos más exhaustivos destinados a evaluar el impacto de otros factores, además de los estudiados, sobre los componentes sanguíneos, por ejemplo el cautiverio o la libertad.-

BIBLIOGRAFÍA

1. Duguay, R. Biology of the Reptilia (III), Carl Gans (Ed), Academic Press, New York, 1982 p 155-88
2. Frair, W. Turtle blood cells packed cell volume, sizes and numbers. *Herpetologica* 1977; 33: 167-90
3. Frair, W.. Sea turtle blood cells parameters correlated with carapace length. *Comp Biochem Physiol* 1972; 56(A): 467-72
4. Gaumner, A.H.; Goodnigh, C.J. Some aspects of the hematology of turtles related to their activity. *The American Midland Naturalist*. 1957; 58: 332-40
5. Giles-Baillen, M.; Schoffeniles, E. Variation saisonnières dans la composition du sang de la tortue grecque *Testudo hermanni*. *Ann Soc Roy Zool Belgique* 1965; 95:75-9
6. Hart, M.G.; Samour, H.; Spratt, M.J.; Savage, B.; Hawkey, C.N. An analysis of hematological findings of a feral population of Aldabra giant tortoises (*Geochelone gigantea*) *Comp Hem Int* 1991; 1:145-9
7. Hawkey, C.N.; Dennet, T.B. A Color Atlas of Comparative Hematology. Wolfe Medical Publications Ltd, Ipswich, England, 1994 p 1-195
8. Jacobson, E.R.; Schumacher, J.; Green, M. Field and clinical techniques for sampling and handling blood for hematologic and selected biochemical determinations in the desert tortoise *Xerobates spp.* *Copeia* 1991; 11: 237-41
9. Lawrence, K.; Hawkey, C.N. Seasonal variations in hematological parameters in long term captive Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*). *Res Vet Scien* 1986; 43: 379-83
10. Muro, J.; Cuenca, R.; Viñas, L., Lavin, L. Interés del hemograma en la clínica de quelonios. *Veterinaria en Praxis* 1994; 9,3:24-9
11. O'Connor, M.P.; Grumbles, J.S.; George, R.H.; Zimmermann, L.C., Spotila, J. Potential hematological and biochemical indicators of stress in free-ranging desert tortoises exposed to a hydric stress gradient. *Herpetological Monographs* 1994; 8: 5-26
12. Otis, V.S. Leucocyte and erythrocyte diluent for reptilian blood cells count. *Copeia* 1974; 1: 253-5
13. Pienar, U de V. Hematology of Some South African reptiles. University of Witwatersrand Press. Johannesburg (RSA) 1962 p 1-29
14. Richter, G.; Olsen, K.; Fletcher, J.; Benirschke, T.; Bogart, J. Collecting blood from Galapagos tortoises and box turtle. *V.M./S.A.C.* 1977; 12: 1376-8
15. Rosenfeld, G. Corante pancromático para hematología e citología humana. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num so corante de emprego rápido. *Mem Inst Butantan* 1947; 20: 328-34
16. Roskopf, W. Normal hemogram and blood chemistry values for California desert tortoise. *V.M. / S.A.C.* 1982; 1: 185-7
17. Sheeler, P.; Barber, A.A. Comparative hematology of the turtle, rabbit and rat. *Comp Biochem Physiol* 1964; 11: 139-45
18. Semple, R.e.; Sigsworth, D.; Titt, J.T. Seasonal observations on the plasma, red blood cells and blood volume of two turtle species natives to Ontario. *Can J Physiol Pharm* 1970; 4: 282-90
19. Stenross, O.O.; Bowman, V.M. Turtle blood. I. Concentrations of various constituents. *Comp Biochem Physiol* 1968; 25(A): 219-22
20. Wood, E.f.; Ebanks, G.K. Blood cytology and hematology of the green sea turtle *Chelonia mydas*. *Herpetologica* 1984; 40: 345-9