

162
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**" DESCRIPCION MORFOMETRICA DE LAS CELULAS SANGUINEAS
EN CRIAS RECIEN NACIDAS DE LA TORTUGA MARINA
Dermochelys coriacea DURANTE LA TEMPORADA
DE ANIDACION 1992-93, EN EL PLAYON
DE MEXIQUILLO, MICHOACAN."**

T E S I S
Que para obtener el Título de:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
OFELIA MARGARITA SILVA PEÑA

DIRECTOR DE TESIS:

**Q.B.P. CONCEPCION RUGERIO VARGAS
BIOL. ADRIANA LAURA SARTI MARTINEZ**



MEXICO, D. F. 1997.

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVIFAUNA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "DESCRIPCION MORFOMETRICA DE LAS CELULAS SANGUINEAS EN CRIAS RECIEN NACIDAS DE LA TORTUGA MARINA *Dermodochelys coriacea* DURANTE LA TEMPORADA DE ANIDACION 1992 -93, EN EL PLAYON DE MEXIQUILLO, MICHOACAN."

realizado por Ofelia Margarita Silva Peña

con número de cuenta 8955256-4 . pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Q.B.P. Concepción Rugerío Vargas

Propietario Biol. Adriana Laura Sarti Martínez

Propietario M. en C. Patricia Rivas Manzano

Suplente M. en C. Leticia Parra Gámez

Suplente Biol. Ana Rebeca Barragán Rocha

Rugeria
Adriana L. Sarti
Patricia Rivas M.
Leticia Parra Gámez
Ana Rebeca Barragán Rocha
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**Ser Joven es levantarse ante cada
adversidad con espíritu indomable,
aprendiendo de nuestros fracasos pero
jamás dandonos por vencidos, luchando
hasta alcanzar la cima anhelada.**

**Buscar desafíos y enfrentarse a retos
extraordinarios con tal entusiasmo que los
mas intrincados obstáculos sean afrontados
con una ferrea disciplina, con una
determinación absoluta y con una sonrisa
en los labios.**

***SER SIEMPRE JOVEN ES LA EXPRESION
MAS SUBLIME DE LA PRESENCIA DE DIOS.***

**A mis padres...
Que me dieron la vida y la
oportunidad de lograr esta meta
Dios los bendiga.**

Agradecimientos:

Agradezco a todo el personal del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, en especial al laboratorio de Técnicas Histológicas Especiales, a la maestra Concepción Rugerio, que sin su ayuda y guía no se hubiera realizado esta tesis.

Al Laboratotoio de Tortugas Marinas y todos los tortugueros especialmente a la Biol. Laura Sarti y a la Biol. Ana Rebeca Barragán.

A mis amigas, Lorena por su apoyo y sincera amistad, Gaby, Claudia, Suitpy y Víctor por su amistad incondicional.

A toda mi familia que es parte de mi y de mi vida.

A tí...gracias por todo.

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCION	5
MARCO TEÓRICO	12
ERITROCITOS	12
<i>Proeritroblastos:</i>	14
<i>Eritroblasto basófilo:</i>	14
<i>Eritroblasto policromatófilo temprano:</i>	14
<i>Eritroblasto policromatófilo tardío:</i>	14
<i>Eritroblasto ortocromático:</i>	15
<i>Eritrocito maduro:</i>	15
LEUCOCITOS	18
<i>Neutrófilos:</i>	18
<i>Eosinófilos:</i>	19
<i>Basófilos:</i>	19
<i>Azurófilos:</i>	20
<i>Linfocitos:</i>	20
<i>Monocitos:</i>	21
<i>Trombocitos:</i>	21
ANTECEDENTES	22

JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS	28
METODOS	28
RESULTADOS	33
DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA	33
<i>ERITROCITOS</i>	33
LEUCOCITOS Y TROMBOCITOS	39
RECUESTO PORCENTUAL	40
<i>ERITROCITOS</i>	40
<i>LEUCOCITOS Y TROMBOCITOS</i>	41
MORFOMETRIA	43
<i>ERITROCITOS</i>	43
<i>LEUCOCITOS Y TROMBOCITOS</i>	47
CELULAS MITOTICAS	49
DISCUSION	51
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFIA	58

RESUMEN

Es de gran importancia conocer la biología de las especies en peligro de extinción, iniciando desde los aspectos básicos como es el estudio hematológico, con el cual se pueden responder preguntas referentes a la descripción del tejido sanguíneo y a la salud de los organismos.

El presente trabajo muestra la morfometría y la proporción porcentual de todas las células sanguíneas, además los cambios morfológicos en el proceso de maduración de los eritrocitos, en dos grupos de crías de la tortuga marina *Demochelys coriacea*, procedentes de dos técnicas de incubación diferentes: caja de poliuretano y vivero. Se realizaron frotis sanguíneos que se tiñeron con el colorante de Wright. Se identificaron los tipos celulares, se hizo el recuento diferencial de leucocitos y eritrocitos, incluyendo en estos últimos las etapas de diferenciación, finalmente se realizó el análisis morfométrico de las células.

Se encontró que las células sanguíneas tienen características morfológicas muy similares con las del resto de los reptiles. Se encontraron diferencias significativas en el recuento porcentual y la morfometría de las células de las crías de caja y de vivero para las etapas de diferenciación de los eritrocitos y para los leucocitos presentes. Con estos resultados se puede suponer que existen diferencias en el grado de desarrollo causadas por algunas condiciones dadas durante la incubación. Así mismo se observan en la sangre circulante un gran número de formas mitóticas, que sugieren la existencia de reproducción eritrocítica fuera del tejido hematopoyético.

INTRODUCCION

La República Mexicana cuenta con la fortuna de tener a lo largo de todo el año la presencia de siete de las ocho especies de tortuga marina existentes en el mundo, y el estado de Michoacán es uno de los lugares que año con año recibe en su costa sur tres de estas especies: la tortuga Gofina (*Lepidochelys olivacea*), la tortuga Prieta (*Chelonia agassizi*) y la tortuga Laúd (*Dermochelys coriacea*).

PLAYON DE MEXIQUILLO

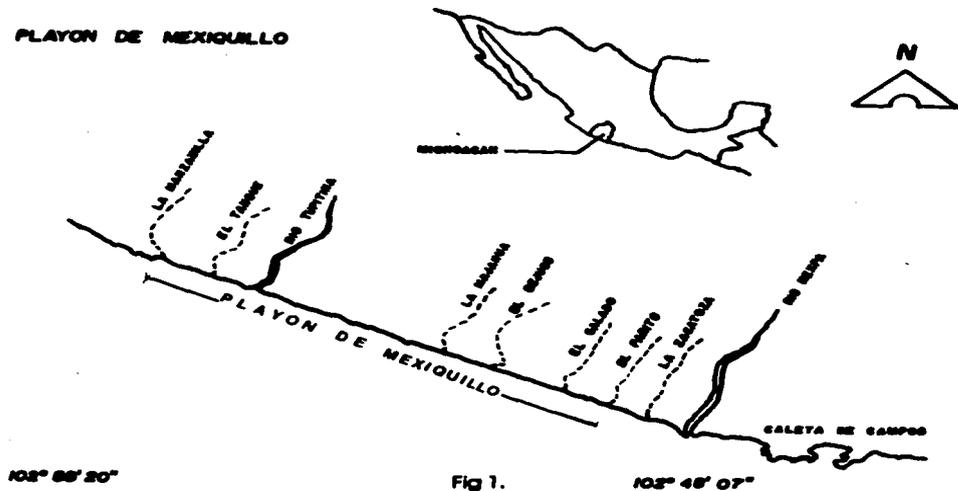


Fig. 1.

Uno de los principales sitios de anidación de estos quelonios es el Playón de Mexiquillo, Michoacán, perteneciente al municipio de Aquila, lugar en que se llevó al cabo la recolección de las muestras para esta investigación. Se localiza a 80 km al Noroeste de Ciudad Lázaro Cárdenas; cuenta con una extensión de 18 km aproximadamente y se ubica desde la saliente rocosa denominada "La Punta" hasta la desembocadura del río "La Manzanilla", entre los paralelos 102°48'07", 102°58'20" longitud oeste y los 18°05'19", 18°09'58" latitud norte ⁽²⁾ (fig. 1); en este lugar se encuentra trabajando desde hace once años el Programa de Tortugas Marinas del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM, con diversos proyectos de conservación e investigación. En el Playón de Mexiquillo se presenta el mayor número de anidaciones de tortuga Golfina y Laúd. La región posee un clima tropical caliente subhúmedo, con lluvias en verano, con una temperatura media anual de 25.2°C y promedio anual de precipitación de 930.8 mm ⁽²⁾; el mes más caluroso del año es el mes de junio ⁽³⁻⁴⁾, con vegetación tropical, playas arenosas con pendientes poco pronunciadas, libres de zonas rocosas, con ríos y acantilados en su línea de costa. ⁽²⁾.

Dicho Playón es importante por el número de hembras anidadoras y por el potencial de producción de crías que tiene, sobre todo, para la especie *Dermochelys coriacea* ⁽²⁾. Este quelonio presenta cuerpo deprimido, caparazón dérmico con siete quillas, sin escamas, posee un pico córneo que finaliza con dos muescas o cúspides bien definidas a cada lado del maxilar superior formando una "W" (fig 2.), posee aletas muy grandes sin uñas, su piel es lisa de color gris obscuro casi negra; en organismos adultos se observa en la cabeza una mancha rosa de muy variadas formas, es la especie de

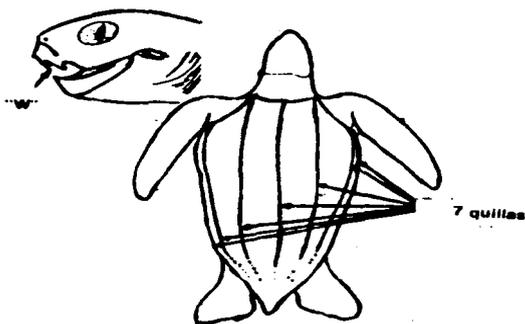


Fig. 2

tortuga marina más grande del mundo con una longitud de caparazón aproximada de 120 a 180 cm en estado adulto ⁽²⁾.

Fig. 2.

Su temporada de anidación comprende los meses de octubre a febrero ⁽³⁾. Se alimenta principalmente de

organismos blandos, como medusas ⁽⁴⁾, hasta una profundidad de 50 m o más ⁽¹⁾.

Anidan de noche o muy temprano, cuando la temperatura no es muy elevada, generalmente cuando no hay mucha luz de luna ⁽⁵⁾. Eligen playas amplias y largas de energía mediana a alta, con pendientes de moderadas a pronunciadas, sin vegetación y donde el mar sea profundo. ⁽⁶⁾ Cuando van a anidar, salen del mar y se dirigen a la cresta de la playa para elegir el sitio donde pondrán sus huevos. Avanzando con movimientos sincronizados de la aletas anteriores, eligen el lugar donde harán su nido y lo inician haciendo una cama quitando la arena seca para continuar con el siguiente paso que es la elaboración de la cámara de incubación, para lo cual cavan con sus aletas posteriores hasta una profundidad de 80 cm, entonces, realiza la oviposición protegiendo el nido con una aleta, al terminar lo cubre con arena, la compacta y esconde el lugar

exacto donde se encuentra el nido, revolviendo con sus aletas la arena del lugar, finalmente regresa al mar, todo esto en un tiempo aproximado de 90 min. ⁽⁹⁾.

La nidada de estos organismos es de alrededor de sesenta huevos, con 5.5 cm de diámetro aproximadamente ⁽¹⁰⁾, además de poner una serie de huevos llamados "inviabiles", de mucho menor tamaño que contienen solo albúmina, cuya función es desconocida. El tiempo de incubación es de sesenta días en promedio durante el cual el desarrollo embrionario puede verse afectado por diversos factores abióticos ⁽¹¹⁾, como la salinidad que disminuye de manera considerable el avivamiento, la humedad que favorece el crecimiento de microorganismos y cambia la temperatura, a su vez, si es baja alarga el tiempo de incubación, disminuyendo el tamaño de la crías. Además, la temperatura tiene una gran influencia en la determinación del sexo ⁽¹²⁾, a temperaturas bajas (24 a 26° C) se obtendrá una producción mayor de machos y a temperaturas altas (32 a 34° C) habrá producción mayor de hembras, existiendo además una temperatura umbral a la cual se obtienen 50% de hembras y 50% de machos. También hay un grupo de crías que pertenecen al grupo de los intersexos, los cuales no presentan un sexo definido, son comunes a temperaturas entre los 28 a 30°C ⁽¹³⁾.

El ciclo de vida de las tortugas marinas no se conoce completamente debido a que la mayor parte de éste transcurre mar adentro, únicamente permanecen en tierra cuando salen a anidar, durante su incubación y su nacimiento. Se desconocen casi por completo las etapas de crías, juveniles y subadultos, debido a esto el entendimiento de muchas áreas de la biología de esta especie, como la anatomía, la histología y la fisiología es deficiente.

Las tortugas marinas durante toda su vida se encuentran expuestas a diversos depredadores que van desde bacterias, hongos, dípteros, cangrejos, animales marinos, perros, hasta el hombre. Por esta causa se realizan trabajos de conservación con diversas técnicas que se enfocan, principalmente, al cuidado de los huevos. En una de las técnicas la nidada es transportada del lugar donde la hembra anidó hasta un vivero, o corral de incubación, ubicado a 7 m aproximadamente de la berna de la playa, cercado con malla de alambre y postes de madera, enterrados a 60 cm de profundidad. La parte inferior de la malla que queda enterrada se recubre con tela plástica de mosquitero para evitar que las tortuguitas escapen o entren depredadores. En el vivero los huevos se siembran en condiciones semejantes al nido natural, en hoyos con una profundidad aproximada de 80 cm y con una forma similar a la original. Cada nido queda ubicado a 1 m de distancia del anterior y de la hilera adjunta, alternándose. Se señalan con una estaca que tiene información de ese nido (fecha, especie, número de huevos y número de identificación individual) Fig. 3.



SIEMBRA EN VIVERO

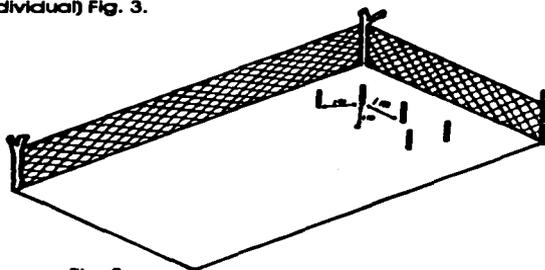
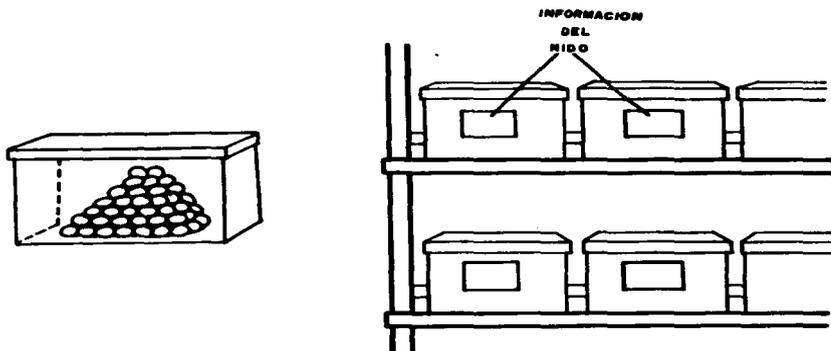


Fig. 3

Se utiliza también la técnica de sembrado en cajas de poliestireno, que consiste en colocar dentro de la caja una capa de arena y encima los huevos ubicados a manera de pirámide, evitando que éstos estén en contacto con las paredes de la caja; finalmente se cubren totalmente con arena húmeda, compactándola suavemente ²⁷. La arena empleada para la siembra se colecta a 80 cm de profundidad y de una zona cercana al área de anidación. Las cajas se colocan en una estantería de madera, dentro de una cámara de incubación hecha de palapa y lámina negra, Fig.4. La humedad de la arena se mantiene cambiando la arena seca superficial, por arena húmeda colectada a la profundidad original.



SIEMBRA EN CAJAS

Fig 4.

Debido a la temporada de lluvias de la región y a la alta energía de la marea, la morfología de la playa es muy cambiante, provocando que las hembras en ocasiones, tengan que anidar en zonas donde los huevos quedan en peligro de inundación⁽¹⁴⁾, para salvar estos huevos también se utilizan ambas técnicas de protección. Con estas técnicas se busca no solo proteger los huevos, sino también incrementar el número de crías que se reclutan a la población silvestre.

Sin embargo, es muy importante conocer que calidad de crías se obtienen con estas técnicas de incubación, para cerciorarse que en realidad cumplen el objetivo para el que se utilizan, obtener el mayor número posible de crías viables.

Si estimamos que una tortuga de buena calidad es una tortuga sana y partimos de la idea de que un animal sano es aquel que no presenta ninguna malformación en cabeza, caparazón y aletas, (reducción o ausencia de ojos y/o aletas, reducción de la cabeza, inversión del caparazón, ausencia de pigmentación, etc.), ni alguna patología o daño reconocible, sea de nacimiento o adquirida, entonces las crías que no presentan estas alteraciones se considerarán de buena calidad, sin embargo, existen datos de salud que no pueden ser detectados con la simple observación macroscópica de la tortuga, por lo que es necesario realizar estudios mas detallados, como son estudios fisiológicos, bioquímicos o histológicos, dentro de éstos últimos se consideró importante el análisis del tejido sanguíneo que al darnos información sobre variaciones en la morfología y función celular, permite detectar carencia de hierro y vitaminas, intoxicaciones, infecciones, mal funcionamiento de algunos órganos y defectos metabólicos, además tiene como ventaja poder obtener la muestra sin necesidad de sacrificar a la cría. ^(24,25)

MARCO TEÓRICO

La sangre es, entre otros factores, de importancia fundamental para el mantenimiento de la homeostasis normal del organismo, es decir, su equilibrio fisiológico y por lo tanto revelador del funcionamiento normal o patológico. La sangre es un tejido fluido compuesto por células y una sustancia intercelular líquida, el plasma sanguíneo. La sangre circula en el organismo por los vasos sanguíneos, si la extraemos es un líquido viscoso, rojo, que tras un corto periodo de reposo se coagula, obteniendo una consistencia gelatinosa. Muchas funciones orgánicas están relacionadas con el plasma sanguíneo, pero otras están relacionadas directamente con las células o elementos figurados⁽²²⁾, que se describen a continuación:

Eritrocitos

Los eritrocitos en la sangre de los mamíferos, son células anucleadas con forma de disco bicóncavo. Dentro de los mismos mamíferos únicamente los camélidos poseen células rojas elípticas; en el resto de los grupos de vertebrados los eritrocitos son nucleados y ovalados. En aves las células rojas son elípticas con núcleo también elíptico, sin embargo en reptiles estas tienen bordes más redondeados y con núcleo generalmente redondo. También existen diferencias entre los vertebrados en el tamaño de estas células, como regla general los eritrocitos de reptiles son más grandes que los de aves, y éstos son más grandes que los de mamíferos. Las células rojas de mayor tamaño se encuentran en anfibios (Amphiuma) y las más pequeñas en ciervos. Además existen variaciones en valores numéricos y tamaños celulares interespecíficos, relacionadas con el tamaño del

cuerpo, factores ambientales, altura a la que habitan, hábitos, etc. ⁽²⁴⁾.

En mamíferos, aves y reptiles, la eritropoyesis normalmente tiene lugar en médula ósea. En reptiles existen varios sitios de formación de sangre: en tortugas la hematopoyesis se lleva al cabo en el bazo y la médula ósea, mientras que en lagartijas la médula ósea es el sitio mas importante. La localización de los sitios eritropoyéticos varía también, de manera interespecífica, de acuerdo a los hábitos de cada especie, dependiendo de que el animal sea marino, terrestre, dulceacuicola, etc. Rhodin y cols ⁽²⁴⁾ reportan que la tortuga marina *Dermochelys coriacea*, presenta tejido condro - óseo y no desarrolla una cavidad medular aún siendo adulta, caso similar al de algunos mamíferos marinos, específicamente cetáceos y sirénidos, atribuyendo esta neotenia secundaria a sus hábitos pelágicos. Esta ausencia de la cavidad medular sugiere que en esta especie los sitios de formación de eritrocitos se ubican en otros órganos.

En el feto humano el tejido productor de células rojas se localiza en hígado, bazo y médula ósea; al aumentar la cavidad medular del esqueleto, aumenta el tejido hematopoyético, posteriormente la grasa va sustituyendo la mayor parte de la médula ósea activa en el esqueleto periférico, el tejido eritropoyético se limita entonces, al eje del esqueleto periférico y a las epífisis de los huesos largos, el hueso ilíaco y los cuerpos vertebrales ⁽²⁴⁾.

Poco se conoce acerca del proceso de maduración de los eritrocitos en reptiles pero se relaciona con lo conocido en mamíferos. Excluyendo la pérdida del núcleo el proceso es esencialmente similar. La primera célula morfológicamente reconocible de la eritropoyesis es el proeritroblasto que da lugar a una serie de células nucleadas: los

proeritroblastos, que presentan cambios progresivos asociados con el incremento de la madurez, incluyendo la disminución en el tamaño del citoplasma y el núcleo, pérdida de nucleolos, decremento en la basofilia citoplásmica y la adquisición de características funcionales morfológicas para el intercambio gaseoso y la circulación en el sistema vascular.

La siguiente es una clasificación de las etapas de maduración de los eritrocitos en aves y reptiles ²⁴:

- Proeritroblastos:

Es una célula grande redonda o amebolde, con cromatina nuclear marcadamente aglutinada formando una red, grandes nucleolos y citoplasma muy basofílico con espacios mitocondriales.

- Eritroblasto basófilo:

Esta célula es un poco mas pequeña que la anterior, con cromatina nuclear aglutinada, nucleolos pequeños pero aún visibles y su citoplasma basofílico sin espacios mitocondriales.

- Eritroblasto policromatófilo temprano:

Célula redonda aún más pequeña, núcleo relativamente pequeño con cromatina aglutinada, sin nucleolos y citoplasma gris o ligeramente eosinófilico.

- Eritroblasto policromatófilo tardío:

Célula más pequeña redonda o ligeramente oval, con núcleo también

redondo o ligeramente oval con grumos de cromatina irregular y citoplasma gris o rosa.

• Eritroblasto ortocromático:

Esta etapa de la eritropoyesis presenta un citoplasma muy eosinofílico, su núcleo es más grande que el de una célula madura, con cromatina aglutinada de forma irregular. La tinción para reticulocitos revela gránulos citoplásmicos que forman una banda perinuclear, estos gránulos se reducen progresivamente en número y desaparecen en el citoplasma.

• Eritrocito maduro:

Es una célula oval, con citoplasma uniformemente eosinofílico, núcleo oval, alargado o algunas veces redondo en reptiles.

En condiciones normales la producción de células rojas es igual a la destrucción de las mismas, esto está determinado por el tiempo de vida de la célula. Existen marcadas diferencias interespecíficas en el período de vida de los eritrocitos y en general está directamente relacionado con la velocidad metabólica y por lo tanto, con el tamaño corporal, de tal manera que en animales de menor tamaño, la sobrevivencia de las células rojas es más corta y la eritropoyesis más activa. Parece ser directa la relación entre la velocidad normal de recambio de células rojas y la velocidad a la cual el animal puede reemplazar los eritrocitos perdidos a causa de una hemorragia o hemólisis; esto es más rápido en animales de menor tamaño que en animales grandes. ²⁴.

Algunas variaciones morfológicas de los eritrocitos pueden ser debidos a parásitos que pueden penetrarlos o a la presencia de otros cuerpos que en ocasiones se observan

en su interior como son:

Los Cuerpos de Howell Jolly que son pequeños fragmentos nucleares considerados como indicadores de división celular anormal o hipoesplenismo, debido tal vez a la ausencia de bazo o mal funcionamiento de éste. No implica daño estructural en médula ósea.

El punteado basófilo que representa la presencia de pequeños gránulos distribuidos en el citoplasma, los cuales consisten en ribosomas agregados que se tiñen de púrpura o azul con tinciones derivadas del método de Romanowsky, técnica para el estudio de la sangre ²⁴; su presencia es generalmente considerada patológica y puede ser asociada con envenenamiento por plomo o anemia hipocrómica, un punteado mas denso se observa en anomalías del estroma de la médula ósea y con eritropoyesis aumentada por eritropoyetina. ²⁴. El punteado basófilo ha sido reportado como normal en mamíferos artiodáctilos durante las primeras semanas de vida, cuando se lleva al cabo el reemplazo de células fetales a células adultas, en estas circunstancias parece no tener significado patológico.

Los Cuerpos de Heinz, no han sido vistos en preparaciones teñidas con tinciones derivadas de Romanowsky, pero utilizando tinciones especiales se logran ver como una o mas estructuras de forma y tamaño irregular de color azul pálido o violeta asociado frecuentemente a la membrana celular, a la cual se adhieren y finalmente son eliminadas por las células reticuloendoteliales en el bazo junto con aquella porción de la membrana del eritrocito donde están adheridas; si existe suficiente daño en la membrana, la célula será destruida. También pueden ser vistos en frotis sin teñir como

estructuras refringentes. Están formados de hemoglobina desnaturalizada, y en humano, puede ser indicativo de disfunción esplénica, exposición a drogas oxidantes, defectos de enzimas que protegen a la hemoglobina de la oxidación o de la presencia de hemoglobina inestable. Se han observado en aves que ingieren aceite de sus plumas contaminadas. ²⁴.

La presencia de todos estos cuerpos en reptiles tiene valor diagnóstico, pues generalmente no se presentan en condiciones normales. ²⁴

Hay otros cambios importantes en la morfología de los eritrocitos, las células rojas de mamíferos muestran tendencia a crearse en frotis preparados con sangre colectada en EDTA, esto tal vez se deba al uso del anticoagulante en una concentración que puede no ser isotónica para los eritrocitos. Además se ha notado que el EDTA induce hemólisis en los eritrocitos de algunas aves y reptiles ²⁴.

En general las observaciones en eritrocitos indicativas de la presencia de una patología son la hipocromia y la microcitosis, ambas asociadas con defectos en la maduración citoplásmica causadas por deficiencia de hierro o defectos de globina y porfirina ²⁴; la esterocitosis, no descrita en reptiles; la presencia de gran número de células inmaduras, que puede ser causada por una infección con hemoparásitos, aunque la presencia de los eritroblastos y otras células inmaduras se reporta como común en organismos jóvenes ²⁴; la evidencia de división celular anormal es otra indicación patológica. En reptiles también se han reportado los siguientes cambios morfológicos: la poliquilocitosis que es una variación en la forma normal de las células o una fragmentación celular, la anisocitosis que es la variación del tamaño de los eritrocitos,

reportada como normal en reptiles; ambos cambios son ocasionados por un defecto metabólico o un incremento en la eritropoyesis ^{R-98}.

La función en los eritrocitos es colaborar en el transporte de gases (O_2 y CO_2), mediar el transporte de oxígeno entre pulmones y los tejidos periféricos de las siguientes formas:

- a) Por la concentración de hemoglobina en los eritrocitos que determina la capacidad de transporte de O_2 ;
- b) La afinidad de la hemoglobina hacia el oxígeno, lo que determina la cantidad de oxígeno ligado y liberado.

Leucocitos

Respecto a la células blancas o leucocitos, éstas se identifican por su morfología y por sus características de tinción.

Las células blancas con citoplasma granular están presentes en los vertebrados clasificándose como Neutrófilos, Eosinófilos y Basófilos de acuerdo a la reacción de tinción con las técnicas derivadas de Romanowsky, sin embargo existen diferencias en cuanto a la morfología y terminología entre los diferentes grupos de vertebrados.

• Neutrófilos:

En reptiles el término Neutrófilo, define a las células que contienen en su citoplasma un gran número de gránulos con afinidad tinte variable, usualmente ovales o espiculados, algunos autores no consideran este término apropiado, conociéndoseles, entonces, como Heterófilos, su principal función es eliminar bacterias mediante

quimiotaxis, opsonización, ingestión y lisis. Un incremento en el número de estas células se presenta como respuesta a infecciones bacterianas y de hongos, daños en el tejido, algunas enfermedades metabólicas, leucemias mieloides y estrés.

• Eosinófilos :

Los granulocitos eosinófilos de todos los reptiles son grandes, generalmente esféricos, con núcleo de forma variable cercano a la periferia, se pueden distinguir gránulos acidófilos, cuya forma varía de esférica a cilíndrica, éstos gránulos se han reportado ya en otros trabajos en diferentes órdenes de reptiles (24,27,28). El tamaño de estas células es muy variable, no solo entre especies, aún en un mismo animal y en un mismo frotis, también el tamaño de los gránulos es muy variable. La densidad de la granulación puede impedir la observación de la forma y posición del núcleo, que es multilobulado, aunque el número de los lóbulos no parece ser muy alto. Los granulocitos eosinófilos aumentan en infecciones parasitarias, actúan destruyendo la pared de los parásitos.

• Basófilos :

Los granulocitos basófilos son sencillos de reconocer, en todas las especies de reptiles estudiadas son pequeños, esféricos, usualmente llenos de gránulos basofílicos; en un frotis, son semejantes a zarzamoras. La granulación es tan densa que raramente se ve el núcleo, no existe tanta variación en el tamaño de los gránulos como en el caso de los eosinófilos. Los granulocitos basófilos son los más pequeños en lagartijas, más grandes en víboras y más grandes aún en tortugas. Se incrementan ante reacciones alérgicas.

- **Azurófilos :**

En reptiles se encuentra otro tipo celular, el Azurófilo, su presencia en la sangre de reptiles fue reportada por Pappenheim en 1909 ⁽²²⁾. Los hematólogos atribuyen su presencia a las etapas de diferenciación de la serie monocítica y no a la granulocítica. Son células con núcleo relativamente pequeño, irregular y excéntrico, varía mucho en tamaño. Los azurófilos contienen cuerpos grasos en el citoplasma, pero pueden no presentarlos, las células seniles azurófilas contienen muchas vacuolas ⁽²³⁾. Tienen como característica distintiva la reacción de metacromasia en su citoplasma con tinciones de Romanowsky.

- **Linfocitos :**

Los Linfocitos son células esféricas, con núcleo redondo, citoplasma azul (claro u obscuro), y cromatina nuclear densa. Respecto a su tamaño, en mamíferos los encontramos desde ligeramente mayores que un eritrocito hasta excepcionalmente tan grandes o mayores que un monocito; en reptiles, se llegan a confundir con trombocitos, en general son más pequeños que los eritrocitos y los granulocitos. Participan en reacciones inmunológicas y en mamíferos y aves, se dividen en dos grupos principales de acuerdo a sus diferentes funciones y morfología. Estos son los linfocitos B que producen inmunoglobulinas y los linfocitos T que son responsables de la inmunidad celular. Ambos tipos de linfocitos no pueden ser diferenciados sin el uso de técnicas especializadas, por ejemplo, mediante receptores de superficie para inmunoglobulinas (linfocitos B) o la presencia de antígenos CD4 o CD8 (linfocitos T).

- **Monocitos :**

Los Monocitos usualmente son mas grandes que los linfocitos, se pueden distinguir por su escasa afinidad tintoria, su núcleo arrifionado y su abundante citoplasma ligeramente opaco, azul grisáceo en reptiles. Sus principales funciones dependen de su actividad fagocitica en organismos parasitados, células necróticas, células de desecho y ser presentadores de antigenos a los linfocitos ⁽²⁴⁾. La monocitosis se presenta en infecciones bacterianas, virales y micóticas.

- **Trombocitos :**

Los Trombocitos de los vertebrados no mamíferos son células redondas, con núcleo central o ligeramente excéntrico y variable cantidad de citoplasma, el cual se tiñe de azul pálido. En los mamíferos, las Plaquetas o elementos hemostáticos no son células, sino fragmentos celulares, formados de citoplasma del megacariocito, por lo tanto no contienen núcleo. Hay una relación inversa entre el tamaño de las plaquetas y su cantidad. En los otros grupos de vertebrados los trombocitos son significativamente mayores en tamaño que las plaquetas y por lo tanto su número es mucho menor. Son producidos en la médula ósea por el precursor mononuclear. Los trombocitos no activos son ovalados igual que su núcleo, tienen un citoplasma azul-gris con gránulos basofílicos que pueden ser visibles. Pueden confundirse con linfocitos, pero se diferencian por la densidad de su cromatina y su citoplasma, los trombocitos presentan cromatina y citoplasma menos denso. Tienden a agruparse, en una función similar a la agregación plaquetaria, se incrementan en hemorragias e infecciones bacterianas ⁽²⁴⁾.

Antecedentes

Desde hace mucho tiempo, hasta fechas recientes se han llevado al cabo muchas investigaciones acerca de la hematología de reptiles, revisando aspectos básicos importantes.

Spector (1956) ⁽¹⁾ reportó datos numéricos y merísticos de células sanguíneas, además de propiedades físicas y químicas sobre la sangre de tortugas y otros vertebrados; Gaumer y Goodnight (1957) ⁽²⁾ presentaron valores celulares y de hematocrito para diferentes géneros de tortugas acuáticas y terrestres relacionándolos con las actividades de éstas, encontraron que la especie *Chelydra* posee células sanguíneas de mayor tamaño, número de eritrocitos mayor y más cantidad de hemoglobina que las otras especies, mostrando que el contenido de hemoglobina en la sangre aumenta en las especies acuáticas, la sangre de las especies estudiadas muestra un pH similar, además las curvas de disociación de oxígeno son similares de acuerdo a los hábitos, es decir, las tortugas terrestres son semejantes entre ellas, y todas las curvas de disociación de bióxido de carbono son parecidas. Altland y Thompson (1958) ⁽³⁾ realizaron algunos experimentos con factores que influyen en la formación de sangre de tortugas terrestres, en la sangre control encontraron que los valores de hematocrito, concentración de hemoglobina y conteo de eritrocitos, es mayor en machos que en hembras, en cambio los valores de leucocitos no muestran diferencia relacionada con el sexo. Hicieron preparaciones histológicas de tejido hematopoyético, del caparazón y de hueso de aletas que demostraron que los eosinófilos con gránulos esféricos eran abundantes, mientras que los

linfocitos y las células reticulares eran menos numerosas, de menor tamaño y mas difíciles de identificar. Los frotis de tejido hematopoyético en huesos de aletas demostraron células sanguíneas de la serie eritrocítica en varios estados de desarrollo. A las tortugas tratadas se les inyectó cobalto a diferentes dosis o extracto de hígado crudo, ambos tratamientos no mostraron evidencia de estimulación en la formación de sangre, otras tortugas fueron sangradas repetidamente, éstas mostraron un marcado incremento en número de reticulocitos al contrario del otro grupo tratado con aminopterina que mostró reducción en la cantidad de eritrocitos, concentración de hemoglobina, valores de hematocrito y en la cantidad de leucocitos hasta la desaparición de eosinófilos. Taylor y Kaptan (1961) ⁽⁶²⁾ publicaron un estudio de células sanguíneas en tortugas dulceacuícolas en el que hacen una descripción de los diferentes tipos celulares encontrados y algunas características cuantitativas de la sangre de la especie estudiada. Saint Girons y Duguy (1963) ⁽⁶⁷⁾ analizaron la citología sanguínea comparada en reptiles de Francia donde señalaron que los eritrocitos de los reptiles poseían la misma morfología que ya se había reportado y variaban en tamaño de acuerdo a la familia y a la especie. Además, hacen una pequeña descripción morfológica de cada grupo celular y las diferencias de los leucocitos entre familias y especies, considerando los factores que pueden modificar la composición de la sangre circulante como son el dimorfismo sexual y la estacionalidad. Heady y Rogers (1962) ⁽⁶⁸⁾ describieron la morfología de las células sanguíneas de tortugas dulceacuícolas y encontraron que los eritrocitos eran como ya se habían descrito, en cuanto a las células blancas en orden de frecuencia encontraron eosinófilos de 26 a 41 %, pequeños acidófilos de 22 a 26%, neutrófilos de 19 a 32%, linfocitos de 11 a 22%, y

monocitos 0.3%. Más tarde Saint Girons (1970) ⁽³⁴⁾ hizo un estudio cuantitativo en el tejido sanguíneo donde demostró que existen diferencias en la cantidad de eritrocitos entre diferentes familias de reptiles y que también influyen factores como el sexo, la edad, las estaciones anuales, además de variaciones geográficas, ecológicas, altitud y carencia de alimento que afectaban tanto la cantidad de eritrocitos como de leucocitos. Desauer (1974) ⁽¹¹⁾ describió las proteínas en el plasma de reptiles, su composición y su especificidad. Meints y cols (1975) ⁽³⁵⁾ se enfocaron a la actividad eritropoyética en tortugas bajo condiciones de anemia, hipoxia y hemorragias, encontraron que hubo cambios en la cantidad de reticulocitos, hematocrito y en las concentraciones de células sanguíneas, además de un aumento en la actividad de los sitios hematopoyéticos. Frair (1977) ⁽¹⁶⁾ realizó dos trabajos, uno orientado a las tortugas marinas, relacionando los parámetros de las células rojas con el largo del caparazón, evidenciando que las tortugas más grandes tienen mayor hematocrito, células rojas más grandes con un volumen mayor, aunque en menor número, y un segundo trabajo (1977) ⁽¹⁶⁾ donde recopiló literatura concerniente a datos hematológicos de tortugas marinas, dulceacuícolas y terrestres demostrando que estos pueden variar de acuerdo a varios factores físicos y fisiológicos. Fern y Ebanks (1984) ⁽¹⁷⁾ presentaron un estudio sanguíneo sobre la tortuga verde (*Chelonia mydas*) citando a Bacher (1980) ⁽⁵⁾ como antecedente en el estudio hematológico de dicha especie, describieron cada uno de los tipos celulares encontrados, tomaron medidas y cuantificaron las mismas.

Sin embargo, aún después de todos estos trabajos todavía es insuficiente la información en reptiles en comparación con lo existente en mamíferos. Dentro de la clase

**DESCRIPCION MORFOMETRICA DE LAS CELULAS SANGUINEAS EN CRAS RECEN NACIDAS DE LA TORTUGA MARINA *Dermochelys coriacea*
DURANTE LA TEMPORADA DE ANIDACION 1992 -1993 EN EL PLAYON DE MESQUILLO, MICHOACAN, MEXICO.**

de los reptiles, las tortugas marinas han sido muy poco estudiadas, pero se continúan las investigaciones hematológicas en estas especies para cubrir dichas deficiencias.

Justificación

Cada año, un número desconocido de especies desaparece de la faz de la tierra y con su extinción se pierde una fracción de la enorme herencia biológica del ser humano y para las especies existentes se limitan las posibilidades de mantener o incrementar su bienestar.

Uno de los grupos de vertebrados mas diversos e interesantes de la República Mexicana son los reptiles. En México se encuentran varios grupos de reptiles como tortugas (marinas, de agua dulce y terrestres), cocodrilos, gecos, lagartijas, iguanas, camaleones, víboras y culebras.

Las tortugas marinas se encuentran en peligro de desaparecer, provocando como consecuencia daños irreparables a la ecología.

La tortuga Laúd Dermochelys coriacea es la más grande de todas las tortugas marinas existentes y se realizan grandes esfuerzos por salvarla; para lograrlo es necesario conocer totalmente su biología, iniciando desde estudios básicos de todas las áreas, uno de ellos es conocer aspectos histológicos sanguíneos, mediante los cuales se puedan llegar a valorar condiciones de salud y condiciones fisiológicas de los organismos, sin necesidad de sacrificarlos, así como la influencia de los cambios ambientales sobre los mismos, lo que nos permitirá incrementar el conocimiento de estos quelonios. Así como la creación de programas de conservación adecuados de acuerdo a la biología de cada especie.

El presente trabajo se ha enfocado a la especie Dermochelys coriacea originaria

del Océano Pacífico, debido a que como se mencionó anteriormente el Playón de Mexquillo, es una de las principales playas de anidación para la especie, considerando la importancia de despejar la incógnita acerca del cumplimiento del objetivo de los trabajos de conservación, que actualmente se realizan: esto es, la producción del mayor número posible de crías viables, teniendo como base el conocimiento de las características de las células sanguíneas (morfología, morfometría, número), que pueda servir como cimiento para otros estudios hematológicos y fisiológicos.

OBJETIVOS

- Describir la morfología y porción numérica, de las células sanguíneas de crías recién nacidas de la tortuga marina *Dermochelys coriacea*.
- Establecer diferencias en la morfología, el número y/o la morfometría de las células sanguíneas de crías provenientes de dos condiciones de incubación.

MÉTODOS

Se utilizaron un total de 30 crías recién nacidas de tortugas Laud, el mes de abril durante la temporada 1992 - 1993. Se consideraron dos grupos de crías, obtenidas de dos técnicas de incubación, un grupo procedente de huevos incubados en cajas de poliestireno (n=15) y el otro de huevos incubados en vivero o corral (n=14).

Se tomaron veintinueve muestras sanguíneas en total. Catorce de crías de vivero y quince de crías de cajas, de cada una de las cuales se hicieron cuatro o cinco frotis de sangre, obteniéndose ciento cuarenta y tres laminillas.

La sangre fue obtenida mediante la técnica de punción cardíaca ⁽³¹⁾ Foto 1, utilizando agujas y jeringas de 1 ml que contenían aproximadamente 0.1 ml de sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA Na, 10%), como anticoagulante. Se tomaron 0.3 ml de sangre de cada cría, la que se mantuvo en tubos de ensayo con tapón de goma a una temperatura aproximada de 4 a 6 °C con el fin de mantener la sangre en buen estado hasta la realización de los frotis, los cuales se hicieron antes de que hubieran transcurrido 24 horas posteriores a la colecta, para que se logren evitar



Foto 1

Cría de Tortuga Laud, la flecha indica el lugar de la punción para la toma de la muestra sanguínea.

quedando listos para ser teñidos con el método de Wright. Fig.5

El colorante utilizado se preparó en el laboratorio empleando 2 g de polvo colorante de Wright (Merck), 970 ml de Metanol (Merck) libre de acetona y 30 ml de Glicerina Q.P. de la siguiente

modificaciones en las células sanguíneas (19). Para la elaboración de los frotis sanguíneos se utilizaron siempre dos portaobjetos para la extensión de la gota de sangre. Los frotis se dejaron secar al aire libre, posteriormente se fijaron 5 min. en metanol

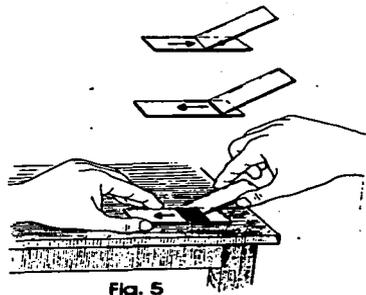


Fig. 5

Técnica de elaboración de frotis (22)

manera:

- ◆ Se mezclaron el metanol y la glicerina perfectamente en un matraz.
- ◆ En un frasco ámbar de un litro, completamente seco, se pusieron los dos gramos de colorante y se agregó la mezcla anterior agitando bien. Posteriormente la solución obtenida se agitó cada quince minutos durante cuatro horas aproximadamente, se guardó a la temperatura del laboratorio y al abrigo de la luz.
- ◆ Se dejó madurar 24 horas. Cada porción que se utilizó se filtró previamente.

La técnica empleada para la tinción de los frotis fue la siguiente:

- ⇒ Se marcaron los extendidos con un lápiz para su identificación, hecho esto se colocaron con el lado con sangre hacia arriba, en un soporte de varillas de vidrio sobre una charola de coloración, seca.
- ⇒ Con una pipeta de 5 ml se puso el reactivo de Wright en cantidad suficiente para cubrir el frotis, aproximadamente 20 gotas, se dejó actuar un minuto.
- ⇒ Se agregó al colorante amortiguador, aproximadamente 10 gotas, se mezcló muy bien a chorro de aire a través de una pipeta de 5 ml. Se dejó actuar el colorante diluido durante 14 minutos.
- ⇒ Se enjuagó abundantemente con amortiguador hasta la eliminación total del colorante sobrante.
- ⇒ Se limpió la parte posterior de los portaobjetos con un isopo mojado con etanol de 96° y se dejaron secar al aire libre.

Se hicieron pruebas de tiempo previas, hasta encontrar el que diera una mejor

tinción, incluso se modificó la metodología de la tinción original sustituyendo el agua destilada por un amortiguador de fosfatos pH 6.4 a 6.5, para diluir el colorante y realizar el lavado. El amortiguador se preparó disolviendo 6.63 g de KH_2PO_4 , (Fosfato diácido de potasio) y 256 g de Na_2HPO_4 , (fosfato monoácido de sodio anhidro) en agua destilada, atorando a 1000 ml. Se ajustó a un pH de 7 con un potenciómetro, marca Coming, modelo 7.

Todo el material que se utilizó, tanto para preparar el colorante como para la tinción estaba completamente seco.

Una vez teñidos y secos, los frotis se montaron con resina disuelta en tolueno y se procedió a la observación de los extendidos en el microscopio utilizando aceite de inmersión. El estudio se inició con la identificación de los diferentes tipos celulares, posteriormente se hizo el recuento porcentual de leucocitos, identificando 100 células y considerando la cantidad contada de cada tipo celular como el porcentaje presente y en la misma forma se realizó el recuento porcentual de los eritrocitos, en estos se incluyeron las etapas de diferenciación. Finalmente se hizo la morfometría utilizando un microscopio Carl Zeiss, modelo K-7-D, con un micrómetro ocular Zeiss, calibrado previamente con un micrómetro objetivo Zeiss 5 + 100/100 mm, haciendo las anotaciones correspondientes en hojas con un formato diseñado para ese fin.

Para los eritrocitos se consideraron cuatro medidas, el diámetro celular mayor (DCM), el diámetro celular menor (DCm), el diámetro nuclear mayor (DNM) y el diámetro nuclear menor (DNm). A los leucocitos únicamente se les tomaron las medidas de diámetro celular mayor (DCM) y el diámetro celular menor (DCm).

La identificación de los tipos celulares encontrados, se basó en la descripción hecha por Hawkey y Dennet ²⁴.

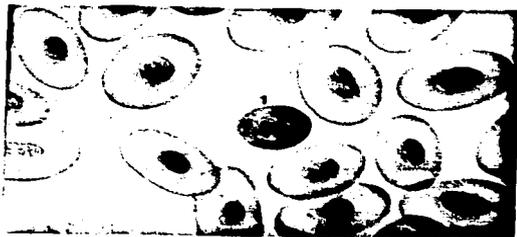
Posteriormente los resultados fueron analizados estadísticamente con el programa Statistical Analysis System (SAS), mediante análisis de varianza.

RESULTADOS

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

- ERITROCITOS

Las células rojas maduras presentes en las crías de *Dermochelys coriacea*, son muy similares a las descritas previamente por otros autores, ^(17,24) Además se encontraron todos los estadios de maduración de la línea roja:



Los PROERITROBLASTOS (etapa 1) son células redondas o ameboides, con un núcleo grande, la cromatina nuclear marcadamente aglutinada, nucleolos grandes muy visibles y citoplasma basofílico. Foto 2.

Fotomicrografía con tinción de Wright. Proeritroblasto al centro (1)

Foto 2



Foto 3

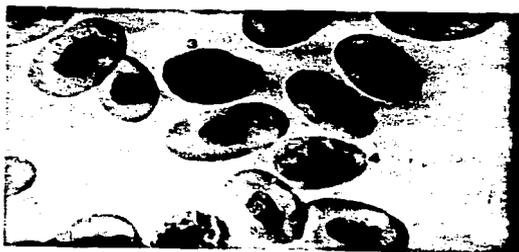
Eritroblasto basófilo (2), junto un trombocito (1). (Wright)

ERITROBLASTO BASOFILO (etapa 2): célula redonda, con cromatina aún aglutinada, nucleolos mas pequeños pero aún visibles y citoplasma basofílico, pero menos que en la etapa anterior. Foto 3.

ERITROBLASTO

POLICROMATOFILO TEMPRANO (etapa 3): célula oval, con núcleo también oval, presenta cromatina aglutinada, sin nucleolos y citoplasma gris o ligeramente acidófilo. Foto 4.

ERITROBLASTO POLICROMATOFILO TARDIO (etapa 4): célula oval, núcleo oval, con cromatina irregular y citoplasma gris o rosa pálido. Foto 4.



Eritroblasto policromatófilo temprano (3) y eritroblasto policromatófilo tardío (4). (Wright).

Foto 4



Foto 5

Eritroblasto ortocromático (S). Al centro dos trombocitos (T).

La flecha señala un eritrocito senil. (Wright).

ERITROCITOS MADUROS:

células ovales con núcleo oval regular, algunas veces redondo, localizado centralmente, con cromatina visible y citoplasma uniformemente eosinofílico.

Obsérvase también una célula en mitosis. Foto 6.

ERITROBLASTO ORTOCROMÁTICO (etapa 5): célula oval, presenta un citoplasma completamente eosinofílico, con un núcleo oval, basofílico y cromatina aglutinada irregularmente. Es el último estado antes de convertirse en ERITROCITO MADURO. Foto 5.



Foto 6

Eritrocitos maduros (EM). La flecha señala una célula en mitosis (Wright).

LEUCOCITOS Y TROMBOCITOS

En el presente trabajo no se encontraron todos los tipos celulares descritos para reptiles, dentro de los granulocitos, estuvieron presentes EOSINOFILOS y BASOFILOS, y de los mononucleares los LINFOCITOS, MONOCITOS y AZUROFILOS, además, células hemostáticas, los TROMBOCITOS, éstos últimos fueron considerados como leucocitos, para el conteo porcentual.

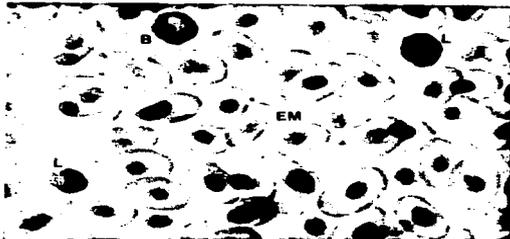
Los EOSINOFILOS observados son células muy grandes generalmente esféricas, con núcleo lobulado sin poder precisar el número de lobulaciones debido a que la densidad de los gránulos no lo permitió. Los gránulos intracitoplásmicos presentan diferentes formas, que van desde las esféricas a las cilíndricas, estos se tiñen desde rosa pálido hasta un rosa muy intenso y el núcleo se tiñe de azul pálido hasta un morado obscuro. Foto 7.



Eosinófilo (E), Trombocito (T), Eritrocitos maduros (EM). (Wright).

Foto 7

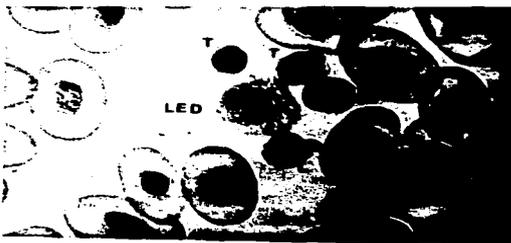
Los granulocitos **BASOFILOS** son pequeños generalmente esféricos con el núcleo situado en la periferia, poco visible por la presencia de los gránulos sobre él. Los gránulos se tiñen de violeta muy intenso. Foto 8.



Basófilo (B). Leucocitos (L). Eritrocitos Maduros (EM). (Wright).

Foto 8

Los **LINFOCITOS** son células generalmente redondas, núcleo redondo, central o ligeramente excéntrico, con citoplasma que tiñe de azul pálido, variando su tonalidad de acuerdo a la cantidad de citoplasma, si es poco, el color es más intenso. Foto 9.



Linfocitos (L). Trombocitos (T). Leucocito en etapa de diferenciación (LED). Wright.
Foto 9



Foto 10

Trombocitos agrupados (T), Eosinófilo (E). (Wright).

requiere experiencia, lograda por medio de muchas observaciones. Las células hemostáticas o trombocitos cuando no están activadas son ovales, y cuando son estimuladas tienden a agregarse, formando cúmulos, en este caso son más esféricas, con el núcleo excéntrico, el citoplasma llega a formar pseudópodos y hay cambios en su contorno. Foto 10.

Los MONOCITOS observados, presentan poca afinidad a la tinción, núcleo muy grande de forma amañonada y citoplasma gris. Foto 11.

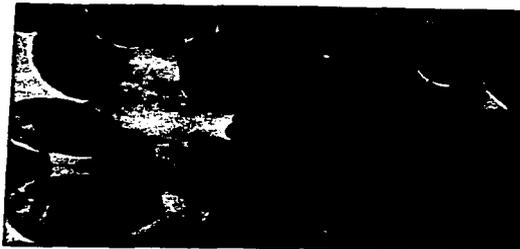


Foto 11

Monocito (M), Trombocito (T). (Wright).

Los AZURÓFILOS son células redondas, similares a los linfocitos, su citoplasma tiñe con variación tinte del azul al violeta, también llamado metacromasia. Foto 12.



Foto 12

Azurófilo (A). Eritrocitos Maduros (EM). (Wright).

RECUESTO PORCENTUAL

• ERITROCITOS

Después de realizar el conteo de las células para obtener el porcentaje de eritroblastos y eritrocitos presentes en cada frotis para ambos grupos, observamos que en las crías incubadas en caja se presenta mayor número de células inmaduras en comparación con lo que se obtuvo en las crías incubadas en el vivero. De una N de 74 frotis para las crías de caja y 69 para las crías de vivero se observaron eritroblastos de la etapa 1 solo en 56 y en 12 frotis respectivamente, de la etapa 2 en 31 y en 12 frotis, de la etapa 3 en 46 y en 22 frotis, de la etapa 4 en 26 y en 24 frotis, en la etapa 5 en 20 y en 15 frotis. Con respecto a los eritrocitos maduros su presencia fue mayor en las crías incubadas bajo las condiciones del vivero, donde encontramos un promedio de 98.55% de estos, contra un promedio de 94.98% presente en las crías incubadas en cajas.

Posteriormente mediante análisis de varianza se comparó el recuento porcentual para los diferentes estadios de maduración de las células rojas y se obtuvieron diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) en las etapas 1,2,3 y EM (eritrocitos maduros), mientras que en las etapas 4 y 5 no se observan diferencias significativas.

La tabla 1 muestra los parámetros estadísticos en el recuento porcentual de los eritrocitos de ambos tratamientos.

Recuento porcentual de eritrocitos y sus etapas de maduración. (caja/vivero)

TABLA 1

Estado Celular	N	Media %	Máxima %	Mínima %	Desv.Est.	p
Etapas 1	74/69	1.85/0.20	11.0/2.0	0.0/0.0	1.86/0.38	0.0001**
Etapas 2	74/69	0.67/0.18	4.0/2.0	0.0/0.0	0.84/0.28	0.0002**
Etapas 3	74/69	1.55/0.37	8.0/2.0	0.0/0.0	1.51/0.39	0.0001**
Etapas 4	74/69	0.51/0.39	3.0/2.0	0.0/0.0	0.64/0.33	0.2980
Etapas 5	74/69	0.40/0.27	4.0/3.0	0.0/0.0	0.76/0.59	0.2637
E. M.	74/69	94.98/98.55	100/100	86.0/96.0	3.10/1.13	0.0001**

* p < 0.05 significativo

** p < 0.01 altamente significativo.

• LEUCOCITOS Y TROMBOCITOS

Al realizar el recuento porcentual de las células blancas obtuvimos los siguientes resultados: los eosinófilos fueron encontrados presentes en todos los frotis que se revisaron de ambos grupos, observamos menor porcentaje de eosinófilos en las crías incubadas en cajas, un promedio de

31.80%, en comparación con un promedio de 37.86% obtenido en las crías incubadas en el vivero. Los basófilos no se observaron en todas las extensiones analizadas, en el grupo de las crías de cajas únicamente en 22 de 72 frotis, mientras que en las crías del vivero en 50 de 65 frotis fueron observados. En los frotis obtenidos de las crías de caja se observan linfocitos en 70 de los 72 revisados, en todos los frotis revisados del grupo de crías incubadas en el vivero se observó este tipo celular. Los monocitos fueron muy escasos en ambos grupos, en los frotis de caja no se observaron y en los del vivero sólo en dos de los 65 revisados se encontraron, del mismo modo los azurófilos no se observaron en frotis de las crías de caja y únicamente en ocho de 65 extensiones revisadas del grupo de las crías incubadas en el vivero. Los trombocitos se observaron en todos los frotis revisados de los dos grupos estudiados.

El análisis estadístico de la relación porcentual de los Leucocitos dio los siguientes resultados:

Se observaron diferencias significativas para los linfocitos, diferencias altamente significativas para los basófilos, azurófilos y trombocitos, no se observan diferencias en eosinófilos y monocitos.

En la tabla 2 se muestran los parámetros estadísticos para el recuento porcentual de los leucocitos y trombocitos de ambas condiciones de incubación.

Recuento porcentual de leucocitos y trombocitos. (caja/vivero)

TABLA 2

Tipo Celular	N	Media %	Máxima %	Mínima %	Desv.Est.	p
eosinófilos	72/65	31.80/37.86	64.0/82.0	8.0/5.0	11.37/23.30	0.0518*
basófilos	72/65	0.52/4.32	4.0/26.0	0.0/0.0	0.97/4.97	0.0001**
linfocitos	72/65	6.55/8.29	15.0/20.0	0.0/2.0	3.43/4.54	0.0129**
monocitos	72/65	0.0/0.32	0.0/13.0	0.0/0.0	0.0/1.88	0.1470
azurófilos	72/65	0.0/0.24	0.0/4.0	0.0/0.0	0.0/0.75	0.0061**
trombocitos	72/65	61.34/48.84	83.0/90.0	26.0/6.0	12.26/25.47	0.0003**

* $p < 0.05$ significativo

** $p < 0.01$ altamente significativo.

MORFOMETRIA

• ERITROCITOS

En general las células rojas de las crías de caja son de menor tamaño que en las crías de vivero, en todas las mediciones realizadas a las células y sus núcleos.

El análisis de varianza para las características morfométricas de cada una de las etapas de maduración dio el siguiente resultado: Se observan diferencias altamente significativas para las medidas de los

diámetros celulares y nucleares para todos los estadios a excepción de la etapa 5 que no presenta diferencia significativa en los diámetros nucleares mayor y menor. En las tablas 3, 4, 5 y 6, se observan los parámetros estadísticos para cada característica morfológica de los eritroblastos y eritrocitos maduros.

Diámetro Celular Mayor (DCM) para eritrocitos. (caja/vivero)

TABLA 3

Estadio Celular	N	Media μ	Máxima μ	Mínima μ	Dev.Est.	p
Etapla 1	322/233	13.24/14.97	17.88/21.56	9.94/10.52	1.59/2.04	0.0001**
Etapla 2	318/211	14.57/16.60	22.09/27.35	9.46/11.57	1.74/2.14	0.0001**
Etapla 3	322/240	16.96/19.98	29.45/28.93	10.52/13.15	3.00/3.36	0.0001**
Etapla 4	324/254	18.88/24.54	26.30/31.56	14.04/13.15	2.66/3.03	0.0001**
Etapla 5	356/308	21.55/22.99	28.93/31.03	11.57/13.15	2.44/2.61	0.0001**
E. M.	322/240	16.96/19.98	29.45/28.93	10.52/13.15	3.00/3.36	0.0001**

* $p < 0.05$ significativo.

** $p < 0.01$ altamente significativo.

Díámetro Celular menor (DCm) para eritrocitos. (caja/vivero)

TABLA 4

Etapa Celular	N	Medio μ	Máximo μ	Mínimo μ	Desv.Est.	p
Etapa 1	322/233	12.19/13.18	16.30/19.98	7.89/9.46	1.48/1.84	0.0001**
Etapa 2	318/211	12.15/12.63	15.78/16.83	1.05/7.89	1.58/1.78	0.0012**
Etapa 3	322/240	12.61/13.77	21.56/22.09	7.36/8.41	1.87/2.18	0.0001**
Etapa 4	324/254	12.76/13.53	16.83/18.93	8.94/7.89	1.45/2.14	0.0001**
Etapa 5	356/308	13.28/14.12	20.51/21.04	7.89/8.41	1.75/2.13	0.0001**
E. M.	322/240	12.61/13.77	21.56/22.09	7.36/8.41	1.87/2.18	0.0001**

* p < 0.05 significativo.

** p < 0.01 altamente significativo.

Diámetro Nuclear Mayor (DNM) para eritrocitos. (celda/vivero)

TABLA 5

Etapa Celular	N	Media μ	Máxima μ	Mínima μ	Dev. Est.	p
Etapa 1	322/233	10.14/11.86	15.78/20.51	6.68/7.89	1.45/1.84	0.0001**
Etapa 2	318/211	9.78/11.62	15.78/15.78	6.31/6.31	1.21/1.57	0.0001**
Etapa 3	322/240	10.29/10.90	15.78/16.83	6.31/6.31	1.36/1.79	0.0001**
Etapa 4	324/254	10.10/11.08	13.67/28.93	6.83/5.26	1.28/2.19	0.0001**
Etapa 5	356/308	9.46/9.31	15.25/15.78	5.26/5.26	1.60/2.15	0.6153
E. M.	322/240	10.29/10.90	15.78/16.83	6.31/6.31	1.36/1.79	0.0001**

* p < 0.05 significativo.

** p < 0.01 altamente significativo.

Diámetro Nuclear menor (DNm) para eritrocitos. (caja/vivero)

TABLA 6

Estado Celular	N	Media μ	Máxima μ	Mínima μ	Desv.Est.	p
Etapla 1	322/233	9.30/10.25	13.67/14.72	5.26/5.78	1.42/1.59	0.0001**
Etapla 2	318/211	8.08/8.67	11.57/12.62	5.78/5.26	1.10/1.20	0.0001**
Etapla 3	322/240	7.73/8.24	14.20/13.15	5.26/4.20	1.33/1.28	0.0001**
Etapla 4	324/254	7.25/7.59	10.52/12.09	5.26/5.26	1.03/1.13	0.0001**
Etapla 5	356/308	6.47/6.40	11.57/13.15	4.20/3.68	0.90/1.14	0.9142
E.M.	322/240	7.73/8.24	14.20/13.15	5.26/4.20	1.33/1.28	0.0001**

* p < 0.05 significativo.

** p < 0.01 altamente significativo.

• LEUCOCITOS Y TROMBOCITOS

De acuerdo a la medidas morfométricas obtenidas, los leucocitos observados en las extensiones de el grupo de las crías de caja son en su mayoría de mayor tamaño que los leucocitos de las crías de vivero.

Los resultados del análisis estadístico de la comparación de la morfometría de las células blancas y trombocitos de las crías de ambas técnicas de incubación mostró lo siguiente:

Para las medidas del diámetro celular mayor se observan diferencias altamente significativas en basófilos y trombocitos, para las medidas del diámetro celular menor , diferencias significativas para

basófilos y altamente significativas para trombocitos, sin embargo para eosinófilos y linfocitos no se observan diferencias significativas para ninguna característica morfométrica.

En las tablas 7 y 8 se observan los parámetros estadísticos para los datos morfométricos de leucocitos y trombocitos en ambas técnicas analizadas.

Diámetro Celular Mayor (DCM) para leucocitos y trombocitos. (caja/vivero)

TABLA 7

Tipo Celular	N	Media μ	Máxima μ	Mínima μ	Dev.Est.	p
eosinófilos	365/345	15.90/16.00	25.24/21.04	8.41/9.99	2.67/3.10	0.6489
basófilos	10/17	12.83/10.98	14.72/13.15	10.52/8.41	1.57/1.40	0.0040**
linfocitos	365/345	12.16/12.12	21.04/24.72	7.89/7.36	2.32/2.55	0.8509
trombocitos	366/345	10.53/9.60	15.25/15.78	6.31/5.26	1.43/1.64	0.0001**

* $p < 0.05$ significativo.

** $p < 0.01$ altamente significativo.

Diámetro Celular menor (DCm) para leucocitos y trombocitos. (caja/vivero)

TABLA 8

Tipo Celular	N	Media μ	Máxima μ	Mínima μ	Desv.Est.	p
eosinófilos	365/345	14.53/14.25	21.04/26.30	7.89/4.20	2.23/2.58	0.1211
basófilos	10/17	11.51/9.90	14.20/12.09	8.94/6.31	1.97/1.47	0.0229*
linfocitos	365/345	11.11/11.11	19.46/18.41	6.83/6.31	1.95/2.17	0.9735
trombocitos	366/345	8.41/7.56	12.62/13.15	4.20/4.20	1.69/1.65	0.0001**

* p < 0.05 significativo

**p < 0.01 altamente significativo.

CELULAS MITOTICAS

Durante las observaciones hechas al microscopio para obtener los resultados anteriores, se apreciaron formas mitóticas en sangre circulante (foto 13 y 14), lo que nos



Célula en Mitosis (CM). Embrión (2) (Wright).

Foto 13



Célula en Mitosis (CM). (Wright).

Foto 14

llevó a realizar como investigación complementaria, cortes de bazo e hígado, además de cortes longitudinales y transversales de fémur y húmero en crías recién eclosionadas de la especie estudiada, con el fin de identificar algunos de los sitios de formación de células sanguíneas reportados en crías de esta especie, la observación dio la siguiente información:

Tanto en bazo como en hígado no se encontraron formas inmaduras de células sanguíneas de la línea eritrocítica, sin embargo, se observaron formas indiferenciadas de la serie granulocítica.

En fémur y húmero se observa una envoltura periosteal, regiones vascularizadas en la epífisis, así como entrada de vasos en la parte central de la diáfisis, con trabéculas de osificación y presencia de gran cantidad de células de la serie granulocítica, además presencia de eritrocitos maduros dentro de los vasos sanguíneos, no se observaron eritrocitos en etapas de diferenciación.

DISCUSION

Este estudio demostró que las células de la sangre de las crías de la tortuga Laúd tienen la morfología que caracteriza a la de los reptiles en general ^(17,25,37,38,42). Sin embargo, en el estudio cuantitativo de las diferentes etapas de maduración de los eritrocitos, en las crías emergidas de las cajas de poliestireno se observó, la presencia de eritroblastos en mayor número en comparación con las crías de vivero. Como dato importante en ninguno de los grupos observamos la presencia de hemoparásitos que en ocasiones, se les ha considerado causa de incremento en el número de eritroblastos ⁽³⁸⁾. Lo anterior sugiere que las crías de caja tienen condiciones fisiológicas diferentes a las de las crías de vivero que provoquen aumento en la eritropoyesis. Esta diferencia, puede ser provocada por las distintas condiciones que se presentaron durante la incubación de las crías⁽¹²⁾. Si comparamos las técnicas de incubación utilizadas, encontramos diferencias en varios factores:

- ◆ **Profundidad:** en los nidos incubados en el vivero, los huevos se colocan a una profundidad máxima aproximada a los 80 cm y una profundidad mínima de 40 cm, a diferencia de la profundidad mínima a la que se encontraban los huevos en las cajas de aproximadamente 10 cm. Esta diferencia en la profundidad induce que las crías de vivero eclosionan uno o dos días antes de llegar a la superficie, y seguramente en este tiempo completan su maduración, mientras, que es muy probable que las crías de caja lleguen a la superficie el mismo día que eclosionaron, siendo tal vez, este tiempo crítico para la

maduración completa de los eritrocitos. Fig. 6.

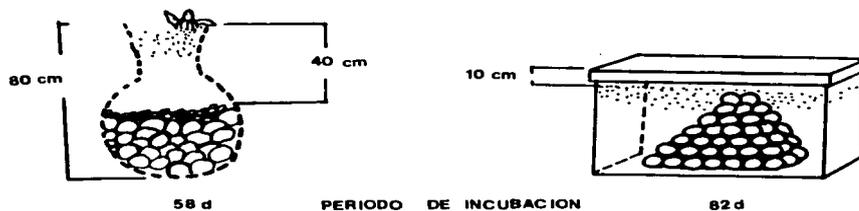


Fig. 6

- ◆ **Periodo de incubación:** Los nidos de vivero y los nidos naturales tienen condiciones similares, ya que Barragán y cols.⁽⁴⁾ reportaron para la temporada 1992 - 1993, misma en la que se realizó la presente investigación, que el promedio del periodo de incubación, para la técnica de vivero fue de 58 días y para los nidos naturales de 57 días, mientras que para la técnica de caja fue de 82 días, lo que indica en este último caso un retraso en el desarrollo. Fig. 6.
- ◆ **Temperatura:** En el trabajo de Barragán y cols. se tomaron temperaturas en tres horarios establecidos (06:00, 14:00 y 22:00 hs) para la arena de cajas y para la arena de la playa (colocando sensores), el promedio de la temperatura de la arena en cajas fue de 25.5 ± 5.2 , 25.6 ± 6 y $27.6 \pm 5.0^\circ\text{C}$ a diferencia de las

temperaturas de la arena, donde el sensor 1 colocado cerca del mar tuvo los siguientes promedios 32.0 ± 1 , 30.9 ± 0 y $32.4 \pm 1^\circ\text{C}$ y el sensor 2 colocado lejos del mar dio los siguientes promedios 32.8 ± 1.4 , 31.3 ± 0.2 y 32.7 ± 1.4 .

Todos estos resultados indican que los nidos de vivero y los naturales tienen mucha similitud en los promedios de temperatura y condiciones de profundidad que da como resultado un período de incubación casi igual. Las crías de caja se desarrollaron a temperatura menor, que tiene influencia directa sobre el período de incubación, las temperaturas bajas alargan el período de incubación y por lo tanto el desarrollo del embrión es más lento. Otra diferencia de las técnicas de incubación es que los nidos de vivero se encuentran en la playa y tienen influencia de la intrusión salina, ^(13,14,23,40). Al subir la marea sube el nivel del agua, produciendo a su vez flujo de aire, así que de manera constante hay intercambio gaseoso (Fig. 7). En las cajas el intercambio gaseoso es mínimo, por lo tanto la concentración parcial de oxígeno es diferente para los dos grupos de crías, ésta puede ser otra condición importante para la presencia de mayor número de células inmaduras. Esto es apoyado por el trabajo de Meints y cols ⁽²⁴⁾ que demostraron que el incremento en la hematopoyesis es inducida por una variedad de estímulos, todos ellos mediados probablemente por la reducción en el aporte de oxígeno requeridos por el organismo.

El número de eritrocitos maduros es mayor en la sangre de las crías emergidas del vivero que en las crías incubadas en cajas, con esto podemos sugerir que las células rojas sí logran terminar su maduración en las crías que eclosionan del vivero, las cuales son muy similares a las crías que nacen de los nidos naturales.

puede ser ocasionada por las condiciones de incubación diferentes a las que se presentan en los nidos del vivero y en los naturales.

La morfometría de los leucocitos presentó, en el grupo de los basófilos y de los trombocitos mayor tamaño en las células de crías de caja, en eosinófilos y linfocitos no se observan diferencias significativas.

El proceso de maduración normal de los leucocitos en reptiles muestra disminución progresiva del tamaño celular y de la basofilia citoplásmica, además condensación de la cromatina, este proceso se da de manera normal intravascularmente ⁽²⁴⁾, entonces podemos decir que células mas grandes en circulación indican menor grado de madurez

Los trombocitos y basófilos presentan tanto diferencias porcentuales como morfométricas en las dos condiciones estudiadas, se sabe que estos dos tipo celulares tienen relación con procesos hemostáticos, los cuales quizá se vean desfavorecidos en las crías de caja como los sugieren estos resultados.

De acuerdo a lo observado en los diferentes cortes de hueso, hígado y bazo, el desarrollo condroóseo observado en los cortes de hueso corresponde a lo descrito por Rhodin ⁽²⁵⁾, pero esto no indica que en médula ósea se lleve a cabo la formación de leucocitos como fue observado por nosotros; del mismo modo la ausencia de células de la línea roja en los cortes de bazo e hígado nos hacen inferir que sean otros los sitios de eritropoyesis, nuestros resultados sugieren que uno de estos sitios es el torrente sanguíneo. Comprobamos esto por la observación de formas mitóticas presentes en sangre circulante.

CONCLUSIONES

- Las células sanguíneas de las crías de tortuga Laúd, tienen la morfología que caracteriza a las células sanguíneas de los reptiles en general.
- La morfología de las células sanguíneas no presenta diferencia entre las crías provenientes de vivero y las de caja.
- Las crías incubadas en cajas de poliestireno, presentan mayor número de eritroblastos, sugiriéndose aumento en la eritropoyesis provocado por condiciones hipóxicas durante la incubación.
- Las células rojas maduras de las crías emergidas del vivero son de mayor tamaño que las células rojas de las crías de cajas.
- El número de eritrocitos maduros es mayor en sangre de las crías emergidas del vivero que en las crías incubadas en cajas.
- Se sugiere que las crías de cajas presentan un grado menor de desarrollo.
- Para poder establecer los parámetros hematológicos de esta especie es necesario

DESCRIPCION MORFOMETRICA DE LAS CELULAS SANGUINEAS EN CRÍAS RECIENTES NACIDAS DE LA TORTUGA MARINA *Dermochelys coriacea*
DURANTE LA TEMPORADA DE ANIDACION 1992 - 1993 EN EL PLAYON DE MEDIOBILLO, MICHOACAN, MEXICO.

Incrementar los muestreos y los análisis sanguíneos para estos organismos.

- Se sugiere montar un experimento para continuar esta investigación en el que se incluya un grupo control con crías eclosionadas en condiciones naturales.
- Es importante conocer los hábitos de buceo de las crías para saber de qué forma influyen las condiciones sanguíneas en este aspecto.

BIBLIOGRAFIA

1. ALTLAND, P.D. and THOMPSON E.C., 1958 Some factors affecting blood formation in turtles. *Proc. soc. Exp. Biol. Med.* 99: 455-459.
2. ALVARADO J., FIGUEROA, A. y H. GALLARDO 1985 Ecología y conservación de las Tortugas Marinas en Michoacán. México U.M.S.H. Cuaderno de Investigación
3. BACHERE, E. 1980 Recherches hemetologiques chez la tortue marine Chelonia mydas (L.) Océa Reunion Ph. D. Dissertation L'Institut National Polytechnique de Toulouse.
4. BARRAGAN, R. A.R., GAMEZ, L. GARCIA, N. HERNANDEZ, C. LOPEZ, C. ORDONEZ, C. SARTI, A.L. SANTAMARIA, F. 1993 Protección e investigación de algunos aspectos biológicos y reproductivos de las tortugas marinas en la zona sur de la costa michoacana, temporada de anidación 1992 - 1993. Informe final del proyecto. Laboratorio de Tortugas Marinas. Facultad de Ciencias U.N.A.M. México D.F.
5. BENANBIB, N. y CRUZ W.E. 1981 Las torugas Marinas en México. *naturaleza*. 3: 157 - 166.
6. BENABIB, M. 1985 Efectos de la temperatura de incubación, la posición del nido y fecha de incubación en la determinación del sexo de Dermochelys coriacea. Tesis M. en C., U.N.A.M. México 60 pp.

DESCRIPCIÓN MORFOMÉTRICA DE LAS CELULAS SANGUÍNEAS EN CRÍAS RECIENTE NACIDAS DE LA TORTUGA MARINA *Dermochelys coriacea*
DURANTE LA TEMPORADA DE ANIDACIÓN 1992 -1993 EN EL PLAYON DE MEDIGULLO, MICHOACÁN, MÉXICO.

7. BRONGERSMAN, L., 1968 Miscellaneous notes on turtles II A. V. 72, No. 1 1969. 76 - 90 pp.
8. BRONGERSMAN, L., 1981 Marine turtles of the Eastern Atlantic Ocean, 407 - 416 pp.
9. CHANG, P. R., 1989 Reporte de anidación de la tortuga Baula (*Dermochelys coriacea*) en la costa del Golfo de Montojo, República de Panamá, Noveno taller anual de conservación y biología de tortuga marina, Febrero 7 - 11 de 1989, Jekyll Island Georgia.
10. DAVIDSON I. y J. B. HEMRY 1979 Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6a. ed. Salvat Ed. España. 1484 pp.
11. DESSAUER, H.C. 1974 Plasma proteins of Reptilia. In Florin and Bradly Chemical Zoology. 9 (q. v.): 1987 - 216
12. DUGUY, R. 1970 Numbers of blood cells and their variation pp.93 - 109 In C. Gans and T.S. Parsons (Eds.) Biology of the Reptilia Vol. 3 Accademic Press. New York.
13. DUNCAN J.R. 1964 The effects of water table and tide cycle on swashback wash sediment distribution and beach profile development. Marine Geology 2(3): 183-197 pp.
14. ECKERT, K. y S. ECKERT, 1987 Environmental Unpredictability and Leatherback Sea Turtle (*Dermochelys coriacea*) nest loss. Herpetologica. 43(3) 315 - 317 pp.
15. ECKERT, S, ECKERT, K. PONGAINS, P. y G. KOOYMAN, 1989 Diving and foraging behavior of Leatherback sea turtle *Dermochelys coriacea*.

16. EMERY K.O. y J.F. FOSTER 1948 Water tables in marine beaches. *J. of Marine Research* VII (3): 644-654 pp.
17. FERN E. W. y G. K. EBANKS 1984 Blood cytology and hematology of the green sea turtle *Chelonia mydas*. *Herpetologica* 40(3), 331 - 336.
18. FRAIR, W. 1977 A Sea Turtle red blood cell parameters correlated with carapace lengths. *Comp. Biochem. Physiol.* 56A: 467 - 472.
19. FRAIR, W. 1977b Turtle red blood packed volumes, sizes and numbers. *Herpetologica*. 33: 167 - 190.
20. GARCIA, E. 1988 Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. 4ª Edición. México 217 pp.
21. GAUMER, A. E. y C. J. GOODNIGHT 1957 The haematology of turtles related to their activities. *Amer. Midland Naturalist*. 58:332 - 340 pp.
22. GENESER, F., 1993 Histología. Ed. Médica panamericana Argentina. 175 pp.
23. GRANT U.S. 1948 Influence of the water table on beach aggradation and degradation *Journal of Marine Research* VII (3) 655-660 pp.
24. HAWKEY, C. M. y T.B. DENNET 1989 Color atlas of comparative veterinary haematology. Wolfe Medical Publications Ltd. England 190 PP.
25. HEADY, J.M. y T. E. ROGERS 1962 Turtle blood cell morphology. *Proc. Iowa Acad. sci.* 69: 587 -590 pp.

26. HILLMAN, R., y C. FINCH, 1977 *Manual de Hematología. Ed. Manual Moderno, México, D.F. 317 pp.*
27. HOPKINS, S., MURPHY, T. STANSELL, K. y P. WILKINSON, 1978 Biotic and abiotic factors affecting nest mortality in the Atlantic loggerhead turtle.
28. INEGI Carta topográfica E 13887 Bahía de Bufadero. México.
29. MARQUEZ, R. 1990 FAO Species catalogue. vol. II. sea Turtles of the world. 81 pp.
30. MEINTS, R. H., GARVER, F.J. GERST, J.W. y D. W. McLAUGHLIN 1975 Erythropoietic activity in the turtle: the influence of hemolytic anemia, hypoxia and hemorrhage on hemopoietic function. *Comp. Biochem. Physiol.* 50A: 419- 422.
31. OWENS, D. W. M. and G.J. RUIZ 1980 New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica.* 36(1) 17 - 20 pp.
32. PAPPENHEIM 1909 citado en Saint Girons 1970.
33. PRITCHARD, P. BACON, P. BERRY, F. FLETMAYER, J. CARR, A., GALLAGER, R. y cols. 1982 *Manual sobre técnicas de investigación y conservación de la tortuga marina. Simposio sobre tortugas del Atlántico Occidental, WATS - Stao, San José, Costa Rica.*
34. RODHIN, A. G. J., OGDEN, J.A. y G.J. CONLONGUE. 1981 Chondro - osseous morphology of *Dermochelys coriacea* a marine reptile with mammalian skeletal features. *Nature.* Vol 290: 244 - 246 pp.
35. RODHIN, A.G.J. 1985 Comparative Chondro-osseous Development and growth of marine turtles. *Copeia.* 839 752-771 pp.

- 36.ROMANOWSKY, D.L. 1981 Zur frage der Parasitologie und therapie der Malaria Parasites. Pub. Health repots Wachr., 16:299-303 and 307-315. citado en : THOMPSON, S.W. 1966 *Selected histochemical and histopathological methods.* Charles C. Thomas publisher. U.S.A. 757-763 pp.
- 37.SAINT GIRONS M.C. y DUGUY, H. 1963 Notes de cytologie sanguine comparee sur les reptiles de France. *Bull. Soc. Zool. France* 88: 613 - 624pp.
- 38.SAINT GIRONS M.C. 1970 Morphology of the circulating blood cells p. 73-91 In C. gans and T.S. parsons (Eds.) *Biology of the Reptilia vol. 3 Accademic Press. New York.*
- 39.SARTI M.L., CABALLERO, E. CRUZ, M. SILVA C., I y A. URIBE, M. 1988. Diferentes técnicas de incubación de huevos de tortuga golfina Lepidochelys olivacea y laúd Dermochelys coriacea y el éxito de sobrevivencia de las crías en: *Memorias de resúmenes del VII encuentro Interuniversitario sobre Tortugas Marinas de México.* Celebrado del 6 al 9 de Junio de 1988 en Guadalajara, Jal. Fac. de Ciencias. Universidad de Guadalajara.
- 40.SCHWARTZ L. M. 1982 *The encyclopedia of beaches and coastal enviroments.* Hutchinson Ross Publishing Company. Stroudsburg Pennsylvania 854-855 pp.
- 41.SPECTOR, W.S. ed. 1956 *Turtle blood sizes and numbers.* In *Handbook of biological data,* W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- 42.TAYLOR, K. and H. KAPLAN 1961 *Light microscopy of the cell of Pseudemys Turtles.* *herpetologica.* 17: 186-192.
-