



## Morfología de las células sanguíneas y perfil leucocitario de *Crotalus polystictus* (Cope 1865)

F.J. ÁLVAREZ MENDOZA\*, E.M. TAMEZ CANTÚ\*, D. LAZCANO\*\*, K.W. SETSER\*\*\*, E. MOCIÑO DELOYA\*\*\*

**E**l estudio hematológico en reptiles es un campo poco explorado a pesar de que se cuenta con la metodología necesaria, y se reconoce que la sangre es responsable de importantes funciones como la respuesta inmunológica, transporte de nutrientes, gases y desechos metabólicos para ser eliminados a través del hígado y riñón, entre otros.<sup>1</sup>

En reptiles, y en el resto de los vertebrados, resulta de vital importancia la correcta evaluación del hemograma, incluyendo el frotis de sangre, ya que la morfología de los eritrocitos y el porcentaje de los leucocitos pueden variar por estados fisiológicos (edad, sexo, periodo reproductivo, etc.), nutrición, parasitosis, enfermedades inflamatorias y otros cuadros patológicos,<sup>2,4</sup> o por factores ecológicos (altitud, hábitat, estación del año).<sup>5</sup>

El estudio de la hematología de reptiles se inicia a mediados del siglo XIX.<sup>6,7</sup> A partir de esta fecha han aparecido numerosas publicaciones sobre los tipos celulares específicos de la serie leucocitaria de especies de la clase *reptilia*, haciendo hincapié en sus relaciones filogenéticas, o en los valores cuantitativos de los índices hematológicos,<sup>8</sup> pero el perfil leucocitario es, además, una herramienta para medir el estrés en vertebrados, ya que los niveles de glucocorticoides incremen-

tan el número de neutrófilos, mientras disminuyen los linfocitos.<sup>9</sup>

Para el grupo de ofidios se han reportado los siguientes tipos de leucocitos: linfocitos, monocitos, azurófilos, heterófilos, eosinófilos y basófilos. Y se reporta a los linfocitos como célula predominante.<sup>8,10,14</sup>

Los eritrocitos en serpientes son nucleados y con forma oval, la longitud en su eje mayor es de 16 micras,<sup>10</sup> en lagartijas de 13.5 micras,<sup>15</sup> y en tortugas de 19.5 micras.<sup>16</sup>

La especie estudiada en el presente trabajo es la serpiente de cascabel hocico de puerco (*Crotalus polystictus*, Cope 1865), endémica de México; su distribución abarca la porción sur del altiplano mexicano, desde el oeste centro de Veracruz pasando por el centro de Puebla, Distrito Federal, norte de Michoacán, suroeste de Querétaro, sur de Guanajuato, centro y este de Jalisco y sur de Zacatecas, a una altitud de 1450 a 2600 msnm.<sup>17,18</sup> La Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal refiere a esta especie en el estatus de sujeta a protección especial.<sup>19</sup>

\* Laboratorio de Histología, FCB-UANL.

\*\* Laboratorio de Herpetología, FCB- UANL.

\*\*\*Departamento de Biología Animal y Ecología Campus Fuentenueva, 18071 Granada, España.

## Metodología

Las serpientes muestreadas son de una población herpetológica silvestre que se localiza en el municipio de Jocotitlán, a 67 Km noroeste de la capital del Estado de México. En esta región, *Crotalus polystictus* se asocia a la población de roedores que provienen de las poblaciones humanas cercanas y de los extensos maizales, que juegan un rol importante en el equilibrio ecológico, controlan las poblaciones de roedores que son problemáticas porque se alimentan de las cosechas y son un importante vector de enfermedades como la rabia. Se realizaron dos colectas, en junio de 2006, y se obtuvo un total de 20 ejemplares (diez hembras y diez machos), con una longitud promedio de 623 mm, y peso promedio de 230 gr. En agosto de 2007 se capturaron catorce serpientes (trece machos y una hembra), con una longitud promedio de 637 mm, y un peso promedio de 241 gr.

Se realizó una auscultación para verificar el estado de salud de los ejemplares, encontrándose sanos. Sólo se trabajó con hembras no preñadas.

Cada serpiente fue sedada para tomar la muestra de sangre, introduciéndolas dentro de un tubo de acrílico con tapa de goma removible a cada lado, se colocó algodón impregnado del anestésico Isoflurane USP, cerrándose ambos lados del tubo durante cinco minutos.

Las muestras sanguíneas de las serpientes fueron aproximadamente de 1%; conforme al peso del animal, se extrajo con una aguja calibre 23, por punción cardiaca en los primeros ocho ejemplares de 2006, y el resto de la vena coccigal.

El frotis de sangre se realizó conforme al método estándar, se fijó en alcohol metílico absoluto por cinco minutos. Se tiñeron con un kit de hemocolorante rápido (marca Hycel, Cat. 548) que da por resultado una tinción clásica del tipo Romanowsky. Las observaciones se hicieron con objetivo de inmersión (100 X) y ocular de 10X. El recuento diferencial se realizó con el método estándar.

El recuento indirecto de trombocitos se calculó sumando los encontrados en diez campos a 1000 aumentos, el valor se dividió entre 10 y se multiplicó por 21.000, y se reportaron los trombocitos por unidad en microlitros (U/ $\mu$ l). Las células se midieron con micrómetro ocular Zeiss.

La determinación del tamaño promedio de los eritrocitos se realizó de la siguiente forma: se sumó la longitud del eje mayor y del eje menor de la célula, y se obtuvo el promedio. Se realizaron cien observaciones por ejemplar.

A los datos obtenidos a partir de estos conteos y mediciones se les determinó la estadística descriptiva y el análisis de varianza correspondiente para cada célula, con el programa estadístico SPSS.

## Resultados

### Eritrocitos

La célula y el núcleo presentaron forma elipsoidal, el citoplasma es acidófilo, en menor proporción se presentaron células de forma esférica, y citoplasma basófilo. Ocasionalmente se observaron eritrocitos policromáticos, que se caracterizan por una cromatina nuclear más densa, el citoplasma presenta zonas tanto acidófilas como basófilas y menor tamaño (figura 1).

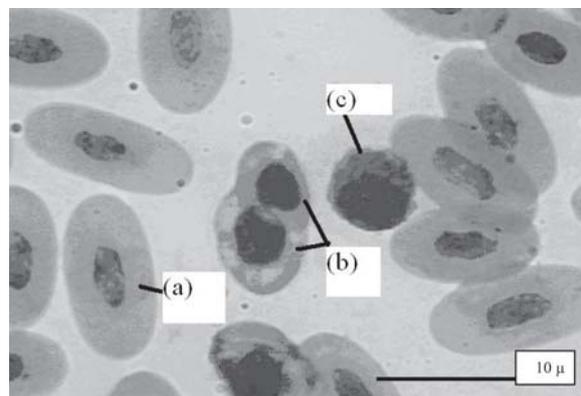


Fig.1. Eritrocitos maduros (a), eritrocitos inmaduros (b), y un azurófilo (c).

El tamaño de los eritrocitos promedio es de  $17.26 \times 9.76 \mu\text{m}$ , y el núcleo  $6.45 \times 3.73 \mu\text{m}$ . La estadística descriptiva mostró que la media de los eritrocitos para ambas colectas con base en la curva de Price-Jones fue de  $(13.51 \pm 1.06\text{mm})$ , mínimo  $5.50 \text{ mm}$  y máximo  $18.50\text{mm}$  y para el núcleo  $(5.09 \pm 0.58 \text{ mm})$ , mínimo  $3.0\text{mm}$  y máximo  $7.0 \text{ mm}$ . No hubo diferencia significativa entre una colecta y otra, ni entre hembras y machos.

### Leucocitos

Para la realización del recuento diferencial fue necesario definir el tipo de célula: linfocitos, heterófilos, eosinófilos, asófilos, monocitos y azurófilos.

### Linfocitos

Son células generalmente esféricas, algunas veces irregulares. Poseen un citoplasma débilmente basófilo, núcleo central o excéntrico fuertemente basófilo, abarca casi toda la célula, de márgenes bien definidos y de cromatina homogénea. Las medidas promedio de esta célula fueron de  $(8.88 \pm 1.85) \times (7.68 \pm 1.51) \mu\text{m}$  (figura 2)

### Monocitos

La forma de este tipo de célula varía de redonda a ameboidea, el citoplasma se tiñe azul-grisáceo y contiene vacuolas o finos gránulos eosinofílicos. Posee un núcleo que puede ser esférico, elipsoide o lobulado. Las medidas promedio para esta célula fueron  $(10.76 \pm 1.92) \times (8.28 \pm 1.30) \mu\text{m}$  (figura 3).

### Azurófilos

Son células de forma redonda a ameboidea, con citoplasma que toma un color azul-gris y posee finos gránulos que se tiñen fuertemente basófilos, éstos se denominan gránulos azurófilos. Las me-

didias promedio para esta célula fueron de  $(8.48 \pm 1.85) \times (6.84 \pm 0.98) \mu\text{m}$  (figura 4).

### Heterófilo

Son células débilmente acidófilas, generalmente esféricas, con gránulos fusiformes débilmente

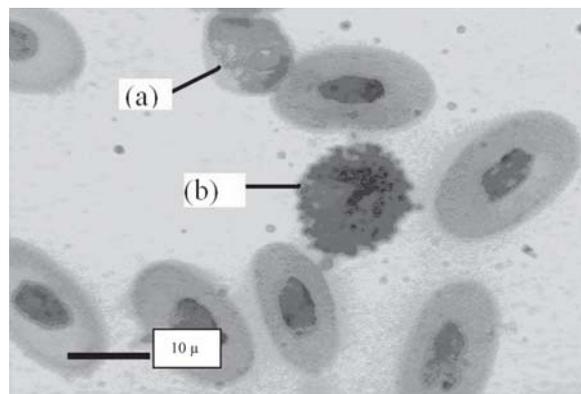


Fig.2. Linfocito (a), basófilo (b).

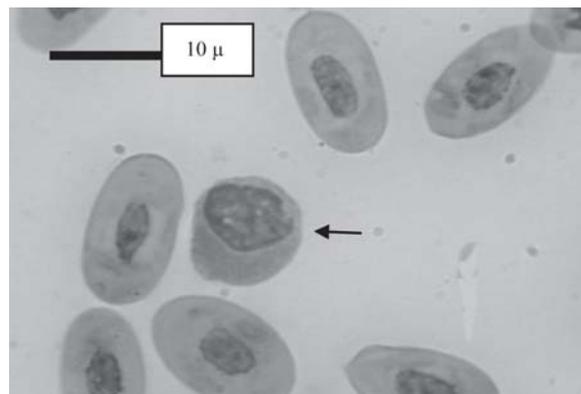


Fig.3. Monocito.

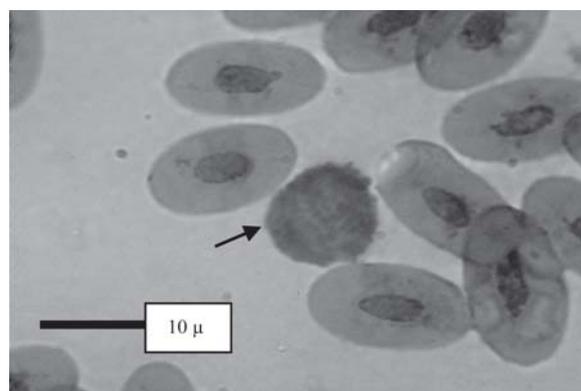


Fig.4. Azurófilo.

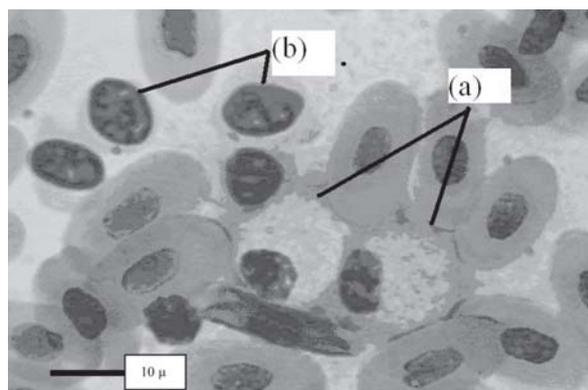


Fig.4. Heterófilos (a), trombocitos (b).

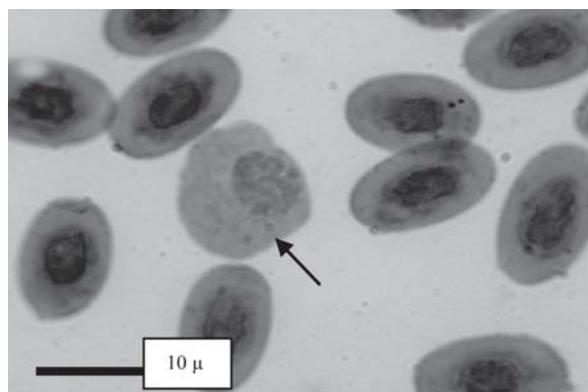


Fig.6. Eosinófilo.

Tabla I. Recuento diferencial de leucocitos de sangre de *Crotalus polystictus*. Considerando el total de individuos analizados de la colecta de 2006 y 2007 (n=33).

	Colecta 2006	Colecta 2007	Total
Célula	Media (± D.S.)	Media (± D.S.)	Media (± D.S.)
Linfocito	68.05 (5.34)	77 (6.42)	71.84 (7.28)
Monocito	8.94 (3.62)	7.92 (2.99)	8.51 (3.36)
Azurófilo	4.10 (2.15)	5.07 (3.02)	4.51 (2.56)
Heterófilo	8.10 (3.57)	5.57 (2.84)	7.03 (3.47)
Eosinófilo	9.68 (6.70)	5.14 (2.82)	7.75 (5.8)
Basófilo	0.94 (0.84)	0.35 (0.63)	0.69 (0.80)

eosinófilos. El citoplasma es transparente. Posee un núcleo típicamente redondo u ovalado en posición excéntrica, con cromatina densa. Las medidas promedio de esta célula fueron: largo  $13(\pm 2.17)\mu$ , y de ancho  $10.16(\pm 2.23)\mu$ , como se muestra en la figura 4a.

### Eosinófilo

Son células esféricas que poseen gránulos citoplasmáticos eosinofílicos, su núcleo generalmente esférico. Las medidas promedio de esta célula fueron:  $(10.2\pm 1.77) \times (8.24\pm 0.96)\mu\text{m}$ , (figura 6).

### Basófilo

Son células esféricas con gránulos color violeta que encubren el citoplasma, el núcleo se distingue por su gran tamaño y el color púrpura de la tinción. Las medidas promedio de esta célula fueron  $(10.78\pm 2.84) \times (8.34\pm 1.43)\mu\text{m}$ , (figura 2b).

### Trombocitos

Son células de forma elíptica a fusiforme con un citoplasma débilmente basófilo, un núcleo central de color violeta, por lo general se encuentran agrupados. Las medidas promedio de esta célula fueron: largo  $10.78(\pm 2.84)$  y de ancho  $8.34(\pm 1.43)\mu$ , como se observa en la figura 4b.

Los datos del recuento diferencial de leucocitos se reportan en la tabla I, la cual muestra la predominancia de linfocitos con una media de 72%, mientras que los basófilos se encuentran en menor proporción, siendo menor de 1% (tabla I).

### Discusión

La descripción de las células blancas realizadas en este trabajo resultaron congruentes con la morfología detallada en la bibliografía para distintas especies de reptiles,<sup>17</sup> pero las dimensiones

encontradas para otras especies de serpientes<sup>11,12</sup> fueron superiores a las de *Crotalus polystictus*. El conteo diferencial de leucocitos mostró que el tipo de célula más abundante son los linfocitos, seguido de monocitos, eosinófilos, heterófilos, azurófilos y basófilos para ambas colectas. Estos resultados se encontraron en el mismo orden, pero en diferente proporción para otros tipos de serpientes que tienen una estrecha relación filogenética porque pertenecen a la misma familia.<sup>8</sup> Sin embargo, para otras especies de serpientes los linfocitos se encontraron dentro del rango reportado,<sup>4,10,12</sup> y fueron mayores para la serpiente acuática.<sup>11</sup>

De igual manera, se compararon los valores entre cada colecta utilizando la Distribución z; se observó que el porcentaje de linfocitos, monocitos y azurófilos se conservó entre un año y otro, pero los valores para heterófilos, eosinófilos y basófilos fueron significativamente distintos, siendo mayores para la colecta de 2006.

Se realizó una comparación por sexo para la colecta 2006, y se encontró una diferencia significativa para eosinófilos y basófilos. La colecta 2007 no se realizó debido a que sólo se capturó una hembra.

El recuento de trombocitos para ambas colectas fue de  $34,809.09 \pm 16,215.88$  U/ $\mu$ l; asimismo, se realizaron comparaciones de medias entre colectas y por género. No se observó diferencia significativa entre colectas, y tampoco entre machos de ambas colectas, pero sí se observó diferencia significativa entre hembras y machos de la colecta 2006, siendo mayor para machos, lo cual concuerda con el análisis realizado para *Iguana iguana*.<sup>20</sup>

## Conclusión

Se reportaron por primera vez el perfil leucocitario y las características morfológicas y cuantitativas de eritrocitos y trombocitos para la serpiente de cascabel hocico de puerco *Crotalus polystictus*.

El tamaño de los glóbulos rojos en muestras de *Crotalus polystictus* reveló diferencia significativa entre machos y hembras de la colecta de 2006.

La descripción morfológica de los linfocitos resultó congruente con la descrita por diversos autores para reptiles.

En el recuento diferencial sólo se encontró diferencia significativa en el porcentaje de linfocitos, siendo mayores los de *Crotalus polystictus* en comparación a otras especies. También se observó una diferencia significativa para los valores de heterófilos, eosinófilos y basófilos de un año a otro. A su vez se mostró diferencia significativa de eosinófilos y basófilos entre machos de ambas colectas. En cuanto a las comparaciones hechas entre machos y hembras de la colecta 2006, se encontró diferencia significativa en los valores de eosinófilos y basófilos, siendo mayor para los machos.

El recuento total de trombocitos para *Crotalus polystictus* se encontró dentro de los rangos reportados para otros reptiles, pero fue significativamente mayor para machos de la colecta 2006, en comparación a las hembras.

Estos valores serán de gran utilidad para establecer rangos de referencia, y así evaluar el estado de salud, estrés, desnutrición y otras condiciones ambientales que impacten en forma negativa a esta especie, para preservarla y hacer un mejor manejo de la misma.

## Resumen

Se llevó a cabo la morfometría de las células sanguíneas de la serpiente de cascabel hocico de puerco *Crotalus polystictus*, especie de importancia ecológica, y endémica de México. Se realizaron dos colectas en verano del 2006 y 2007, capturando un total de 34 ejemplares. Se analizó el tamaño de los eritrocitos, el conteo diferencial y el número de trombocitos (U/ $\mu$ l). Los leucocitos reportados fueron: linfocitos (72%), monocitos (8%), heterofilos (7%), azurófilos (4%), eosinófi-

los (8%), y basófilos (<1%). Se encontró que no había diferencia significativa del tamaño de los eritrocitos entre colectas (muestras) o por sexo. Pero se encontró diferencia significativa para eosinófilos, basófilos y heterófilos.

**Palabras clave:** *Crotalus polystictus*, Eritrocitos, Leucocitos, Trombocitos.

## Abstract

We conducted a morphometric analysis of blood cells from the Mexican Lance-headed Rattlesnake *Crotalus polystictus*, an important ecological and endemic species of Mexico. Two collections were made in the summer of 2006 and 2007, capturing a total of 34 specimens. We analyzed the size of erythrocytes, differential counting, and the number of thrombocytes (U /  $\mu$ l). Leukocytes were reported as: lymphocytes (72%), monocytes (8%), heterophils (7%), azurophils (4%), eosinophils (8%), and basophils (<1%). We found no significant differences in the size of erythrocytes between samples or sex; but were significantly different for eosinophils, basophils, and heterophils.

**Keywords:** *Crotalus polystictus*, Erythrocytes, Leukocytes, Thrombocytes.

## Referencias

1. Troiano, J.C. (2005). Hematología en reptiles. Reptilia: revista especializada en reptiles, anfibios y artrópodos, ISSN 1135-5832, N°. 51: 79-82.
2. Reavill, D. (2005). Selected Topics In: Reptile Clinical Pathology. Lecture given at the University of California, Davis Avian/Exotic Animal Symposium, California. 1994.
3. Thrall M.A., D. Baker, R. Alan, T. Campbell, and E. Duane (2004). Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams and Wilkins.
4. Mussart N.B., N.N. Barboza, S.A. Fioranelli, G.A. Koza, W.S. Prado, and J.A. Coppo (2006). Age, sex, year season and handling system modif. The leukocytal parameters from captive Caiman latirostris and Caiman yacare (Crocodylia: Alligatoridae). Rev. Vet. 17(1): 3-10.
5. Acuña, M.L. (1975). Hematología normal de *Iguana iguana* (Linne, 1758) Aspectos citomorfológicos y comparaciones intraespecíficas. Caribbean J. of Science 15: 1-2.
6. Mandl, L. (1839). Note sur les globules sanguine de protee et des crocodiliens. Am. Sci. Nat., 12 (2): 289-291.
7. Gulliver, G. (1840). On the blood corpuscles of Crocodilia. Proc. Zool. Sot. Lend., 8: 131-133.
8. Troiano J.C., J.C. Vidal, E.F. Gould, J. Heker, J. Gould, A.U. Vogt, C. Simoncini, E. Amantini, and A. De Roodt (2000). Hematological values of some Bothrops species (Ophidia-Crotalidae) in captivity. Journal of Venomous Animals and Toxins. 6 (2).
9. Davis A.K. and J.C. Maerz (2008). Comparison of Hematological Stress Indicators in Recently Captured And Captive Paedomorphic Mole Salamanders *Ambystoma talpoideum*. Copeia. 3: 613-617.
10. Salakij C., J. Salakij, S. Apibal, N. Narkkong, L. Chanhome, N. Rochanapant (2002). Hematology, Morphology, Cytochemical Staining, and Ultrastructural Characteristics of blood cells in King Cobras (*Ophiophagus hannah*). Veterinary Clinical Pathology. 31(3):16-126.
11. Salakij, C., J. Salakij, P. Suthunmapinunta, L. Chanhome. (2002). Hematology, Morphology and Ultrastructure of blood cells and Blood Parasites from puff-faced Watersnakes (*Homalopsis buccata*). Kasetsart J. Nat. Scie. 36:35-43.
12. Salakij, C., J. Salakij, L. Chanhome, (2002). Comparative Hematology, Morphology and

- Ultrastructure of blood cells in Monocellate Cobra (*Naja kaouthia*), Siamese Spitting Cobra (*Naja siamensis*) and Golden Spitting Cobra (*Naja sumatrana*). *Kasetsart J..Nat. Scie.* 36: 291-300.
13. Salakij, C., J. Salakij, N. Narkkong (2003). Hematology and Ultrastructure of Blood Cells in Banded krait (*Bungarus fasciatus*) *Journal of Electron Microscopy Society of Thailand.* 17(1):55-60.
  14. Allender, M.C., M.A. Mitchell, C.A. Phillips, K. Gruszynski, V. R. Beasley (2006). Hematology, Plasma Biochemistry and antibodies to select viruses in wild caught eastern massasauga rattlesnakes (*Sistrurus catenatus catenatus*) from Illinois. *Journal of Wildlife Diseases* 42(1):107-114.
  15. Sevick M., I.H. Ugurtas, H.S. Yildirimhan (2000). Erythrocyte Measurements in *Lacerta rudis* (Reptilia, Lacertidae). *Turk Journal of Zoology.* 24: 207-209.
  16. Knotkova Z., J. Doubek, Z. Knotek, P. Hajkova (2002). Blood Cell Morphology and Plasma Biochemistry in Russian Tortoise (*Agrionemys horsfieldi*). *Acta Vet.* 71 :191-198.
  17. Campbell, J.A. and W.W Lamar. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere.* 2: 475.
  18. McDiarmid R.W., J.A. Campbell, T. Touré (1999). *Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference,* Herpetologists League. 1: 511.
  19. Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal (2004). Programa de Manejo, Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco, propuesta 2004: 9.
  20. Novoa-Fajardo D., I. Benítez-Tumay, J. R. Corredor-Matus, J. Rodríguez-Pulido (2008). Hallazgos hematológicos en iguana verde suramericana (*Iguana iguana*), de Ejemplares ubicados en zona urbana y suburbana de Villavicencio (Meta). *Revista Oriniquia* 12(1):67-80

*Recibido: 26 de febrero de 2010*

*Aceptado: 24 de noviembre de 2010*