



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Determinación de valores hematológicos en cuatro diferentes géneros de pitón en el herpetario del Parque Zoológico “Benito Juárez”.

TESIS QUE PRESENTA

ROMARIO IRVING PÉREZ MARTÍNEZ

PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR:

MC. SALVADOR PADILLA ARELLANES

COASESOR:

MVZ. CARLOS FEDERICO MONTALVO GONZALEZ



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“Determinación de valores hematológicos en cuatro diferentes géneros de
pitón en el herpetario del Parque Zoológico “Benito Juárez”.**

TESIS QUE PRESENTA

ROMARIO IRVING PÉREZ MARTÍNEZ

PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Morelia, Mich. Junio 2013

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres:

Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

A mi familia:

Porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

A mi asesor de tesis:

Al MC. Salvador Padilla Arellanes por su disposición permanente e incondicional en aclarar mis dudas y por sus substanciales sugerencias durante la redacción de este proyecto, por su amistad.

Al Zoológico de Morelia “Benito Juárez”:

Por todas las facilidades brindadas durante la realización de este proyecto de tesis.

ÍNDICE

Introducción.....	1
Antecedentes.....	2
Material y métodos.....	12
Resultados y discusión.....	14
Conclusiones.....	20
Imágenes.....	21
Anexos.....	25
Bibliografía.....	29

INTRODUCCIÓN

Los reptiles, son organismos altamente especializados, dotados de innumerables muestras de evolución, resultan hoy en día animales de elección para su manutención en cautiverio como animales de compañía o con fines de investigación y docencia (Czaplewski, 2005).

Se tiene conocimiento de al menos 7780 especies establecidas y con esto caemos en cuenta de la enorme diversidad de la clase reptilia, así como la gran variabilidad de hábitats, requerimientos nutricionales y ambientales. Dentro de este amplio grupo encontramos alrededor de 2500 especies y subespecies de serpientes (Czaplewski, 2005).

Los pitonidos o pitones (*Pythonidae*), son una familia de serpientes constrictoras. El género *Python* fue descrito por Daudin en 1803. Son una familia de serpientes no venenosas, se encuentran en África, Asia y Australia. Entre sus miembros se encuentran algunas de las serpientes más grandes del mundo. Ocho géneros y 26 especies son actualmente reconocidas (<http://enciclopediaanimal.wordpress.com/pythonidae-%c2%B7-serpientes-constrictoras/>).

La mayoría de las especies de esta familia están disponibles en el comercio de mascotas exóticas. Sin embargo, se debe tener precaución con las especies más grandes, ya que pueden ser peligrosas (<http://enciclopediaanimal.wordpress.com/pythonidae-%c2%B7-serpientes-constrictoras/>).

Algo fundamental en los servicios médicos aplicados en reptiles es comprender la gama de variantes anatómicas, fisiológicas y zootécnicas, para integrar los hallazgos clínicos y ejercer los lineamientos terapéuticos (Czaplewski, 2005).

La obtención de muestras de sangre de los reptiles para la evaluación hematológica se logra fácilmente con el conocimiento adecuado de la anatomía, la formación y la practica adecuada (Douglas, 2010).

En la medicina herpetológica y en general de los reptiles es muy complejo llegar al diagnóstico de alguna enfermedad, ya que estos ejemplares no presentan fiebre o algunos otros signos además de que no tienen nódulos linfáticos como en los mamíferos y en ocasiones puede ser difícil el manejo.

Por lo tanto la evaluación del hemograma y otros estudios de la sangre es parte del diagnóstico de laboratorio de los pacientes reptiles. La hematología se utiliza para detectar condiciones tales como la anemia, enfermedades inflamatorias, parasitemias, desordenes hematopoyéticos y trastornos hemostáticos. La evaluación hematológica involucra la examinación de los eritrocitos, leucocitos y trombocitos en la sangre (Thrall, 2004).

ANTECEDENTES

Eritrocitos de los reptiles

Morfología

Los eritrocitos maduros de los reptiles en general, son más grandes que los de las aves y los mamíferos. Los eritrocitos de los reptiles son células elipsoidales con posición central, los núcleos son ovales o redondos, la cromatina es de un color purpura denso, y a menudo, los márgenes son irregulares (fig. 1). El citoplasma es uniforme y presenta manchas de color naranja-rosado. Los eritrocitos policromatófilos tienen la cromatina nuclear menos densa y el citoplasma es más basófilo que los eritrocitos maduros. Los eritrocitos inmaduros en ocasiones se ven en la sangre periférica de los reptiles, especialmente en animales muy jóvenes o de quienes padecen ecdisis. Los eritrocitos inmaduros son células redondas irregulares con núcleos grandes, redondos y un citoplasma basófilo. (Martínez, 2011).

Los reticulocitos son detectados por tinción de las células con un colorante vital, tales como el nuevo azul de metileno. Los reticulocitos de las

serpientes al igual que los reticulocitos de las aves, tienen un anillo distinto de retículo agregado que rodea al núcleo de las células rojas. Estas células corresponden a los eritrocitos policromatofilos que se encuentran en las extensiones de la sangre teñidas con Romanowsky. (Thrall, 2004).

Las inclusiones basofílicas irregulares con frecuencia se observan en el citoplasma de los eritrocitos, en los frotis de sangre periférica de muchas especies de reptiles. Estas inclusiones representan probablemente un artefacto en la preparación del portaobjetos, ya que los frotis de sangre hechos en repetidas ocasiones de la misma muestra a menudo revelan distintos grados de estas inclusiones. (Thrall, 2004).

Las imágenes del microscopio electrónico sugieren que estas inclusiones son orgánulos degenerados. Otros artefactos que se encuentran en el citoplasma de los eritrocitos son las vacuolas y áreas claras refráctiles. Estos pueden ser minimizados con una cuidadosa preparación de los frotis de sangre. (Thrall, 2004).

La evaluación de laboratorio

La evaluación en el laboratorio de los eritrocitos de reptiles implica la determinación del volumen del paquete celular (PCV) o hematócrito, conteo total de eritrocitos (TRBC) y hemoglobina (Hb) en sangre. El PCV se obtiene por centrifugación del microhematocrito. Un PCV también se puede calcular por los contadores de células electrónicos, que están ajustados con precisión para cada especie de acuerdo con las diferencias en tamaños de los eritrocitos. Sin embargo la centrifugación del microhematocrito es el método más práctico para la obtención del PCV en la sangre de los reptiles. (Martínez, 2011).

Un TRBC puede ser determinado por el método hemocitómetro, recuento manual o por un contador de células electrónico. El sistema Unopette de eritrocitos es el método más fácil, porque la dilución 1:200 de la sangre entera, anticoagulada, se realiza mediante el diluyente y el vial de la mezcla proporcionada con el kit. (Martínez, 2011).

La Hb está determinada por la misma técnica descrita para hematología aviar. El método cianometahemoglobina o procedimientos automatizados, tales como el uso del hemoglobinómetro, pueden determinar la hemoglobina en la sangre de los reptiles. (Martínez, 2011).

Respuestas en la enfermedad

Los reptiles tienen menor TRBC en comparación con el de los mamíferos y las aves, y el TRBC parece tener una relación inversa con el tamaño de los eritrocitos. Los lagartos suelen tener los eritrocitos más pequeños que otros reptiles, por lo tanto tienen un mayor TRBC. Las serpientes tienen valores de TRBC más bajos que los lagartos pero mayores que los quelonios. (Thrall, 2004).

Los valores TRBC, Hb y PCV pueden variar por una serie de factores, incluyendo el medio ambiente, el estado nutricional y el género. El PCV normal de la mayoría de los reptiles oscila entre 20% y 40%. Por lo tanto, un hematocrito (PCV) menor a 20% sugiere la anemia, un hematocrito mayor a 40% sugiere una hemoconcentración o eritrocitosis (policitemia). (Thrall, 2004).

Las causas de la anemia en reptiles son similares a las descritas para las aves y los mamíferos. La anemia se puede clasificar como hemorrágica, hemolítica o la anemia por depresión. Las anemias hemorrágicas por lo general son el resultado de lesiones traumáticas o de parásitos chupadores de sangre, sin embargo, otras causas como la coagulopatía o una lesión ulcerosa, también se deben considerar. La anemia hemolítica puede ser resultado de parasitemia, septicemia o toxemia. La anemia por depresión generalmente está asociada con enfermedades inflamatorias crónicas, especialmente aquellas asociadas con un agente infeccioso. Otras causas que deben ser consideradas para la anemia de la depresión en los reptiles son la enfermedad crónica renal o hepática, neoplasia, los productos químicos y posiblemente el hipotiroidismo. (Thrall, 2004).

El grado de policromasia o reticulocitosis en los frotis de sangre de reptiles normales, generalmente es baja, y representan menos del 1% de la

población de eritrocitos. Esto puede asociarse con la larga vida de los eritrocitos, por lo tanto, la tasa de rotación de los eritrocitos en los reptiles es más lenta en comparación con las aves y los mamíferos. La tasa metabólica relativamente baja de los reptiles puede ser también un factor. Los reptiles jóvenes tienden a tener un mayor grado de policromasia que los adultos. La anisocitosis y poiquilocitosis leve se considera normal para la mayoría de los eritrocitos en reptiles. De moderada a marcada anisocitosis y poiquilocitosis están asociados con la respuesta a la regeneración de los eritrocitos y con menos frecuencia con los trastornos de los eritrocitos. Un aumento en la policromasia y en el número de eritrocitos inmaduros se ve en reptiles que responden a condiciones anémicas. Reptiles jóvenes o aquellos sometidos a ecdisis también pueden presentar el aumento de la policromasia y de la concentración de eritrocitos inmaduros. Eritrocitos que exhiben binucleación, formas anormales nucleares o actividad mitótica pueden estar asociados con marcadas respuestas regenerativas. Estos hallazgos nucleares, sin embargo, también pueden ocurrir en los reptiles después de la hibernación o en asociación con una enfermedad inflamatoria severa, la desnutrición y el hambre. Un basófilo punteado generalmente sugiere una respuesta regenerativa, pero también puede ser visto en pacientes con intoxicación por plomo. Los eritrocitos hipocrómicos se asocian con la deficiencia de hierro o a una enfermedad inflamatoria crónica. (Thrall, 2004).

Leucocitos de los reptiles

Morfología

Los granulocitos de los reptiles se pueden clasificar en dos grupos, acidófilos y basófilos, a partir de su aparición en los frotis de sangre preparados con tinciones de Romanowsky. Los acidófilos se dividen en heterófilos y eosinófilos. Los heterófilos de los reptiles en general, son células redondas con eosinofilia, granulocitos citoplasmáticos fusiformes (fig. 2). El citoplasma de los heterófilos normales es incoloro. El núcleo de los heterófilos maduros es típicamente redondo u ovalado y se coloca excéntricamente en la célula, con la cromatina densamente agrupada. Algunas especies de lagartos tienen heterófilos con núcleos lobulados. Los heterófilos oscilan entre los 10 y 23 μm

de tamaño, pero puede variar entre las especies y muestras individuales de sangre. (Mead, 2004)

Los gránulos citoplasmáticos de los heterófilos en reptiles generalmente son peroxidasa negativa, excepto en unas pocas especies de serpientes y lagartos. Además, los heterófilos de reptil no se tiñen para la fosfatasa alcalina. Por lo tanto, los heterófilos de los reptiles son funcionalmente equivalentes a los neutrófilos de mamíferos, pero lo más probable es comportarse como los heterófilos de las aves en donde dependen más de mecanismos oxígeno-dependientes para destruir los microorganismos fagocitados. (Mead, 2004)

Los eosinófilos en la mayoría de los frotis de sangre de reptil son células grandes, redondas, con gránulos eosinófilos esféricos citoplasmáticos. Los gránulos de algunas especies de reptiles, como iguanas, se tiñen de azul con la tinción de Romanowsky. Los gránulos citoplasmáticos de los eosinófilos también se tiñen positivos para la peroxidasa en algunas especies de reptiles, lo que permite una fácil diferenciación entre los eosinófilos y los heterófilos. Tanto los heterófilos como los eosinófilos varían de tamaño según la especie. Por ejemplo, las serpientes tienen eosinófilos grandes, mientras que los lagartos los tienen más pequeños. El núcleo se encuentra en una posición celular central y su forma es variable, va desde ligeramente alargado a lobulado. (Mead, 2004)

Los basófilos por lo general son células pequeñas y redondas que contienen gránulos en el citoplasma y metacromatinas, que a menudo ocultan el núcleo (fig. 3). Cuando es visible, el núcleo de las células es un poco excéntrico en su posición y no es lobulado. Los gránulos de los basófilos con frecuencia se ven afectados por el agua, que provocan que se disuelvan parcialmente. Por lo tanto, la fijación con alcohol y el uso de tinción de Romanowsky ofrecen los mejores resultados para la tinción de los basófilos de reptiles. Tanto los acidófilos, como los basófilos varían de tamaño según la especie, pero en general oscilan entre los 7 y 20 μm . Los lagartos suelen tener basófilos pequeños, mientras que las tortugas y cocodrilos presentan basófilos grandes. (Thrall, 2004).

Los linfocitos de los reptiles son parecidos a los de las aves y mamíferos. Varían de tamaño, desde pequeñas (5-10 μm) hasta grandes (15 μm). Los linfocitos están alrededor de las células adyacentes en el frotis de sangre o en un margen retirado del citoplasma. Tienen un núcleo redondo ligeramente posicionado excéntricamente, la cromatina nuclear está fuertemente agrupada en los linfocitos maduros (fig. 4). Típicamente los linfocitos tienen un núcleo grande. Los linfocitos grandes tienen más volumen en comparación con el citoplasma de linfocitos de un tamaño pequeño, y el núcleo se tiñe de un color pálido. El citoplasma de un linfocito normal parece ser homogéneo y carece tanto de vacuolas como de gránulos. Los monocitos en general, son los mayores leucocitos en la sangre periférica de los reptiles, y son parecidos a los de las aves y mamíferos. Los monocitos varían en forma, pueden ser redondos o de forma ameboidea. El núcleo también es variable en forma, oscila entre redondo u ovalados con lóbulos. La cromatina nuclear de los monocitos es menos condensada y se tiñen de un color relativamente pálido en comparación con los núcleos de los linfocitos (fig. 5). (Thrall, 2004).

La evaluación de laboratorio

La evaluación del leucograma en reptiles implica la determinación de un total y un diferencial de leucocitos y también implica el examen de la morfología de los leucocitos en un frotis de sangre teñida. Los métodos de recuento manual se utilizan para obtener la concentración total de leucocitos en los reptiles de igual manera se utilizan en la hematología aviar. La presencia de eritrocitos nucleados y trombocitos en la sangre de los reptiles no permite el uso de procedimientos electrónicos para el conteo de células. Existen dos métodos manuales comúnmente utilizados para obtener un recuento total de leucocitos en sangre de reptiles uno es el método de Natt y Herrick y otro el método floxina B. En especies de reptiles que normalmente tienen un mayor número de linfocitos que de heterófilos circulantes, se prefiere el método de Natt y Herrick, porque la exactitud del método floxina B se basa en un gran número de heterófilos y eosinófilos. (Thrall, 2004).

Respuestas en la enfermedad

El porcentaje de heterófilos en el diferencial de leucocitos de los reptiles de los reptiles normales varía con la especie. Los heterófilos pueden representar hasta un 40% de los leucocitos en algunos reptiles normales. La concentración de heterófilos en los reptiles también se ve influenciada por factores estacionales. Por ejemplo, la concentración de heterófilos es mayor durante los meses de verano y es más baja durante la hibernación, porque la función principal de los heterófilos es la fagocitosis, los aumentos significativos en el recuento de heterófilos de los reptiles por lo general se asocian con enfermedades inflamatorias, especialmente microbios y las infecciones parasitarias o alguna lesión en los tejidos. En condiciones no inflamatorias que pueden resultar en heterofilia incluyen el estrés, una neoplasia y la leucemia heterofilica. (Mead, 2004)

Los heterófilos pueden parecer anormales en reptiles que sufren una variedad de enfermedades. Por ejemplo, los heterófilos pueden presentar en diversos grados de toxicidad, con las enfermedades inflamatorias, en especial las que involucran a agentes infecciosos como las bacterias. Los heterófilos tóxicos presentan un aumento de la basofilia citoplasmática, granulación anormal y vacuolización citoplasmática. Los heterófilos degranulados pueden estar asociados con artefactos en la preparación del frotis de sangre o representar cambios tóxicos. La lobulación nuclear en las especies que normalmente no la presentan sugiere una inflamación severa. (Mead, 2004)

El número de eosinófilos circulantes en los reptiles normales es variable. En general, los lagartos suelen tener un número bajo de eosinófilos en comparación con algunas especies de tortugas, que pueden tener hasta 20% de eosinófilos. El número de eosinófilos y de heterófilos presentes en la sangre periférica se ve influenciada por factores ambientales, tales como los cambios estacionales. El número de eosinófilos es menor durante los meses de verano y más alto durante la hibernación e algunas especies. La eosinofilia puede estar asociada con infecciones parasitarias y la estimulación del sistema inmune. (Martínez, 2011).

El porcentaje de basófilos en el recuento diferencial de leucocitos de reptiles normales pueden variar desde 0% a 40%. La variación estacional de la concentración de los basófilos es mínima, a diferencia de la concentración de acidofilos, que varía con la temporada. Algunas especies de reptiles tienen normalmente un elevado número de basófilos en la circulación. Por ejemplo, algunas especies de tortugas presentan 40% de basófilos en el diferencial de leucocitos, aunque la razón de esto es desconocida. (Martínez, 2011).

La concentración de linfocitos en sangre de reptil también varía y puede representar más del 80% del diferencial normal de leucocitos en algunas especies. El número de linfocitos se ve influido por varios factores ambientales y fisiológicos. Los heterófilos, eosinófilos y linfocitos también se ven influenciadas por el cambio estacional, el recuento de linfocitos tiende a ser más bajo durante los meses de invierno y más alta durante los meses de verano. Los reptiles de clima templado disminuyen los números de linfocitos durante la hibernación, después de lo cual aumenta la concentración de linfocitos. Los reptiles tropicales también muestran una disminución del número de linfocitos circulantes durante los meses de invierno, a pesar de su falta de hibernación. El número de linfocitos también se ven afectados por el género, algunas hembras de varias especies tienen concentraciones significativamente más altas de linfocitos que en los machos de la misma especie. (Martínez, 2011).

Los linfocitos de los reptiles funcionan de una manera similar a los de las aves y mamíferos. Tienen las mismas clases principales de linfocitos; los linfocitos B y T, que están implicados con una variedad de funciones inmunológicas. Sin embargo, a diferencia de las aves y los mamíferos, las respuestas inmunológicas de los reptiles ectotermicos están muy influenciadas por el medio ambiente. Por ejemplo, las temperaturas bajas pueden suprimir la respuesta inmune en reptiles. (Lucas, 1999).

La linfopenia se puede asociar a la desnutrición o puede ser secundaria a una serie de enfermedades debido al estrés y a la inmunosupresión. La linfocitosis se produce durante la cicatrización de heridas, enfermedades

inflamatorias, infecciones parasitarias y las infecciones virales. La linfocitosis también se produce durante la ecdisis. La presencia de linfocitos reactivos y la presencia de células plasmáticas, sugiere la estimulación del sistema inmune. (Lucas, 1999).

Los monocitos generalmente se producen en pequeñas cantidades en los frotis de sangre de reptiles normales, oscilan entre 0% y 10% en el diferencial de leucocitos. Las serpientes suelen tener los monocitos con un aspecto azurofilo en el citoplasma. Los cambios en la concentración de los monocitos son pocos y las variaciones estacionales no tienen mucha influencia en estos valores. La monocitosis sugiere enfermedades inflamatorias, especialmente inflamación granulomatosa. (Thrall, 2004).

Trombocitos de los reptiles

Morfología

Los trombocitos de reptiles aparecen como células nucleadas elípticas a fusiformes (fig. 7). El núcleo en posición central tiene la cromatina nuclear densa y se tiñe de color púrpura, mientras que el citoplasma es incoloro y puede contener gránulos azurofilos. Los trombocitos activados son comunes y aparecen como células con un citoplasma con márgenes irregulares y vacuolas. (Thrall, 2004).

La evaluación de laboratorio

La concentración real de trombocitos puede ser difícil de determinar, porque los trombocitos tienden a aglutinarse tanto in vitro cuando se exponen a la heparina, que es un anticoagulante de uso común en la hematología de reptiles. La concentración de trombocitos se puede medir utilizando el método de Natt y Herrick. Después de preparar la dilución 1:200 de sangre con la solución de Natt-Herrick y cargando la cámara de Neubauer en un hemocitometro, se cuenta el número de trombocitos en toda la zona central y después se cuenta en ambos lados del hemocitometro. El número de trombocitos por micro litro de sangre se obtiene multiplicando el número obtenido por 1000. Una concentración de trombocitos subjetiva se puede

determinar basándose en el número de trombocitos que aparecen en un frotis de sangre teñido, y puede ser reportada como normal, reducida o aumentada. Los trombocitos se presentan típicamente en cantidades que oscilan entre los 25 y 350 trombocitos por cada 100 leucocitos en el frotis de sangre de los reptiles normales. (Lucas, 1999).

Respuestas a las enfermedades

Los trombocitos en los reptiles tienen un papel importante en la formación de trombos, y los trombocitos funcionan de manera similar a los trombocitos de las aves y las plaquetas de los mamíferos. Algunas características ultraestructurales de los trombocitos es que son pseudópodos con material granulomatoso muchos de fibrina como filamentos que irradian tanto entre y alrededor de las células. Los trombocitos inmaduros de los reptiles se parecen a los trombocitos inmaduros de las aves y cuando están presentes en los frotis de sangre, representan una respuesta regenerativa. Las trombocitopenias de reptiles son el posible resultado de una utilización periférica excesiva de trombocitos o una disminución en la producción de trombocitos. Los trombocitos con núcleos polimórficos se consideran anormales, y esta característica puede estar asociada con una enfermedad inflamatoria grave. (Lucas, 1999)

Es importante conocer estos valores para evaluar a nuestras especies cuando presenten alguna enfermedad o algún cambio en su comportamiento y así poder determinar un diagnóstico oportuno para elegir un tratamiento más adecuado y específico.

El objetivo general de este trabajo fue determinar valores hematológicos en cuatro diferentes géneros de *Python* clínicamente sanos en el herpetario del Parque Zoológico “Benito Juárez” de Morelia, Michoacán.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el área del herpetario del Parque Zoológico “Benito Juárez”, ubicado en la ciudad de Morelia Michoacán, México.

Se realizó examen físico previo a la extracción de sangre a cada uno de los ejemplares con los que se trabajó; este fue sistemático y completo, como en otras especies similares a los reptiles.

Se tomó una muestra sanguínea de doce pitones del herpetario del zoológico de Morelia (anexo 1), durante los meses de agosto, septiembre, octubre y noviembre de 2012.

Las muestras sanguíneas se tomaron de la vena coccígea ventral (Carpenter 2005) con jeringas desde 1 ml hasta 10 ml, tomando en cuenta la talla de cada uno de los ejemplares, posteriormente la sangre se depositó en tubos con anticoagulante ácido etildiaminotetracético (EDTA), se transportaron el mismo día al Laboratorio de la Clínica Veterinaria para perros y gatos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana para su análisis.

Con las muestras de sangre se realizó el hemograma completo para la obtención de los valores hematológicos, de acuerdo a la técnica descrita por Thrall 2004. Además se realizaron dos frotis: uno de capa delgada y uno de capa gruesa para la identificación de posibles hemoparasitos.

Para determinar el valor de las proteínas plasmáticas y el hematocrito se llenó un capilar hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad, posteriormente se colocó en una micro centrifuga y se centrifuga a 11,000 rpm durante 5 minutos, se sacó el capilar y en una tabla para determinar el hematocrito se obtuvo el valor de este, para obtener el valor de las proteínas se utilizó un refractómetro en el que se puso el plasma del capilar y se observó a contra luz. La determinación de la hemoglobina se realizó mediante la técnica de cianometahemoglobina, la cual

consiste en poner en 2.5 ml de solución Drabkin 10 μ l de sangre y dejar reaccionar durante 10 minutos y posteriormente se obtiene el valor en un espectrofotómetro.

El conteo de glóbulos rojos, glóbulos blancos y trombocitos se realizó de manera manual, utilizando una cámara de Neubauer. Se utilizó una pipeta de Thoma para realizar una dilución 1:200 de sangre con solución de Natt-Herrick, se dejó reposar de 2 a 3 minutos para después colocarla en un agitador durante un minuto. Se llenó la cámara de Neubauer con una o dos gotas de la dilución y se observó al microscopio. El conteo de glóbulos blancos y trombocitos se realizó en los 9 cuadrantes de la cámara con el objetivo de 10x y el conteo de eritrocitos se hizo en el área central de la cámara utilizando el objetivo de 40x

Para el conteo diferencial de leucocitos se hizo un frotis de capa delgada y se tiñó con Wright para posteriormente observarlo al microscopio con el objetivo de 100x y realizar el conteo de 100 células.

La determinación del VGM y CGMH se realizó mediante cálculos matemáticos utilizando los valores del Ht, Hb y eritrocitos.

Los resultados obtenidos se analizaron en hojas de cálculo Excel, obteniendo el promedio, valor mínimo y valor máximo de cada uno de los analitos. Con los resultados obtenidos se realizó una base de datos que podrá utilizarse para análisis futuros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para obtener las muestras de sangre en reptiles para hematología y bioquímica sanguínea se utilizan una gran variedad de métodos, la elección del método debe ir en función de las peculiaridades de la especie, el volumen de sangre que se necesita, el tamaño del reptil y la preferencia del colector. Los puntos disponibles de punción venosa en reptiles para el muestreo de sangre son pocos; debido a que los vasos linfáticos a menudo acompañan a los vasos sanguíneos en los reptiles, en la punción venosa de los vasos periféricos se produce frecuentemente una mezcla de sangre con linfa. (Thrall 2004).

La cardiocentesis comúnmente se lleva a cabo para la obtención de la sangre en reptiles, especialmente en serpientes. El corazón de una serpiente lo ubicamos mediante la observación de los latidos del corazón, ya que se mueven los escudos ventrales que cubren el corazón, o por palpación. Ya que el corazón se moverá caudalmente y cranealmente, debe ser estabilizado en el vértice y la base utilizando el dedo pulgar y el índice durante el tiempo de la toma de muestra. Se inserta una aguja debajo del escudo y luego se avanza hasta el corazón. Generalmente la jeringa se llena muy lentamente, conforme el corazón late. (Thrall 2004).

La vena coccígea ventral también es un sitio común para la obtención de sangre en los reptiles, sobre todo en lagartos, serpientes y cocodrilos. Esta vena se encuentra justamente ventral a las vértebras caudales. Para obtener sangre de la vena coccígea ventral, la aguja se inserta en la escala ventral o la línea media ventral y luego se dirige hacia la vértebra. Se debe aplicar ligera presión negativa a la jeringa y al mismo tiempo avanzar con la aguja. A menudo, una vértebra se encuentra antes que la sangre entre en la aguja, y en tales casos, la aguja se retira lentamente hasta que la sangre fluye en la jeringa. Los lagartos y cocodrilos pueden ser sangrados de la cola. (Thrall 2004).

En el desarrollo de nuestra investigación solamente se obtuvo la sangre de la vena coccígea ventral ya que se decidió que era la vía menos invasiva

para el animal y de esta manera evitar el estrés del mismo (fig. 8). Es importante mencionar que en algunos de los animales con los que se trabajó se tuvo que realizar la punción hasta cuatro veces para lograr la obtención de sangre, y en algunos no se obtuvo muestra para realizar el hemograma, por lo que el número de animales de estudio se redujo. (Anexo 2).

Al momento de evaluar los resultados hematológicos de los reptiles, no deben ser pasados por alto los factores externos como las condiciones ambientales que pueden potenciar o inhibir la respuesta del animal a una enfermedad. Las respuestas celulares en la sangre de los reptiles son menos predecibles que las de la sangre de mamíferos y aves cuyos microambientes celulares son más estables. Una serie de factores intrínsecos, tales como la edad o el sexo también afectan los datos hematológicos de reptiles. Además, influyen un gran número de factores en la manipulación de las muestras, tales como el sitio de recolección de sangre, el tipo de anticoagulante utilizado, el método de recuento de células y el tipo de tinción usado. Todos estos factores complican el establecimiento de los valores de referencia normales en los reptiles. Por lo tanto, el recuento leucocitario total y diferencial debe diferir mucho de los valores de referencia normales para que se consideren significativos. (Thrall 2004).

Los animales con los que se trabajó durante la realización de esta investigación se encuentran con las condiciones ambientales (temperatura y humedad) controladas, cabe mencionar que antes de la venopunción se realizó un examen físico completo (anexo 3) para asegurarnos de que eran animales clínicamente sanos. La muestra de sangre que se obtuvo se depositó en tubos con anticoagulante EDTA y el mismo día se realizó el análisis de la muestra en el laboratorio para evitar posibles alteraciones en los resultados.

Los resultados que obtuvimos en nuestro estudio se encuentran en las **tablas 1, 2 y 3**. Obteniendo un intervalo en hematocrito de 0.22 – 0.39 L/L, trombocitos de 53 - 206 y leucocitos de 1.5 – 20.6.

Tabla 1

Analitos	Ht	Hb	GR	VGM	CGMH	Trombocitos
Unidades	L/L	g/L	$\times 10^{12}/L$	f/L	g/L	$\times 10^9/L$
P. Green	0.29	106	0.54	537	365.5	72.5
P. Granito	0.23	82	1.2	537	356	57.5
P. Burmesse macho	0.22	85	0.64	344	386	52.5
P. Reticulado normal	0.30	82	0.79	379	273	92.5
P. Labios blancos	0.29	66	0.51	568	227	105
P. Reticulado purpura	0.25	98	1.4	179	392	90
P. Morelia	0.39	120	1.1	355	307	112.5
P. Cabeza amarilla	0.28	129	0.61	459	460	77.5
P. Burmesse hembra	0.29	132	0.98	295	455	82.5
P. Reticulado platinum	0.30	126	1.1	330	420	97.5
P. Reticulado tigre	0.24	96	1.3	184	400	205.5

Tabla 1: valores hematológicos de la línea roja y trombocitos de 11 pitones del herpetario del parque zoológico “Benito Juárez” en Morelia, Michoacán.

Tabla 2

Analitos	Prot.	GB	Heterofilos	Linf.	Mon.	Azurofilos	Eos.	Bas.
Unidades	g/L	$\times 10^9/L$	%	%	%	%	%	%
P. Green	76	2	51	9	12	23	0	5
P. Granito	86	2.6	53	11	10	20	0	6
P. Burmesse macho	74	1.6	24	14	9	42	0	11
P. Reticulado normal	87	2.4	40	12	3	35	0	10
P. Labios blancos	94	1.5	37	9	28	23	0	2
P. Reticulado purpura	105	18.3	47	7	5	39	0	2
P. Morelia	97	20.6	41	19	7	18	0	16
P. Cabeza amarilla	82	6.8	55	17	11	15	0	2
P. Burmesse hembra	86	2.6	51	12	5	22	0	10
P. Reticulado platinum	105	19.3	64	6	12	18	0	0
P. Reticulado tigre	113	1.9	64	15	6	13	1	1

Tabla 2: valores hematológicos de proteína y línea blanca de 11 pitones del herpetario del parque zoológico “Benito Juárez” en Morelia, Michoacán.

Tabla 3

Analito	Unidades	Promedio	Valor min.	Valor max.
Ht	L/L	0.28	0.22	0.39
Hb	g/L	102	66	132
Eritrocitos	$\times 10^{12}/L$	0.92	0.51	1.4
VGM	f/L	379	179	568
CGMH	g/L	367	227	460
Trombocitos	$\times 10^9/L$	95	53	206
Prot.	g/L	91	74	113
Leucocitos	$\times 10^9/L$	7.24	1.5	20.6
Heterofilos	%	47.91	24	64
Linfocitos	%	11.91	6	19
Monocitos	%	9.82	3	28
Azurofilos	%	24	13	42
Eosinofilos	%	0.09	0	1
Basofilos	%	5.91	0	16

Tabla 3: valores mínimo, máximo y promedio de la línea roja, trombocitos, proteína y línea blanca de 11 pitones del herpetario del parque zoológico "Benito Juárez" en Morelia, Michoacán.

Roskopf en 2002 publicó valores hematológicos en *Pythones spp.* obteniendo un hematocrito de 0.25-0.40 L/L, eritrocitos 1.0-2.5 ($10^{12}/L$), GB 6-12 ($10^9/L$), heterofilos 20-80 (%), linfocitos 10-60 (%), monocitos 0-3 (%), eosinofilos 0-3 (%) y basófilos 0-10 (%), no reportando trombocitos.

Carpenter 2005 publicó valores hematológicos en *Python reticulatus* con un hematocrito de 0.18-0.32 L/L, eritrocitos 0.5-1.1 (%), hemoglobina 99-113 (g/L), VGM 250-411 (f/l), CGMH 96-180 (g/L) y GB 3.4-9.2 ($10^9/L$), no reportando trombocitos.

Campbell en 2007 documento resultados hematológicos en piton bola (*Python regius*), obteniendo un hematocrito de 0.16-0.21 L/L, hemoglobina de 55-79 (g/L), eritrocitos de 0.3-1.3 ($10^{12}/L$), GB de 7.9-16.4 ($10^9/L$), heterofilos 56-67 (%), linfocitos 7-21 (%), monocitos 0-1 (%), azurofilos 12-22 (%) y basófilos 0.2 (%), no reportando trombocitos.

Los resultados que se obtuvieron durante nuestra investigación son muy similares a los reportados por los autores ya mencionados en los párrafos anteriores. En algunos de los analitos se observa una pequeña diferencia en los valores, pero no se considerarían relevantes al momento de comparar, además es importante mencionar que esas pequeñas diferencias pueden estar asociadas a factores externos tales como la época del año en la que se tomó la muestra de los animales o el sitio de la venopunción. Es importante resaltar que en nuestro estudio se hizo conteo de trombocitos y azurofilos.

. La concentración de trombocitos se puede medir utilizando el método de Natt y Herrick. Después de preparar la dilución 1:200 de sangre con la solución de Natt-Herrick y cargando la cámara de Neubauer en un hemocitometro, se cuenta el número de trombocitos en toda la zona central y después se cuenta en ambos lados del hemocitometro. El número de trombocitos por micro litro de sangre se obtiene multiplicando el número obtenido por 1000. Una concentración de trombocitos subjetiva se puede determinar basándose en el número de trombocitos que aparecen en un frotis de sangre teñido, y puede ser reportada como normal, reducida o aumentada. Los trombocitos se presentan típicamente en cantidades que oscilan entre los 25 y 350 trombocitos por cada 100 leucocitos en el frotis de sangre de los reptiles normales. (Lucas, 1999), para el conteo de los trombocitos durante el desarrollo de nuestra investigación se realizó el método de Natt y Herrick ya descrito anteriormente.

Los hemoparásitos de los reptiles se observan con frecuencia en la sangre de los animales sanos y generalmente en los animales capturados de vida libre. La mayoría de estos hemoparasitos no son patógenos. Los hemoparásitos patógenos están asociados principalmente con una anemia hemolítica y con otras enfermedades clínicas, sobre todo cuando el estrés es un factor. (Stacy 2011).

El término hemogregarinas se utiliza para describir una variedad de organismos morfológicamente similares a partir de 4 diferentes géneros. Se pueden encontrar en la mayoría de las especies de reptiles y no pueden ser

diferenciados basándose solamente en la morfología. Los gametocitos de las hemogregarinas se identifican fácilmente en el citoplasma de los eritrocitos de los animales infectados. Son organismos oblongos con un citoplasma basófilo pálido y redondo, núcleos centrados ovalados con cromatina púrpura oscuro. El organismo se puede desplazar o envolver alrededor del núcleo de la célula huésped. Las hemogregarinas se consideran generalmente no patógenas, pero tienen la capacidad de provocar una respuesta inflamatoria significativa. (Stacy 2011), en nuestro trabajo solo en uno de los animales observamos este tipo de parasito, por lo que fue descartado de nuestros criterios de inclusión (fig. 9).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que los ejemplares con los que se trabajó son animales clínicamente sanos, por lo que los valores obtenidos pueden utilizarse para análisis o comparaciones en un futuro.

Ha habido avances significativos en el entendimiento de la hematología en reptiles en los últimos años. Gran parte del trabajo se ha hecho para identificar los tipos de células sanguíneas y su función en muchas de las especies de reptiles. Los datos e intervalos de referencia se han establecido para muchas especies, y muchos de los procesos infecciosos, ambientales y neoplásicos que influyen en el resultado del hemograma de reptiles se han documentado. Sin embargo, dada la gran cantidad de especies de reptiles y el reconocimiento cada vez mayor de nuevos procesos patológicos mediante técnicas de laboratorio, las investigaciones no son suficientes, especialmente en los estudios basados en la evidencia de la enfermedad y las anomalías hematológicas.

IMÁGENES

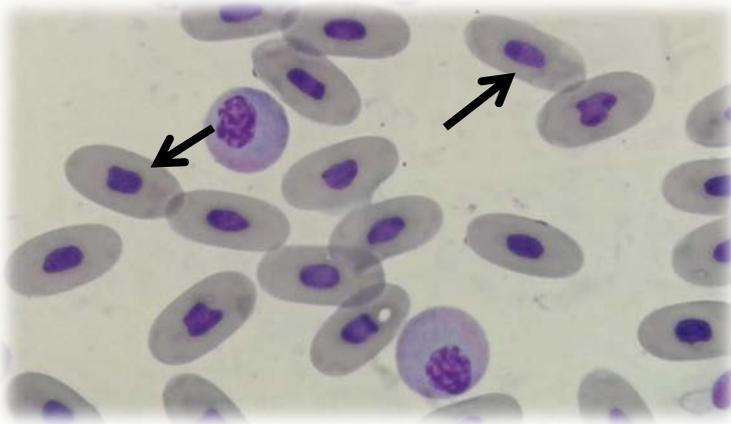


Fig. 1: eritrocitos normales en un frotis de sangre de una serpiente (*Python reticulatus*). Teñido con Wright, objetivo 100x.

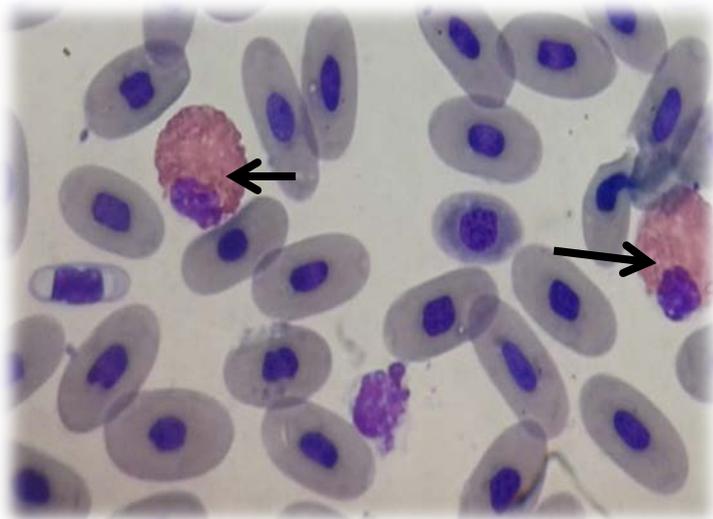


Fig. 2: heterofilo en un frotis de sangre de una serpiente (*Pithon molurus bivittatus*). Teñido con Wright, objetivo 100x.

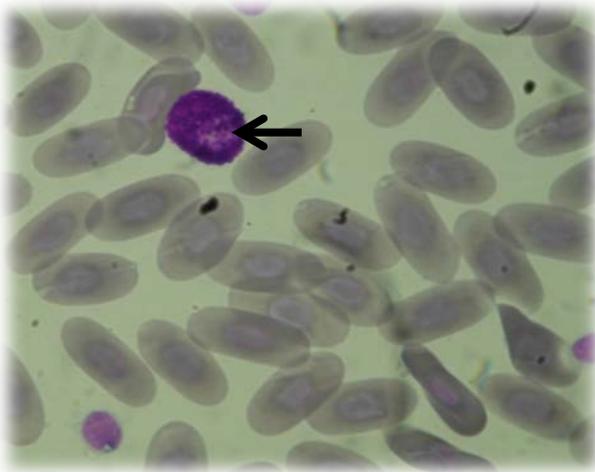


Fig. 3: basófilo en un frotis de sangre de una serpiente (*Morelia viridis*). Teñido con Wright, objetivo 100x.

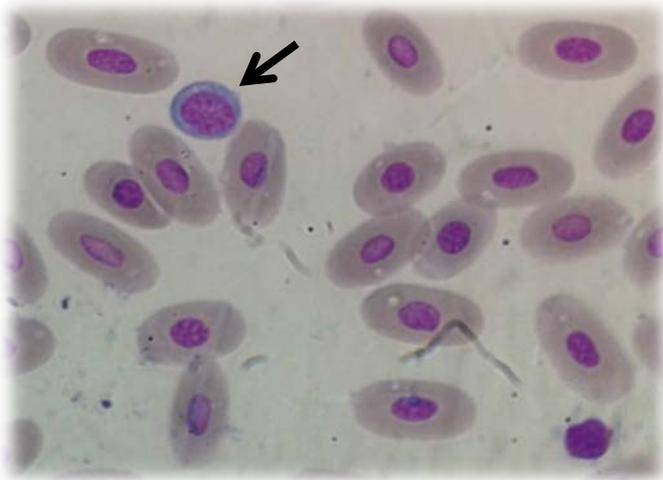


Fig. 4: linfocito en un frotis de sangre de una serpiente (*Leiopython albertsii*). Teñido con Wright, objetivo 100x.

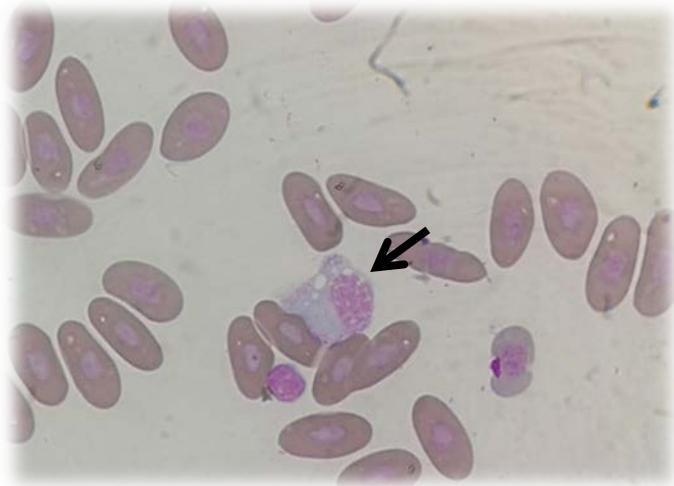


Fig. 5: monocito en un frotis de sangre de una serpiente (*Python reticulatus*). Teñido con Wright, objetivo 100x.

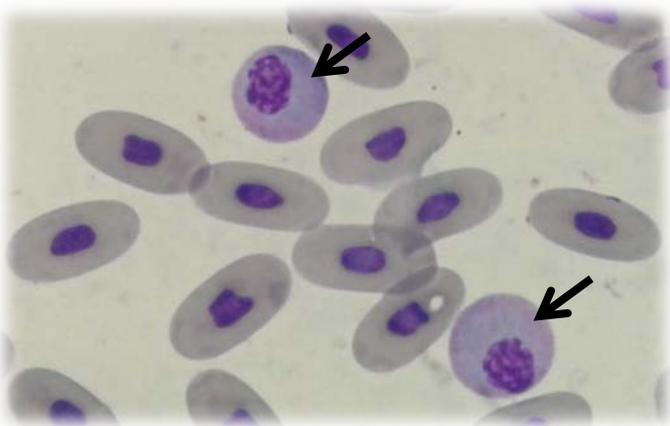


Fig. 6: azurofilo en un frotis de sangre de una serpiente (*Python molurus bivittatus*). Teñido con Wright, objetivo 100x.

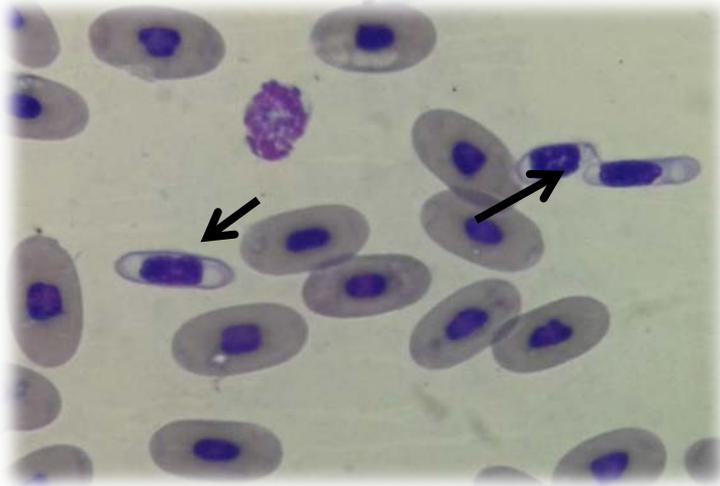


Fig. 7: trombocitos en un frotis de sangre de una serpiente (*Liasis fuscus*).
Teñido con Wright, objetivo 100x.



Fig. 8: extracción de sangre en una serpiente en la vena coccígea ventral

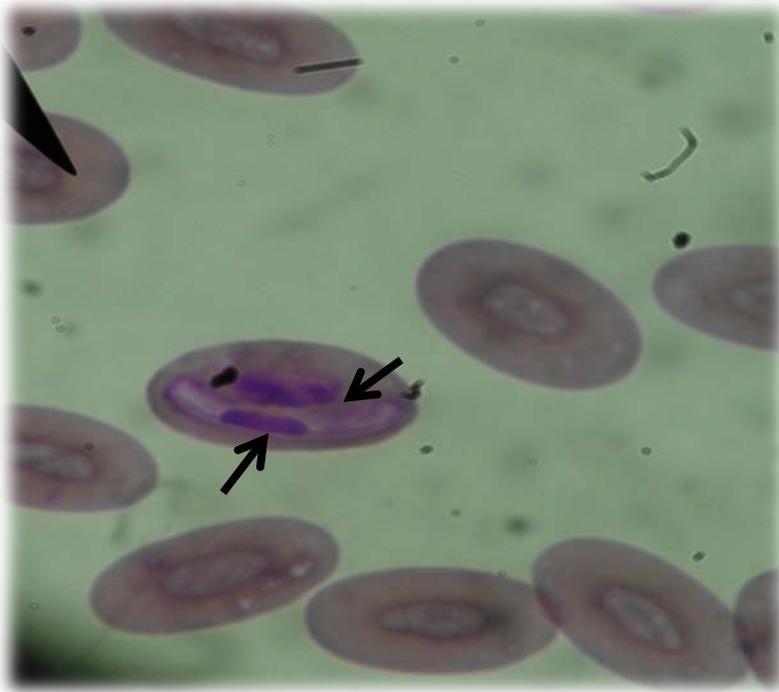


Fig. 9: Hemogregarina, probablemente *Hepatozoon*, en un frotis de sangre de una serpiente (*Liasis fuscus*). Teñido con Wright, objetivo 100x.

ANEXOS

Anexo 1

Nombre común	Nombre científico	Genero	Cantidad
Pitón acuático	<i>Liasis fuscus</i>	<i>Liasis</i>	1
Pitón labios blancos	<i>Leiopython albertisii</i>	<i>Leiopython</i>	1
Pitón reticulado tigre	<i>Python reticulatus</i>	<i>Python</i>	1
Pitón reticulado cabeza amarilla	<i>Python reticulatus</i>	<i>Python</i>	1
Pitón reticulado fase normal	<i>Python reticulatus</i>	<i>Python</i>	1
Pitón reticulado púrpura albino	<i>Python reticulatus</i>	<i>Python</i>	1
Pitón reticulado platinum	<i>Python reticulatus</i>	<i>Python</i>	1
Pitón verde	<i>Morelia viridis</i>	<i>Morelia</i>	1
Pitón burmeses o bimanos	<i>Python molurus bivittatus</i>	<i>Python</i>	2
Pitón green albino	<i>Python molurus bivittatus</i>	<i>Python</i>	1
Pitón granito	<i>Python molurus bivittatus</i>	<i>Python</i>	1

Anexo 2

Toma de muestras				
Nombre científico	Nombre común	Id	Fecha	Obtención
<i>Python molurus bivittatus</i>	Piton burmesse	macho	13/08/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python molurus bivittatus</i>	Piton green albino		13/08/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python molurus bivittatus</i>	Piton granito		13/08/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python molurus bivittatus</i>	Piton burmesse	hembra	13/08/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			19/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			02/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python regius</i>	Piton bola	hembra 1	27/08/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			18/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			14/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			19/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python regius</i>	Piton bola	hembra 2	27/08/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			18/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			14/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python regius</i>	Piton bola	hembra 3	27/08/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			18/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			14/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python regius</i>	Piton bola	cuarentena	27/08/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			18/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			14/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			19/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Morelia viridis</i>	Piton verde		02/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Liasis fuscus</i>	Piton acuático		31/08/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			27/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Liasis mackloti</i>	Piton macklot	macho	03/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			19/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			19/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Liasis mackloti</i>	Piton macklot	hembra	03/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			19/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			19/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python reticulatus</i>	Piton reticulado fase normal		10/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python reticulatus</i>	Piton reticulado cabeza amarilla		10/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			25/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			23/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python reticulatus</i>	Piton platinum		25/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			16/10/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python reticulatus</i>	Piton reticulado tigre		06/11/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python reticulatus</i>	Piton reticulado purpura albino		25/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Python curtus</i>	Piton sangre		10/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			25/09/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
			06/11/2012	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Leiopython albertisii</i>	Piton labios blancos		31/08/2012	<input checked="" type="checkbox"/>

Anexo 3

Formato de examen físico



Área administrativa: Unidad Operativa de Atención a Reptiles.

Nombre del documento: Examen físico y diagnóstico.

No. de expediente: _____

Fecha: _____

Nombre común: _____ Nombre científico: _____

Sexo: _____ Hora de inicio: _____ Hora de terminación _____

Actitud: _____ Peso: _____

Deshidratación: _____ FR: _____ FC: _____

Condición corporal: _____

Mucosas (Oral, conjuntival y cloacal): _____

REVISION CORPORAL SISTÉMICA.

TEGUMENTO	
DIGESTIVO	
RESPIRATORIO	
UROGENITAL	
LOCOMOTOR	
NERVIOSO	
CARDIOVASCULAR	
CAVIDAD CELÓMICA	

Diagnósticos
diferenciales: _____

Diagnostico presuntivo:

Alojamiento asignado: _____

Tratamiento inicial:

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Microbiología	Hematología	Química clínica	Parasitología	Imagenología	Otras
Fecha recepción de resultados:					

Resultados de análisis interno:

Resultados de análisis externos:

Diagnóstico clínico:

Plan terapéutico:

Observaciones: _____

Resolución: _____

FIRMA DEL MVZ RESPONSABLE

VoBo. Jefe de Unidad
Operativa de Atención a Reptiles

BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar R. F. et al. 2010. Atlas de medicina de animales exóticos. Ed. Inter-Medica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires – República Argentina. p. 136-137.
2. Campbell T. et al. 2007. Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology. 3^{ra} ed. Ed. Blackwell Publish. Ames, Iowa.
3. Carpenter J. W. 2005. Formulario de animales exóticos. 3^{ra} ed. Ed. Inter-medica. Buenos Aires, República Argentina. p.117.
4. Czaplewski R. W. 2005. Diplomado a distancia en fauna silvestre, MÓDULO V. Ed. por CEAMVET/Corporación Educativa. México DF. p. 9-12.
5. Douglas J. W. et al. 2010. Schalm's veterinary hematology. 6^{ta} ed. Ed. Wiley-Black well. Ames, Iowa. p. 1004.
6. Douglas R. M. Reptile medicine and surgery. 2^{da} ed. Ed. Elsevier. Marathon, Florida, USA. p. 513-517.
7. Feldman B. F. et al. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5^{ta} ed. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. p. 1026-1032.
8. International Species Information System (ISIS). Apple Valley. MN. 2002. www.isis.org.
9. Jacobson E. R. 2007. Infectious diseases and pathology of reptiles. Ed. CRC Press. USA. p. 1-2, 19.

10. Jenkins J. 2012. Hematology evaluation of reptiles: A diagnostic mainstay. [en línea]. <http://www.amasquefa.com/uploads/109173.pdf>. (consulta: Febrero 10, 2013).
11. Lucas A. J. et al. 1999. Atlas of Avian Hematology. Washington DC, United States. Department of Agriculture.
12. Martinez S. A. 2011. Hematology and blood cytology in reptiles. [en línea]. <http://www.amasquefa.com/uploads/109173.pdf>. (consulta: 11 Diciembre, 2012).
13. Mead K. F. 2004. Surface immunoglobulins on granular and agranular leukocytes in the thymus and spleen of the snapping turtle, Chelydra serpentina. *Dev Comp Immunol.* p. 109-120.
14. Stacy N. I. 2011. Diagnostic hematology of reptiles. [en línea]. <http://www.amasquefa.com/uploads/109173.pdf>. (consulta: Febrero 10, 2013).
15. Telford S. R. 2009. Hemoparasites of the Reptilia : color atlas and text. Ed. Taylor & Francis Group. USA. p. 200-259.
16. Thrall M. A. et al. 2004. Veterinary hematology and clinical chemistry. Ed. Lippincott Williams y Wilkins. Baltimore, USA. p. 259-271.
17. Word Press.com. Enciclopedia animal 2008. "Pythonidae, serpientes constrictoras". [en línea]. <http://enciclopediaanimal.wordpress.com/pythonidae-%c2%B7-serpientes-constrictoras/>. (consulta: 15 mayo, 2012.)
18. Zug. G. R. et al. 2001. Herpetology an introductory biology of amphibians and reptiles. 2^{da} ed. Ed. Academic press. San Diego, California, USA. p. 515-517.