



# Consideraciones para la obtención de sangre en tortugas: sitios de venopunción y anticoagulantes

Cristian C. Rodríguez-Almonacid<sup>1\*</sup> ; Carolina M. Vargas-León<sup>2</sup> ;  
Carlos A. Moreno-Torres<sup>3</sup> ; Nubia E. Matta C<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Grupo de Estudio Relación Parásito-Hospedero. 111321 Bogotá, Colombia

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup>Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento de Salud Animal. Bogotá D.C., Colombia.

\*Correspondence: [crrodrigueza@unal.edu.co](mailto:crrodrigueza@unal.edu.co)

Recibido: Marzo 2021; Aceptado: Diciembre 2021; Publicado: Mayo 2022.

## RESUMEN

**Objetivo.** Evaluar diferentes puntos de venopunción y el uso de dos anticoagulantes para la obtención de muestras sanguíneas en tortugas. **Materiales y métodos.** Se muestrearon 82 individuos de las especies *Trachemys callirostris*, *Podocnemis unifilis* y *Chelonoidis carbonaria*. Los puntos de venopunción evaluados fueron: seno venoso subcaparacial, vena coccígea dorsal y vena yugular; y se compararon dos anticoagulantes: heparina de sodio y EDTA. **Resultados.** A partir de la vena yugular se obtuvieron muestras sanguíneas sin hemodilución y en un volumen suficiente para realizar análisis hematológicos. Por el contrario, a partir de los otros sitios de venopunción se obtuvieron mayoritariamente muestras hemodiluidas. Las muestras de sangre obtenidas a partir de *C. carbonaria* se hemolizaron tras su almacenamiento en EDTA (40 µl/ml de sangre), lo que no se evidenció al utilizar heparina de sodio (100 UI/ml de sangre) como anticoagulante. **Conclusiones.** La vena yugular es el sitio de venopunción más recomendable para la extracción de muestras sanguíneas con fines clínicos. La heparina de sodio fue el anticoagulante de elección para almacenar dichas muestras al no inducir hemólisis en estas.

**Palabras clave:** Anticoagulante; Química sanguínea; Hematología; *Chelonoidis carbonaria*; *Podocnemis unifilis*; *Trachemys callirostris* (Fuente: CAB).

## ABSTRACT

**Objective.** Evaluate different venipuncture points and the use of two anticoagulants to obtain blood samples in turtles. **Materials and methods.** Eighty-two turtles of the species *Trachemys callirostris*, *Podocnemis unifilis* and *Chelonoidis carbonaria* were sampled. Three venipuncture

### Como citar (Vancouver).

Rodríguez-Almonacid CC, Vargas-León CM, Moreno-Torres CA, Matta NE. Consideraciones para la obtención de sangre en tortugas: sitios de venopunción y anticoagulantes. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(2):e2256. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2256>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

points were evaluated: subcarapacial venous sinus, dorsal coccygeal vein, and jugular vein. Two anticoagulants were tested: sodium heparin and EDTA. **Results.** The jugular vein was the best place to practice venipuncture as the blood samples obtained were free of hemodilution and enough volume to carry out a blood profile. In contrast, samples from the other venipuncture points were usually hemodiluted. Blood samples from *C. carbonaria* stored with EDTA (40 µl/ml of blood) showed haemolysis, which was not observed using sodium heparin (100 UI/ml of blood) as anticoagulant. **Conclusions.** The jugular vein is the most recommended venipuncture site for the extraction of blood samples for clinical purposes. Sodium heparin was the best anticoagulant to store blood samples due to the fact that it does not induce haemolysis in any sample.

**Keywords:** Anticoagulants; Blood chemistry; Hematology; *Chelonoidis carbonaria*; *Podocnemis unifilis*; *Trachemys callirostris* (Source: CAB).

## INTRODUCCIÓN

Las tortugas, junto con los crocodilios, son los grupos de reptiles más amenazados en Colombia, ya que algunas especies son usadas como fuente de alimento, mascotas o para aprovechamiento de sus pieles (1); esto sumado al impacto por la pérdida de hábitat, contaminación ambiental, tráfico ilegal y enfermedades infecciosas que afectan generalmente a los reptiles, contribuyendo a la drástica disminución de sus poblaciones (2). De acuerdo con The Reptile Database, Colombia posee 36 especies de tortugas, de las cuales el 94.4% poseen hábitos acuáticos. Para 2015, el 37% de las especies de tortugas en Colombia se encontraban bajo alguna categoría de amenaza y, desafortunadamente, varias especies no se encuentran catalogadas (1).

Dada a la alta diversidad de tortugas presentes en Colombia y a la amenaza constante del tráfico ilegal, es común encontrar un gran número de estos especímenes resguardados en centros de rescate de fauna silvestre. La Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) de la Universidad Nacional de Colombia realiza la valoración clínica y, de ser necesario, el respectivo tratamiento. La valoración médica de estos reptiles se realiza a través de exámenes físicos, imagenología, pruebas hematológicas y de bioquímica sanguínea (3). Idealmente se debe contar con valores de referencia para los especímenes analizados; sin embargo, existe una carencia de rangos y valores normales para gran parte de las especies de tortugas en Colombia, pues la única especie en este país que cuenta con parámetros hematológicos de referencia es *Trachemys callirostris* (4,5); mientras que a nivel de neotrópico, sólo se cuenta con reportes hematológicos para

tortugas de las especies *Podocnemis expansa*, *Phrynops geoffroanus*, *Eretmochelys imbricata*, *Chelonoidis chathamensis* y *C. denticulata* (6,7,8,9,10,11,12).

A nivel clínico, la calidad de la muestra sanguínea se convierte en un factor determinante para obtener información confiable a partir de las pruebas de laboratorio; sin embargo, obtener muestras sanguíneas en tortugas puede ser complicado, debido a variaciones anatómicas entre especies, la presencia de estructuras dérmicas de protección como caparazón y escamas, la dificultad de manipulación debido a la fuerza de los individuos, la difícil localización y visualización de venas y senos venosos y la proximidad de los sitios de venopunción a diferentes vasos linfáticos (13). La hemodilución con linfa es uno de los obstáculos más frecuentes cuando se trata de obtener muestras para procesamiento en el laboratorio clínico (14); así mismo, otro factor extrínseco que afecta la calidad de la muestra es el anticoagulante utilizado (15).

Con base en lo anterior, el presente artículo tiene como objetivo evaluar diversos puntos de venopunción, así como el anticoagulante adecuado para la extracción y conservación de muestras sanguíneas de quelonios de las especies *Podocnemis unifilis*, *Trachemys callirostris* y *Chelonoidis carbonaria*; de tal forma que permitan un óptimo análisis de parámetros hematológicos y de química sanguínea.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aspectos éticos.** La Facultad de Ciencias, a través del comité de ética, estudió y avaló el presente estudio mediante el acta 03-2019 del 01 de abril del 2019 y el muestreo se realizó

bajo la supervisión de médicos veterinarios especialistas en el área, garantizando la seguridad de los individuos muestreados. Adicionalmente, esta investigación se llevó a cabo siguiendo la ley 84 de 1989 del congreso de la república de Colombia, por la cual se adopta el estatuto nacional para la protección animal; de igual forma, se siguieron los lineamientos estipulados en la resolución 8430 de 1993 del ministerio de salud, la cual regula la investigación biomédica en donde se ven involucrados animales.

**Muestra.** Se efectuó un muestreo a conveniencia de tortugas de las especies *Podocnemis unifilis* (N=8), *Trachemys callirostris* (N=43) y *Chelonoidis carbonaria* (N=31). El tamaño muestral y las especies elegidas estuvieron dadas por la disponibilidad de individuos presentes en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS), adscrita a la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (2.555 msnm, temperatura promedio: 14°C). Las tortugas se encontraban acondicionadas a una temperatura ambiental artificial promedio de 30°C.

**Evaluación de los puntos de venopunción.** La venopunción fue realizada siguiendo las recomendaciones propuestas por Naguib (13) y Perpiñan (16) para la toma de muestras sanguíneas de tortugas. En todos los casos, se usaron jeringas sin anticoagulante acopladas a agujas de calibre 25 y de una pulgada de longitud. Cada uno de los puntos fue previamente desinfectado usando Clorhexidina. El volumen de sangre tomado se calculó a partir del peso del individuo y no superó el 1% de la relación peso/volumen (p/v). Una vez obtenida la muestra, se aplicó presión moderada a los sitios de venopunción para evitar la formación de hematomas. Los puntos de venopunción evaluados se exponen a continuación:

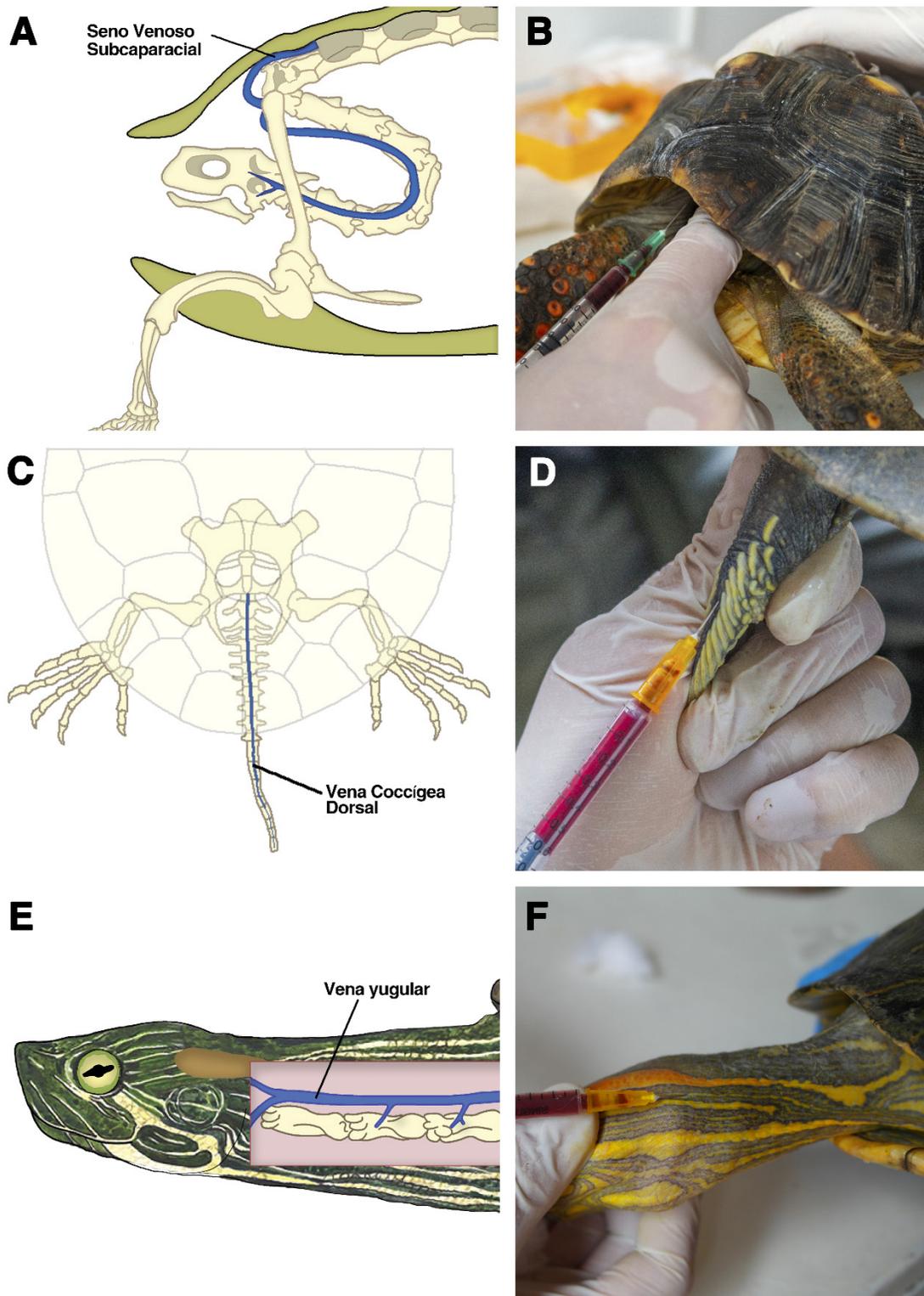
(A) *El seno venoso subcaparacial* es un punto de convergencia de numerosos vasos, éste se ubica sobre la línea media del animal en el punto en el cual la octava vértebra cervical se une con el caparazón (17) (Figura 1A). Para acceder a este punto, se puede inducir la retracción de la cabeza del individuo en el caparazón o extender la misma y cuidadosamente doblarla hacia abajo (17). La aguja debe ser introducida sobre la línea media dorsal del cuello cerca del límite entre la piel y el caparazón en ángulo caudodorsal (Figura 1B). Si la vértebra es tocada, la aguja debe moverse ligeramente en dirección craneal (16).

(B) *La vena coccígea dorsal* se encuentra en la línea media de la cola del animal (Figura 1C), por lo que se debe efectuar la punción sobre este plano inclinando la aguja entre 45° y 60° (17). Dado que estas venas se encuentran adyacentes a la vértebra, se recomienda introducir la aguja hasta tocar la vértebra y luego retirarla lentamente, ejerciendo presión negativa en la jeringa hasta lograr extraer sangre (Figura 1D) (18).

(C) *La vena yugular* se encuentra recorriendo el cuello del animal de forma antero-posterior, a la altura del tímpano (Figura 1E) (19). La aguja debe insertarse superficialmente, paralela al cuello en dirección caudal (Figura 1F) (16).

**Almacenamiento de muestras sanguíneas.** Una vez tomada la sangre, esta fue depositada en viales plásticos que contenían el anticoagulante. Se probaron dos anticoagulantes correspondientes a Heparina de sodio (Liquemine®, Roche), a una concentración de 100 UI/ml de sangre (20), y Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Químicos Albor), a una concentración de 40 µl/ml de sangre, recomendada por la casa comercial. La sangre fue conservada a 4°C previo a su análisis hematológico. Las muestras sanguíneas fueron procesadas en un periodo máximo de 18 horas. La evaluación del anticoagulante fue realizada a través de la observación macroscópica de la sangre y de la determinación de la integridad de las células sanguíneas a nivel microscópico, al observarse extendidos sanguíneos de muestras almacenadas en ambos anticoagulantes transcurridas 12 horas a partir del muestreo.

**Análisis hematológico.** Con el fin de evaluar la influencia del sitio de venopunción en la calidad de la muestra tomada, 15 ejemplares de *Trachemys callirostris* fueron muestreados a partir de los tres puntos evaluados. Se analizaron tres variables hematológicas: hematocrito, hemoglobina y recuento de glóbulos rojos (RGR). El porcentaje de hematocrito se determinó mediante centrifugación de la sangre en un microhematocrito a 12.000 g durante 5 minutos. Por otro lado, la cuantificación de hemoglobina se realizó por medio de espectrofotometría usando el equipo BTS-350 (BioSystem S.A., Barcelona - España) y el recuento de glóbulos rojos se efectuó de forma manual en cámara de Neubauer utilizando la solución de Natt-Herrick a una dilución 1:100 (21).



**Figura 1.** Sitios de venopunción evaluados. A. Localización del seno venoso subcaparacial, B. Extracción de sangre a partir del seno venoso subcaparacial en tortuga de la especie *Chelonoidis carbonaria*. C. Localización de la vena coccígea dorsal, D. Extracción de sangre a partir de la vena coccígea dorsal en tortuga de la especie *Podocnemis unifilis*, E. Localización de la vena yugular (Modificado de Innis & Knotek (17)), F. Extracción de sangre a partir de la vena yugular en la tortuga de la especie *Trachemys callirostris*.

**Análisis estadístico.** El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó usando el paquete R commander versión 2.6-2 del software R versión 4.0.3 (2020). Se implementó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y posteriormente se efectuó un análisis de varianzas mediante el uso de ANOVA de un factor, tomando una significancia del 95%, para la comparación de las variables dependientes: hematocrito, hemoglobina y RGR, en los diferentes grupos que conformaban la variable independiente sitio de punción.

## RESULTADOS

### Evaluación de los puntos de venopunción:

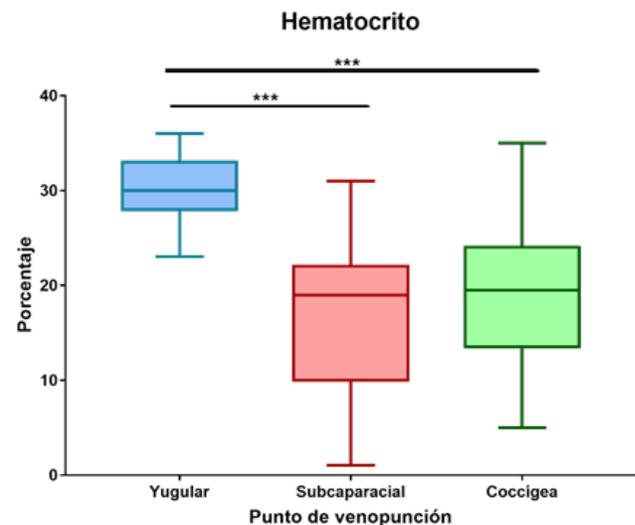
Los sitios de venopunción evaluados mostraron las siguientes características:

**Seno venoso subcaparacial.** Punto de fácil acceso para la obtención de sangre, especialmente en individuos muy activos donde la manipulación de extremidades o de la cabeza se dificultaba. No obstante, dada su cercanía a vasos linfáticos se incrementó la probabilidad de hemodilución con linfa; esto fue evidente macroscópicamente, ya que las muestras hemodiluidas presentaron una coloración rojiza pálida y clara, a diferencia de la sangre sin hemodilución, la cual presentó un color rojo oscuro. Dicha dilución conllevó a que las muestras no fueran idóneas para análisis hematológicos o de química sanguínea.

**Vena coccígea dorsal.** Este punto de muestreo permitió extraer sangre de diversos individuos; sin embargo, su manipulación es algo compleja dada la movilidad y fuerza que poseen en esta extremidad. Adicionalmente, cerca del 50% de las muestras analizadas a lo largo del estudio se encontraron hemodiluidas en alguna proporción (Figura 2).

**Vena yugular.** La accesibilidad a esta vena fue compleja a causa de la naturaleza retráctil de la cabeza de las tortugas, especialmente aquellas pertenecientes al suborden Cryptodira, y la gran fuerza que ejercen para ello. A pesar de esto, una vez se tenía el control sobre la cabeza, la vena era fácilmente observable y palpable. Las muestras sanguíneas obtenidas a partir de este punto fueron de buena calidad y en raras ocasiones la sangre se diluyó con linfa, lo cual pudo ser evidenciado tras el RGR y el análisis de concentración de hemoglobina, donde los valores obtenidos a partir de este punto de

venopunción fueron significativamente mayores que los de los demás sitios (Figuras 3 y 4). La vena yugular mostró gran flujo sanguíneo y fácil localización, esto favoreció la formación de hematomas, por lo que, para evitar su aparición, fue necesario aplicar presión moderada en el punto de punción durante aproximadamente dos minutos posteriores a la extracción de la sangre. Algunas de las ventajas y desventajas observadas en cada sitio de venopunción se resumen en la tabla 1.



**Figura 2.** Porcentaje de hematocrito de las muestras obtenidas de cada sitio de venopunción en *T. callirostris*. \*\*\*:  $p < 0.001$

Tras efectuar la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, se evidenció que los datos se comportan de manera normal ( $p > 0.05$ ), por tanto, se implementó un ANOVA para contrastar el comportamiento de las variables en los diferentes puntos de muestreo. La prueba ANOVA mostró una diferencia significativa entre los sitios de punción evaluados ( $p < 0.01$ ). Al efectuar la prueba *post-hoc* se observó que los resultados de laboratorio obtenidos a partir de la vena yugular difieren tanto de seno subcaparacial como de vena coccígea en las tres variables analizadas (Figuras 2, 3 y 4), a excepción de la hemoglobina, en donde no se observó diferencias significativas entre las muestras tomadas a partir de la vena yugular y el seno subcaparacial (Figura 3). Adicionalmente, las Figuras 2, 3 y 4 muestran cómo los resultados obtenidos a partir del seno venoso subcaparacial (Ht:  $16.6\% \pm 8.8$ ; Hb:  $5.6 \text{ mg/dL} \pm 2.2$ ; RGR:  $3.96 \times 10^5 \pm 2.0$ ) y vena coccígea (Ht:  $18.6\% \pm 8$ ; Hb:  $4.4 \text{ mg/dL} \pm 2$ ; RGR:  $4.42 \times 10^5 \pm 1.9$ ) tienden a ser menores que los obtenidos a partir de la vena yugular (Ht:  $30\% \pm 3.6$ ; Hb:  $7.5 \text{ mg/dL} \pm 2.7$ ; RGR:  $6.97 \times 10^5 \pm 0.9$ ).

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas de los sitios de venopunción evaluados en las tres especies de tortugas.

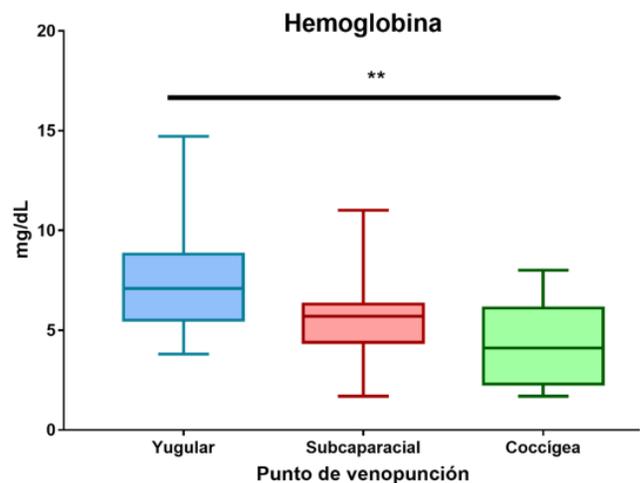
Sitio de venopunción	Especie		
	<i>Trachemys callirostris</i>	<i>Podocnemis unifilis</i>	<i>Chelonoidis carbonaria</i>
Vena yugular	<b>Ventajas</b> Vena fácilmente observable. Nula hemodilución	<b>Ventajas</b> Buen volumen de sangre. Nula hemodilución.	<b>Ventajas</b> Piel del cuello delgada. Vena fácilmente observable. Nula hemodilución
	<b>Desventajas</b> Difícil manipulación de la cabeza (Cryptodira) Es una especie agresiva.	<b>Desventajas</b> Posee una piel gruesa, lo que dificulta la visualización de la vena.	<b>Desventajas</b> Difícil manipulación de la cabeza (Cryptodira). Posee gran fuerza en el cuello. Se pueden formar hematomas.
Vena coccígea dorsal	<b>Ventajas</b> Punto de fácil acceso.	<b>Ventajas</b> Punto de fácil acceso. La cola es generalmente grande.	<b>Ventajas</b> La cola es manipulable en individuos grandes. Punto de fácil acceso.
	<b>Desventajas</b> Algunas muestras presentan hemodilución. La cola es generalmente pequeña. La vena no es visible. Podría causar trauma en la espina dorsal	<b>Desventajas</b> Algunas muestras presentan hemodilución. La vena no es visible. Podría causar trauma en la espina dorsal	<b>Desventajas</b> En individuos pequeños se dificulta la manipulación de la cola. La vena no es visible. Podría causar trauma en la espina dorsal
Seno venoso subcaparacial	<b>Ventajas</b> Punto de fácil acceso.	<b>Ventajas</b> Punto de fácil acceso.	<b>Ventajas</b> Punto de fácil acceso.
	<b>Desventajas</b> La mayoría de las muestras presentan hemodilución. El seno venoso no es visible.	<b>Desventajas</b> La mayoría de las muestras presentan hemodilución. El seno venoso no es visible.	<b>Desventajas</b> La mayoría de las muestras presentan hemodilución. El seno venoso no es visible.

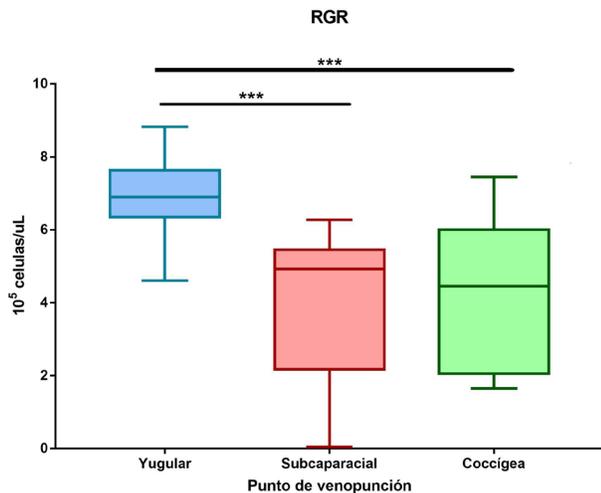
**Almacenamiento de muestras sanguíneas:**

A pesar de haberse usado jeringas sin anticoagulante, durante el procedimiento no se evidenció una rápida coagulación de la sangre, lo que permitió dividir la muestra *a posteriori* en los diferentes contenedores, ya fuese en microtubos con gel para separación de suero (análisis bioquímicos) o viales con EDTA o Heparina de sodio (análisis hematológico).

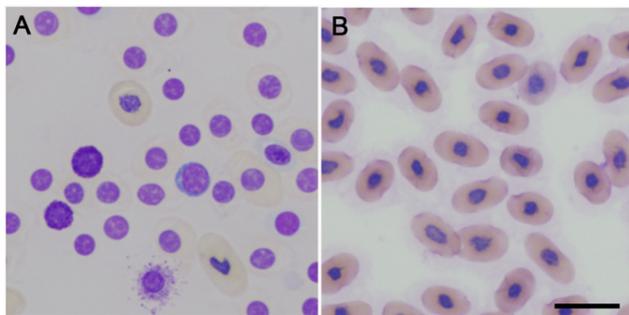
El EDTA causó lisis en todas las muestras de sangre de las tortugas de la especie *C. carbonaria*, lo cual impidió su procesamiento. A nivel microscópico, transcurridas 12 horas a partir del muestreo, se evidenció la presencia de núcleos libres y eritrocitos en avanzado proceso de muerte celular en las muestras almacenadas en EDTA, indicadores de lisis celular (Figura 5A). Por el contrario, tras el almacenamiento en heparina de sodio, los extendidos sanguíneos mostraron que la integridad morfológica de los eritrocitos de dichas muestras se encontraba

levemente comprometida, observándose bordes citoplasmáticos y nucleares irregulares y coloración deficiente (Figura 5B).

**Figura 3.** Concentración de hemoglobina de las muestras obtenidas de cada sitio de venopunción en *T. callirostris*. \*\*:  $p < 0.01$



**Figura 4.** Recuento de glóbulos rojos (RGR) de las muestras obtenidas de cada sitio de venopunción en *T. callirostris*. ANOVA y Test Post-hoc:\*\*\*:  $p < 0.001$



**Figure 5.** *Chelonoidis carbonaria's* blood 12 hours after sampling. A. Blood was anticoagulated with EDTA, B. Blood anticoagulated with sodium heparin. Bar: 20  $\mu\text{m}$

## DISCUSIÓN

De los sitios de venopunción evaluados, la vena yugular fue el punto más favorable, ya que permitió obtener las muestras sanguíneas sin hemodilución y en cantidad suficiente para analizar los perfiles sanguíneos (Figura 2, 3 y 4). La restricción al movimiento de la cabeza puede ser una labor difícil debido a que estos animales poseen gran fuerza; adicionalmente, esta acción puede ser peligrosa, ya que algunos individuos, como los pertenecientes a la especie *T. callirostris*, son muy agresivos e imprimen gran fuerza en su mandíbula; se han reportado casos de amputación de extremidades a causa de mordeduras de quelonios y las infecciones subsiguientes también son un riesgo para el operador (22). Este sitio de venopunción

resultó favorable, ya que es posible observar la vena con facilidad y el flujo de sangre permitió la obtención de una muestra de un volumen suficiente y de calidad óptima para los propósitos de diagnóstico de laboratorio; por lo que se recomienda este sitio de extracción de sangre sobre los demás. De manera general, se observó que la vena yugular del costado derecho poseía un mayor tamaño, por lo cual se detectó con mayor facilidad, esto también había sido reportado por Redrobe y MacDonald (18); adicionalmente, la vena se hace más visible al inclinar la parte anterior del cuerpo de la tortuga cerca de  $45^\circ$  hacia abajo.

Previos reportes, como el trabajo de Redrobe y MacDonald (11), exponen que algunas ventajas de extraer sangre a partir de la vena yugular en quelonios, son: la velocidad de recolección de la muestra, el buen volumen que se logra obtener y el bajo riesgo de inducir una infección (18,23). Adicionalmente, en estudios como los de Naguib (13), Perpiñan (16), Mans (19) y Eatwell et al (24), se recomienda dicho sitio dada la baja o nula posibilidad de hemodilución con linfa, característica que también fue evidenciado en este estudio.

La vena coccígea dorsal puede ser una buena alternativa cuando se trabaja con individuos de gran tamaño, ya que estos poseen una gran fuerza de retracción en su cabeza, lo que dificulta el acceso a la vena yugular. Sin embargo, la vena coccígea puede resultar un sitio problemático de venopunción, ya que su cercanía a vasos linfáticos puede aumentar el riesgo de hemodilución. Adicionalmente, es necesario mencionar que esta opción no es recomendable con individuos de poca envergadura, ya que el escaso tamaño de la cola dificulta su manipulación; sin mencionar que una punción incorrecta puede conllevar a un trauma en la espina dorsal, pérdida de sensibilidad y movilidad de la cola y riesgo de introducir infecciones en el espacio epidural (18).

Estudios previos también evidenciaron los inconvenientes de usar la vena coccígea como sitio de venopunción en tortugas. Por ejemplo, López-Olvera et al (25) observaron una marcada hemodilución en muestras obtenidas a partir de este punto, en comparación con aquellas obtenidas de la vena braquial en la tortuga griega (*Testudo marginata*), lo cual incidió negativamente en parámetros hematológicos y de química sanguínea analizados. Medeiros et al (26) también evidenciaron una marcada

hemodilución de las muestras obtenidas a partir de vena coccígea dorsal de *T. scripta elegans*, frente a muestras obtenidas a partir de seno occipital, que produjo una disminución significativa en el conteo de leucocitos y la concentración de proteínas plasmáticas totales. Por el contrario, estudios como el de Perpiñán et al (27), resaltan que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados hematológicos y de química sanguínea de las muestras obtenidas a partir de la vena coccígea dorsal y el seno venoso subcaparacial de la tortuga de caparazón blando espinosa (*Apalone spinifera*).

El seno venoso subcaparacial mostró como ventaja su fácil acceso, sin embargo, al igual que con la vena coccígea dorsal, se observó una mayor probabilidad de hemodilución en comparación con la vena yugular. En algunos casos, se extrajo en primera instancia un líquido cuya coloración variaba entre incoloro a levemente amarillo, probablemente correspondiente a linfa o líquido intersticial, sin rastros de sangre, por lo que era necesario intentar obtener nuevamente la muestra, sometiendo al individuo a un mayor estrés. En este sentido, teniendo en cuenta que la presencia de linfa afecta los parámetros hematológicos y bioquímicos (14,25), no se recomienda obtener muestras sanguíneas a partir de este punto si se desea realizar pruebas hematológicas o bioquímicas; por otro lado, si la muestra sanguínea es requerida para análisis genéticos, donde la presencia de linfa o líquido intersticial no afecta la calidad del análisis, este punto resulta muy favorable para la extracción de sangre, debido a la facilidad en el manejo de los individuos y en la obtención de muestra sanguínea.

Además del sitio de punción y la calidad de la muestra obtenida, es importante tener en cuenta el anticoagulante usado durante el periodo de almacenamiento de la sangre, de tal forma que se garantice una apropiada conservación de esta. Bajo esta premisa, se analizó la pertinencia del uso de heparina de sodio y EDTA como anticoagulantes, con el fin de mantener la sangre en condiciones óptimas para la realización de análisis hematológicos. Aunque de manera general, el EDTA es comúnmente usado como el anticoagulante de elección para estudios hematológicos, en ciertas especies de quelonios se ha determinado que este anticoagulante causa lisis de las células sanguíneas, por lo cual, algunos autores recomiendan la heparina de litio para conservar

sangre de tortugas (15). Los resultados aquí obtenidos, muestran la hemólisis de células sanguíneas de *C. carbonaria* cuando estas eran almacenadas con EDTA, lo que impidió la medición de parámetros hematológicos; sin embargo, el almacenamiento de muestras sanguíneas de *P. unifilis* y *T. callirostris* en EDTA no conllevó a la hemólisis de las muestras, lo que permitió los análisis hematológicos subsiguientes.

Nuestros hallazgos coinciden con los reportados por Muro et al (15) y Perpiñán et al (27), donde también se observó que el EDTA presentaba efectos hemolíticos en tortugas de las especies *Testudo hermanni* y *Apalone spinifera*, respectivamente (15,27). Estudios llevados a cabo por Lyman (28) mostraron la importancia del calcio en la permeabilidad de eritrocitos de la tortuga *Chelydra serpentina* (Chelydridae), determinando que, a bajas concentraciones de este ion, se observaba una mayor permeabilidad de cationes al interior de los eritrocitos, lo que conllevaba a hemólisis (28). El EDTA, al ser un agente quelante del calcio, podría causar la permeabilidad de cationes que conllevarían a la hemólisis, sin embargo, esto no sucede en todas las especies. Lyman indica que *C. serpentina* es considerado como un quelonio primitivo, cuyos eritrocitos son dependientes del calcio para el control iónico de la permeabilidad, mientras que otros géneros pueden haber perdido esta dependencia en el curso de su historia evolutiva (28), lo que podría explicar el comportamiento hemolítico observado en *C. carbonaria*.

La mayoría de los estudios mencionan a la heparina de litio como el anticoagulante de elección para almacenar sangre de quelonios. A pesar de esto, la heparina de sodio utilizada en este estudio mostró resultados favorables al mantener las muestras sanguíneas de todas las especies analizadas en óptimas condiciones para análisis hematológicos. Estos resultados apoyan diferentes reportes donde también se ha usado a la heparina de sodio para la medición de parámetros hematológicos de tortugas de las especies *T. scripta elegans*, *T. dorbingyi*, *Podocnemis expansa*, *Chelonoidis chathamensis*, *Caretta caretta* y *Geochelone radiata* (11,29,30,31,32,33) *semiárido nordestino brasileiro, visando estabelecer valores sanguíneos básicos de saúde e gerar dados úteis na fisiologia comparativa de Testudines. Após 120 dias de adaptação e jejum de 24 horas, 2,5 mL de sangue foram coletados do seio occipital dorsal e depositados*

*em tubo com heparina sódica para a avaliação, na sequência, dos níveis hematológicos. A contagem total de eritrócitos (CTE). A diferencia del EDTA, la heparina actúa inhibiendo la trombina, por lo cual se disminuye el riesgo de hemólisis a causa del secuestro del calcio; sin embargo, se ha reportado que este anticoagulante puede interferir con tinciones Romanowsky, al promover la aglutinación de trombocitos y leucocitos, así como generar un efecto azulado en los extendidos (24,33). Así mismo, tras 12 horas de almacenamiento, las células sanguíneas de *C. carbonaria* mostraron una leve alteración morfológica, lo cual puede estar acentuado por el lapso y los efectos de la heparina en la tinción usada. En este sentido, se recomienda efectuar los extendidos sanguíneos a partir de la sangre sin anticoagulante y en el menor tiempo posible, con el fin de evitar alteraciones morfológicas. Adicionalmente, acorde a lo planteado previamente por diferentes autores, se recomienda el uso de la heparina de sodio para el almacenamiento de muestras sanguíneas de tortugas, con propósitos de análisis hematológicos.*

El presente reporte refiere estrategias para la obtención de muestras sanguíneas que permitan el desarrollo de investigaciones orientadas a establecer parámetros hematológicos y de química sanguínea, tanto en especímenes de vida silvestre como en cautiverio; para ello se recomienda la extracción de sangre a partir de la vena yugular y el uso de heparina de sodio para su posterior almacenamiento, en el caso de muestras requeridas para análisis hematológicos. Adicionalmente, se propone la extracción de sangre a partir del seno subcaparacial para estudios orientados hacia la genética en poblaciones silvestres, donde se puede obtener tejido sanguíneo de forma poco invasiva, la manipulación de los individuos se facilita y la calidad del análisis no se verá afectada por la hemodilución con linfa. Este trabajo se realizó a partir del muestreo tres especies de tortugas: *Podocnemis unifilis*, *Trachemys*

*callirostris* y *Chelonoidis carbonaria*, pero creemos que, dadas las diferencias anatómicas y de hábitat de estas, estos resultados pueden llegar a ser extrapolables a una amplia gama de tortugas continentales.

En conclusión, para las especies de tortugas estudiadas, el sitio de venopunción que presenta el menor riesgo de hemodilución es la vena yugular, lo que permite obtener muestras de óptima calidad que puedan ser usadas en la evaluación de parámetros hematológicos y valoración clínica de estos individuos. Así mismo, el EDTA no mostró efectos hemolizantes sobre células sanguíneas de tortugas de las especies *T. callirostris* y *P. unifilis*, sin embargo, esto sí fue observado en las muestras sanguíneas obtenidas a partir de *C. carbonaria*. Por otra parte, las muestras sanguíneas con heparina de sodio se conservaron adecuadamente en las tres especies de tortugas evaluadas, facilitando su posterior análisis en el laboratorio. Nuestros datos proveen información básica útil para investigadores de fauna silvestre y médicos veterinarios de centros de rehabilitación poco familiarizados con variables metodológicas asociadas a la obtención de muestras sanguíneas de quelonios para análisis de laboratorio.

### **Conflicto de intereses**

Los autores del presente estudio declaramos que no existe conflicto de intereses con la publicación de este artículo.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen a los integrantes del Grupo GERPH, a los veterinarios de la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) y a los integrantes del Laboratorio Clínico de la Clínica de Pequeños Animales de la Universidad Nacional de Colombia. Este trabajo fue apoyado por la División de Investigación Bogotá - Universidad Nacional de Colombia, proyecto N° 42105.

## REFERENCIAS

1. Moreno LA, Andrade GI, Ruíz-Contreras LF. Biodiversidad 2016. Estado y tendencias de la biodiversidad continental de Colombia. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; 2016. <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/32962>
2. Gibbons JW, Scott DE, Ryan TJ, Buhlmann KA, Tuberville T, Metts BS, et al. The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians. *Bioscience*. 2000; 50(8):653–66. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0653:TGDORD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0653:TGDORD]2.0.CO;2)
3. Hofmeyr MD, Henen BT, Walton S. Season, sex and age variation in the haematology and body condition of geometric tortoises *Psammobates geometricus*. *African Zool*. 2017; 52(1):21–30. <https://doi.org/10.1080/15627020.2017.1284575>
4. Arcila VH. Hematología y química sérica en hembras quelonios (*Trachemys scripta callirostris*) en la ribera del río Lebrija, Puerto Wilches (Santander) Parte I. *Spei Domus*. 2005; 1(2). <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/568>
5. Carrascal J, Negrete H, Rojano C, Álvarez G, Chacón J, Linares J. Caracterización hematológica de hicoteas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. *Rev Med Vet*. 2014; 28:43. <https://doi.org/10.19052/mv.3180>
6. Oliveira-Júnior AA, Tavares-Dias M, Marcon JL. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Res Vet Sci*. 2009; 86(1):146–151. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.05.015>
7. Rossini M, Blanco PA, Marín E, Comerma-Steffensen S, Zerpa H. Haematological values of post-laying Arrau turtle (*Podocnemis expansa*) in the Orinoco River, Venezuela. *Res Vet Sci*. 2012; 92(1):128–131. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.026>
8. Rojas G, Varillas L. Hemograma de la Tortuga Taricaya (*Podocnemis unifilis*). *Hosp Vet*. 2013; 5(1):13–15. [http://www.rhv.cl/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=67&Itemid=](http://www.rhv.cl/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=67&Itemid=)
9. Ferronato BO, Genoy-puerto A, Piña CI, Souza FL, Verdade LM, Matushima ER. Notes on the hematology of free-living *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in polluted rivers of Southeastern Brazil. *Zool*. 2009; 26(4):795–798. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702009000400027>
10. Muñoz-Pérez JP, Lewbart GA, Hirschfeld M, Alarcón-Ruales D, Denkinger J, Castañeda JG, et al. Blood gases, biochemistry and haematology of Galápagos hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*). *Conserv Physiol*. 2017; 5(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/cox028>
11. Lewbart GA, Griffioen JA, Savo A, Muñoz-Pérez JP, Ortega C, Loyola A, et al. Biochemistry and hematology parameters of the San Cristóbal Galápagos tortoise (*Chelonoidis chathamensis*). *Conserv Physiol*. 2018; 6(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/coy004>
12. Cabrera M, Li O, Gálvez H, Sánchez N, Rojas G. Valores hematológicos de la tortuga motelo (*Geochelone denticulata*) mantenida en cautiverio. *Rev Investig Vet del Peru*. 2011; 22(2):144–150. <https://doi.org/10.15381/rivep.v22i2.287>
13. Naguib M. How to take blood from a tortoise. *Companion Anim*. 2016; 21(7):422–425. <https://doi.org/10.12968/coan.2016.21.7.422>
14. Crawshaw GJ, Holz P. Comparison of Plasma Biochemical Values in Blood and Blood-Lymph Mixtures from Red-eared Sliders, *Trachemys scripta elegans*. *Bull Assoc Reptil Amphib Vet*. 1996; 6(2):7–9. <https://doi.org/10.5818/1076-3139.6.2.7>
15. Muro J, Cuenca R, Pastor J, Vinas L, Lavin S. Effects of Lithium Heparin and Tripotassium EDTA on Hematologic Values of Hermann's Tortoises (*Testudo hermanni*). *J Zoo Wildl Med*. 1998; 29(1):40–44. <https://www.jstor.org/stable/20095714>

16. Perpiñán D. Chelonian haematology: 1. Collection and handling of samples. In Pract. 2017; 39(5):194–202. <https://doi.org/10.1136/inp.j1692>
17. Innis C, Knotek Z. Tortoises and Freshwater Turtles. En: Heatley J, Russell K, editores. Exotic Animal Laboratory Diagnosis. 1º ed. Hoboken, USA: Wiley; 2020. <https://doi.org/10.1002/9781119108610.ch16>
18. Redrobe S, MacDonald J. Sample Collection and Clinical Pathology of Reptiles. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 1999; 2(3):709–730. [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30118-4](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30118-4)
19. Mans C. Venipuncture techniques in chelonian species. Lab Anim. 2008; 37(7):303–304. <https://doi.org/10.1038/lab0708-303>
20. Hattingh J, Smith EM. Anticoagulants for avian and reptilian blood: Heparin and EDTA. Pflügers Arch Eur J Physiol. 1976; 363(3):267–269. <https://doi.org/10.1007/BF00594613>
21. Natt MP, Herrick CA. A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. Poult Sci. 1952; 31(4):735–738. <https://doi.org/10.3382/ps.0310735>
22. Johnson RD, Nielsen CL. Traumatic Amputation of Finger From an Alligator Snapping Turtle Bite. Wilderness Environ Med. 2016; 27(2):277–281. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2016.02.003>
23. Gottdenker NL, Jacobson ER. Effect of venipuncture sites on hematologic and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). Am J Vet Res. 1995; 56(1):19–21.
24. Eatwell K, Hedley J, Barron R. Reptile haematology and biochemistry. In Pract. 2014; 36(1):34–42. <https://doi.org/10.1136/inp.f7488>
25. López-Olvera JR, Montané J, Marco I, Martínez-Silvestre A, Soler J, Lavin S. Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). J Wildl Dis. 2003; 39(4):830–836. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.4.830>
26. Medeiros N, Locatelli-dittrich R, Schmidt E, Alvares A, Patrício L, Lange RR, et al. Efeito do sítio de venopunção nos parâmetros hematológicos em tigre-d'água-americano, *Trachemys scripta elegans*. Pesqui Vet Bras. 2012; 32(1):37–40. [http://pvh.org.br/portal/download\\_artigo/MTA1MHwyMDIxMDMwNDE5NTk1NA==](http://pvh.org.br/portal/download_artigo/MTA1MHwyMDIxMDMwNDE5NTk1NA==)
27. Perpiñán D, Armstrong DL, Dórea F. Effect of Anticoagulant and Venipuncture Site on Hematology and Serum Chemistries of the Spiny Softshell Turtle (*Apalone spinifera*). J Herpetol Med Surg. 2011; 20(2–3):74–78. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-20.2.74>
28. Lyman RA. The anti-haemolytic function of calcium in the blood of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. J Cell Comp Physiol. 1945; 25(1):65–73. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030250108>
29. Gradela A, Souza VN, Queiroz MM de, Constantino A da C, Bandeira CGC, Faria MD de, et al. Biometria corporal e parâmetros hematológicos de *Trachemys scripta elegans* e *Trachemys dorbignyi* (Testudines: Emydidae) criadas em cativeiro em Petrolina, Pernambuco. Pesqui Vet Bras. 2017; 37(1):83–90. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000100014>
30. Kakizoe Y, Sakaoka K, Kakizoe F, Yoshii M, Nakamura H, Kanou Y, et al. Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). J Zoo Wildl Med. 2007; 38(1):77–84. <https://doi.org/10.1638/05-096.1>
31. Rohilla MS, Tiwari PK. Simple method of blood sampling from Indian freshwater turtles for genetic studies. Acta Herpetológica. 2008; 3(1):65–69. [https://doi.org/10.13128/Acta\\_Herpetol-2485](https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-2485)
32. Zaias J, Norton T, Fickel A, Spratt J, Altman NH, Cray C. Biochemical and hematologic values for 18 clinically healthy radiated tortoises (*Geochelone radiata*) on St Catherines Island, Georgia. Vet Clin Pathol. 2006; 35(3):321–325. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2006.tb00139.x>
33. Garcia GC, Alves-Júnior JRF, Santana ÁE, Stas CMF, Silva CC, Kanayama CY, et al. Hematologic variables of the Arrau turtle (*Podocnemis expansa*) under the effects of different anticoagulants and cytologic stains. Vet Clin Pathol. 2021; 50(2):209–215. <https://doi.org/10.1111/vcp.12960>