



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

UNIDAD REGIONAL UNIVERSITARIA DE ZONAS ÁRIDAS

ESTUDIO HEMATOLÓGICO DE LA TORTUGA DEL BOLSÓN (*Gopherus flavomarginatus*) EN LA RESERVA DE LA BIOSFERA MAPIMÍ

TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA:

Biol. MARÍA MAGDALENA RIVAS GARCÍA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

24 de Abril de 2017.
Bermejillo, Durango.

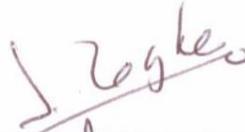


El presente trabajo de tesis titulado "ESTUDIO HEMATOLÓGICO DE LA TORTUGA DEL BOLSÓN (*Gopherus flavomarginatus*) EN LA RESERVA DE LA BIOSFERA MAPIMÍ", fue realizado por la Biol. María Magdalena Rivas García bajo la supervisión del Dr. Jorge A. Zegbe Domínguez y asesorada por la Dra. Cristina García De La Peña, Dr. Luis Antonio Tarango Arámbula, Dr. Rafael Castro Franco y Dr. Guillermo Medina García. Ha sido revisado y aprobado por el Comité Revisor como requisito parcial para obtener el título de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE EN ZONAS ÁRIDAS

Comité Revisor:

DIRECTOR:



Dr. Jorge A. Zegbe Domínguez

CO-DIRECTORA:



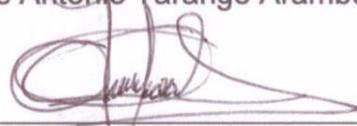
Dra. Cristina García De La Peña

ASESOR:



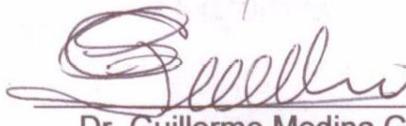
Dr. Luis Antonio Tarango Arámbula

ASESOR:



Dr. Rafael Castro Franco

ASESOR:



Dr. Guillermo Medina García

Bermejillo, Durango. Marzo 2017.

DEDICATORIA

A Dios, por TODO.

A mis padres, por esa fe ciega y el amor más allá de la razón que siempre han tenido por mí.

A mis hermanos y amigos, por aguantarme en mis malos ratos y sacarme sonrisas cuando mis ojos reflejan tristeza.

A los doctores y profesores que me han dado ese voto de confianza, algunos incluso sin conocerme; a los que han compartido conmigo no sólo conocimiento sino también experiencia.

*“SI HE LOGRADO VER MÁS LEJOS,
HA SIDO PORQUÉ HE SUBIDO A HOMBROS DE GIGANTES”*

Isaac Newton (1675)

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindar el financiamiento para llevar a cabo esta investigación.

A la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) a través de M. C. Cristino Villarreal por permitirnos el acceso a la Reserva, así como la manipulación y toma de muestras a los individuos.

A las diversas instituciones a las que pertenecemos los investigadores involucrados en esta investigación (URUZA-UACH, INIFAP Zacatecas, FCB-UJED) por las facilidades brindadas durante esta investigación.

A las personas que formaron parte del equipo de trabajo, aportando desinteresadamente horas valiosas de su tiempo aun sabiendo el esfuerzo que implica trabajar bajo el sol de la región, solo por la satisfacción de colaborar en el proyecto.

A todo el personal y compañeros del Posgrado en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas por la cordialidad y disposición brindadas a lo largo de los dos años que curse la Maestría.

DATOS BIOGRÁFICOS

La C. María Magdalena Rivas García, es originaria de Gómez Palacio, Dgo. Es Bióloga egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Obtuvo el grado de licenciatura con la monografía titulada “Biología, ecología y conservación del tejón norteamericano (*Taxidea taxus*)” dirigida por la Dra. Cristina García De La Peña, de ésta se publicó el libro titulado “Historia natural del Tejón norteamericano (*Taxidea taxus*)” (ISBN-13: 978-3-659-07306-9, ISBN-10: 3659073067).

Su línea de investigación es la medicina de la conservación y fauna silvestre con el proyecto “Estudio hematológico de la Tortuga del Bolsón (*Gopherus flavomarginatus*) en la Reserva de la Biosfera Mapimí” por medio del cual finalizó el presente trabajo de tesis bajo la supervisión directa de sus tutores y asesores la Dra. Cristina García De La Peña y el Dr. Jorge A. Zegbe Domínguez. Derivado de este trabajo ya se han logrado tres presentaciones en el XXV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias: 1) Hematología de *Gopherus flavomarginatus* en la Reserva de la Biosfera Mapimí, México; 2) Características morfológicas de células sanguíneas de *Gopherus flavomarginatus* en la Reserva de la Biosfera Mapimí, México y 3) Metales Pesados en la sangre de la tortuga del Bolsón de Mapimí (*Gopherus flavomarginatus*) en México.

ESTUDIO HEMATOLÓGICO DE LA TORTUGA DEL BOLSÓN (*Gopherus flavomarginatus*) EN LA RESERVA DE LA BIOSFERA MAPIMÍ

HEMATOLOGICAL STUDY OF THE BOLSON TORTOISE (*Gopherus flavomarginatus*) IN THE MAPIMÍ BIOSPHERE RESERVE

María Magdalena Rivas García¹, Cristina García De La Peña² y Jorge Artemio Zegbe Domínguez³

RESUMEN

Durante los últimos años ha habido una gran mortalidad de tortugas endémicas *Gopherus flavomarginatus* en la Reserva de la Biosfera Mapimí, siendo las causas desconocidas. En este estudio se caracterizaron células sanguíneas, se determinaron y compararon valores de biometría y bioquímica sanguínea y se analizó la concentración de As, Cd y Pb en función del sexo, clase de edad y localidad. Se obtuvieron muestras sanguíneas en las localidades de La Flor, Guadalupe y Mohovano. Se encontraron tres tipos de células. El análisis de varianza detectó diferencias significativas entre los tipos de células. Los valores medios de los parámetros de biometría hemática no mostraron diferencia significativa entre los niveles de los factores. Los parámetros de bioquímica sanguínea mostraron variaciones entre horas de actividad, sexo, clases de edad y localidades. Los metales pesados no presentaron diferencias significativas entre los factores de estudio. La información del presente estudio sugiere "buena salud" al comparar los valores de *G. flavomarginatus* con los de *G. agassizii*, *G. berlandieri* y *G. polyphemus* sanas.

Palabras clave: *Gopherus flavomarginatus*, biometría hemática, bioquímica sanguínea, arsénico, cadmio, plomo, ecosistema árido.

ABSTRACT

During the last years there has been a high mortality of the endemic Bolson tortoise (*Gopherus flavomarginatus*) in the Mapimí Biosphere Reserve, due to unknown causes. In this study the blood cells were characterized, the biometric and blood biochemistry values were determined and compared, and the concentration of As, Cd and Pb were analyzed in relation to gender, age class and location. Blood samples were obtained in the locations of La Flor, Guadalupe and Mohovano. Three types of cells were found. Analysis of variance detected significant differences between cell types. The mean values of the hematic biometry parameters did not show significant difference among levels of factors. The blood biochemistry parameters showed variations between hours of activity, gender, age classes and locations. Heavy metals did not present significant differences among levels of factors. The information in the present study suggests "good health" when comparing the values of *G. flavomarginatus* with those of healthy *G. agassizii*, *G. berlandieri* and *G. Polyphemus* tortoises.

Keywords: *Gopherus flavomarginatus*, hematic biometry, blood biochemistry, arsenic, cadmium, lead, arid ecosystem.

¹ Tesista

² Codirectora

³ Director

Contenido

I. INTRODUCCIÓN	16
II. HIPÓTESIS	19
III. OBJETIVO GENERAL	20
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
V. REVISIÓN DE LITERATURA	21
5.1 Descripción de la especie	21
5.2 Caracterización morfométrica de células sanguíneas	23
Eritrocito	23
Leucocito	24
1) Heterófilos	24
2) Eosinófilos	24
3) Basófilos	24
4) Linfocitos	25
5) Monocitos	25
6) Azurófilos	25
Trombocitos	25
5.3 Biometría hemática	27
1) Hematocrito (Ht)	27
2) Hemoglobina (Hb)	27
3) Conteo de eritrocitos	27

4) Índices eritrocitarios	27
5) Conteo total de leucocitos	28
6) Conteo diferencial de leucocitos	28
7) Trombocitos	29
5.4 Bioquímica sanguínea	30
1) Glucosa.....	30
2) Ácido úrico y urea.	31
3) Proteínas totales.	32
4) Albumina.	33
5) Globulinas.	33
6) Creatinina.....	34
7) Colesterol.....	35
8) Triglicéridos.....	35
9) Alanino aminotransferasa (ALT).....	36
10) Aspartato aminotransferasa (AST).....	36
11) Fosfatasa alcalina (FA).	37
12) Lipasa y Amilasa.	37
13) Colinesterasa.	37
14) Lactato deshidrogenasa (LDH).	38
15) Cloro.....	38
16) Sodio.....	38
17) Potasio.	39
18) Calcio.	39
19) Fósforo.....	41

5.5 Toxicología	41
5.5.1 Metales pesados	42
Arsénico (As).....	43
Plomo (Pb).	44
Cadmio (Cd).....	45
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	48
6.1 Descripción del área de estudio	48
6.2 Trabajo de campo.....	48
6.2.1 Medidas de seguridad sanitarias.....	50
6.2.2 Obtención de datos y muestras.....	50
6.3 Trabajo de laboratorio.....	53
6.3.1. Caracterización morfométrica de las células sanguíneas	53
6.3.2 Biometría hemática	54
6.3.3 Bioquímica sanguínea	58
1) Glucosa.....	58
2) Ácido úrico.	58
3) Urea.	59
4) Proteínas totales.	59
5) Albumina.....	59
6) Globulinas.....	59
7) Creatinina.....	59
8) Colesterol.....	60
9) Triglicéridos.....	60
10) Alanino aminotransferasa.	60

11) Aspartato aminotransferasa	61
12) Fosfatasa alcalina.	61
13) Lipasa.	61
14) Amilasa.	61
15) Colinesterasa.	62
16) Lactato deshidrogenasa.....	62
17) Cloro.	62
18) Sodio.....	62
19) Potasio.....	62
20) Calcio.....	63
21) Fósforo.....	63
6.3.4 Análisis de metales pesados	63
6.4 Análisis estadístico	63
6.5 Ubicación geográfica de las tortugas estudiadas	65
VI. RESULTADOS.....	66
7.1. Caracterización morfométrica de las células sanguíneas de <i>G.</i> <i>flavomarginatus</i>	66
7.1.1. Eritrocitos	66
7.1.2 Leucocitos	67
Linfocitos	67
Monocitos.....	68
Heterófilos.....	68
Eosinófilos.....	69
Basófilos.....	70

7.1.3 Trombocitos.....	70
7.1.4 Medidas de las células sanguíneas.....	71
7.2 Biometría hemática.....	73
7.3 Bioquímica sanguínea	77
7.4 Metales pesados.....	83
7.5 Análisis de Componentes Principales.....	84
VIII. DISCUSIÓN.....	88
IX. CONCLUSIONES.....	95
X. RECOMENDACIONES.....	97
XI. LITERATURA CITADA	98

Índice de figuras

Figura 1. Tortuga del Bolsón (<i>G. flavomarginatus</i>). Foto: Martínez, R. 2015.	18
Figura 2. Reserva de la Biosfera Mapimí y áreas donde se llevó a cabo el muestreo de <i>G. flavomarginatus</i>	49
Figura 3 Técnica de manipulación de individuos y equipo utilizado durante . Del lado derecho una persona sujeta a la tortuga, del lado izquierdo otra persona obtiene la muestra.	50
Figura 4. Sitio de venopunción en la vena subvertebral en tortugas (círculo rojo). Adaptado de Bojanus (1819).	51
Figura 5. Esquema de la cámara de Neubauer. En azul los cuadros para recuento de eritrocitos (E).....	55
Figura 6. Esquema de la cámara de Neubauer. Se señalan los cuadros considerados para el recuento de leucocitos (L).....	56
Figura 7. Técnica de zig-zag para conteo diferencial de leucocitos en frotis sanguíneo.....	57
Figura 8. Eritrocitos en frotis sanguíneo de <i>G. flavomarginatus</i> . Tinción Wright, 40x.....	67
Figura 9. Linfocitos en frotis sanguíneo de <i>G. flavomarginatus</i> . Tinción Wright, 40x.....	68
Figura 10. Heterófilos en frotis sanguíneo de <i>G. flavomarginatus</i> . Tinción Wright, 40x.....	69
Figura 11. Eosinófilos en frotis sanguíneo de <i>G. flavomarginatus</i> . Tinción Wright, 40x.....	69

Figura 12. Basófilos en frotis sanguíneo de <i>G. flavomarginatus</i> . Tinción Wright, 40x.....	70
Figura 13. Trombocitos en frotis sanguíneo de <i>G. flavomarginatus</i> . Tinción Wright, 40x.....	71
Figura 14. Comparación entre las áreas de las cinco células más abundantes en la sangre de <i>G. flavomarginatus</i> . En cada valor medio, las barras verticales indican el error estándar.	72
Figura 15. Microhematocritómetro para cuantificar el hematocrito de una muestra de sangre de <i>G. flavomarginatus</i>	73
Figura 16. Muestra de sangre de <i>G. flavomarginatus</i> en cámara de Neubauer. Las flechas indican los cinco cuadros para el conteo de eritrocitos. Tinción Natt y Herrick, 10x.	74
Figura 17. Muestra de sangre de <i>G. flavomarginatus</i> en cámara de Neubauer. Las flechas delgadas y la gruesa indican leucocitos y un eritrocito, respectivamente. Tinción Natt y Herrick, 40x.....	74
Figura 18. Representación bidimensional de los dos primeros componentes principales (CP) para los parámetros hematológicos de <i>G. flavomarginatus</i> en la Reserva de la Biosfera Mapimí. HT= hematocrito, CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular media y HCM= hemoglobina corpuscular media.....	86
Figura 19. Gráfica de sedimentación que representa la variabilidad acumulada (eigenvalor en porcentaje) de cada componente principal.	87
Figura 20. Ubicación geográfica de las tortugas <i>G. flavomarginatus</i> del presente estudio.	87

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la tortuga <i>G. flavomarginatus</i> (ITIS, 2015).....	21
Cuadro 2. Estadísticos descriptivos del área (μm^2) de los cinco tipos de células sanguíneas más abundantes en <i>G. flavomarginatus</i> . Min= Mínimo, Max= Máximo e IC ₉₅ = Intervalo de confianza al 95%.	72
Cuadro 3. Análisis de varianza para cada uno de los parámetros de biometría hemática de <i>G. flavomarginatus</i> con relación a las fuentes de variación (F.V.). gl = grados de libertad, F = estadístico de la prueba de Fisher, P = nivel de significancia.....	75
Cuadro 4. Estadísticas descriptivas e intervalos de confianza (IC) al 95% de confiabilidad para los parámetros de biometría hemática considerados para <i>G. flavomarginatus</i> (n = 25). VCM = volumen corpuscular medio, HCM = hemoglobina corpuscular media, CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media, Min = mínimo, Max = máximo e IC ₉₅ = intervalo de confianza al 95%.....	77
Cuadro 5. Análisis de varianza para cada uno de los parámetros de química sanguínea de <i>G. flavomarginatus</i> con relación a las fuentes de variación (F.V). gl = grados de libertad, F = estadístico de la prueba de Fisher, P = nivel de significancia.	78
Cuadro 6. Estadísticas descriptivas e intervalo de confianza (IC) al 95% para los parámetros de bioquímica sanguínea (PQS) considerados para <i>G. flavomarginatus</i> (n = 28). Min = mínimo, Max = máximo e IC ₉₅ = intervalo de confianza al 95%.....	81
Cuadro 7. Análisis de varianza para la concentración de arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) en sangre entre sexos de <i>G. flavomarginatus</i> . g.l. = grados de libertad, F = estadístico de la prueba de Fisher, P = nivel de significancia.	83

Cuadro 8. Análisis de varianza para la concentración de arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) en sangre entre clases de edad de <i>G. flavomarginatus</i> . g.l. = grados de libertad, F = estadístico de la prueba de Fisher, P = nivel de significancia.....	83
Cuadro 9. Análisis de varianza para la concentración de arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) en sangre entre localidades para <i>G. flavomarginatus</i> . g.l. = grados de libertad, F = estadístico de la prueba de Fisher, P = nivel de significancia.....	84
Cuadro 10. Estadísticas descriptivas para las concentraciones de arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) para <i>G. flavomarginatus</i> (n = 28). Min = mínimo, Max = máximo, IC ₉₅ = intervalo de confianza al 95%.....	84
Cuadro 11. Valores propios de los componentes principales (eigenvalores) y % de varianza explicada por cada componente principal.	85
Cuadro 12. Valores propios (eigenvectores) de las variables según el componente principal (CP). HCM = hemoglobina corpuscular media y CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media.	85
Cuadro 13. Parámetros de química sanguínea de las especies <i>G. agassizii</i> , <i>G. berlandieri</i> y <i>G. polyphemus</i> que resultaron elevados en <i>G. flavomarginatus</i>	89

I. INTRODUCCIÓN

El análisis hematológico es una herramienta que proporciona un fácil diagnóstico de salud (Canfield, 1998; Campbell, 2004; Tavares-Días *et al.*, 2009). También representa una forma invasiva mínima que proporciona datos importantes y confiables para hacer evaluaciones de salud, especialmente para la determinación de efectos asociados como la desnutrición y la deshidratación (Dutton, 1996; Campbell y Ellis, 2007). En los quelonios, muchas enfermedades (anemias, leucemias, enfermedades inflamatorias, alergias, etc.) se asocian a cambios en los parámetros hematológicos; es por ello que esta herramienta se ha utilizado desde los años 40 como indicador diagnóstico para el tratamiento médico (DuGuy, 1970; Work y Balazs, 1999; Knotkova *et al.*, 2005; Joyner *et al.*, 2006). También, a través del tejido sanguíneo se pueden detectar los contaminantes presentes en los organismos, ya que la sangre los transporta por todo el cuerpo a través del sistema circulatorio, ya sea para excretarlos por el medio correspondiente o hasta que estos se fijan en el órgano afín (Ley, 2009). Tal es el caso de los metales pesados que al ser ingeridos son reducidos a iones libres durante la digestión y pasan al torrente sanguíneo (Ley, 2009). Algunos animales podrían no manifestar síntomas de intoxicación al ingerir cantidades pequeñas de estos metales o presentar sólo patologías menores que no resultan perjudiciales; la sensibilidad se incrementa en exposiciones

posteriores, pudiendo conducirle a un envenenamiento crónico (Casarett y Doull, 2001; Monroy *et al.*, 2002).

En México, la especie emblemática de la Reserva de la Biosfera Mapimí es la tortuga endémica *Gopherus flavomarginatus*, la cual se encuentra en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010; Figura 1). Esta es una especie clave para el ecosistema donde habita por la importancia ecológica de sus madrigueras y por ser dispersora de semillas de herbáceas; además, es una especie “bandera”, es decir, que goza de simpatía hacia el público y gracias a esto es posible concientizar a la población sobre la importancia de su conservación (SEMARNAT, 2010).

Durante los años 2012, 2013 y 2014 de monitoreo poblacional de la tortuga *G. flavomarginatus* en la Reserva de la Biosfera Mapimí, en el Programa de Monitoreo Biológico en Áreas Naturales Protegidas (PROMOBI), se han registrado 282 tortugas muertas (Salas-Westphal *et al.*, 2012, 2013, 2014). Una causa probable de esta mortalidad son los padecimientos generados por el medio ambiente (e. g., deshidratación por escasez de lluvias) o por alguna enfermedad infecciosa, crónica o degenerativa. Dado que todo diagnóstico de salud debe contar con una base hematológica, en el presente estudio se llevó a cabo una caracterización morfométrica de las células sanguíneas de *G. flavomarginatus*, se determinaron y compararon los valores de biometría y bioquímica sanguínea según la hora de actividad, sexo, clase de edad y localidad, y se cuantificó la concentración de tres metales pesados (arsénico, cadmio y plomo) según sexo, clase de edad y localidad. Esta información forma parte de un macro-proyecto en desarrollo en el que se establecerá el estado de

salud de los individuos de esta especie de tortuga con base en valores hematológicos y bacteriológicos. La meta es mejorar el plan de manejo de *G. flavomarginatus* que conduce la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) en la Reserva de la Biosfera Mapimí incorporando información fisiológica que ayude a su conservación.



Figura 1. Tortuga del Bolsón (*G. flavomarginatus*). Foto: Martínez, R. 2015.

II. HIPÓTESIS

1. *G. flavomarginatus* presenta distintos tipos de células sanguíneas.

2. Los parámetros de biometría y bioquímica sanguínea varían entre individuos de *G. flavomarginatus* de acuerdo con la hora de actividad, sexo, edad y localidad.

3. Las concentraciones de metales pesados como arsénico, cadmio y plomo varían entre individuos de *G. flavomarginatus* de acuerdo con el sexo, edad y localidad.

III. OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio hematológico de la tortuga *Gopherus flavomarginatus* en la Reserva de la Biosfera Mapimí.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar morfométricamente las células sanguíneas de *G. flavomarginatus*.

- 2) Determinar los valores de biometría y bioquímica sanguínea de *G. flavomarginatus* y compararlos entre horas de actividad, sexo, clases de edad y localidades.

- 3) Cuantificar la concentración de arsénico, cadmio y plomo en sangre de *G. flavomarginatus* y compararlos entre sexo, clases de edad y localidades.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Descripción de la especie

En 1959, Legler describe una nueva especie de tortuga del género *Gopherus* y la nombra *flavomarginatus*. La palabra “*Gopherus*” significa “excavadora” (Rafinesque, 1832) y el nombre *flavomarginatus* se deriva de la palabra en latín *flavus*, “amarillo” y *marginatus* “bordeada”, en referencia a los bordes amarillos de los escudos del caparazón (Legler, 1959). Esta especie pertenece a la familia Testudinidae y es la más grande de las cinco especies (*G. agassizii*, *G. berlandieri*, *G. polyphemus* y *G. morafka*) que conforman este género (Murphy *et al.*, 2011). Su clasificación taxonómica completa y actual se presenta en la Cuadro 1 (Integrated Taxonomic Information System, 2015).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la tortuga *G. flavomarginatus* (ITIS, 2015).

Taxón	Nombre
Reino	Animalia
Subreino	Bilateria
Infrareino	Deuterostomia
Filo	Chordata
Subfilo	Vertebrata
Infracilo	Gnathostomata
Superclase	Tetrapoda
Clase	Reptilia (Laurenti, 1768)
Orden	Testudines (Batsch, 1788)
Suborden	Cryptodira (Cope, 1868)
Superfamilia	Testudinoidea (Fitzinger, 1826)
Familia	Testudinidae (Batsch, 1788)
Género	<i>Gopherus</i> (Rafinesque, 1832)
Especie	<i>Gopherus flavomarginatus</i> (Legler, 1959)

Los machos son significativamente más pequeños que las hembras, de acuerdo a los resultados presentados por Germano (1993). En machos la cola es más larga que en las hembras, más puntiaguda, y tiene una punta pronunciada con una o varias escamas.

Lemos-Espinal y Smith (2007) mencionan que *G. flavomarginatus* posee una característica distintiva: su caparazón tiene las orillas claras, y hay un área oscura en el centro de cada escudo vertebral y costal. El color del fondo del caparazón es de amarillo claro o café. Este contraste disminuye con la edad, aunque permanece a través de toda la vida en los escudos marginales. El plastrón (estructura aplanada que conforma la parte ventral del caparazón) de los jóvenes tiene manchas oscuras contrastantes las cuales desaparecen totalmente en los adultos. Hasta ahora, para *G. flavomarginatus* se ha registrado una longitud máxima de 370 mm del caparazón, el escudo nucal está frecuentemente dividido en dos o tres partes. El caparazón en machos es ligeramente más cóncavo en la región abdomino-femoral, que el de las hembras, esta diferencia puede detectarse satisfactoriamente si se examinan muchos ejemplares de ambos sexos al mismo tiempo. La piel es gris, frecuentemente con puntos negros diminutos (Legler y Webb, 1961).

G. flavomarginatus utiliza madrigueras como refugio ante las temperaturas extremas, para evitar a los depredadores, para el cortejo y la anidación (Adest *et al.*, 1989). Los adultos pasan el 99% de su vida dentro de sus madrigueras y sólo el 1% en la superficie (Adest *et al.*, 1989). Cada individuo presenta una alta fidelidad por el uso de su madriguera, ya que sigue

rutas de viaje conocidas y puede volver al mismo sitio de anidación en años sucesivos (Lovich y Daniels, 2000; Daren-Riedle *et al.*, 2008).

5.2 Caracterización morfométrica de células sanguíneas

De acuerdo con Arikan y Çiçek (2014) la sangre periférica de los reptiles consiste en células llamadas eritrocitos, leucocitos y trombocitos. Stacy *et al.* (2011) presentaron una descripción detallada de la morfología y características distintivas de cada tipo de célula sanguínea de los reptiles, la cual se presenta a continuación:

Eritrocito. Son células nucleadas de mayor tamaño que las de los mamíferos. Los eritrocitos maduros son elípticos y poseen citoplasma abundante de color naranja a rosa. El núcleo presenta posición central, con forma irregular a elíptica y con su cromatina condensada e intensamente basofílica (coloración morada). En ocasiones pueden observarse eritrocitos en forma de lágrima o fusiformes en reptiles sanos. También es común registrar un porcentaje bajo (<1%) de eritrocitos policromatófilos en la sangre de reptiles sanos (particularmente en individuos juveniles o en proceso de muda). Estas células son redondas y poseen un núcleo más grande y basófilo que los eritrocitos maduros. Su núcleo contiene áreas de eucromatina de baja densidad, lo que indica una producción activa de hemoglobina. Asimismo, pueden llegar a observarse etapas tempranas de eritrocitos inmaduros, principalmente rubricitos, los cuales presentan citoplasma basofílico oscuro, un gran núcleo redondo u ovalado y una cromatina más gruesa que los policromatófilos. En ocasiones pueden llegar a confundirse con los linfocitos. Un

bajo número de inclusiones puntiformes basofílicas pequeñas y/o vacuolas transparentes se observan con frecuencia en eritrocitos de quelonios sanos. Estas inclusiones han sido identificadas mediante microscopía electrónica como organelos degenerados.

Leucocito. Los leucocitos conforman un grupo de células clasificadas como granulocitos (heterófilos, eosinófilos y basófilos) y células mononucleadas (linfocitos, monocitos y azurófilos). En general, los leucocitos varían en número y morfología de sus gránulos, patrones de tinción citoquímica y concentración relativa en la sangre periférica dependiendo de la especie de reptil que se trate. A continuación, se describen las características de cada uno de ellos.

1) Heterófilos. Son el equivalente de los neutrófilos de los mamíferos. Son células grandes y redondas (10-23 μm) con citoplasma transparente lleno de gránulos color naranja a rosado muy brillante. Los quelonios presentan gránulos fusiformes muy distintivos. Su núcleo es excéntrico y varía de redondo a ovalado.

2) Eosinófilos. Su morfología es similar a la de los mamíferos. Varían de 9 a 20 μm en diámetro, poseen citoplasma transparente y gránulos completamente redondos de color rosa, y su núcleo puede ser central o excéntrico, de forma redonda, ovalada, alargada o bilobulada.

3) Basófilos. Son células que pueden medir hasta 20 μm ; contienen numerosos gránulos pequeños, redondos, de color morado oscuro (metacromáticos) que con frecuencia cubren al núcleo. Los basófilos que muestran un citoplasma rosa pálido o transparente pueden haberse

desgranulado durante la toma de muestra sanguínea o la preparación de la laminilla.

4) Linfocitos. Son similares a los que se encuentran en los mamíferos midiendo de 5 a 15 μm . Se categorizan como linfocitos B y T, cada uno con sus propias funciones. Son células redondas a ameboides con un núcleo que cubre casi la totalidad de la célula. Cuando se observa, su citoplasma es transparente formando una “media luna” en un extremo de la célula.

5) Monocitos. Los monocitos en los reptiles son variables en tamaño (8-25 μm) y forma (redonda u ovalada) con los bordes citoplasmáticos muy distintivos y citoplasma abundante de color azul o gris. El núcleo es redondo, ovalado, arriñonado o multilobulado con la cromatina ligeramente agrupada. Pueden observarse vacuolas en el citoplasma cuando el monocito está reactivo.

6) Azurófilos. Este tipo de leucocito es único de los reptiles y aunque en cocodrilos y escamosos son muy comunes, en quelonios es muy poco frecuente observarlos. Son células redondas con citoplasma azul o gris que contiene numerosos gránulos morados muy pequeños (como polvo) y en ocasiones algunas vacuolas puntiformes. El núcleo es redondo a ovalado, excéntrico y su cromatina se observa muy agrupada.

Trombocitos. A diferencia de las plaquetas de los mamíferos, los trombocitos de los reptiles son nucleados y representan una línea celular distinta que se origina de los tromboplastos a partir del tejido hematopoyético; de ahí su nombre de trombocito. Son células elipsoidales u ovaladas muy pequeñas (8 a 16 x 5 a 9 μm), con citoplasma transparente y brillante al microscopio (refringente). El núcleo es redondo u ovalado, central y su

cromatina es muy densa y oscura (color morado). Durante la toma de muestra sanguínea o en la preparación de la laminilla, los trombocitos pueden activarse o romperse. Los que se activan tienden a agruparse y los que se rompen se observan como un núcleo libre con poca cromatina. La sangre de los reptiles con frecuencia se colecta en tubos con heparina de litio como anticoagulante, lo que provoca que algunos trombocitos se agrupen. En comparación con los linfocitos, los trombocitos son ligeramente más pequeños y de diversas formas (redonda, ovalada o elíptica).

Otros autores han presentado descripciones detalladas de las células sanguíneas de reptiles y de ciertas especies de tortugas terrestres, semiacuáticas y marinas (Wilkinson, 2004; Thrall *et al.*, 2006; Irizarry-Rovira, 2010; Martínez-Silvestre *et al.*, 2011; Jenkins-Perez, 2012). Para el género *Gopherus* existe poca información sobre las características morfométricas de las células sanguíneas. Únicamente Alleman *et al.* (1992) reportaron descripciones morfométricas y citoquímicas de las células sanguíneas de la tortuga del desierto (*G. agassizii*); observaron que los eritrocitos maduros son homogéneos en tamaño, forma (ovalada) y color, con un núcleo redondeado que contiene cromatina densa de color oscuro. También reportaron que las características de los leucocitos son similares a los de otras especies de tortugas, pero con pequeñas diferencias observadas en el número y forma de los gránulos de heterófilos y eosinófilos.

5.3 Biometría hemática

La biometría hemática o hemograma es un grupo de pruebas desarrolladas a partir de una muestra de sangre que proporciona información importante sobre la salud de las células sanguíneas, del estado del sistema inmune y de la capacidad de coagulación de un individuo. Stacy *et al.* (2011) y Turgeon (2012) mencionan las características de cada una de estas pruebas y se describen a continuación:

1) Hematocrito (Ht). Es el volumen de eritrocitos en la sangre cuantificado en porcentaje. Refleja directamente el número de células rojas presentes. Una disminución en el Ht se relaciona directamente con un descenso en el conteo de eritrocitos. El Ht en reptiles sanos es menor (20% a 40%) que el que presentan los mamíferos, lo que indica una capacidad menor en el transporte de oxígeno debido a su naturaleza ectotérmica.

2) Hemoglobina (Hb). Es la proteína que ayuda a los eritrocitos a transportar el oxígeno a todos los tejidos corporales. En reptiles sanos la Hb varía de 5.5 a 12 g/dL.

3) Conteo de eritrocitos. Es el número de células rojas transportadoras de oxígeno. Esta prueba es importante, ya que si se presenta una disminución de estas células pueden presentarse diversos padecimientos como la anemia.

4) Índices eritrocitarios. Consisten en tres medidas que describen el tamaño de los eritrocitos, el volumen corpuscular medio (VCM), la cantidad de hemoglobina que contienen estas células o hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina comparada con el volumen total de la célula o concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). El VCM es

mayor en reptiles que en mamíferos y varía según la especie. Debido a la relación inversa entre el número y tamaño de eritrocitos, las especies con mayor VCM como las tortugas, presentan un conteo de eritrocitos menor que las lagartijas, las cuales registran un VCM menor y un conteo de eritrocitos mayor.

5) Conteo total de leucocitos: Es el número total de células blancas (leucocitos).

6) Conteo diferencial de leucocitos: Consiste en calcular la cantidad de cada tipo de leucocito en una muestra sanguínea ya que cada uno de ellos desempeña distintas actividades inmunológicas. En general en reptiles, los heterófilos comprenden del 30% al 45% de los leucocitos en la sangre periférica, pero en los quelonios pueden sobrepasar el 50%. Estas células son el equivalente en función a los neutrófilos de los mamíferos, ya que fagocitan bacterias y material extraño que ingresa al organismo. Los heterófilos tóxicos se pueden observar en reptiles con infecciones bacterianas, inflamaciones severas o necrosis; el grado de toxicidad refleja la severidad de la enfermedad. Al igual que en lo mamíferos, la presencia de heterófilos inmaduros (desviación a la izquierda) se asocia a inflamación o infección activas. Los eosinófilos comprenden entre el 7% y 20% de los leucocitos en reptiles sanos con valores más altos en quelonios. Números anormalmente elevados de estas células se han asociado con infecciones parasitarias (protozoarios o helmintos). El porcentaje de basófilos varía de acuerdo con la especie de reptil. Se han documentado valores de más de 40% de basófilos en sangre de quelonios terrestres sanos pero este valor puede incrementarse cuando se presentan

infecciones hemoparasíticas (hemogregarinas y tripanosomas) y virales (iridovirus). Se ha reportado también que en algunas tortugas los basófilos liberan histamina. En el caso de los linfocitos, estas células son los leucocitos predominantes en la mayoría de las especies de reptiles (más del 80%). Se dividen en linfocitos B y T según su función: producción de inmunoglobulinas y mediador celular de respuestas inmunitarias, respectivamente. Los linfocitos reaccionan aumentando su número ante inflamaciones, infecciones, heridas, parasitismo (hematozoa) y enfermedades virales. También pueden indicar desnutrición cuando los números son bajos. Los monocitos son leucocitos muy escasos en la sangre de los reptiles sanos (0-10%). Son esenciales para la formación de células gigantes, una respuesta común a infecciones microbianas en reptiles; su porcentaje aumenta durante la estimulación antigénica e inflamación crónicas y en enfermedades bacterianas y parasitarias. Por último, los azurófilos son extremadamente escasos en quelonios, pero si se observa un número elevado de estas células en algún individuo, es indicador de un estado crónico de alguna enfermedad.

7) Trombocitos: Son las células encargadas de la coagulación sanguínea y mantenimiento de la hemostasis. También pueden mostrar capacidad fagocitaria ante bacterias, desechos nucleoproteínicos, eritrocitos y melanina. Debido a que los trombocitos suelen agruparse en muestras de sangre heparinizadas, su estimación sólo puede ser subjetiva clasificándolos como en cantidad normal, alta o baja.

En el género *Gopherus* existen estudios que han descrito hemogramas completos o al menos algunos de sus componentes tanto en tortugas de vida

libre como en cautiverio. Hasta ahora, la especie más estudiada al respecto es *G. agassizii*, en la que se han determinado los valores de referencia para tortugas sanas, los cambios hematológicos entre estaciones del año, situaciones de estrés y enfermedades (O'connor *et al.*, 1994; Christopher *et al.*, 1999; Dickinson *et al.*, 2002). Para *G. polyphemus* también se han obtenido valores hematológicos comparando estaciones y sexos (Taylor y Jacobson, 1982) y como parte de los estudios para determinar estado de salud de sus individuos (Díaz-Figueroa, 2005). En el caso de *G. berlandieri*, sólo se cuenta con hemogramas obtenidos de individuos en cautiverio (Teare, 2013b). Finalmente, para *G. flavomarginatus* únicamente se tiene el estudio realizado por Morafka *et al.* (1986), quienes a partir de 41 individuos de Mapimí determinaron los porcentajes de cada tipo de leucocito; sin embargo, estos autores indican la presencia de “neutrófilos” además de heterófilos y no registraron azurófilos.

5.4 Bioquímica sanguínea

La química sanguínea proporciona información sobre las condiciones del metabolismo y funcionamiento de ciertos órganos como el hígado, riñón etc. (Turgeon, 2012). A continuación, se describen las pruebas más importantes determinar el estado de salud de un animal:

1) Glucosa. Es el carbohidrato más importante en el metabolismo porque representa la principal fuente de energía para los vertebrados. Se obtiene fundamentalmente a través de la alimentación y se almacena en el hígado, el cual mantiene los niveles de glucosa en sangre (glucemia) (Murray *et al.*, 2009).

Para que esos niveles se mantengan y el almacenamiento en el hígado sea adecuado, se apoya con la insulina, secretada por el páncreas (Murray *et al.*, 2009). En las tortugas, la glucosa es un indicador importante y fácil de obtener. Los valores normales para estos reptiles según McArthur *et al.* (2004) se encuentran entre 60 y 120 mg/dl. Los niveles de glucosa en la sangre se reducen (hipoglucemia) cuando se presentan hepatopatías, anorexia, desnutrición y septicemia, y pueden ocurrir temblores, pérdida de reflejos y pupilas dilatadas sin respuesta; en contraste, valores elevados pueden deberse a estresantes agudos antes de la toma de muestra (McArthur *et al.*, 2004). Se han descrito posibles casos de diabetes mellitus en quelonios con hiperglicemia persistente (Frye *et al.*, 1976; Frye, 1991; Frye, 1999).

2) Ácido úrico y urea. El ácido úrico es un compuesto orgánico que se produce por el rompimiento de ácidos nucleicos y otras moléculas (e. g. trifosfato de adenosina ATP), además de ser el principal producto de desecho del catabolismo de las purinas (Murray *et al.*, 2009). La urea es un compuesto orgánico cristalino que en los mamíferos representa el principal desecho nitrogenado del metabolismo de las proteínas y se excreta en la orina y materia fecal. Ambos conceptos son importantes para comprender la fisiología renal de los reptiles, la cual es diferente a la de los mamíferos. McArthur *et al.* (2004) mencionan que en los quelonios existen cuatro patrones de excreción: uricotelismo (principales productos de excreción son ácido úrico y uratos), ureotelismo (urea como producto de excreción), amino-ureotelismo (combinación de amoniaco y urea como productos de desecho) y ureo-uricotelismo (ácido úrico y urea como desecho). Estos patrones distintos son un

reflejo del ambiente en el cual un individuo se desarrolla. Los quelonios que habitan en regiones con escasez de agua o que hibernan se consideran uricotélicos o ureo-uricotélicos. Estas especies poseen vejigas urinarias para conservar agua, pero en ellas también se acumulan desechos nitrogenados, en su mayoría ácido úrico, un compuesto más soluble que la urea y que puede excretarse con una mínima cantidad de agua (Thrall *et al.*, 2006). En general, en los estudios sanguíneos de reptiles, la urea no es un indicador útil de diagnóstico; sin embargo, en los quelonios terrestres sí lo es. Esto se debe a que su orina se retiene en la vejiga como una reserva de fluidos en periodos de escasez de agua. La urea cruza fácilmente las membranas biológicas y se puede equilibrar entre la sangre y la vejiga urinaria (en contraste con el ácido úrico, el cual se precipita en la vejiga en forma de uratos insolubles). Por sí solo, el valor de ácido úrico en sangre es un indicador de salud renal (niveles por encima de 1000 $\mu\text{mol/L}$ pueden indicar insuficiencia renal en los reptiles y niveles por debajo de 100 $\mu\text{mol/L}$ orienta hacia patología hepática), pero en conjunto con la determinación de los niveles de urea se obtienen otras interpretaciones. Por ejemplo, un nivel normal de ácido úrico en sangre con un nivel elevado de urea indica deshidratación y catabolismo proteico con función renal normal (McArthur *et al.*, 2004).

3) Proteínas totales. Las proteínas en el plasma sanguíneo se dividen en albúmina y globulinas (Murray *et al.*, 2009). Según Thrall *et al.* (2006) los valores normales en reptiles se encuentran entre 3 y 7 g/dL. Las hembras muestran un incremento en su concentración de proteínas totales durante la foliculogénesis debido a los estrógenos. La concentración de proteínas totales

se normaliza después de la ovulación. La hiperproteinemia se indica por los valores de proteínas totales mayor de 7 g/dL, y ocurre por la deshidratación o la hiperglobulinemia asociada con enfermedades inflamatorias crónicas. La hipoproteinemia se indica por un valor total de proteínas menor a 3 g/dL y se asocia con la desnutrición crónica, digestión deficiente, pérdida sanguínea y enfermedades renales o hepáticas.

4) Albumina. La albúmina es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo (aproximadamente entre 30-40%) y se sintetiza en el hígado. Participa en el transporte de bilirrubina, hormonas, metales y vitaminas, además de desempeñar una función importante en el metabolismo de las grasas uniendo los ácidos grasos y manteniéndolos solubles en el plasma. Por esta razón, la hiperlipidemia ocurre en situaciones clínicas de hipoalbuminemia (Busher, 1990). En los quelonios un nivel alto de albúmina en la sangre es un indicador de deshidratación. Sin embargo, en ocasiones las hembras de diversas especies presentan una alta concentración de albumina durante la época reproductiva (en promedio 30% más que los machos), probablemente debido a la formación de la yema de huevo (Lawrence, 1987). Por otra parte, valores bajos de albumina (hipoalbuminemia) se han observado en animales con anorexia, desnutrición, parasitismo, estomatitis intestinal y otras enteropatías. La hipoalbuminemia parece ser más común en animales inmaduros ya que suelen presentar menos proteína en la sangre (McArthur *et al.*, 2004).

5) Globulinas. Las globulinas son cientos de proteínas que conforman una parte importante de la sangre y que cumplen funciones de transporte,

enzimas, complemento e inmunidad; la mayoría se sintetiza en el hígado, excepto las inmunoglobulinas que se originan en las células plasmáticas. Las globulinas se dividen en cuatro grupos: alfa 1 y alfa 2, beta y gamma (Busher, 1990), En general, concentración de globulinas aumentan o disminuyen en el plasma a partir de los procesos inflamatorios o infecciosos y que sirven para determinar ciertas patologías. Las concentraciones de globulinas en los perfiles bioquímicos rutinarios se calculan restando la concentración de albúmina a las proteínas plasmáticas totales. La hiperglobulinemia se debe a infección e inflamación. La hipoglobulinemia puede ser observada en estados de inmunosupresión causadas por estrés y enfermedades virales (Bush, 1999).

6) Creatinina. La creatinina es un compuesto orgánico formado a partir de la condensación y deshidratación en los músculos. Se considera un desecho metabólico de la constante contracción muscular del cuerpo, que es removido casi por completo en la orina mediante la filtración glomerular de la excreción renal (Thrall *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2009). En mamíferos, la creatinina es el modo más simple de monitorizar la correcta función de los riñones, pero debido a la baja cantidad de creatinina que se ha cuantificado en el plasma de los reptiles en general (<1 mg/dL), algunos autores han considerado que no tiene valor de diagnóstico clínico (McArthur *et al.*, 2004; Campbell, 1996). Sin embargo, en estudios con reptiles enfermos se ha sugerido que el valor de creatinina en plasma se puede aplicar para diagnosticar daño renal y como un parámetro para predecir la sobrevivencia del animal (Knotek *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2015).

7) Colesterol. El colesterol es un esteroide (lípidos) que se encuentra en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo de los vertebrados. Se presenta en altas concentraciones en el hígado, médula espinal, páncreas y cerebro. Pese a tener consecuencias perjudiciales en altas concentraciones, es esencial para crear la membrana plasmática que regula la entrada y salida de sustancias que atraviesan la célula (Murray *et al.*, 2009). Durante la época de reproducción, las tortugas hembras muestran niveles altos de colesterol en la sangre y éste disminuye antes de la hibernación en especies de climas templados (Derikson, 1976). En *G. agassizii*, Jacobson *et al.* (1991) señalan que los niveles de colesterol altos son más frecuentes en tortugas enfermas que en sanas. Jackson y Legendre (1967) observaron que la concentración de colesterol fue baja en especies herbívoras (como *G. polyphemus*) y alta en las carnívoras (*Chelydra spp.*). McArthur *et al.* (2004) indican que los niveles bajos de colesterol se asocian con animales anoréxicos.

8) Triglicéridos. Son un tipo de lípidos formados por una molécula de glicerol esterificado con ácidos grasos, que suelen ser distintos. Se almacenan principalmente en el citoplasma de los adipocitos y también en el hígado (Cox y García-Palmieri, 1990). Los triglicéridos proceden de la dieta o de su síntesis en el hígado. En tortugas, McArthur *et al.* (2004) reportan valores de triglicéridos entre 0.06 y 7.15 mmol/L. La concentración más alta la observaron en una tortuga rusa (*Testudo horsfieldi*) con anorexia que presentaba evidencia histopatológica de lipidosis hepática (acumulación anormal de grasa en el hígado). Asimismo, observaron que las hembras en estado preovulatorio mostraron niveles más altos de triglicéridos en comparación con los machos.

Christopher *et al.* (1999) establecieron valores de 2 a 439 mg/dl para la especie *G. agassizii*

9) Alanino aminotransferasa (ALT). La ALT, anteriormente conocida como transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) es una enzima de gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, corazón y músculos (Murray *et al.*, 2009). Aparece elevada durante las enfermedades hepáticas víricas y en bajas cantidades ante enfermedades crónicas como la cirrosis hepática o tumores hepáticos. De acuerdo con Ramsay y Dotson (1995) la ALT está presente en los riñones de las tortugas (250 U/g) y en menor medida en el hígado (40 U/g). Según McArthur *et al.* (2004) la concentración de ALT rara vez se eleva, incluso cuando hay padecimiento de glomerulonefritis. Para la especie *G. agassizii*, Christopher *et al.* (1997) indicaron valores de 5 a 10 UI/L.

10) Aspartato aminotransferasa (AST). El AST, enzima antes conocida como transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) o aspartato transaminasa (AST), es una enzima que se encuentra en varios tejidos de los vertebrados, especialmente en el corazón, el hígado y el tejido muscular (Murray *et al.*, 2009). Se encuentran cantidades elevadas de esta enzima en casos de hepatopatía aguda, miopatías y en cualquier enfermedad o trastorno, durante las cuales las células se dañan seriamente. Ramsay y Dotson (1995) estudiaron la actividad de enzimas de reptiles en varios tipos de tejidos y encontraron a la AST en cantidades significativas en el hígado, riñón y corazón. De acuerdo con McArthur *et al.* (2004), los niveles altos de AST se encuentran con frecuencia

en sangre de animales enfermos con infección por virus del herpes, glomerulonefritis, heridas, estomatitis y artritis séptica.

11) Fosfatasa alcalina (FA). La FA o también llamada orto-fosfórico-monoéster hidrolasa es la enzima responsable de eliminar grupos de fosfatos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides (Murray *et al.*, 2009). El proceso de eliminación del grupo fosfático se denomina desfosforilación, estas enzimas son producto de la ruptura normal de las células sanguíneas y de otros tejidos. Muchas de ellas no tienen un papel metabólico en el plasma excepto las enzimas relacionadas con la coagulación y con el sistema del complemento. Las fosfatasas alcalinas son enzimas que se encuentran en casi todos los tejidos del organismo, siendo alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón (Murray *et al.*, 2009). En individuos inmaduros de tortugas leopardo (*Geochelone pardalis*) con enfermedad ósea metabólica se registró una concentración alta (765-1157 UI/L) de FA, así como en hembras en estado preovulatorio (666-1272 UI/L) (Raiti y Haramati, 1997) y McArthur *et al.* (2004).

12) Lipasa y Amilasa. Son enzimas digestivas secretadas por el páncreas. La lipasa ayuda en la digestión de las grasas para metabolizar los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol, mientras que la amilasa ayuda a digerir los carbohidratos (Thrall *et al.*, 2006).

13) Colinesterasa. La colinesterasa sérica, butirilcolinesterasa, pseudocolinesterasa o formalmente llamada acilcolina acilhidrolasa se encuentra principalmente en el hígado y suero (Mayer *et al.*, 1992). Este tipo de colinesterasa hidroliza rápidamente la butirilcolina. Es una enzima que cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina sobrante en el espacio sináptico en

colina y ácido acético, reacción necesaria para permitir que la neurona colinérgica retorne a su estado de reposo después de la activación, evitando así una activación excesiva causada por la acetilcolina, la cual puede causar daño en la neurona o músculo (Murray *et al.*, 2009).

14) Lactato deshidrogenasa (LDH). Es una enzima catalizadora que se encuentra en diversos tejidos de los reptiles como el hígado, riñón, músculo esquelético y cardíaco, así como en pequeñas cantidades en el intestino. En ocasiones sus niveles se elevan en animales enfermos con daño tisular inespecífico. En plasma, los niveles mayores a 700 UI/L se asocian con estomatitis, obstrucción gastrointestinal, prolapso cloacal o falla renal; por otra parte, incrementos superiores a 1000 UI/L se pueden asociar con un daño en el hígado, músculo esquelético o cardíaco (Wagner y Wetzel, 1999; McArthur *et al.*, 2001, 2004).

15) Cloro. Es el principal anión en el fluido extracelular. Participa en procesos de transporte integrales al balance de cationes y agua, así como un anión conjugado en el metabolismo ácido-base. La concentración normal de cloro en plasma de reptiles varía entre especies, pero suelen oscilar entre 100 y 130 mEq/L. En tortugas el intervalo se encuentra entre 100 y 110 mEq/L (Thrall *et al.*, 2006). La hipercloremia (valores altos de cloro en sangre) se asocia con deshidratación, un posible fallo renal o bien patologías de las glándulas de la sal. Las situaciones de hipocloremia (valores bajos en sangre) son poco frecuentes (Martínez-Silvestre *et al.*, 2013).

16) Sodio. Es el principal catión en el fluido extracelular, su función predominante se da en el metabolismo celular participando en la transmisión del

impulso nervioso (bomba de sodio-potasio) manteniendo el volumen y la osmolaridad. Los valores de sodio plasmático en reptiles sanos oscilan entre 120 y 170 mEq/L y varían con la especie (Thrall *et al.*, 2006). La hipernatremia (exceso de sodio en sangre) se produce con la deshidratación provocada bien por una ingesta inadecuada de agua o bien por una pérdida excesiva de la misma (normalmente asociada a diarrea) o por un aporte excesivo de sal en la dieta. La elevación del sodio se ha observado también en la enfermedad renal debido a la vasoconstricción provocada por mediación del sistema renina angiotensina. Por el contrario, la hiponatremia (bajo nivel de sodio en sangre) se genera cuando se producen pérdidas excesivas de sodio, asociadas a problemas gastrointestinales o problemas renales (McArthur, 2001).

17) Potasio. Es el principal catión en el fluido intracelular, se involucra en el mantenimiento del equilibrio normal del agua, en el equilibrio osmótico entre las células y el fluido intersticial y en el equilibrio ácido-base. El potasio también está involucrado en la contracción muscular y la regulación de la actividad neuromuscular, al participar en la transmisión del impulso nervioso. Los reptiles en general, presentan valores de potasio sérico o plasmático entre 2 y 6 mEq/L (Thrall *et al.*, 2006). En reptiles, las situaciones de hipopotasemia puede ocurrir por una ingesta inadecuada de potasio o por la pérdida excesiva del mismo (diarrea), así como por enfermedad renal o fallo renal terminal (Selleri y Hernandez-Divers, 2006).

18) Calcio. Este elemento se encuentra en el medio interno de los organismos como ion calcio (Ca^{2+}) o formando parte de otras moléculas. Los iones de calcio actúan como cofactores en muchas reacciones enzimáticas,

intervienen en el metabolismo del glucógeno y junto al potasio y sodio regulan la contracción muscular (Thrall *et al.*, 2006). Además, forma parte del esqueleto de los vertebrados (Devlin, 2004). El metabolismo del calcio en los reptiles y sus niveles de calcio ionizado en el plasma, están mediados por la parathormona, la calcitonina y la vitamina D3 (Frye, 1991). El papel principal de la parathormona es la de mantener los niveles de calcio sanguíneos normales, mediante su acción en el hueso (movilización del calcio óseo), riñones (aumento de su reabsorción) y mucosa intestinal (aumento de su reabsorción). A su vez, los aumentos de calcio sanguíneo estimulan la liberación de calcitonina que inhibe la actividad osteoclástica y con ello la reabsorción de calcio del hueso. La forma activa de la vitamina D estimula la absorción de calcio y fósforo a partir de la mucosa intestinal. En la mayoría de los reptiles diurnos la exposición a la radiación ultravioleta es imprescindible para el metabolismo normal del calcio mediante la producción fotoquímica de la forma activa de vitamina D (Adkins *et al.*, 2003). Los niveles de calcio séricos normales para reptiles, varían entre especies y dependen del estado fisiológico, oscilando entre 8 y 11 mg/dl. En la mayoría de reptiles, la hipocalcemia se produce cuando la concentración de calcio plasmático es inferior a 8 mg/dl. Esto puede ser causado por deficiencia de calcio y vitamina D₃, una cantidad excesiva de fósforo en la dieta, alcalosis, hipoalbuminemia o hipoparatiroidismo. La hipercalcemia en reptiles se presenta cuando las concentraciones de calcio plasmático superan los 20 mg/dl, lo cual sucede cuando la dieta es excesiva en su contenido de calcio (Thrall *et al.*, 2006).

19) Fósforo. Se encuentra principalmente en el fluido intracelular como un componente de la hidroxiapatita en el hueso, en unidades fosforiladas de alta energía de muchos intermediarios metabólicos y como parte estructural de las fosfoproteínas y los fosfolípidos. Al ser inorgánico juega un papel importante en el metabolismo ácido-base. La mayoría de los reptiles tienen niveles séricos o plasmáticos normales entre 1 y 5 mg/dl, sin embargo, la hipofosfatemia puede ser el resultado de inanición o de una deficiencia nutricional (Thrall *et al.*, 2006).

Existen diversos estudios sobre química sanguínea del género *Gopherus*. La especie *G. agassizii* ha sido la más estudiada, se han obtenido valores de referencia en tortugas sanas (Roskopf, 1982), se han comparado los valores de sexos y entre estaciones del año, así como generado protocolos para determinar su estado de salud (Christopher *et al.*, 1999; Dickinson *et al.*, 2002). Para *G. polyphemus* también se han obtenido valores de química sanguínea comparando entre estaciones y sexos (Taylor y Jacobson, 1982) y como parte de los estudios para determinar el estado de salud de sus individuos (Díaz-Figueroa, 2005). En el caso de *G. berlandieri*, solo se cuenta con valores de química sanguínea obtenidos de individuos en cautiverio (Teare, 2013b). Para *G. flavomarginatus*, Morafka *et al.* (1986) determinaron los valores de AST, LDH, glucosa, proteínas totales, creatinina y ácido úrico.

5.5 Toxicología

La toxicología es el estudio de los venenos, identificación y cuantificación de los efectos adversos asociados a la exposición a agentes físicos, sustancias químicas y otras situaciones; abarca desde estudios de investigación básica

sobre el mecanismo de acción de los agentes tóxicos hasta la elaboración e interpretación de pruebas normalizadas para determinar las propiedades tóxicas de los agentes (Silbergeld, 1998).

5.5.1 Metales pesados

Clark (2002) define a los metales pesados como aquellos elementos químicos que poseen un peso atómico comprendido entre 63.55 (Cu) y 200.59 (Hg) y presentan una densidad superior a 4 g/cm^3 , así como un cierto grado de toxicidad, pudiendo causar efectos nocivos en el ambiente. Estos contaminantes no pueden ser degradados por el ataque bacterial en un lapso corto, siendo conservativos y persistentes en el ambiente, por lo que sus efectos impactan fuertemente en la salud del ecosistema y en sus organismos (Aranda-Cirerol, 2001). Las características químicas de los contaminantes se basan en su estructura electrónica que condiciona las preferencias de enlace, en algunos predomina el enlace metálico que se establece entre átomos del mismo elemento, se caracteriza por la formación de estructuras cristalinas en que cada átomo y comparte los electrones de muchos de sus vecinos; en otros predomina el enlace iónico, sobre todo entre los metales alcalinos, alcalinotérreos y los no metales (Cotton y Wilkinson, 1988). Así, los elementos metálicos dan lugar a diferentes tipos de compuestos:

- Metales en estado elemental
- Compuestos inorgánicos: halogenuros, hidroxilos, oxoácidos
- Compuestos orgánicos: alquilos, acetatos, fenilos

El proceso mediante el cual los metales entran a un organismo, ya sea por vía respiratoria, digestiva o cutánea acumulándose en los órganos y tejidos de los organismos se conoce como bioacumulación (Aranda-Cirerol, 2001). Una vez incorporados, pueden permanecer en el organismo y adquirir mayores concentraciones (a este proceso se le denomina bioconcentración) o bien, pueden ser excretados total o parcialmente dependiendo del elemento, la forma química en que se encuentre y la afinidad de los tejidos por cada uno de los metales. Finalmente, a través de las redes tróficas los metales son transferidos de un eslabón a otro, presentando así, un proceso de biomagnificación que puede alcanzar niveles tóxicos para el organismo bioacumulador y los distintos eslabones de la red trófica, incluso a humanos (Skoch y LaCognata, 1998).

La minería es una de las principales fuentes de metales pesados, primero por el volumen de sus descargas y segundo por el vertimiento de los metales tóxicos (Monroy *et al.*, 2002; Soto-Jiménez *et al.*, 2003; Cabrera-Carranza *et al.*, 2004). La agricultura también que aporta al ambiente una cantidad alta de metales pesados (Páez-Osuna, 1996).

Arsénico (As). El As se encuentra en la Cuadro periódica entre el P y el Sb, y tiene propiedades similares al fósforo. Es un metaloide, es decir, con propiedades intermedias entre metales y no metales; por ello forma aleaciones con metales, pero también enlaces covalentes con el carbono, hidrógeno y oxígeno. Forma compuestos trivalentes inorgánicos (trióxido arsenioso, arsenito de Na) y orgánicos (arsfenamina), así como pentavalentes inorgánicos (pentaóxido arsénico, arseniato de Pb, ácido arsénico). En la naturaleza está ampliamente distribuido en una serie de minerales como compuestos de cobre,

níquel y hierro, y sulfuro y óxido de arsénico (Who, 1981; Yip *et al.*, 2001). En el agua se suele encontrar en forma de arsenato o arsenito, ambas muy hidrosolubles (Who, 1981; Yip *et al.*, 2001). El arsénico se absorbe por todas las vías con la eficacia suficiente para producir toxicidad, aunque la preferente es la vía digestiva con una eficacia superior al 90%. La absorción a través de la piel es escasa, aunque ésta se facilita con la irritación que la propia sustancia produce. En la sangre se encuentra en el interior de los eritrocitos y unido a las proteínas plasmáticas, tras una dosis aguda se produce una distribución a todos los órganos con una mayor concentración en el hígado y riñón. Su exposición crónica e manifiesta en altas concentraciones en piel, pelo y uñas por su rico contenido en cisteínas (Lawerys, 1990).

Plomo (Pb). El plomo es un metal pesado, gris y blando muy difundido en la corteza terrestre. Se encuentra en la naturaleza como mezcla de tres isótopos (206, 207 y 208). Su forma más abundante es el sulfuro (PbS), formando las menas de galena. Con frecuencia está asociado a otros metales como plata, cobre, cinc, hierro y antimonio. Forma compuestos en estado de valencia 2+ y 3+, orgánicos como acetato, tetraetilo y tetrametilo, e inorgánicos como nitrato, arsenato, carbonato, cloruro, óxidos y silicato (Cotton y Wilkinson 1988). El Pb penetra en el organismo por todas las vías, en los pulmones se absorbe bien en forma de humos o partículas finas que son fagocitadas por los macrófagos alveolares. La absorción gastrointestinal depende de la solubilidad del tipo de sal y del tamaño de las partículas. Los adultos absorben por esta vía entre 20 ó 30% de la dosis ingerida, pero en los niños se alcanza hasta un 50%. Su absorción cutánea a través de la piel no es un problema, pero puede

absorberse en sus formas orgánicas. Además, el plomo de los proyectiles termina solubilizándose y distribuyéndose desde los tejidos donde han quedado alojados (Ferrer, 2003). En la sangre, la mayor parte del plomo absorbido se encuentra en el interior de los eritrocitos, desde ellos se distribuye a los tejidos alcanzando una mayor concentración en huesos, dientes, hígado, pulmón, riñón, cerebro y bazo (Keogh *et al.*, 2001). En los dos primeros territorios se acumula el 95% de la carga orgánica total de plomo, el hueso es el territorio preferente de acumulación en sustitución del Ca y, aunque no causa ningún problema, puede ser origen de reaparición de toxicidad crónica por movilización (Silbergeld *et al.*, 1988).

Cadmio (Cd). Las propiedades químicas y físicas del cadmio (Cd) son muy similares a las del zinc y con frecuencia coexiste con este metal en la naturaleza. En los minerales y las menas, la proporción de cadmio y zinc oscila entre 1:100 a 1:1.000 (Nordberg, 1998). La absorción gastrointestinal del cadmio ingerido es aproximadamente de 2% al 6% en condiciones normales. Además, se pueden absorber cantidades significativas de este metal por vía pulmonar, como consecuencia de la inhalación de humo de tabaco o por la exposición profesional al polvo de cadmio atmosférico. Se calcula que la absorción pulmonar del polvo de cadmio respirable inhalado es del 20% al 50%. Tras la absorción, ya sea por vía digestiva o respiratoria, el cadmio se transporta al hígado, donde se inicia la producción de una proteína de bajo peso molecular que se une al cadmio, la metalotioneína (Nordberg, 1998). En los casos de exposición de larga duración a niveles bajos de cadmio, los riñones son los órganos críticos, es decir, los primeros afectados. El cadmio se acumula

en la corteza renal. Se calcula que las concentraciones superiores a 200 μg Cd/g de peso en fresco producen disfunción de los túbulos renales y disminución de la reabsorción de las proteínas de la orina. Esto produce proteinuria tubular y un aumento en la excreción de proteínas de bajo peso molecular, como la α , α -1-microglobulina (proteína HC), la β -2-microglobulina y la proteína de unión al retinol (RTB). A medida que avanza la insuficiencia renal también se pierden por la orina aminoácidos, glucosa y minerales como el calcio y el fósforo. El aumento de la eliminación de calcio y fósforo puede alterar el metabolismo óseo y no es raro encontrar cálculos en organismos expuestos a este metal. Tras la exposición prolongada a niveles medios-elevados de cadmio, también pueden verse afectados los glomérulos renales, produciéndose una disminución en la tasa de filtración glomerular. En casos graves, puede llegar a desarrollarse uremia. En casos de intoxicación crónica por cadmio de carácter grave se han detectado osteomalacias (Nordberg, 1998).

Jacobson *et al.* (1991) obtuvieron valores de selenio, cobre, hierro, plomo, cadmio y mercurio en el hígado de la tortuga del desierto (*Gopherus agassizii*). En promedio se registró 0.51 ppm de cadmio 0.51 y 0.035 ppm de plomo.

Homer *et al.* (1996) realizaron exámenes post-mortem a tortugas del desierto (*G. agassizii*) en vida libre de las que se sospechaba tenían una elevada concentración de metales pesados incluyendo cadmio, mercurio, plomo, molibdeno, arsénico, selenio, cromo y níquel en hígado y riñones. Las tortugas que mostraban evidencias de degeneración en hígado y riñones

presentaron concentraciones elevadas de mercurio, cadmio o plomo concluyendo así que las concentraciones elevadas de estos metales pudieron haber influido en su morbilidad y mortalidad.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Descripción del área de estudio

La Reserva de la Biósfera Mapimí cuenta con una superficie aproximada de 342,388 ha y se ubica en la región conocida como Bolsón de Mapimí. Comprende parte de los municipios de Tlahualilo y Mapimí en el Estado de Durango, de Jiménez, Chihuahua y Sierra Mojada, Coahuila (Figura 2). Se localiza entre los paralelos 26°00' y 26°10' de latitud Norte y los meridianos 104°10' y 103°20' de longitud Oeste a una altitud de 1,000 y 1,200 msnm en las partes bajas, alcanzando 2,000 m los cerros más altos, presenta numerosos relieves de origen volcánico o calcáreo. La temperatura promedio anual es de 25.5° C (García y Martínez, 2004). Según la clasificación de Köppen, adaptada para México por García (1973), el clima del área corresponde al tipo BWhw(e), muy árido, semicálido, con lluvias en verano y de amplitud térmica extremosa, con una precipitación pluvial histórica promedio de 145.9 mm (1993-2003). La vegetación predominante son los matorrales rosetófilo y micrófilo, así como la vegetación halófila y gipsófila. Los suelos predominantes son del tipo yermosol, regosol, xerosol, litosol, solonchack y fluvisol (García y Martínez, 2004).

6.2 Trabajo de campo

El presente trabajo se desarrolló durante el 10 de agosto al 02 de octubre del 2015, periodo en el que *G. flavomarginatus* es más activa (CONANP, 2015).

El equipo de trabajo consistió en cinco personas, quienes recorrieron las áreas con presencia de colonias de tortugas, las cuales forman parte del protocolo de monitoreo de *G. flavomarginatus* (CONANP, 2015). Las localidades consideradas fueron La Flor, Guadalupe y Mohovano dentro de la Reserva (Figura 2).

La búsqueda de tortugas se realizó a lo largo de transectos cuya longitud varió entre 0.5 y 1 km. Los transectos se recorrieron simultáneamente por cinco personas manteniendo una distancia a ambos lados entre ellas de 15 metros; es decir, los transectos recorridos tuvieron un ancho de 90 m y una longitud de entre 0.5 y 1 km, tratando siempre de cubrir la mayor área posible por recorrido (4.5 y 9.0 ha). El horario de búsqueda de individuos fue de 0800 a 1300 h y de 1600 a 2000 h con cinco muestreos semanales y con un esfuerzo de muestreo de 225 h/persona (1,125 h de muestreo total).

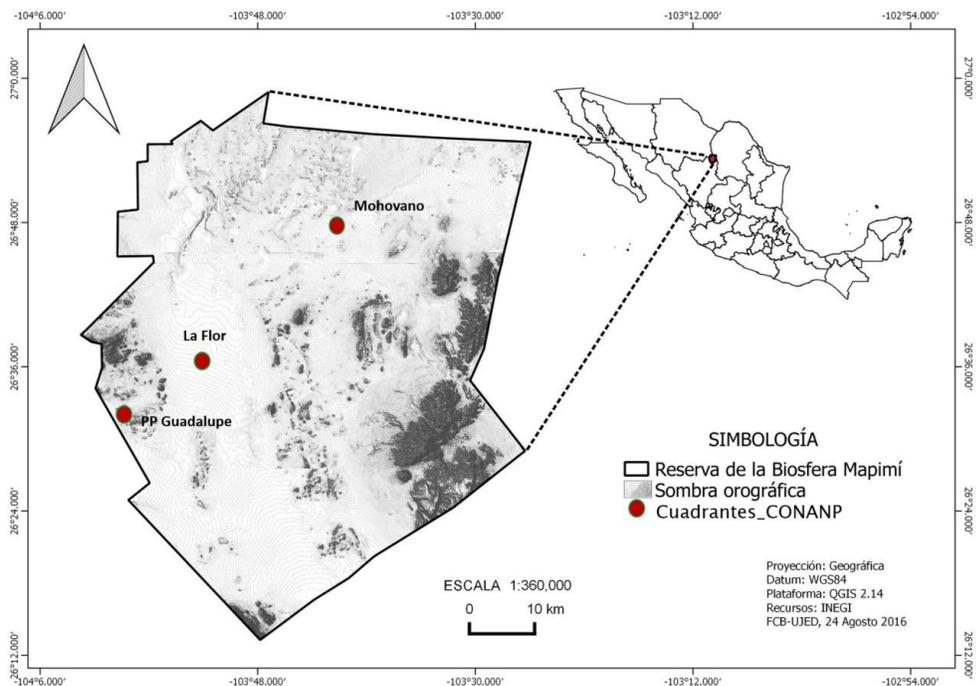


Figura 2. Reserva de la Biosfera Mapimí y áreas donde se llevó a cabo el muestreo de *G. flavomarginatus*.

6.2.1 Medidas sanitarias

Durante la captura de tortugas y la toma de muestras sanguíneas, se tomaron las medidas necesarias para evitar el contacto directo entre las tortugas y el personal de trabajo, y prevenir la transmisión de microorganismos a ellos y entre individuos y colonias de *G. flavomarginatus*. Durante la manipulación de cada individuo, los integrantes del equipo utilizaron un cubrebocas y un par de guantes desechables nuevos. La persona encargada de sujetar a cada tortuga durante la toma de datos y muestras utilizó una bata estéril de exploración médica desechable para cada individuo (Figura 3).



Figura 3 Técnica de manipulación de individuos de *G. flavomarginatus*. Del lado derecho una persona sujeta a la tortuga, del lado izquierdo otra persona obtiene la muestra.

6.2.2 Obtención de datos y muestras

En cada sitio y para cada tortuga capturada se registró la fecha, hora, localidad, coordenadas geográficas (GPS ETrex20 Garmin®) y se clasificó

como hembra o macho y como subadulto o adulto de acuerdo con criterios específicos (Lemos y Smith, 2007; CONANP, 2015).

La toma de muestra sanguínea se realizó en la vena subvertebral o subcarapacial (Díaz-Figueroa, 2005) (Figura 4). Se limpió el área de punción con algodón e Isodine® y se utilizó una jeringa de 5 ml con aguja de 23G x 25 mm para colectar 4 ml de sangre en tortugas adultas y 3 ml en subadultas. De éstos, 1 ml se depositó en un tubo Vacutainer® verde con heparina de litio como anticoagulante y 3 ml en un tubo Vacutainer® rojo. Los tubos fueron rotulados con números consecutivos y se almacenaron en una hielera a una temperatura aproximada de 4° C, hasta su resguardo y proceso en el laboratorio.

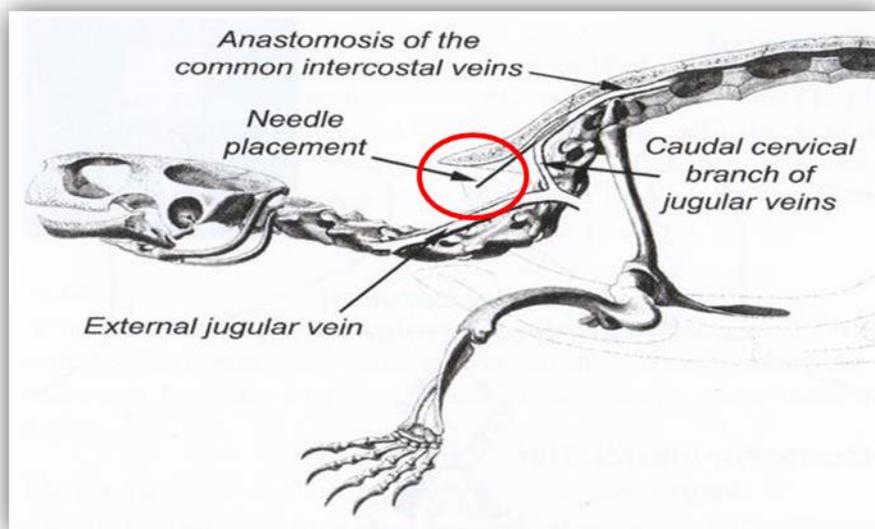


Figura 4. Sitio de venopunción en la vena subvertebral en tortugas (círculo rojo).

Adaptado de Bojanus (1819).

En seguida se tomaron datos de longitud y ancho del caparazón utilizando un flexómetro (cm). Finalmente, cada tortuga se identificó con una

pequeña marca roja con pintura textil no tóxica en el segundo escudo marginal izquierdo para identificar a distancia a las tortugas ya capturadas en los recorridos subsecuentes. Para relajar e hidratar a la tortuga después de la toma de muestras y datos se colocó al individuo en una bandeja de plástico de 60 x 40 x 15 cm con tres litros de agua purificada durante 10 a 15 min. En seguida la tortuga fue liberada en el mismo sitio de su captura y se realizaron observaciones durante varios minutos para asegurar que el individuo mostrara una conducta normal mientras se alejaba. La manipulación y toma de muestras se realizó de la manera más rápida, eficiente y cuidadosa para evitar incomodar o lastimar a cada individuo durante el proceso.

En cuanto al estrés experimentado por los individuos de esta especie durante el trabajo de campo, un estudio realizado por Kahn *et al.* (2007) con *G. polyphemus*, indicó que esta especie no presentó un nivel de estrés significativo que impida su conducta normal posterior a las prácticas invasivas como captura, manipulación y toma de muestras. Esta conclusión se basó en el análisis de los niveles de corticosterona en plasma, la cual se incrementa considerablemente en otros animales vertebrados (Jessop *et al.*, 2004; Suleman *et al.*, 2004; Romero y Reed, 2005) cuando son sometidos a situaciones estresantes. Sin embargo, *G. polyphemus* no presentó incrementos significativos de esta hormona y su conducta no tuvo repercusiones posteriores (conducta normal) a la manipulación. Dado que *G. polyphemus* y *G. flavomarginatus* pertenecen al mismo género, es probable que esta última sea también resistente a la breve situación de estrés a la que fue sometida en el presente trabajo. Considerando la situación actual de vulnerabilidad de *G.*

flavomarginatus en cuanto a su estatus de conservación y por convencimiento personal de la importancia de seguir lineamientos bioéticos en el estudio de animales.

6.3 Trabajo de laboratorio

6.3.1. Caracterización morfométrica de las células sanguíneas

Para cada muestra sanguínea se realizaron cuatro frotis utilizando portaobjetos. Cada laminilla fue rotulada con el número de la tortuga utilizando un lápiz punta de diamante. Se colocó una gota de sangre en cada laminilla y con otro portaobjetos se realizó el barrido en un ángulo de 45°. Se dejó secar al aire. Posteriormente, todas las laminillas fueron teñidas utilizando colorante de Wright (Analytyka®) por siete minutos, luego se agregaron gotas de agua destilada como solución buffer por ocho minutos más. Finalmente, las laminillas se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente hasta su observación.

El sitio ideal de observación fue aquel donde las células se presentaron en monocapas bien definidas, es decir, una distribución homogénea sin presentar aglutinaciones (Harvey, 2001). Para analizar la morfología de los diferentes tipos de células sanguíneas de *G. flavomarginatus* se tomaron como referencia los criterios de Alleman *et al.* (1992), Wilkinson (2004), Thrall *et al.* (2006), Irizarry-Rovira (2010), Stacy *et al.* (2011) y Jenkins-Perez (2012) registrando forma y color de las distintas estructuras. Se obtuvieron fotografías de cada tipo celular utilizando una cámara Axiocam ERc5s Carl Zeiss®. Posteriormente, se seleccionaron al azar dos laminillas derivadas de la sangre

de cada tortuga y se recorrieron en el microscopio en busca de 10 células de cada tipo para las cuales se registró el largo y ancho de la célula completa y de su núcleo. Estas mediciones se llevaron a cabo utilizando el software ZEN2® Ver. 2.0. A partir de la base de datos generada en Excel se calculó el tamaño de cada tipo celular utilizando las fórmulas de área de la elipse ($\pi \times d1 \times d2 / 4$), donde $d1$ = diámetro mayor y $d2$ =diámetro menor).

6.3.2 Biometría hemática

Las muestras se procesaron según los protocolos establecidos por Thrall *et al.* (2006), Ciesla (2007), Jenkins-Perez (2012), Turgeon (2012). A partir de la sangre contenida en el tubo verde se llevó a cabo la determinación del porcentaje del paquete celular o hematocrito (Ht) mediante la técnica de microhematocrito utilizando capilares de vidrio, centrifuga (3, 500 rpm x 5 min) y hematocritómetro. Se obtuvo la medida total (MT) y la medida de paquete celular (MPC) de cada muestra sanguínea. Los valores de hematocrito se calcularon con la siguiente fórmula: $Ht\% = (MPC / MT) \times 100$, cuyas siglas ya fueron definidas.

El conteo de eritrocitos y leucocitos se llevó a cabo utilizando pipeta de Thoma con perla roja y hematocitómetro de Neubauer. La pipeta se llenó de sangre contenida en el tubo verde hasta el nivel de 0.5 (para dilución 1/200) y posteriormente se rellenó con tinción de Natt y Herrick hasta la marca de 101 evitando la formación de burbujas. La pipeta se dejó reposar en posición horizontal por 15 minutos. Tras descartar 10 gotas de la pipeta de Thoma, la cámara de Neubauer se cargó en ambos lados, dejando que una gota ingresara

bajo el cubreobjetos por capilaridad. La cámara se colocó en un microscopio y se dejó reposar por un minuto para permitir la sedimentación de las células. El conteo de eritrocitos se llevó a cabo con el objetivo 10x sobre el cuadrado grande central de la cámara en cinco cuadrados pequeños (uno central y cuatro angulares) (Figura 5) de ambos lados de la cámara de Neubauer. Posteriormente, se aplicó la siguiente fórmula para obtener el número total de eritrocitos:

$$\text{Eritrocitos (x10}^6 \text{ ul)} = \text{Media eritrocitos} \times \text{dilución (200)} \times \text{factor volumen (50)}$$

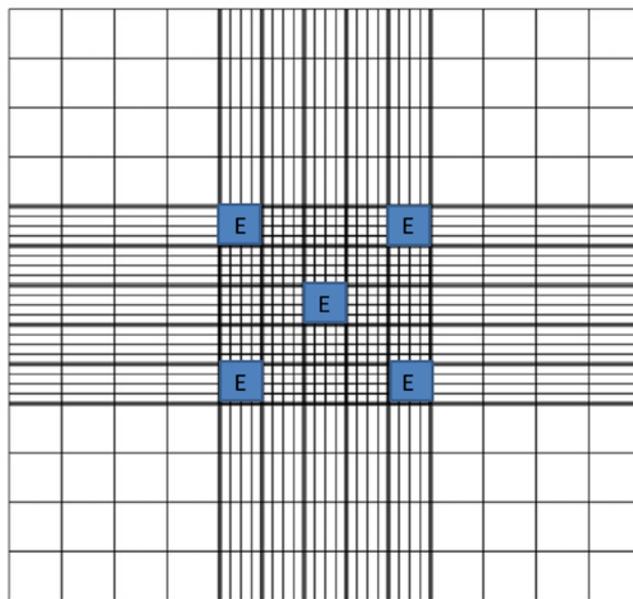


Figura 5. Esquema de la cámara de Neubauer. En azul los cuadros para recuento de eritrocitos (E).

El conteo de leucocitos se llevó a cabo con objetivo 40x sobre los nueve cuadrados grandes (Figura 6) de ambos lados de la cámara de Neubauer. Se aplicó la siguiente fórmula para obtener el número total de leucocitos:

Leucocitos ($\times 10^3$ ul) = (Media leucocitos x dilución (200)) / factor volumen (0.9)

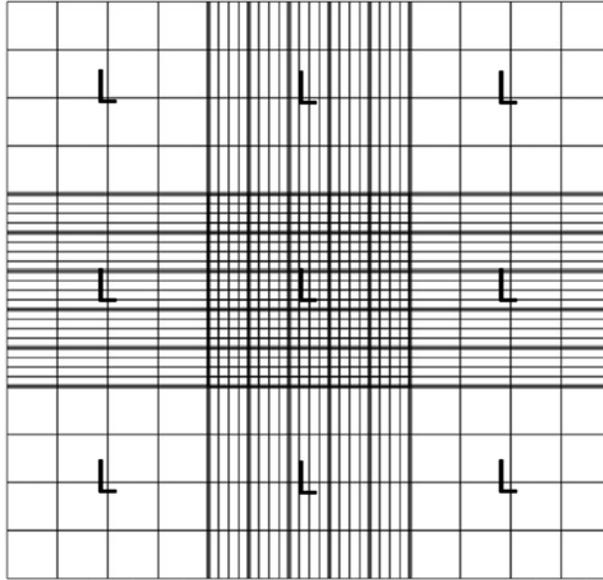


Figura 6. Esquema de la cámara de Neubauer. Se señalan los cuadros considerados para el recuento de leucocitos (L).

La concentración de hemoglobina se cuantificó mediante el método colorimétrico de Drabkin utilizando el kit comercial de Spinreact®. La hemoglobina es oxidada por la acción del ferricianuro a metahemoglobina y mediante el cianuro se convierte en cianmetahemoglobina. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de hemoglobina presente en la muestra ensayada (Van Kampen *et al.*, 1961; Franco, 1984).

La fórmula utilizada para calcular el volumen corpuscular medio (VCM) fue la siguiente (Turgeon, 2012):

$$\text{VCM (fL)} = \text{Ht} / \text{Eritrocitos (}\times 10^6 \text{ ul)}$$

La fórmula para calcular la hemoglobina corpuscular media (HCM) fue la siguiente (Turgeon, 2012):

$$\text{HCM (pg)} = (\text{Hg} \times 10) / \text{Eritrocitos (x10}^6 \text{ ul)}$$

La fórmula para cuantificar la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) fue la siguiente (Turgeon, 2012):

$$\text{CHCM (g/dL)} = (\text{Hg} \times 100) / \text{Ht}$$

A partir de dos laminillas seleccionadas al azar, se contaron 100 leucocitos en cada una siguiendo la técnica de zig-zag en el cuerpo del frotis (Figura 7). Se obtuvo la media de ambas laminillas y los resultados se expresaron en porcentaje de cada célula (conteo diferencial relativo). Para obtener el conteo diferencial absoluto se multiplicó el valor total de leucocitos ($\times 10^3$ cel/ul) por la media porcentual de cada tipo de leucocito y se dividió el resultado entre 100.



Figura 7. Técnica de zig-zag para conteo diferencial de leucocitos en frotis sanguíneo.

6.3.3 Bioquímica sanguínea

La sangre del tubo rojo fue centrifugada por 5 min a 3,500 rpm; el suero fue separado del paquete celular utilizando micropipeta de 1,000 μ l y se depositó en tubo de plástico estéril de 1.5 ml. A partir del suero se analizaron los valores de química sanguínea de glucosa, ácido úrico, proteínas totales, albumina, globulinas, creatinina, urea, colesterol, triglicéridos, alanino aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, lipasa, amilasa, colinesterasa, lactato deshidrogenasa, cloruro, sodio, potasio, calcio y fósforo. Se utilizó suero humano normal SpintrolH Spinreact® como control. Estos análisis se desarrollaron en un espectrofotómetro VetTest® Chemistry Analyzer con reactivos marca Spinreact®.

A continuación, se describen los métodos utilizados para el análisis de cada parámetro de química sanguínea:

1) Glucosa. La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol, 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de la peroxidasa (POD). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada (Kaplan, 1984a).

2) Ácido úrico. El ácido úrico es oxidado por la uricasa a alantoína y peróxido de hidrógeno ($2H_2O_2$) que en presencia de peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF) y 2-4 Diclorofenol Sulfonato (DCPS) forma un compuesto rosáceo. La intensidad de quinonaimina roja formada es proporcional a la concentración de ácido úrico presente en la muestra ensayada (Schultz, 1984).

3) Urea. La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea presente en la muestra, en amoniaco (NH_4^+) y anhídrido carbónico (CO_2). Los iones amonio formados se incorporan al α -cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) con oxidación paralela de NADH a NAD^+ . La disminución de la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración de urea de la muestra ensayada (Kaplan, 1984b).

4) Proteínas totales. Se utilizó el método Biuret colorimétrico. En medio alcalino, las proteínas dan un intenso color violeta azulado en presencia de sales de cobre; contiene yoduro como antioxidante. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de proteína total en la muestra ensayada (Koller, 1984; Burtis *et al.*, 1999).

5) Albumina. La albúmina se combina con el verde de bromocresol a pH ligeramente ácido, produciéndose un cambio de color del indicador, de amarillo verdoso a verde azulado proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra ensayada (Gendler, 1984).

6) Globulinas. La cantidad de globulinas en una muestra plasmática o sérica se obtiene restando el valor de albumina al de las proteínas totales (Busher, 1990).

7) Creatinina. El ensayo de la creatinina está basado en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino descrito por Jaffé. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo. El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra ensayada (Murray, 1984a).

8) Colesterol. El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la siguiente reacción: Ésteres colesterol + H₂O = Colesterol + Ácidos grasos, Colesterol + O₂ = 4-Colestenona + H₂O₂, 2H₂O₂+Fenol + 4-Aminofenazona = Quinonimina + 4H₂O. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada (Meiattini *et al.*, 1978; Naito, 1984).

9) Triglicéridos. Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) por GPO. Al final, el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada (Kaplan *et al.*, 1984c).

10) Alanino aminotransferasa. La alanina aminotrasferasa (ALT) inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvica (GPT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α-cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada (Murray, 1984b).

11) Aspartato aminotransferasa. La aspartato aminotransferasa (AST) inicialmente llamada transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada (Murray, 1984c).

12) Fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina (FAL) cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (pNPP) a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato. La velocidad de formación del p-Nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra ensayada (Wenger *et al.*, 1984).

13) Lipasa. La lipasa pancreática en presencia de colipasa, iones calcio y desoxicolato, hidroliza el sustrato 1-2-O-dilauril-rac-glicerol-3-glutárico-(6'-metilresorufina)-éster. La velocidad de formación de metilresorufina determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de lipasa en la muestra ensayada (McNeely, 1984).

14) Amilasa. La α -amilasa hidroliza el 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriósido (CNPG3) a 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) y forma 2-cloro-4-nitrofenil- α -Dmaltoside (CNPG2), maltotriosa (G3) y glucosa (G). La velocidad de formación de 2-cloro-4-nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de α -amilasa en la muestra ensayada (Ying-Foo *et al.*, 1998).

15) Colinesterasa. La colinesterasa hidroliza la butiriltiocolina a tiocolina y butirato. La tiocolina reacciona con el ácido 5.5'-ditiobis-2-nitrato (DTNB) formando 2-nitromercaptobenzoato. La velocidad de formación de 2-nitromercaptobenzoato, determinado fotométricamente, es proporcional a la actividad enzimática de colinesterasa en la muestra ensayada (Whittaker *et al.*, 1983; King, 1984).

16) Lactato deshidrogenasa. El lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción del piruvato por el NADH, según la siguiente reacción: Piruvato + NADH + H⁺ = L-lactato + NAD⁺. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de LDH en la muestra ensayada (Pesce, 1984).

17) Cloro. Los iones de cloro de la muestra reaccionan con tiocianato de mercurio desplazando el ion tiocianato. El tiocianato libre en presencia de iones férricos forma un complejo coloreado medible colorimétricamente. La intensidad del color es proporcional a la concentración de iones cloruro presente en la muestra ensayada (Miller, 1984).

18) Sodio. El Sodio se determina enzimáticamente a través de la actividad de β -galactosidasa, usando como sustrato ONPG. La absorbancia del producto o-nitrofenil a 405 nm es proporcional a la concentración de sodio (Berry *et al.*, 1988).

19) Potasio. El Potasio se determina enzimáticamente a través de la actividad de ADP, usando como sustrato fosfoenolpiruvato. El piruvato formado reacciona con el NADH en presencia de LDH para formar Lactato y NAD. El

correspondiente descenso de absorbancia a 340 nm es proporcional a la concentración de potasio (Berry *et al.*, 1989).

20) Calcio. La medición del calcio se basa en la formación de un complejo coloreado entre el calcio y la o-cresolftaleína, en medio alcalino. La intensidad del color formado es directamente proporcional a la concentración de calcio presente en la muestra ensayada (Farell, 1984a).

21) Fosforo. El fósforo inorgánico reacciona en medio ácido con molibdato amónico formando un complejo fosfomolibdico de color amarillo. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de fósforo inorgánico presente en la muestra ensayada (Farell, 1984b).

6.3.4 Análisis de metales pesados

Las muestras sanguíneas se sometieron a análisis de concentración de As, Pb y Cd por espectrómetro de masas inductivamente acoplado (ICP-MS) con método EPA 200.8; se emplearon estándares de referencia certificados Perkin Elmer.

6.4 Análisis estadístico

Para el uso de pruebas paramétricas, se probó la normalidad de cada parámetro sanguíneo (morfometría celular, biometría hemática, bioquímica sanguínea y metales pesados) mediante pruebas de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas por pruebas de Levene. Debido a que la mayoría de los parámetros no se ajustaron a la normalidad se transformaron a log₁₀ (Zar, 1999).

Se utilizaron análisis de varianza para probar diferencia de tamaño entre las distintas células sanguíneas. Para los parámetros de biometría y bioquímica sanguínea se realizaron comparaciones entre las variables hora de actividad (mañana/tarde), sexo (hembra/macho), clase de edad (adulto/subadulto) y localidad (La Flor, Guadalupe y Mohovano) mediante análisis de varianza ($P \leq 0.05$). Posteriormente, se llevó a cabo un muestreo Bootstrap con 1,000 submuestreos para establecer intervalos de confianza al 95% para cada parámetro. Finalmente, se calcularon las estadísticas descriptivas como el valor medio, desviación estándar, error estándar, mínimo y máximo para todos los parámetros. Para el análisis de los metales pesados, se realizaron comparaciones entre sexos, clases de edad y localidades mediante análisis de varianza, también se obtuvieron estadísticas descriptivas.

Se aplicó un análisis de componentes principales (ACP) para estudiar las relaciones que se presentaron entre los parámetros hematológicos correlacionados. Primero se realizó un análisis de correlación múltiple entre todos los parámetros y se seleccionaron aquellos cuya correlación fuera ≥ 0.8 . Estos parámetros se estudiaron al través de la técnica multivariada de ACP. Se obtuvieron los valores propios de cada componente (eigenvalores) y el porcentaje de varianza explicada, así como los valores propios de cada variable (eigenvectores). Posteriormente, los dos primeros componentes fueron representados en una gráfica de dispersión (scatterplot) de cuatro cuadrantes que fue interpretada de acuerdo con los eigenvectores y se obtuvo una gráfica de sedimentación que representa los componentes principales según su porcentaje de eigenvalor.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los programas SPSS Ver. 18 y PAST 3.x (Hammer *et al.*, 2001).

6.5 Ubicación geográfica de las tortugas estudiadas

Se elaboraron mapas con la ubicación de los individuos capturados en cada una de las localidades, distribución por sexo y edad con relieve sombreado generado a partir del continuo de elevaciones mexicano 3.0 (INEGI, 2013) como referencia. Se utilizó el programa QGIS (2015) Ver. 2.14 "Essen".

VI. RESULTADOS

Durante el estudio se capturaron 28 tortugas *Gopherus flavomarginatus*, de las cuales 20 fueron de la localidad de La Flor, tres en Guadalupe y cinco en Mohovano en la reserva de la Biosfera Mapimí.

7.1. Caracterización morfométrica de las células sanguíneas de *G. flavomarginatus*

7.1.1. Eritrocitos

El eritrocito de *G. flavomarginatus* se observó como una célula elíptica con bordes lisos; posee un núcleo redondeado en el centro de la misma. El citoplasma es abundante en relación al núcleo y mostró coloración acidófila (color rosado). El núcleo mantiene la cromatina concentrada y tiñó de color morado (Figura 8).

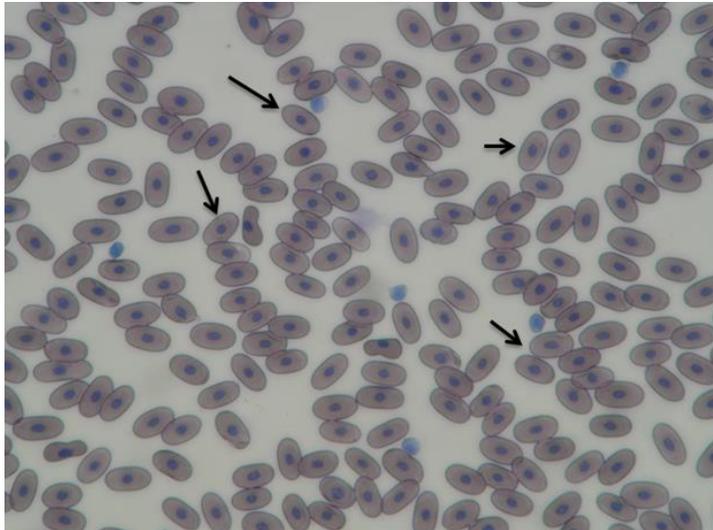


Figura 8. Eritrocitos en frotis sanguíneo de *G. flavomarginatus*. Tinción Wright, 40x.

7.1.2 Leucocitos

Se identificaron cinco tipos de leucocitos de acuerdo con su forma, tamaño y presencia/ausencia de gránulos: linfocitos, monocitos, heterófilos, eosinófilos y basófilos. Cada uno de ellos se describe a continuación.

Linfocitos

Los linfocitos de *G. flavomarginatus* se observaron como células redondas con núcleo circular cubriendo casi 100% del citoplasma. El color del núcleo fue morado oscuro y el citoplasma azul (Figura 9).

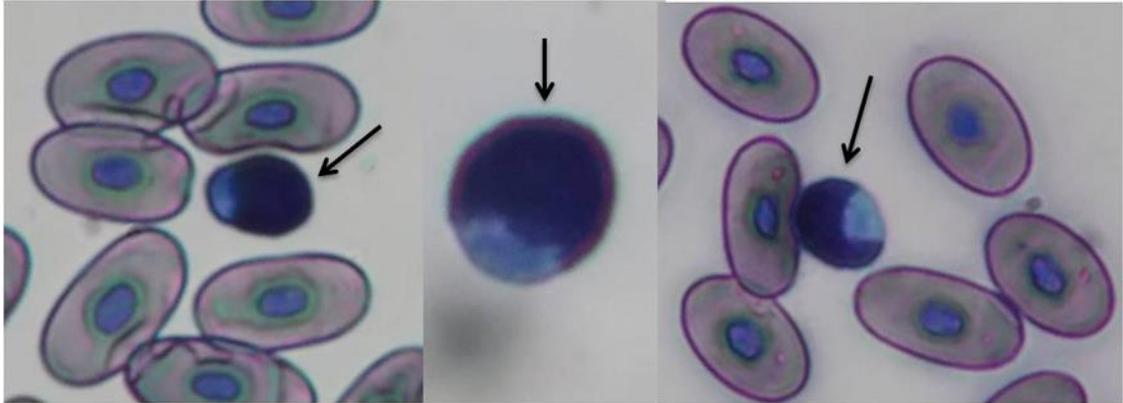


Figura 9. Linfocitos en frotis sanguíneo de *G. flavomarginatus*. Tinción Wright, 40x.

Monocitos

Los monocitos de *G. flavomarginatus* presentaron una morfología celular que varió de redonda a ameboide; su núcleo fue pleomórfico (redondo, oval o lobulado) en forma de habichuela o arriñonado. El citoplasma de esta célula se tiñó de color azul claro a grisáceo, mientras que el núcleo se tiñó de color azul o lila.

Heterófilos

Los heterófilos de *G. flavomarginatus* son células esféricas que contienen una gran cantidad de gránulos citoplasmáticos de formas redonda y abastonada que se tiñen de color rosado anaranjado. El núcleo es redondo u ovalado de color morado de forma redondeada u ovalada con una posición excéntrica (Figura 10).

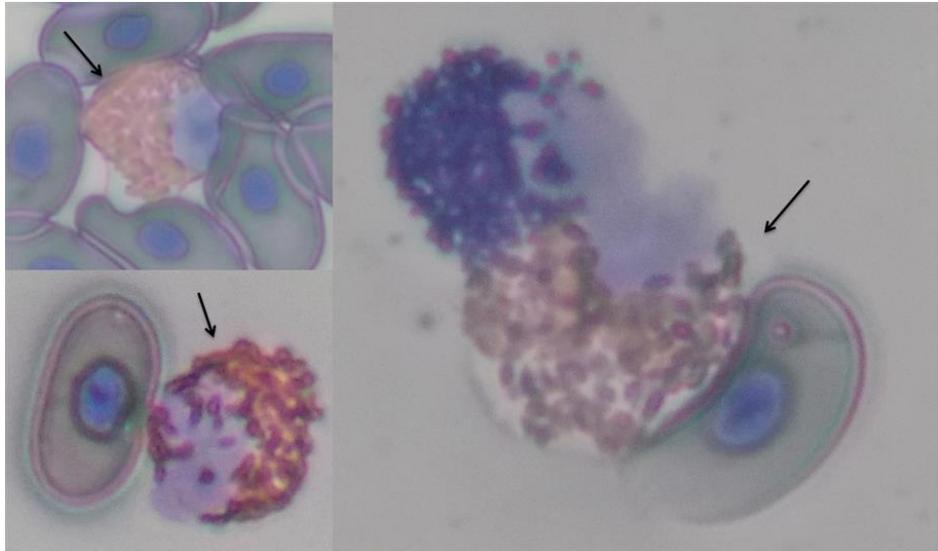


Figura 10. Heterófilos en frotis sanguíneo de *G. flavomarginatus*. Tinción Wright, 40x.

Eosinófilos

Los eosinófilos de *G. flavomarginatus* son células redondas muy parecidas a lo heterófilos, sin embargo, sus gránulos citoplasmáticos son completamente esféricos y de color rosado anaranjado. El núcleo es redondo u ovalado de color morado de forma redondeada u ovalada con una posición excéntrica (Figura 11).

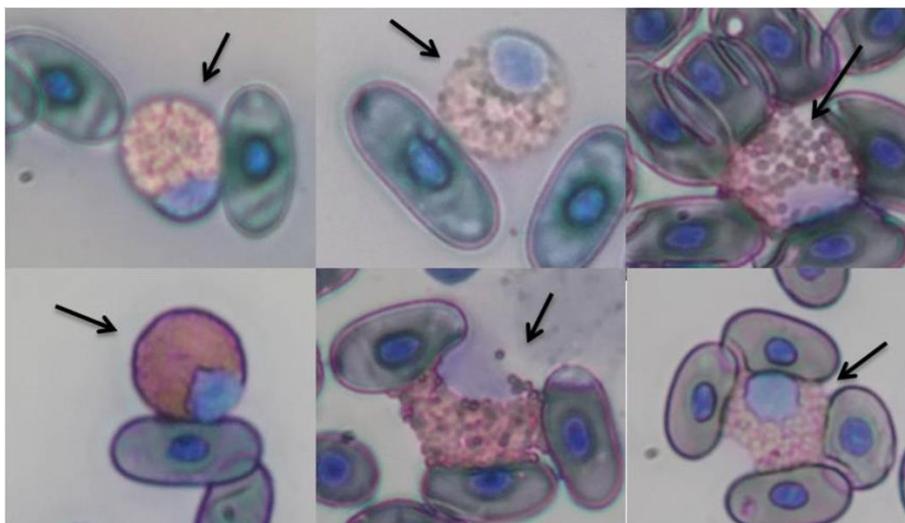


Figura 11. Eosinófilos en frotis sanguíneo de *G. flavomarginatus*. Tinción Wright, 40x.

Basófilos

Los basófilos de *G. flavomarginatus* son células redondas a ovaladas que contienen un gran número de gránulos citoplasmáticos intensamente basofílicos (morados), que pueden llegar a cubrir el núcleo. Éste último es grande y se puede encontrar en posición central o excéntrica (Figura 12).

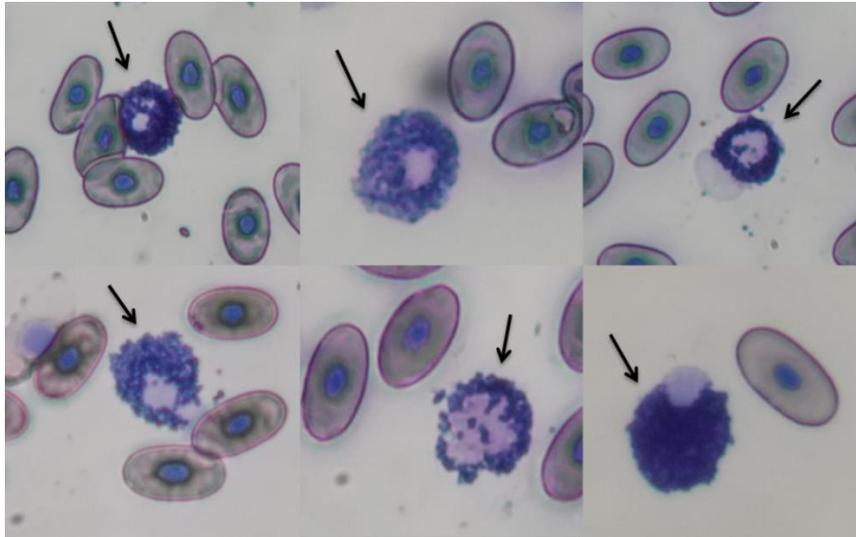


Figura 12. Basófilos en frotis sanguíneo de *G. flavomarginatus*. Tinción Wright, 40x.

7.1.3 Trombocitos

Los trombocitos de *G. flavomarginatus* son células pequeñas de forma ovalada que carecen de granulaciones. Su núcleo es redondo o con tendencia rectangular y se tiñe de color morado. El citoplasma rodea al núcleo y se observa transparente brillante (refringente) (Figura 13).

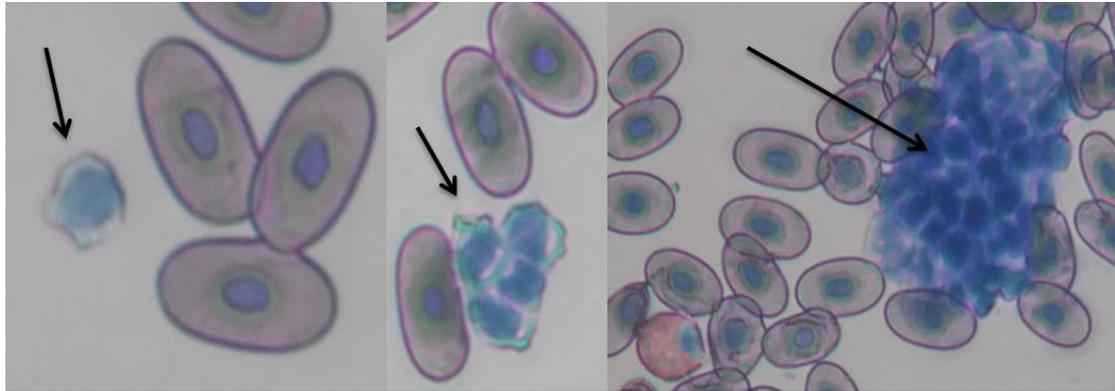


Figura 13. Trombocitos en frotis sanguíneo de *G. flavomarginatus*. Tinción Wright, 40x.

7.1.4 Medidas de las células sanguíneas

Se calculó el área (μm^2) de cada tipo de célula sanguínea de *G. flavomarginatus* y se probó diferencia significativa entre ellas. El análisis de varianza mostró diferencia significativa entre algunas células ($F = 156.18$, g. l. = 4, 215; $P < 0.001$). Las células más grandes fueron los heterófilos y basófilos ($\bar{x} = 42.5 \mu\text{m}^2$ y $\bar{x} = 40.8 \mu\text{m}^2$, respectivamente), seguidas por los eosinófilos y eritrocitos ($\bar{x} = 30.3 \mu\text{m}^2$ y $\bar{x} = 28.3 \mu\text{m}^2$, respectivamente) y por último los linfocitos ($\bar{x} = 13.2 \mu\text{m}^2$) (Figura 14). Las estadísticas descriptivas del área de estos cinco tipos de células sanguíneas se indican en la Cuadro 2.

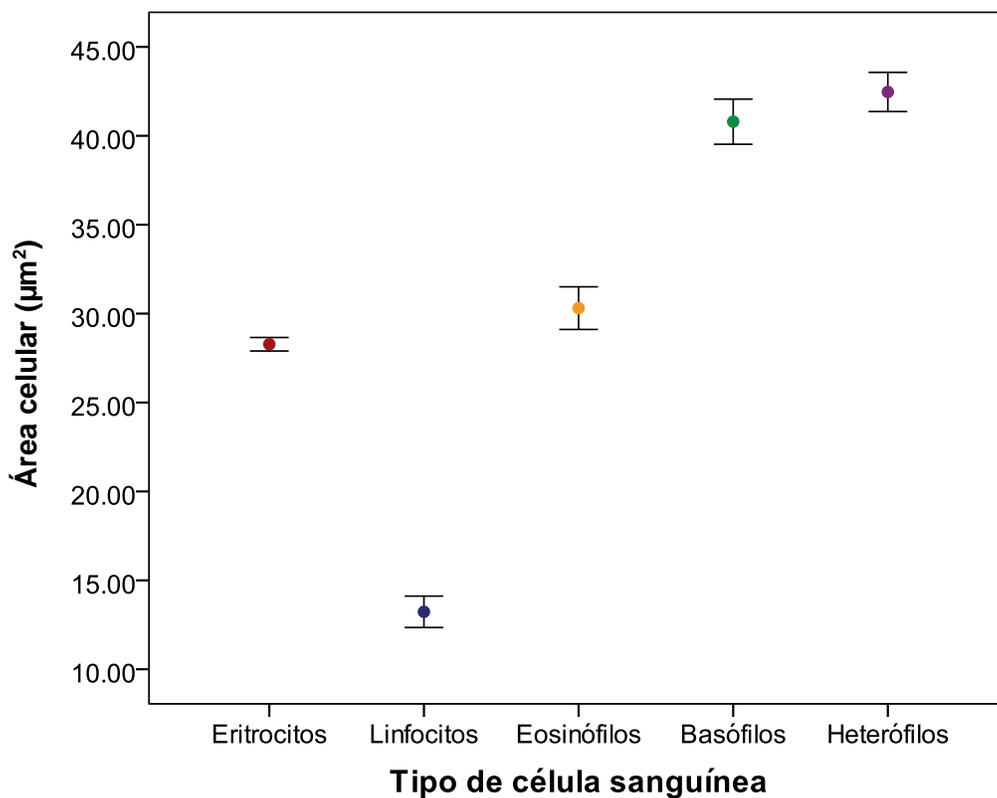


Figura 14. Comparación entre las áreas de las cinco células más abundantes en la sangre de *G. flavomarginatus*. En cada valor medio, las barras verticales indican el error estándar.

Cuadro 2. Estadísticos descriptivos del área (µm²) de los cinco tipos de células sanguíneas más abundantes en *G. flavomarginatus*. Min= Mínimo, Max= Máximo e IC₉₅= Intervalo de confianza al 95%.

Célula	N	Media	Min	Max	IC ₉₅
Eritrocitos	100	28.3	20.7	39.8	27.5 - 29.0
Linfocitos	30	13.2	6.5	24.6	11.4 - 15.0
Eosinófilos	30	30.3	18.9	47.0	27.9 - 32.8
Basófilos	30	40.8	23.0	54.4	38.2 - 43.4
Heterófilos	30	42.5	31.9	58.1	40.2 - 44.7
Total	220	30.1	6.5	58.1	28.8 - 31.5

7.2 Biometría hemática

Se obtuvieron valores de biometría hemática de 25 tortugas. En la Figura 15 se muestra la medición de un capilar para el cálculo del hematocrito. En la Figura 16 se observan los campos de la cámara de Neubauer en los que se realizaron los conteos de eritrocitos, mientras que en la Figura 17 se observa la diferencia entre eritrocitos y leucocitos durante el conteo total de éstos últimos.

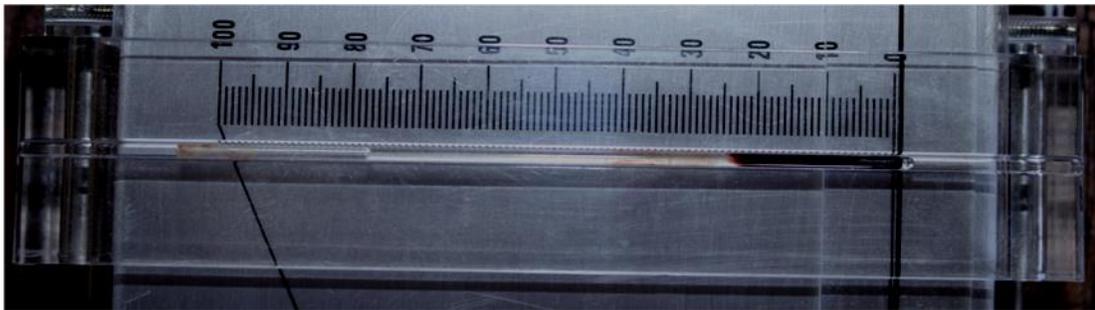


Figura 15. Microhematocritómetro para cuantificar el hematocrito de una muestra de sangre de *G. flavomarginatus*.

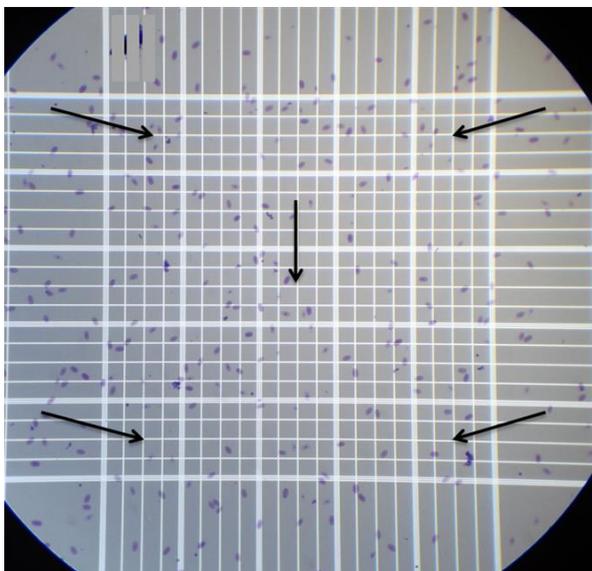


Figura 16. Muestra de sangre de *G. flavomarginatus* en cámara de Neubauer. Las flechas indican los cinco cuadros para el conteo de eritrocitos. Tinción Natt y Herrick, 10x.

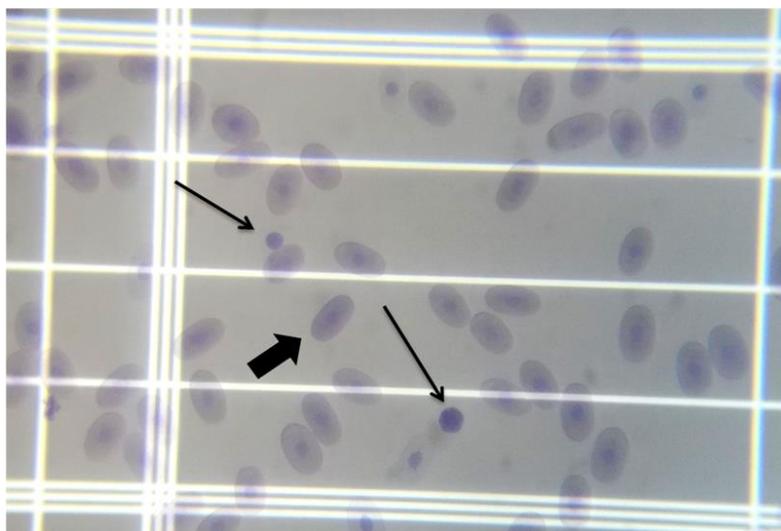


Figura 17. Muestra de sangre de *G. flavomarginatus* en cámara de Neubauer. Las flechas delgadas y la gruesa indican leucocitos y un eritrocito, respectivamente. Tinción Natt y Herrick, 40x.

No se observaron diferencias significativas en los distintos parámetros sanguíneos entre ninguna de las variables consideradas (hora de actividad, sexo, clase de edad y localidad). Los resultados de los análisis de varianza de cada variable se muestran en la Cuadro 3.

Cuadro 3. Análisis de varianza para cada uno de los parámetros de biometría hemática de *G. flavomarginatus* con relación a las fuentes de variación (F.V.). gl = grados de libertad, F = estadístico de la prueba de Fisher, P = nivel de significancia.

Parámetro	F.V.	gl	F	P
Hematocrito (%)	Hora de actividad	1, 23	0.691	0.414
	Sexo	1, 23	0.259	0.615
	Edad	1, 23	0.213	0.649
	Localidad	2, 22	2.555	0.100
Hemoglobina (g/dl)	Hora de actividad	1, 23	0.220	0.644
	Sexo	1, 23	0.029	0.867
	Edad	1, 23	0.899	0.353
	Localidad	2, 22	0.704	0.506
Eritrocitos ($\times 10^6$ cel/ul)	Hora de actividad	1, 23	1.067	0.312
	Sexo	1, 23	0.003	0.954
	Edad	1, 23	0.151	0.701
	Localidad	2, 22	2.003	0.159
Leucocitos ($\times 10^3$ cel/ul)	Hora de actividad	1, 23	0.216	0.647
	Sexo	1, 23	0.230	0.636
	Edad	1, 23	0.000	0.999
	Localidad	2, 22	0.550	0.584
Volumen Corpuscular medio (fl)	Hora de actividad	1, 23	0.699	0.412
	Sexo	1, 23	0.144	0.708
	Edad	1, 23	0.025	0.876
	Localidad	2, 22	2.218	0.133
Hemoglobina Corpuscular media (pg)	Hora de actividad	1, 23	1.705	0.205
	Sexo	1, 23	0.275	0.605
	Edad	1, 23	0.040	0.842
	Localidad	2, 22	2.901	0.076

Cuadro 3 (Continúa).

Parámetro	F.V.	gl	F	P
Concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dl)	Hora de actividad	1, 23	1.695	0.206
	Sexo	1, 23	0.243	0.627
	Edad	1, 23	0.030	0.864
	Localidad	2, 22	2.446	0.110
Linfocitos ($\times 10^3$ cel/ul)	Hora de actividad	1, 23	0.630	0.435
	Sexo	1, 23	1.934	0.178
	Edad	1, 23	1.095	0.306
	Localidad	2, 22	0.644	0.535
Monocitos ($\times 10^3$ cel/ul)	Hora de actividad	1, 23	0.569	0.458
	Sexo	1, 23	0.889	0.355
	Edad	1, 23	3.375	0.079
	Localidad	2, 22	1.236	0.310
Heterófilos ($\times 10^3$ cel/ul)	Hora de actividad	1, 23	0.038	0.847
	Sexo	1, 23	0.032	0.859
	Edad	1, 23	0.011	0.918
	Localidad	2, 22	0.871	0.432
Eosinófilos ($\times 10^3$ cel/ul)	Hora de actividad	1, 23	0.051	0.824
	Sexo	1, 23	0.786	0.384
	Edad	1, 23	0.282	0.601
	Localidad	2, 22	2.314	0.122
Basófilos ($\times 10^3$ cel/ul)	Hora de actividad	1, 23	1.266	0.272
	Sexo	1, 23	0.364	0.552
	Edad	1, 23	1.126	0.300
	Localidad	2, 22	0.603	0.556

Se calcularon las estadísticas descriptivas e intervalos de confianza al 95% para los valores medios de todos los parámetros de biometría hemática estudiados para *G. flavomarginatus* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estadísticas descriptivas e intervalos de confianza (IC) al 95% de confiabilidad para los parámetros de biometría hemática considerados para *G. flavomarginatus* (n = 25). VCM = volumen corpuscular medio, HCM = hemoglobina corpuscular media, CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media, Min = mínimo, Max = máximo e IC₉₅= intervalo de confianza al 95%.

Parámetro	Media	Min	Max	IC ₉₅
Hematocrito (%)	24.44	13.3	35.6	21.9-27.1
Hemoglobina (g/dl)	7.9	1.4	24.1	5.9-10.4
Eritrocitos (x10 ⁶ cel/ul)	0.6	0.2	1.0	0.5-0.6
Leucocitos (x10 ³ cel/ul)	8.7	2.3	21.3	7-10.5
VCM (fl)	502.7	216.6	886.5	433-582.9
HCM (pg)	182.5	30.4	735.4	122.9-266.4
CHCM (g/dl)	31.8	7.2	91.0	24.8-40.6
Heterófilos (x10 ³ cel/ul)	3.5	1.0	10.0	2.7-4.4
Linfocitos (x10 ³ cel/ul)	2.9	0.7	7.1	2.2-3.5
Eosinófilos (cel/ul)	1.6	0.41	8.4	1-2.3
Basófilos (cel/ul)	0.5	0.1	2.1	0.3-0.7
Monocitos (cel/ul)	0.2	0.0	0.6	0.1-0.3

7.3 Bioquímica sanguínea

A partir del suero sanguíneo de 28 tortugas se obtuvieron valores de química sanguínea. No se observaron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros considerados para las variables de hora de actividad, sexo, clase de edad y localidad (Cuadro 5). Sin embargo, el ácido úrico resultó más alto en la hora de actividad en la tarde (\bar{x} = 18.82 mg/dl; n = 6) que en la

mañana (\bar{x} = 5.62 mg/dl, n = 22). La colinesterasa resultó más alta en machos (\bar{x} = 403.64 UI/l; n = 14) que en hembras (\bar{x} = 197.18 UI/l; n = 14). El cloro fue más alto en la localidad de Guadalupe (\bar{x} = 565.11 mmol/l; n = 3), en comparación con La Flor (\bar{x} = 225.10 mmol/l; n = 20) y Mohovano (\bar{x} = 207.77 mmol/l; n = 5). Finalmente, el potasio fue más alto en los subadultos (\bar{x} = 7.42 mmol/l; n = 3) que en los adultos (\bar{x} = 5.18 mmol/l; n = 25) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para cada uno de los parámetros de química sanguínea de *G. flavomarginatus* con relación a las fuentes de variación (F.V). gl = grados de libertad, F = estadístico de la prueba de Fisher, P = nivel de significancia.

Parámetro	F.V.	gl	F	P
Glucosa (mg/dl)	Hora de actividad	1, 26	3.869	0.060
	Sexo	1, 26	0.311	0.582
	Edad	1, 26	1.130	0.298
	Localidad	2, 25	2.224	0.129
Ácido úrico (mg/dl)	Hora de actividad	1, 26	5.215	0.031
	Sexo	1, 26	0.043	0.837
	Edad	1, 26	0.000	0.987
	Localidad	2, 25	0.351	0.707
Proteínas totales (g/dl)	Hora de actividad	1, 26	0.029	0.867
	Sexo	1, 26	3.775	0.063
	Edad	1, 26	1.059	0.313
	Localidad	2, 25	0.363	0.699
Albumina (g/dl)	Hora de actividad	1, 26	0.102	0.752
	Sexo	1, 26	3.569	0.070
	Edad	1, 26	2.022	0.167
	Localidad	2, 25	0.802	0.459

Cuadro 5 (Continúa).

Parámetro	F.V.	gl	F	P
Globulinas (g/dl)	Hora de actividad	1, 26	0.078	0.782
	Sexo	1, 26	2.116	0.158
	Edad	1, 26	0.340	0.565
	Localidad	2, 25	0.509	0.607
Creatinina (mg/dl)	Hora de actividad	1, 26	0.318	0.578
	Sexo	1, 26	2.633	0.117
	Edad	1, 26	2.964	0.097
	Localidad	2, 25	2.573	0.096
Urea (mg/dl)	Hora de actividad	1, 26	0.001	0.976
	Sexo	1, 26	0.120	0.732
	Edad	1, 26	0.421	0.522
	Localidad	2, 25	1.776	0.190
Colesterol (mg/dl)	Hora de actividad	1, 26	3.535	0.071
	Sexo	1, 26	0.131	0.720
	Edad	1, 26	0.010	0.921
	Localidad	2, 25	1.354	0.276
Triglicéridos (mg/dl)	Hora de actividad	1, 26	1.333	0.259
	Sexo	1, 26	0.000	0.988
	Edad	1, 26	0.166	0.687
	Localidad	2, 25	0.514	0.604
Alanino aminotransferasa (IU/l)	Hora de actividad	1, 26	0.003	0.955
	Sexo	1, 26	0.001	0.970
	Edad	1, 26	0.009	0.924
	Localidad	2, 25	1.138	0.336
Aspartato aminotransferasa (UI/l)	Hora de actividad	1, 26	0.025	0.877
	Sexo	1, 26	0.031	0.861
	Edad	1, 26	0.390	0.538
	Localidad	2, 25	1.088	0.352
Fosfatasa alcalina (UI/l)	Hora de actividad	1, 26	2.834	0.104
	Sexo	1, 26	3.332	0.079
	Edad	1, 26	0.564	0.459
	Localidad	2, 25	1.001	0.382

Cuadro 5 (Continúa).

Parámetro	F.V.	gl	F	P
Lipasa (UI/l)	Hora de actividad	1, 26	2.652	0.115
	Sexo	1, 26	0.716	0.405
	Edad	1, 26	3.993	0.056
	Localidad	2, 25	1.954	0.163
Amilasa (UI/l)	Hora de actividad	1, 26	2.032	0.166
	Sexo	1, 26	0.679	0.417
	Edad	1, 26	1.418	0.245
	Localidad	2, 25	1.465	0.250
Colinesterasa (UI/l)	Hora de actividad	1, 26	0.038	0.848
	Sexo	1, 26	7.412	0.011
	Edad	1, 26	2.032	0.166
	Localidad	2, 25	0.126	0.882
Lactato deshidrogenasa (UI/l)	Hora de actividad	1, 26	0.070	0.793
	Sexo	1, 26	0.215	0.646
	Edad	1, 26	0.695	0.412
	Localidad	2, 25	0.506	0.609
Cloro (mmol/l)	Hora de actividad	1, 26	2.703	0.112
	Sexo	1, 26	0.310	0.583
	Edad	1, 26	1.399	0.248
	Localidad	2, 25	5.786	0.009
Sodio (mmol/l)	Hora de actividad	1, 26	0.086	0.772
	Sexo	1, 26	0.013	0.910
	Edad	1, 26	0.247	0.623
	Localidad	2, 25	1.025	0.373
Potasio (mmol/l)	Hora de actividad	1, 26	0.625	0.436
	Sexo	1, 26	0.020	0.888
	Edad	1, 26	5.623	0.025
	Localidad	2, 25	0.307	0.739
Calcio (mg/dl)	Hora de actividad	1, 26	0.627	0.435
	Sexo	1, 26	0.492	0.489
	Edad	1, 26	0.010	0.922
	Localidad	2, 25	2.023	0.153

Cuadro 5 (Continúa).

Parámetro	F.V.	gl	F	P
Fosforo (mg/dl)	Hora de actividad	1, 26	0.159	0.694
	Sexo	1, 26	0.007	0.935
	Edad	1, 26	0.393	0.536
	Localidad	2, 25	1.819	0.183

Se calcularon las estadísticas descriptivas e intervalo de confianza de la media con confiabilidad del 95% para los 21 parámetros de bioquímica sanguínea (Cuadro 6).

Cuadro 6. Estadísticas descriptivas e intervalo de confianza (IC) al 95% para los parámetros de bioquímica sanguínea (PQS) considerados para *G. flavomarginatus* (n = 28). Min = mínimo, Max = máximo e IC₉₅ = intervalo de confianza al 95%.

Parámetro	Media	Min	Max	IC ₉₅
Glucosa (mg/dl)	83.1	14.7	194.9	60.0 -108.9
Ácido úrico (mg/dl)	8.4	0.1	66.5	4.7-13.5
Proteínas totales (g/dl)	9.2	0.5	44.9	4.8 -14.4
Albumina (g/dl)	1.6	0.1	12.4	0.8 - 2.7
Globulinas (g/dl)	7.6	0.0	40.7	3.5 -12.4
Creatinina (mg/dl)	0.5	0.0	1.7	0.4 - 0.6
Urea (mg/dl)	16.3	0.0	303.5	4.0 - 39.4
Colesterol (mg/dl)	207.3	2.6	692.3	124.5 - 296.3
Triglicéridos (mg/dl)	188.1	60.5	509.8	155.7-231.1
ALT (UI/l)	8.9	0.1	38.0	6.0-12.2

Cuadro 6 (Continúa).

Parámetro	Media	Min	Max	IC₉₅
AST (UI/l)	35.5	0.8	105.0	26.4 - 45.3
FA (UI/l)	52.8	8.7	164.9	38.1 - 68.2
Lipasa (UI/l)	0.4	0.1	1.7	0.3 - 0.5
Amilasa (UI/l)	316.0	28.6	955.4	217.4 - 426.2
Colinesterasa (UI/l)	300.4	4.3	772.5	230.9 - 367.7
LDH (UI/l)	138.6	13.5	378.4	97.1 - 183.5
Cloro (mmol/l)	258.4	109.1	643.0	193.0 - 330.2
Sodio (mmol/l)	33.0	0.0	120.9	22.6-45.2
Potasio (mmol/l)	5.4	3.5	9.8	4.9-6.1
Calcio (mg/dl)	12.7	3.6	33.1	10.2-15.7
Fósforo (mg/dl)	4.3	0.6	7.3	3.3-5.0

7.4 Metales pesados

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de As, Cd y Pb entre sexos, clases de edad ni localidades (Cuadros 7, 8 y 9, respectivamente).

Cuadro 7. Análisis de varianza para la concentración de arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) en sangre entre sexos de *G. flavomarginatus*. g.l. = grados de libertad, F = estadístico de la prueba de Fisher, P = nivel de significancia.

Fuente de variación		Suma de cuadrados	g.l.	Varianza	F	P
As	Inter-grupos	0.016	1	0.016	0.459	0.504
	Intra-grupos	0.921	26	0.035		
	Total	0.937	27			
Cd	Inter-grupos	0.000	1	0.000	0.070	0.794
	Intra-grupos	0.001	26	0.000		
	Total	0.001	27			
Pb	Inter-grupos	0.000	1	0.000	0.004	0.951
	Intra-grupos	0.532	26	0.020		
	Total	0.532	27			

Cuadro 8. Análisis de varianza para la concentración de arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) en sangre entre clases de edad de *G. flavomarginatus*. g.l. = grados de libertad, F = estadístico de la prueba de Fisher, P = nivel de significancia.

Fuente de variación		Suma de cuadrados	g.l.	Varianza	F	P
As	Inter-grupos	0.000	1	0.000	0.0003	0.957
	Intra-grupos	0.937	26	0.036		
	Total	0.937	27			
Cd	Inter-grupos	0.000	1	0.000	0.149	0.703
	Intra-grupos	0.001	26	.000		
	Total	0.001	27			
Pb	Inter-grupos	0.001	1	0.001	0.066	0.800
	Intra-grupos	0.531	26	0.020		
	Total	0.532	27			

Cuadro 9. Análisis de varianza para la concentración de arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) en sangre entre localidades para *G. flavomarginatus*. g.l. = grados de libertad, F = estadístico de la prueba de Fisher, P = nivel de significancia.

Fuente de variación		Suma de cuadrados	g.l.	Varianza	F	P
As	Inter-grupos	0.019	2	0.009	0.258	0.775
	Intra-grupos	0.918	25	0.037		
	Total	0.937	27			
Cd	Inter-grupos	0.000	2	0.000	1.875	0.174
	Intra-grupos	0.001	25	0.000		
	Total	0.001	27			
Pb	Inter-grupos	0.073	2	0.037	1.988	0.158
	Intra-grupos	0.459	25	0.018		
	Total	0.532	27			

Las medias de las concentraciones de cada metal en sangre de *G. flavomarginatus* fueron: As = 0.40 ppm, Cd = 0.007 ppm y Pb = 0.71. Algunos estadígrafos para cada metal se indican en la Cuadro 10.

Cuadro 10. Estadísticas descriptivas para las concentraciones de arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) para *G. flavomarginatus* (n = 28). Min = mínimo, Max = máximo, IC₉₅ = intervalo de confianza al 95%.

	Media	Min	Max	IC ₉₅
As	0.40	0.00	5.03	0.00 - 0.80
Cd	0.00	0.00	0.06	0.00 - 0.01
Pb	0.71	0.19	5.03	0.36 - 1.07

7.5 Análisis de Componentes Principales

Los parámetros hematológicos de proteínas totales, globulinas, hematocrito, hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) mostraron correlaciones por arriba de

0.8 por lo cual fueron incluidas en el análisis de CP. Los primeros dos componentes principales explicaron el 96.6% de la variación total (Cuadro 11). Los eigenvectores se indican en la Cuadro 12. El primer componente principal (CP1) representó las proteínas totales y globulinas en la sangre de *G. flavomarginatus*, mientras que el segundo componente principal (CP2) tuvo mayor peso hacia el hematocrito, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media, lo que se puede interpretar como hiperproteinemia y hemoconcentración (Figura 18). En la gráfica de sedimentación se indica la varianza acumulada atribuible a los dos primeros CP (Figura 19).

Cuadro 11. Valores propios de los componentes principales (eigenvalores) y % de varianza explicada por cada componente principal.

Componente Principal	Eigenvalor	Varianza (%)
1	3.06381	61.276
2	1.76348	35.27
3	0.0806369	1.6127
4	0.0497671	0.99534
5	0.0423027	0.84605

Cuadro 12. Valores propios (eigenvectores) de las variables según el componente principal (CP). HCM = hemoglobina corpuscular media y CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media.

Variable	CP1	CP2
Proteínas totales	0.26475	0.65541
Globulinas	0.27704	0.64668
Hematocrito	0.54615	-0.16937
HCM	0.52163	-0.27278
CHCM	0.53178	-0.22168

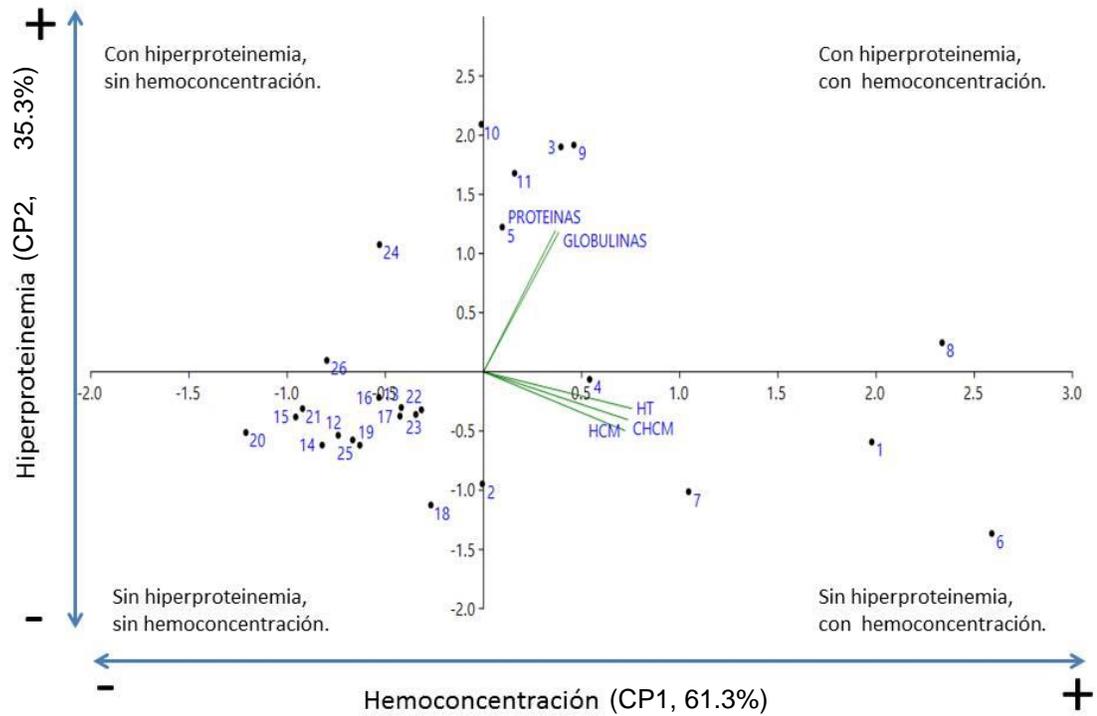


Figura 18. Representación bidimensional de los dos primeros componentes principales (CP) para los parámetros hematológicos de *G. flavomarginatus* en la Reserva de la Biosfera Mapimí. HT= hematocrito, CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular media y HCM= hemoglobina corpuscular media.

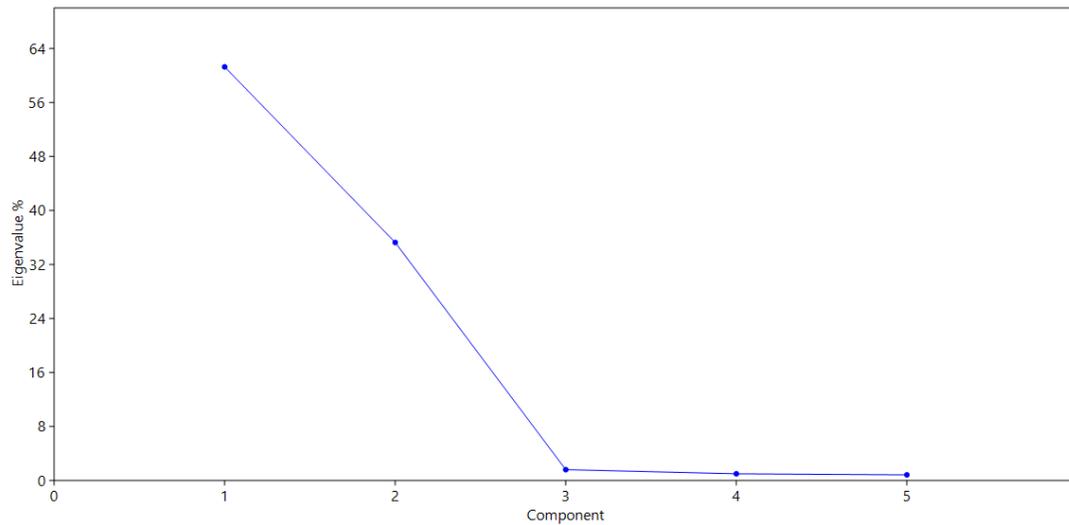


Figura 19. Gráfica de sedimentación que representa la variabilidad acumulada (eigenvalor en porcentaje) de cada componente principal.

En la Figura 20 se muestra la ubicación geográfica de las tortugas que fueron consideradas en el presente estudio.

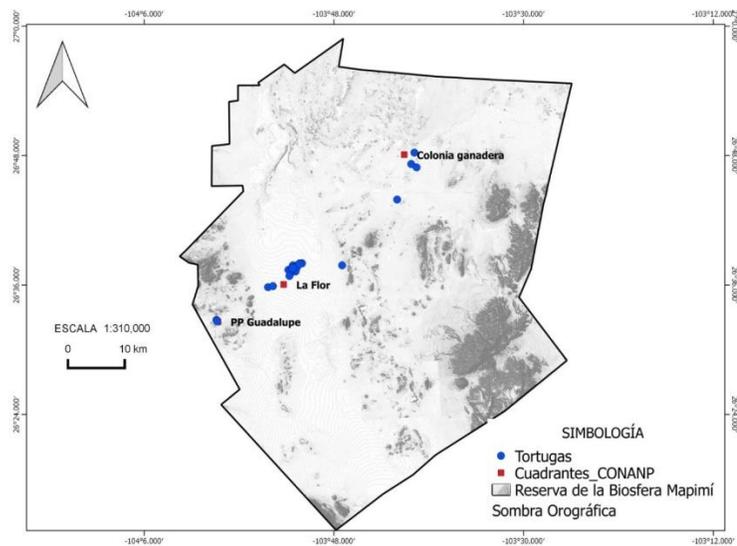


Figura 20. Ubicación geográfica de las tortugas *G. flavomarginatus* del presente estudio.

VIII. DISCUSIÓN

La morfometría de las células sanguíneas de *G. flavomarginatus* coincidió con lo descrito en otras especies de tortugas. Sin embargo, no se observaron azurófilos que según Salakij *et al.* (2002) son un tipo celular de la sangre de los reptiles con una función similar a los monocitos. Wilkinson (2004) indicó que éstos sólo se ven ocasionalmente en quelonios, incluso Martínez-Silvestre (2011) expresó que actualmente hay un consenso científico que confirma que estas células son exclusivas de serpientes.

Christopher *et al.* (1999) realizaron estudios con 60 individuos de *G. agassizii* (30 machos y 30 hembras), donde analizaron la influencia de la localización geográfica, el sexo, la estación del año y la precipitación en la biometría hemática. Estos autores encontraron diferencias significativas entre sexos en el parámetro hematocrito, el cual en los machos fue más elevado que en las hembras. En contraste, Taylor y Jacobson (1989) obtuvieron valores de biometría en trece individuos de *G. polyphemus* durante las estaciones de otoño y primavera de 1977 y 1978, pero no encontraron diferencias significativas en la interacción sexo y estación para ninguna variable (hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, monocitos, basófilos y trombocitos). En el presente estudio con *G. flavomarginatus* no se detectó diferencia significativa en ningún parámetro de biometría hemática; sin embargo, según algunos antecedentes existe la posibilidad de detectar diferencias si se incrementa el

número de muestras y si se consideran otras variables como la estación del año, entre otras.

Teare (2013 a,b,c) resumió los valores de biometría hemática de individuos de *G. agassizii*, *G. berlandieri* y *G. polyphemus* sanos mantenidos en zoológicos de EUA. Las tortugas de *G. flavomarginatus* en el presente estudio presentaron valores medios similares a los reportados por Teare (2013 a,b,c,) al encontrarse dentro de los intervalos de referencia de las otras especies de *Gopherus* con buen estado de salud.

En el mismo documento, Teare (2013 a,b,c) proporciona información de bioquímica sanguínea para *G. agassizii*, *G. berlandieri* y *G. polyphemus*. Los resultados de *G. flavomarginatus* resultaron similares a los parámetros de estas tres especies excepto para el sodio y proteínas totales (Cuadro 13).

Cuadro 13. Parámetros de química sanguínea de las especies *G. agassizii*, *G. berlandieri* y *G. polyphemus* que resultaron elevados en *G. flavomarginatus*.

Parámetro	<i>G. agassizii</i>	<i>G. berlandieri</i>	<i>G. polyphemus</i>	<i>G. flavomarginatus</i>
Sodio (mmol/l)	130 -155	123 -153	120 -145	32.96
Proteínas totales (g/dl)	1.5 - 6.5	1.2 -7.7	1.4 - 6.4	9.24

G. flavomarginatus presenta valores muy bajos de sodio en relación a los establecidos como normales para las otras tres especies, Martínez-Silvestre (2013) especifica que la hiponatremia se da cuando existen enfermedades renales relacionadas a la deshidratación y también cuando hay pérdidas

excesivas de sodio debido a enfermedades gastrointestinales. Las proteínas totales resultaron elevadas en *G. flavomarginatus*, dicho parámetro se asocia a deshidratación o a alguna enfermedad inflamatoria crónica (Martínez-Silvestre, 2013).

En este estudio, estadísticamente, el ácido úrico fue más elevado en las muestras colectadas por tarde ($\bar{x} = 18.8$ mg/dl; $n = 6$) que en la mañana ($\bar{x} = 5.6$ mg/dl, $n = 22$), este parámetro indica deshidratación temporal o niveles altos de calcio o proteínas en la dieta (Martínez-Silvestre, 2013), esto es comprensible para *G. flavomarginatus* ya que en la mañana las tortugas salen de sus madrigueras y llevan varias horas sin ingerir alimentos o hidratación, lo contrario sucede por la tarde. Asimismo, la colinesterasa fue más alta en machos ($\bar{x} = 403.6$ UI/l; $n = 14$) que en hembras ($\bar{x} = 197.2$ UI/l; $n = 14$), este resultado orienta a que esta enzima tiene influencia con el sexo de las tortugas; no existe información sobre este resultado en otras investigaciones de reptiles. Este fenómeno requiere llevar a cabo una investigación más exhaustiva ya que es la primera vez que se registra este comportamiento. También cabe mencionar que este parámetro es un indicador de intoxicación por plaguicidas organoclorados, estos inactivan a las colinesterasas, ingresan al organismo por inhalación de vapores, vacíos o polvos, por absorción gastrointestinal y por penetración a través de la piel debido a su alta liposolubilidad (Lotti, 1995), en las zonas de la periferia de La Reserva se practica la agricultura, principalmente de pasto ballico italiano anual (*Lolium multiflorum*), sorgo forrajero y melón (CONANP,

2013) en los cuales se utilizan este tipo de plaguicidas. El cloro fue más alto en la localidad de Guadalupe ($\bar{x} = 565.1$ mmol/l; $n = 3$), en comparación con La Flor ($\bar{x} = 225.1$ mmol/l; $n = 20$) y Mohovano ($\bar{x} = 207.8$ mmol/l; $n = 5$). Los minerales se encuentran en el agua y suelo y varían de acuerdo a la región o localidad. Finalmente, el potasio fue más alto en los subadultos ($\bar{x} = 7.4$ mmol/l; $n = 3$) que en los adultos ($\bar{x} = 5.2$ mmol/l; $n = 25$). A este respecto, Martínez-Silvestre (2013) señaló que los valores de potasio sufren alteraciones debido a episodios en el ciclo de vida de los reptiles, que alteran drásticamente el equilibrio electrolítico.

Los valores de Pb en *G. flavomarginatus* se consideraron elevados al compararlos con otras especies de vertebrados. Al respecto, Jacobson *et al.* (1991) realizaron una cuantificación de Pb y Cd en dos grupos de tortugas *G. agassizii* en el desierto de Mojave. Para Pb en el grupo I encontraron valores de $\bar{x} = 0.035$ ppm ($n = 10$) y en el grupo II de $\bar{x} = 0.012$ ppm ($n = 4$); para Cd los valores fueron de $\bar{x} = 0.51$ ppm ($n = 10$) en el grupo I de $\bar{x} = 0.41$ ppm ($n = 4$) en el grupo II; no se observó diferencia significativa en las concentraciones de estos metales para ninguno de los grupos. En *G. polyphemus* en Florida se han reportado valores elevados de Pb (0.51 y 0.78 ppm) (Díaz-Figueroa, 2005); este elemento llega al suelo de los hábitats terrestres a través del viento y es absorbido por las plantas que son consumidas por las tortugas como herbáceas

nativas, pastos perenes, arbustos anuales y cactus. Considerando los valores de los estudios antes mencionados, se puede establecer que los individuos de *G. flavomarginatus* analizados presentaron una concentración elevada de plomo en la sangre ($\bar{x} = 0.71$ ppm, $n = 26$) la cual podría deberse a la bioacumulación de este metal en las plantas que forman parte de su dieta, y este metal a su vez provenir de los desechos de minas de la región. Cabe mencionar que valores de plomo elevados en sangre pueden producir signos de deshidratación (Skoch y Lacognata, 1998) lo que coincide con los registros en campo en los que se reportaron a algunas tortugas del presente estudio con condiciones de deshidratación (ojos hundidos, piel flácida y aletargamiento).

En el análisis de componentes principales, el CP1 (61.3%) se representó con los parámetros proteínas totales y globulinas que comúnmente son utilizados para el diagnóstico de la hiperproteinemia, es por esto que se utilizó este concepto para representar el gradiente del CP1. Asimismo, se utilizó el término hemoconcentración para representar el gradiente del CP2 (35.3%) debido a que involucra los parámetros hematocrito, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media. Martínez-Silvestre (2011, 2013) comentó que la hiperproteinemia y la hemoconcentración se asocian con la deshidratación, principalmente ligada a las globulinas, lo cual coincide con los datos obtenidos en esta investigación, ya que en los registros de campo hay tortugas con indicios de deshidratación. De los 25 individuos que formaron parte del presente estudio, cinco presentaron hiperproteinemia y hemoconcentración, catorce individuos no presentaron ninguno de estos

padecimientos y los otros 6 individuos presentaban hiperproteinemia o hemoconcentración.

Con respecto a la mortalidad de tortugas reportadas por Salas-Westphal *et al.* (2013), Rivas-Lavin (2015) analizó los datos del 2013, donde indica que de 84 restos cadavéricos encontrados durante ese periodo en la Reserva de la Biosfera Mapimí, el 39% (n=32) mostró signos de depredación, mientras que en el resto (62%, n=52), no fue posible determinar la causa de muerte. Se podría suponer que estas muertes se debieron a causas naturales (edad avanzada) o a alguna enfermedad o padecimiento, como en este caso, posiblemente haya sido la deshidratación, ya que en comparación con la precipitación media histórica (258.2 mm, INEGI, 2015), en 2011 y 2012 en la región se registró una precipitación de apenas 122.5 y 180.1 mm, respectivamente. A pesar de que en 2015 se registró una precipitación de 379.6 mm (INEGI, 2016), durante la investigación (agosto-septiembre) se registraron 16 mm, únicamente; cuando en ambos meses, históricamente, se presentan aproximadamente 98 mm (INEGI, 2016). Por lo tanto, la evidencia de los signos físicos detectados en las tortugas y los valores de biometría y química sanguínea reportados conduce fuertemente a la hipótesis de que esta especie está expuesta a deshidratación, lo cual pudo haber incrementado la mortalidad. Longshore *et al.* (2003), argumentan que las tortugas del desierto son susceptibles a la deshidratación e inanición durante los periodos de sequía, y, por ende, a morir.

Según el Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (2007), las modificaciones climáticas actuales pueden impactar significativa y negativamente sobre la salud animal y provocar enfermedades. Esto es

especialmente cierto en el caso de las tortugas terrestres, las cuales regulan su temperatura corporal con el medio ambiente cercano, y por lo tanto, son particularmente sensibles a la variación climática experimentando consecuencias fisiológicas negativas (Huey y Berrigan, 2001). Esto puede estar generando padecimientos en las tortugas como respuesta al estrés experimentado, lo cual, a su vez, disminuye la capacidad de su sistema inmune para hacer frente a microorganismos emergentes o que si antes se mantenían como flora inocua, ahora pueden estar provocando infecciones (Lubroth, 2012). La consecuencia más grave de estos padecimientos es la disminución de las poblaciones y el descenso en la capacidad reproductiva, lo cual para especies endémicas y/o en peligro de extinción sería catastrófico.

IX. CONCLUSIONES

La hipótesis planteada en esta investigación de que *G. flavomarginatus* presenta distintos tipos de células se acepta, ya que se encontraron tres distintas células tales como eritrocitos, leucocitos (linfocitos, heterófilos, eosinófilos, monocitos y basófilos) y trombocitos. El análisis de varianza mostró diferencia significativa entre los tipos de células. Las células más grandes fueron los heterófilos y basófilos, seguidas por los eosinófilos y eritrocitos y por último los linfocitos.

La hipótesis de que los parámetros de biometría hemática varían entre individuos de acuerdo con el sexo, edad y localidad se rechaza ya que las medias de los parámetros de biometría hemática no mostraron diferencia significativa entre horas de actividad, sexo, edad y localidad. Sin embargo, en los parámetros de bioquímica sanguínea se observaron algunas variaciones entre horas de actividad, sexo, clases de edad y localidades. Se detectó que en promedio la concentración del ácido úrico fue mayor en la tarde, la colinesterasa más baja en las hembras, el cloro más alto en la localidad de Guadalupe y el potasio fue superior en los subadultos.

La hipótesis planteada de que las concentraciones de metales pesados varían entre los individuos de *G. flavomarginatus* de acuerdo con el sexo, edad y localidad se rechaza debido a que el análisis estadístico de concentraciones

de metales pesados (As, Cd y Pb) no presentó diferencias significativas entre sexos, clases de edad y localidades.

Esta investigación es una de los primeros esfuerzos para establecer el estado de salud actual de la tortuga del Bolsón (*G. flavomarginatus*). En general la información del presente estudio indica “buena salud” al comparar los valores de *G. flavomarginatus* con aquellos de *G. agassizii*, *G. berlandieri* y *G. polyphemus* sanas. Sin embargo, la tortuga del Bolsón debe seguir siendo monitoreada para tomar medidas en caso de encontrarse algún padecimiento que afecte su salud como en este caso la deshidratación y por ende su conservación.

Finalmente, esta investigación se sugiere que el cambio climático es una realidad y está afectando a las especies, en esta ocasión a la tortuga *G. flavomarginatus* que a pesar de ser una especie adaptada a la poca precipitación y por ende a la deshidratación, ya presenta repercusiones de los cambios climáticos presentados en el planeta en estos últimos años.

X. RECOMENDACIONES

La información recabada en esta investigación sobre hematología es la primera para la especie por lo cual proporciona las bases para trabajos futuros de *G. flavomarginatus* ya que establece parámetros sanguíneos. También esta investigación en conjunto con otros trabajos de bacteriología, parasitología y uso de hábitat permitirá dar un diagnóstico sobre el estado de salud de las tortugas, qué en caso de resultar algún padecimiento poblacional, se pueda actuar de forma inmediata para su conservación.

Es necesario llevar a cabo más investigaciones hematológicas y toxicológicas en *G. flavomarginatus*, y considerar la estacionalidad como una variable importante a analizar; además, de ser posible, aumentar el número de individuos para disminuir el margen de error en los parámetros.

En el presente estudio se implementaron técnicas nuevas, como por ejemplo la hidratación posterior a la toma de muestra en la cual la mayoría de las tortugas se observaron bebiendo agua de manera oral o cloacal; esta práctica de hidratación se consideró positiva para las tortugas ya que fue evidente el bienestar experimentado por ellas durante este lapso. Por lo tanto, este trabajo también puede ser tomado como referencia en cuanto a bienestar animal para futuras investigaciones en tortugas terrestres.

XI. LITERATURA CITADA

- Adest, G. A., G. Aguirre-León, D. J. Morafka y J. V. Jarchow. 1989. Bolsón tortoise (*Gopherus flavomarginatus*) conservation: I. Life history. *Vida Silvestre Neotropical* 2:7-13.
- Adkins, E., T. Driggers, G. W. Ferguson, et al. 2003. Ultraviolet light and reptiles, amphibians. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 13(4): 27-37.
- Alleman, A. R.; E. R. Jacobs, R. E. Raskin. 1992. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *American Journal of Veterinary Research*. 53(9):1645-1651.
- Aranda-Cirerol, N. 2001. "Alimentando al mundo, envenenando al planeta: eutrofización y calidad del agua." *Avance y Perspectiva* vol. 20: 293-303.
- Arikan H. y K. Çiçek. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-western Journal of Zoology* 10 (1): 190-209.
- Berry M. N., R. D. Mazzachi, M. Pejakovic, M. J. Peake. 1988. Enzymatic determination of sodium in serum. *Clinical Chemistry*. 34 (11):2295-98.
- Berry M. N., R. D. Mazzachi, M. Pejakovic, M. J. Peake. 1989. Enzymatic determination of potassium in serum. *Clinical Chemistry*. 35 (5):817-20.
- Bojanus, L. H. 1819. *Anatome Testudinis Europaeae*. Reprinted 1970 by the Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ohio, University.
- Burtis, A. et al. 1999. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd ed. AACC.

- Bush, B. M. 1999. Interpretación de los análisis de laboratorio para clínicos de pequeños animales. Barcelona. Ediciones S. 616 p.
- Busher, J. T. 1990. Serum albumin and globulin. En: Clinical Methods: The history, physical, and laboratory examinations, 3rd ed., Walker H. K., W. D. Hall y J. W. Hurst (eds.), Butterworths, Boston, USA.
- Cabrera-Carranza, C., D. M. Maldonado y C. L. Romero. 2004. "Impacto ambiental en sedimentos marinos superficiales por residuos líquidos industriales y urbanos Revista del Instituto de Investigación Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica 7, no.14: 15-22.- 15-22.
- Campbell, T. W. 1996. Clinical pathology. In Reptile medicine surgery, D. R. Mader (ed.). W B. Saunders Company Ltd, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 248–257.
- Campbell T. W. 2004. Hematology of lower vertebrates. In 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP), ACVP and ASVCP (Eds.), Middleton WI, USA. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 1214, pl 1104.
- Campbell, T. W., C. K. Ellis. 2007. Hematology if reptiles. En: Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology. 3ed. Iowa: Blackwell Publishing Co. p 51-91.
- Canfield P. J. 1998. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. Aust Vet J, 76: 793–800.

- Casarett y Doull. 2001. Casarett and Doull's Toxicology. Kansas City, Kansas, McGraw-Hill. 1176 p.
- Christopher, M. M., K. A. Nagy, I. Wallis, J. K. Klaassen, y K. H. Berry. 1997. Laboratory health profiles of desert tortoises in the Mojave Desert: A model for health status evaluation of chelonian populations. In Proceedings: Conservation, Restoration, and Management of Tortoises and Turtles—An International Conference, James Van Abbema (ed.). New York Turtle and Tortoise Society, New York, New York, pp. 76–82.
- Christopher, M. M., K. H. Berry, I. R. Wallis, K. A. Agy, B. T. Enen, And C. C. Peterson. 1999. Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the Mojave Desert. *Journal of Wildlife Diseases* 35: 212–238.
- Ciesla, B. 2007. Hematology in practice. F. A. David Company, Philadelphia. USA. 368pp.
- Clark, R. B. 2002. Marine Pollution. Ed. Oxford sexta edición 224 pp.
- CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). 2013. Anexo 2. Protocolo de Monitoreo No. 6: Monitoreo de la Tortuga del Bolsón (*Gopherus flavomarginatus*) en la Reserva de Biosfera Mapimí, en los Estados de Durango, Chihuahua y Coahuila. 112. <http://www.conanp.gob.mx/programas/pdf/Anexo%20%20Protocolo%206%20RB%20Mapimi.pdf>; última consulta: 16.X.2013.
- Cotton F. A., G. Wilkinson. 1988. Advanced Inorganic Chemistry. 5ª Ed. New York: Wiley and sons.

- Cox, R. A. y M. R. García-Palmieri. 1990. Cholesterol, triglycerides, and associated lipoproteins. En: Clinical Methods: The history, physical, and laboratory examinations, 3rd ed., Walker H. K., W. D. Hall y J. W. Hurst (eds.), Butterworths, Boston, USA.
- Daren-Riedle, J., R. C. Averill-Murray, C. L. Lutz y D. K. Bolen. 2008. Habitat use by Desert Tortoises (*Gopherus agassizii*) on alluvial fans in the Sonoran Desert, SouthCentral Arizona. *Copeia* 2008:414-420.
- Derickson, W. K. 1976. Lipid storage and utilization in reptiles. *Am. Zool.* 16:711.
- Devlin, T. M. 2004. *Bioquímica*, 4ª edición. Reverté, Barcelona. ISBN 84-291-7208-4.
- Diaz-Figueroa, O. 2005. Characterizing the health status of the Louisiana Gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). A thesis submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State southern university and agricultural and mechanical college, 1–109.
- Dickinson, V., J. Jarchow, y M. H. Trueblood,. 2002. Hematology and plasma biochemistry reference range values for free ranging desert tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases* 38:143-153.
- DuGuy R. 1970. Numbers of blood cells and their variation. In: Gans C., Parsons T.S. (Eds). *Biology of the Reptilia*. Vol. 3. New York: Academic Press, 93–109.
- Dutton, P. 1996. 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. Comerxe. Miami 09/12-14, 1995. Florida. U.S.A. Pp 14-24.
- Farell, E. C 1984a. . Calcium. Kaplan, A. et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1051-1255 and 418.
- Farell, E. C. 1984b. Phosphorus. Kaplan, A. et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1072-1074 and 418.
- Ferrer A. 2003. Intoxicación por metales. ANALES del Sistema Sanitario de Navarra 26:1 pp. 141-153.
- Franco, R. S. 1984. Hemoglobin. Kaplan, A. et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1294-1296 and 418.
- Frye, F. L. 1991. Infectious diseases. En: Frye, F.L. (ed.), Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry. Malabar, Florida: Krieger Publishing Co., 113-123.
- Frye, F. L. 1999. Spontaneous autoimmune pancreatitis and diabetes mellitus in a western pound turtle *Clemmys m. marmorata*. Proceedings of the Association of reptilian and amphibian veterinarians. pp. 103-106.
- Frye, F. L., F. R. Dutra, J. D. Carney y B. Johnson. 1976. Spontaneous diabetes mellitus in a turtle. Veterinary Medicine/Small Animal Clinician, pp. 935-939.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Publ. UNAM, México, D.F. 246 pp.
- García, G. I. y J. G. Martínez. 2004. Caracterización de la Reserva de la Biosfera Mapimí Mediante el uso de sistemas de información geográfica.

- Memorias del IV Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. Universidad Autónoma de Chihuahua-Universidad de Sonora. 369- 377 pp.
- Gendler, S. 1984. Uric acid. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1268-1273 and 425.
- Germano, D. J. 1993. Shell morphology of North American tortoises. American Midland Naturalist. 129(2): 319-335.
- Hammer, Ø., D. A. T. Harper, P. D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Harvey, J. 2001. Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals. Saunder. China.
- Homer B. L., K. H. Berry, Ross, F., C. Reggiardoand, E. R. Jacobson. 1996. Potentially toxic metals in liver and kidney of desert tortoise in California (abstract). In: Bartholomew, B. (ed.). Proceedings Desert Tortoise Council symposium, Las Vegas, Nevada.
- Huey, R. B. y D. Berrigan. 2001. Temperature, demography, and ectotherm fitness. Am. Nat. 158: 204–210.
- INEGI. 2013. Anuario estadístico y geográfico de Durango 2013. México/INEGI. 464 pp.
- INEGI. 2013. Conjunto de elevaciones mexicano versión 3.0. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/datosrelieve/continental/descarga.aspx>[Acceso el 20 de octubre de 2015]

- INEGI. 2015. Anuario estadístico y geográfico de Durango 2013. México/INEGI. 446 pp.
- INEGI. 2016. Anuario estadístico y geográfico de Durango 2013. México/INEGI. 503 pp.
- Irizarri-Rovira A. R. 2010. Hematology of reptiles. En Weiss, D. J. y K. J. Wardrop (Eds). Schalm's Veterinary Hematology. Willey-Blackwell. Iowa, USA. Pp.1004-1012.
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System). 2015. *Gopherus flavomarginatus* Legler, 1959. Taxonomic Serial No.: 202114. Consultado el 15 de Noviembre del 2015. Disponible en: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=202114
- Jackson, C. G. y R. C. Legendre. 1967. Blood serum cholesterol levels in turtles, comparative biochemistry and physiology. 20: 311-312.
- Jacobson E. R., J. M. Gaskin, M. B. Brown, R. K. Harris, C. H. Gardiner, J. L. LaPointe, P. H. Adams y C. Reggiardo 1991. Chronic upper respiratory tract disease of free-ranging desert tortoises (*Xerobates agassizzi*). Journal of wild life Diseases, 27(2), pp. 296-316.
- Jenkins-Perez. J. 2012. Hematologic evaluation of reptiles: A diagnostic mainstay. Veterinary Technician. 1-8.
- Jessop, T. S., J. M. Sumner, C. J. Limpus y J. M. Whittier. 2004. Interplay between plasma hormone profiles, sex and body condition in immature hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) subjected to a capture stress

- protocol. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology* 137: pp.197–204.
- Joyner P. H., A. A. Shreve, J. Spahr, A. L. Fountain, J. M. Sleeman. 2006. Phaeohyphomycosis in a free-living eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*). *J Wildl Dis*, 42 (4): 883–888.
- Kahn, F. P. Guyer .C. Mendonça. T. M. 2007. Handling, Blood Sampling, and Temporary Captivity Do Not Affect Plasma Corticosterone or Movement Patterns of Gopher Tortoises (*Gopherus Polyphemus*). pp, 88-102.
- Kaplan L. A. 1984a. Glucose. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*; 1032-1036.
- Kaplan, A. 1984b. Urea. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*; 1257-1260 and 437and 418.
- Kaplan, A. et al. 1984c. Triglycerides. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*; 437 and *Lipids* 1194-1206.
- Keogh J. P., Boyer L. V. Lead. 2001. En: Sullivan JB, Krieger GR, editors. *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins. Pp. 879- 889.
- King, M. 1984. Cholinesterase. Kaplan, A. et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*; 1108-1111.
- Knotek, Z., K. Hauptman, á. Z. Knotkov, á. P. Hájkov y ý. F. Tich. 2002. Renal disease haemogram and plasma biochemistry in green iguana. *Acta Veterinaria Brno* 71: 333–340.
- Knotkova Z., S. Mazanek, M. Hovorka, M. Sloboda, Z. Knotek. 2005. Haematology and plasma chemistry of Bornean River turtles suffering

- from shell necrosis and haemogregarine parasites. Case Report, 50(9): 421–426
- Koller, A. 1984. Total serum protein. Kaplan, A. et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1316-1324 y 418.
- Lauwerys R. 1990. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. 3^a ed. Paris: Masson. 170-191.
- Lawrence, K. 1987. Seasonal variation in blood biochemistry of long term captive Mediterranean tortoise (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*). Research in veterinary science. 43(3): 379-83.
- Legler, J. M. 1959. A new tortoise genus *Gopherus* from north central Mexico. University of Kansas Publications of the Museum of Natural History 11:335-343.
- Legler, J. y R. G. Webb. 1961. Remarks on a collection of bolson tortoises, *Gopherus flavomarginatus*. Herpetologica. 17(1): 26-37.
- Lemos, J. y H. Smith. 2007. Anfibios y reptiles del estado de Chihuahua, México. UNAM, CONABIO. México.
- Ley C. P. 2009. Determinación de metals pesados en tortugas marinas del Noreste de México (tesis de Maestria). Instituto Politécnico Nacional, centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Guasave Sin. 76 p.
- Li, T-H, C-C, Chang, I-J, Cheng y S-C, Lin. 2015. Development of a Summarized Health Index (SHI) for Use in Predicting Survival in Sea Turtles. PLoS ONE 10(3): e0120796. doi:10.1371/journal.

- Lotti M. 1995. Cholinesterase Inhibition: Complexities in Interpretation. *Clinical Chemistry*. 41:1814-8.
- Lovich, J. E. y R. Daniels. 2000. Environmental characteristics of desert tortoise (*Gopherus agassizii*) burrow locations in an altered industrial landscape. *Chelonian Conservation and Biology* 3:714-721.
- Lubroth, J. 2012. Climate change and animal health. En: Building resilience for adaptation to climate change in the agriculture sector, Proceedings of a Joint FAO/OECD Workshop; Meybeck, A., J. Lankoski, S. Redfern, N. Azzu y V. Gitz. Pp 63 – 70. Food and Agriculture Organization of the United Nations Organization for Economic Co-Operation and Development, Rome.
- Martínez-Silvestre A., S. Lavín, R. Cuenca. 2011. Hematología y citología sanguínea en reptiles. *Clínica veterinaria de pequeños animales revista oficial de AVEPA*. 31 (3): 131-141.
- Martínez- Silvestre A., S. Lavín, R. Cuenca. 2013. La bioquímica sanguínea en clínica de reptiles. *Consulta difus. Vet.* 2013 200: 31-40.
- Mayer, F. L., D. J. Versteeg, M. J. McKee, L. C. Folmar, R. L. Graney, D. C. McCume y B. A. Rattner. 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Proceedings of the Eighth Pellston Workshop, Keystone, Colorado, Lewis Publishers: 347 p.
- McArthur, S. 2001. Renal function in chelonians: dehydration and the stabilization of posthibernation hyperuricemia, hyperkalemia, and anuria in *Testudo spp.* *Proceedings A R A V*, 8: 87-96.

- McArthur, S., R. Wilkinson y J. Meyer. 2004. *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Blackwell Publishing Ltd. 579pp.
- McNeely M. 1984. Lipase. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*; 1130-1134, 892.
- Meiattini, F. et al. 1978. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. *Clin Chem*; 24 (12): 2161-2165.
- Miller W. G. 1984. Chloride. Kaplan, A. et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton* 1984; 1059-1062 and 417.
- Monroy, M., F. Díaz-Barriga, I. Razo. 2002. "Evaluación de la contaminación por arsenico y metales pesados (pb, cu, zn) y análisis de riesgo en salud en villa de la Paz-Matehuala, S.L.P."
- Morafka D. J., R. A. Yates, J. Jerchow, W. J. Roskopf, G. A. Adesf y G. A. Aguirre. 1986. Preliminary results of microbial and physiological monitoring of the Bolson tortoise, *Gopherus flavomarginatus*. In Rocek, Z. (ed) *Studies in Herpetology: Proceeding of the European Herpetological Meeting (3rd Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica)*, Praga, 1985. Pp. 657-662.
- Murphy, R. W., K. H. Berry, T. Edwards, A. E. Leviton, A. Lathrop y J. D. Riedle. 2011. The dazed and confused identity of Agassiz's land tortoise, *Gopherus agassizii* (Testudines, Testudinidae) with the description of a new species, and its consequences for conservation. *ZooKeys* 113: 39-71.
- Murray, R. L. 1984a. Creatinine. Kaplan, A. et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*; 1261-1266 and 418.

- Murray R. 1984b. Alanine aminotransferase. Kaplan, A. et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1088-1090.
- Murray, R. 1984c. Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1112-1116.
- Murray, R. K., P. J. Kennelly, V. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham y A. Weil. (2009). Harper's Illustrated Biochemistry (28th ed.). McGraw-Hill Medical.
- Naito H. K. 1984. Cholesterol. Kaplan, A. et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1194-11206 and 437.
- Nordberg G. 1998. Capítulo 63 Metales: Propiedades químicas y toxicidad. En Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo (vol. 1). Oficina internacional del Trabajo; Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene del Trabajo. Ginebra: OIT. ISBN: 84-7434-974-5.
- O'Connor, M. P., J. S. Grumbles, R. H. George, L. C. Zimmerman y J. R. Spotila. 1994. Potential hematologic and biochemical indicators of stress in free-ranging desert tortoises and captive tortoises exposed to a hydric stress gradient. Herpetological Monographs. 8: 5–26.
- Páez-Osuna, F. 1996. Fuentes de metales en la zona costera marina. Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. J. L. R.-G. A.V.Botello, J.A. Benitez, D. Zárate-Lomelí Universidad Autónoma de Campeche, EPOMEX Serie Científica: 297-308.
- Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático. 2007. Synthesis report: contribution of working groups I, II, and III to the fourth assessment report

- of the Intergovernmental Panel on Climate Change: Geneva, Switzerland, Intergovernmental Panel on Climate Change, 104 p.
- Pesce, A. 1984. Lactate dehydrogenase. Kaplan, A. et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1124-117, 438.
- Rafinesque, C. S. 1832. Description of two new genera of soft shell turtles of North America. Atlantic Journal and Friend of Knowledge, 1: 64-65.
- Raiti, P. y N. Haramati. 1997. Magnetic resonance imaging and computerized tomography of a gravid leopard tortoise (*Geochelone pardalis pardalis*) with metabolic bone disease. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 28(2): 189-197.
- Ramsay, E. C., and T. K. Dotson. 1995. Tissue and serum enzyme activities in the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). Am. J. Vet. Res. 56: 423–428.
- Romero, L. M. y J. M. Reed. 2005. Collecting baseline corticosterone samples in the field: Is under 3 min good enough? Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology 140:73–79.
- Rivas-Lavín A. 2015. Caracterización de factores asociados a la mortalidad de la Tortuga del Borsón (*Gopherus flavomarginatus*). Facultad de ciencias Biológicas. Universidad Juarez del Estado de Durango. Gómez palacio Durango. Pp.66.
- Roskopf, W. J. 1982. Normal hemogram and blood chemistry values for California desert tortoises. Veterinary Medicine/Small Animal Clinicians 1:85–87.

- Salakij Ch, J. Salakij, S. Apibal. 2002. Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in King cobras (*Ophiophagus hannah*). *Vet Clin Path.* 31: 116-126.
- Salas-Westphal, A. I., Castañeda-Gaytán, J. G., Carrillo-Moreno D. I., Ramos-Robles S. L, Torres-Olave, M. E. y M. C. García-De la Peña. 2012. Reporte técnico final: Monitoreo de la Tortuga del Bolsón (*Gopherus flavomarginatus*) en la Reserva de Biosfera Mapimí, en los Estados de Durango, Chihuahua y Coahuila. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Convenio No. CONANP/DRNySMO/RBMAPIMI/PROMOBI/01/2012.
- Salas-Westphal, A. I., Castañeda-Gaytán, J. G., Favela-Carrillo, S. S., Rivas-Lavín, A., Cueto-Mijares, M. A. y S. I. Valenzuela-Ceballos. 2013. Informe técnico final: Monitoreo de la Tortuga del Bolsón (*Gopherus flavomarginatus*) en la Reserva de la Biosfera Mapimí, Localidades: Ejido La Flor, P.P. Guadalupe, P.P. San Ignacio, Mpio. Mapimí, Durango. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Convenio No. PROMOBI/RNESMO/MAPIMI/01/2013.
- Salas-Westphal, A. I., Castañeda-Gaytán, J. G., Favela-Carrillo, S. S., Rivas-Lavín, A., Bustamante-Piña T. L., Cueto-Mijares, M. A y S. I. Valenzuela-Ceballos. 2014. Monitoreo de la Tortuga del Bolsón (*Gopherus flavomarginatus*) en la Reserva de la Biosfera Mapimí. Localidades: Terreno Nacional: “Los Pechos” Mpio. De Jiménez, Chihuahua; P.P. San Ignacio: “San Ignacio” Y “Pastizales” Mpio. Mapimí, Durango. Facultad

- de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango.
Convenio No. PROMOBI/RNEySMO/MAPIMI/01/2014.
- Schultz A. 1984. Uric acid. Kaplan, A. et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1261-1266 and 418.
- Selleri, P. y S. J. Hernandez-Divers. 2006. Renal diseases of reptiles. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice. 9: 161-174.
- SEMARNAT (Secretaría De Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial. 30 diciembre 2010. México, D.F.
- Silbergeld E. 1998. Capítulo 33 Toxicología. En Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo (vol. 1). Oficina internacional del Trabajo; Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene del Trabajo. Ginebra: OIT. ISBN: 84-7434-974-5.
- Silbergeld E. k., J. Schwartz, K. Mahaffey. 1988. Lead and osteoporosis: Mobilization of lead from bone in post-menopausal women. Environ Res. 47: 79-94.
- Skoch, E. J. y LaCognata. 1998. Recommended methods for the digestion and analysis of Heavy Metals in tissues Marine Mammals Research Lab. Cleveland. Oh.
- Soto-Jiménez, M., F. Páez-Osunab y A. C. Ruiz-Fernández (2003). "Geochemical evidences of the anthropogenic alteration of trace metal

- composition of the sediments of Chiricahueto marsh (SE Gulf of California)." *Environmental Pollution* 125: 423-432.
- Stacy N. I., A. R. Alleman y K. A. Sayler 2011. Diagnostic hematology of reptiles. *Clinics in Laboratory Medicine*. 31(1):87-108.
- Suleman, M. A., E. Wango, R. M. Sapolsky, H. Odongo y J. Hau. 2004. Physiologic manifestations of stress from capture and restraint of freeranging male African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 35:20–24.
- Tavares-Dias M., A. A. Oliveira-Junior, M. G. Silva, J. L. Marcon, J. F. M. Barcellos 2009. Comparative hematologic and biochemical analysis for giant turtles from the Amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Vet Arhiv*, 79: 601–610.
- Taylor, R. W. y E. R. Jacobson. 1982. Hematology and serum chemistry of the gopher tortoise, *Gopherus polyphemus*. *Comparative Biochemical Physiology* 72: 425–428.
- Teare, J. A. (ed.): 2013a, "Gopherus_agassizii_No_selection_by_gender__All_ag
es_combined_Conventional_American_units__2013_CD.html" in *ISIS Physiological Reference Intervals for Captive Wildlife: A CD-ROM Resource.*, International Species Information System, Eagan, MN.
- Teare, J. A. (ed.): 2013b, "Gopherus_berlandieri_No_selection_by_gender__All_ag
es_combined_Conventional_American_units__2013_CD.html" in *ISIS*

Physiological Reference Intervals for Captive Wildlife: A CD-ROM Resource., International Species Information System, Eagan, MN.

Teare, J. A. (ed.): 2013c,

"Gopherus_polyphemus_No_selection_by_gender__All_ag
es_combined_Conventional_American_units__2013_CD.html" in ISIS
Physiological Reference Intervals for Captive Wildlife: A CD-ROM
Resource., International Species Information System, Eagan, MN.

Thrall M. A., D. C. Baker, T. W. Cambell, D. DeNicola, M. J. Fettman, E. D.
Lassen, A. Rebar y G. Weiser. 2006. Veterinary hematology and clinical
chemistry. Blackwell Publishing.

Turgeon, M. L. 2012. Clinical Hematology: Theory & Procedures. 5th Ed. Wolters
Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. 628pp.

Van Kampen, E. J. et al. 1961. Standarization of hemoglobinometry Clin. Chim;
6: 438-544

Wagner, R. A. y R. Wetzel. 1999. Tissue and plasma enzyme activities in
juvenile green iguanas. American Journal of Veterinary Research; 60(2):
201-203.

Wenger, C. et al. 1984. Alkaline phosphatase. Kaplan, A. et al. Clin Chem The
C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1094-1098.

Wenger, C. et al. 1984. Alkaline phosphatase. Kaplan, A. et al. Clinical
Chemistry The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1094-1098.

Whittaker, M. et al. 1983. Comparison of a Commercially Available Assay
System with Two Reference Methods for the Determination of Plasma
Cholinesterase Variants. Clin. Chem; (29/10); 1746-1760.

- WHO. 1981. Lead. Environmental Health Criteria 3. Geneva: WHO, 1977
- Wilkinson R. 2004. Clinical Pathology. En: McArthur, S., R. Wilkinson & J. Meyer (Eds.), Medicine and surgery of tortoises and turtles. Blackwell Publishing Ltd. Oxford UK. Pp. 141-186.
- Work T. M., G. H. Balazs. 1999. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *J Wildl Dis*, 35(4): 804–807.
- Ying-Foo, A. et al. 1998. Amylase measurement with 2-chloro-4-nitrophenyl maltotrioside as substrate. *Clin Chim* 272; 137-147.
- Yip L, R. Dart, J. B. Sullivan Mercury. 2001. En: Sullivan JB, Krieger GR, editors. Clinical environmental health and toxic exposures. Philadelphia:
- Zar, J. H. 1999. Bioestadistical Analysis. Fourth edition. Prentice Hall. Upper Sandle River, New Yersey, USA. 663p.