



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**PERFIL BIOQUÍMICO Y HEMATOLÓGICO DEL
COCODRILO DEL ORINOCO (*Crocodylus
intermedius*) Y TORTUGAS ACUÁTICAS
MANTENIDAS EN CONDICIONES *EX-SITU*.**

Cristian Camilo Rodríguez Almonacid

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2020

PERFIL BIOQUÍMICO Y HEMATOLÓGICO DEL COCODRILO DEL ORINOCO (*Crocodylus intermedius*) Y TORTUGAS ACUÁTICAS MANTENIDAS EN CONDICIONES *EX-SITU*.

Cristian Camilo Rodríguez Almonacid

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias - Biología.

Director (a):

Ph.D MSc Nubia Estela Matta Camacho

Codirector (a):

VMD Carlos Alfonso Moreno Torres

Línea de Investigación:

Hematología y bioquímica sérica de reptiles

Grupo de Investigación:

Caracterización inmunológica y genética

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2020

Por y para mi familia

Declaración de obra original

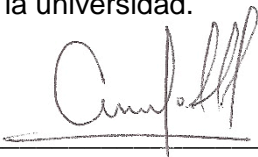
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Cristian Camilo Rodríguez Almonacid

Fecha 09/09/2020

Agradecimientos

Deseo expresar mis agradecimientos a los integrantes de mi familia, con especial énfasis a mis abuelitos, quienes desde el principio me han apoyado y han hecho parte vital en esta etapa de mi vida.

A mis tutores, los profesores Nubia Estela Matta y Carlos Alfonso Moreno, por su apoyo en el desarrollo de este proyecto de investigación y la confianza brindada. A la profesora Nubia Estela Matta, un agradecimiento especial por brindarme la oportunidad de hacer parte del grupo GERPH y permitirme hacer parte de esta nueva familia.

A mis compañeros del Grupo de Estudio Relación Parasito – Hospedero (GEPRH), con especial énfasis en Paola González, Carolina Vargas, Germán Gutierrez e Ingrid Lotta, por su apoyo y por ser una parte vital de este proceso, así como a mis compañeros del proyecto, Steven Barajas e Isaac Durán.

A la Dr. Lina Puentes, Dr. Victoria Rodríguez, el Dr. Miguel Nova, y los demás miembros de la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros de la Estación Biológica Tropical Roberto Franco, por su colaboración en la fase de campo en el manejo de los individuos analizados.

A los miembros del Laboratorio Clínico de la Clínica de Pequeños Animales de Universidad Nacional de Colombia, por su calidez y el apoyo brindado.

Resumen

Colombia es el cuarto país con la mayor diversidad de reptiles a nivel mundial. A pesar de esta riqueza y el importante papel ecosistémico de los reptiles, la sobreexplotación para el consumo, la destrucción y transformación de su hábitat y su extracción para el comercio de mascotas, han causado que gran parte esta biodiversidad y, especialmente tortugas y crocodilidos, se encuentren bajo alguna categoría de amenaza. Debido a estos factores, estos grupos de organismos son recurrentemente incautados y trasladados a centros de rescate y rehabilitación animal, donde se les brinda el cuidado medico necesario. Dentro de los exámenes clínicos rutinarios, los análisis de sangre constituyen una de las herramientas mas importantes para determinar el estado de salud de un organismo, sin embargo, la información base para interpretar estos resultados es escasa para animales silvestres. En este sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar los parámetros hematológicos y de química sérica del cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) y tortugas acuáticas de los géneros *Podocnemis* y *Trachemys* mantenidos en estado de cautiverio, con el fin de establecer intervalos de referencia que permitan ser usados en la interpretación clínica de los exámenes sanguíneos. Para esto, se tomaron muestras sanguíneas de individuos de las especies *Podocnemis unifilis*, *P. vogli*, *Trachemys callirostris* y *C. intermedius* mantenidos en cautiverio en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) y la Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF) de la Universidad Nacional de Colombia y se evaluaron diferentes parámetros hematológicos y de química sérica. Se establecieron los intervalos de referencia hematológicos y bioquímicos de las especies analizadas, y, para algunas especies, se logró demostrar diferencias significativas entre sexos y edades. Este estudio representa el primer acercamiento a establecimiento de parámetros hematológico para especies como *P. vogli* y *C. intermedius*, adicionalmente se realizan nuevos reportes hematológicos para *P. unifilis* y *T. callirostris*.

Palabras clave: Hematología, química sérica, Terecay, Galápago sabanero, Hicotea, Cocodrilo del Orinoco, Colombia, Intervalos de referencia

Abstract

Colombia ranks fourth in reptile biodiversity worldwide. Despite this biological richness and the important ecosystem role of reptiles, the overexploitation for consumption, the destruction and transformation of their habitats and their extraction for the pet trade, have caused that some reptile species, especially turtles and crocodilians, be included in any category of threat. Due to these factors, those groups of organisms are recurrently seized and transferred to animal rescue and rehabilitation centers, where necessary medical care is provided. Within routine clinical examinations, blood tests are one of the most important tools to determine the health status of an organism, however, the base information necessary to interpret these results, is scarce for wild animals. In this way, the objective of this study was to evaluate the hematological and serum chemistry parameters of the Orinoco crocodile (*Crocodylus intermedius*) and aquatic turtles of the *Podocnemis* and *Trachemys* genera kept in captivity, in order to establish the reference intervals that could be used in the clinical interpretation of blood tests. For this, blood samples were taken from individuals of the species *Podocnemis unifilis*, *P. vogli*, *Trachemys callirostris* and *C. intermedius* held in captivity at Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) and the Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF) of the Universidad Nacional de Colombia. Different hematological and serum chemistry parameters were evaluated. The hematological and biochemical reference intervals of the analyzed species were established, and, for some species, significant differences between sexes and ages were detected. This study represents the first hematological approach for species such as *P. vogli* and *C. intermedius*, additionally new hematological reports are made for *P. unifilis* and *T. callirostris*.

Keywords: Hematology, serum chemistry, Terecay, Savannah Galapago, Hicotea, Orinoco's crocodile, Colombia, Reference intervals

Contenido

	Pag.
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XVI
Introducción	19
Referencias	22
Objetivos	29
Objetivos específicos	29
Marco teórico.....	30
Reptiles de colombia.....	30
Orden testudines	30
Orden Crocodylia.....	35
Hematología de reptiles	37
Eritrocitos.....	38
Leucocitos.....	39
Trombocitos.....	42
Bioquímica sanguínea de reptiles.....	42
Parámetros bioquímicos del perfil renal.....	43
Parámetros del perfil hepático de los reptiles.....	45
Evaluación de las proteínas séricas o plasmáticas.....	46
Evaluación del metabolismo de la glucosa.....	47
Evaluación de daño muscular	48
Anticoagulantes.....	48
Referencias	49
1. Capítulo 1. Consideraciones para la venopunción y obtención de muestras para análisis hematológicos de tortugas de los géneros <i>Podocnemis</i>, <i>Trachemys</i> y <i>Chelonoidis</i>.....	54
1.1 Resumen	56
1.2 Introducción.....	57
1.3 Materiales y métodos.....	58
1.3.1 Aspectos éticos.....	58
1.3.2 Muestra	58
1.3.3 Evaluación de los puntos de venopunción.....	59
1.3.4 Almacenamiento de muestras sanguíneas de quelonios.....	61

1.4	Resultados.....	61
1.4.1	Evaluación de los puntos de venopunción.....	61
1.4.2	Almacenamiento de muestras sanguíneas.....	63
1.5	Discusión.....	64
1.6	Agradecimientos.....	69
1.7	Referencias.....	69
2.	Capítulo 2. Parámetros hematológicos y de química sanguínea de <i>Podocnemis vogli</i> (Müller, 1935) y <i>Podocnemis unifilis</i> (Troschel, 1848) en condiciones de cautiverio.....	73
2.1	Resumen.....	75
2.2	Introducción.....	75
2.3	Materiales y métodos.....	77
2.3.1	Consideraciones éticas.....	77
2.3.2	Población.....	78
2.3.3	Recolección de las muestras sanguíneas.....	78
2.3.4	Hematología.....	78
2.3.5	Bioquímica sérica.....	79
2.3.6	Análisis estadísticos.....	79
2.4	Resultados.....	80
2.4.1	Muestras.....	80
2.4.2	Hematología y química sanguínea.....	81
2.5	Discusión.....	87
2.6	Agradecimientos.....	93
2.7	Referencias.....	93
2.8	Anexos.....	97
3.	Capítulo 3. Hematología y química sérica de la tortuga hicoatea (<i>Trachemys callirostris callirostris</i>, Gray, 1855) en condiciones de cautiverio.....	105
3.1	Resumen.....	107
3.2	Introducción.....	107
3.3	Materiales y metodos.....	109
3.3.1	Consideraciones éticas.....	109
3.3.2	Localidades.....	109
3.3.3	Obtención de muestras sanguíneas.....	109
3.3.4	Análisis hematológico.....	110
3.3.5	Análisis de química sérica.....	110
3.3.6	Análisis estadístico.....	111
3.4	Resultados.....	112
3.4.1	Muestras.....	112
3.4.2	Análisis hematológico.....	112
3.4.3	Análisis estadísticos.....	113
3.5	Discusión.....	116
3.6	Agradecimientos.....	121
3.7	Referencias.....	121
3.8	Anexos.....	126

4. Capítulo 4. Hematology and biochemistry reference intervals, and morphological description of peripheral blood cells for captive <i>Crocodylus intermedius</i> (Graves, 1918) in Colombia.	135
4.1 Abstract	137
4.2 Introduction.....	137
4.3 Methods and materials.....	139
4.3.1 Ethical statements	139
4.3.2 Population.....	139
4.3.3 Sampling.....	140
4.3.4 Hematology.....	140
4.3.5 Serum chemistry analyses	141
4.3.6 Intraindividual analysis	141
4.3.7 Peripheral blood cell characterization	141
4.3.8 Statistical analysis	142
4.4 Results.....	142
4.4.1 Population.....	142
4.4.2 Hematology and serum chemistry analyses	143
4.4.3 Peripheral blood cell characterization	143
4.4.4 Intraindividual analysis	143
4.4.5 Correlations	144
4.5 Discussion	149
4.6 Acknowledgments	153
4.7 References	153
4.8 Supplementary material	158
5. Discusión general	165
5.1 Discusión	165
5.2 Referencias	169
6. Conclusiones y recomendaciones	171
6.1 Conclusiones.....	171
6.2 Recomendaciones	172
7. Anexos.....	175

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 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 *Podocnemis unifilis*, E. Localización de la vena yugular (Modificado de Innis & Knotek, 2020), F. Extracción de sangre a partir de la vena yugular en la tortuga de la especie *Trachemys callirostriscoccígea* dorsal, D. Extracción de sangre a partir de la vena coccígea dorsal en tortuga de la especie 60

Capítulo 2

Figura 2.1 Células de la sangre periférica de *Podocnemis vogli* con tinción de Wright. A: Eritrocito maduro; B: Policromatófilo; C: Heterófilo; D: Linfocito inmaduro; E: Basófilo; F: Eosinófilo; G: Monocito; H: Azurófilo-like; I: Trombocitos. Barra: 10 μm 83

Figura 2.2 Células de la sangre periférica de *Podocnemis unifilis* con tinción de Wright. A: Eritrocito maduro; B: Policromatófilo; C: Heterófilo; D: Linfocito maduro; E: Basófilo; F: Eosinófilo; G: Monocito; H: Azurófilo-like; I: Trombocitos. Barra: 10 μm 84

Figura 2.3 Estadios de *Haemocystidium pacayae* hallados en una tortuga de la especie *P. vogli* (EBT044). : Gametocito inmaduro; B: Microgametocito; C: Macrogametocito. Tinción de Giemsa. Barra: 10 μm 85

Capítulo 3

Figura 3.1 Células observadas en la sangre periférica de *Trachemys callirostris*. : Eritrocito maduro; B: Policromatófilo; C: Heterófilo; D: Eosinófilo; E: Linfocito; F: Monocito; G: Basófilo; H: Trombocitos. Tinción de Wright. Barra: 10 μm 113

Capítulo 4

- Figure 4.1** Peripheral blood cells of *Crocodylus intermedius*. A: Mature erythrocyte; B: Polychromatophil; C: Heterophil; D: Mature lymphocyte; E: Basophil; F: Eosinophil; G: Monocyte; H: Azurophil-like; I: Thrombocytes. Bar: 10 μm 146
- Figure 4.2** Thrombocytes of *Crocodylus intermedius* that showed an irregular appearance. Cytoplasm with the large colorless vacuole (arrowhead), note the deformed and slightly displaced nucleus (asterisk), and the normal coloration of thrombocyte cytoplasm. Bar: 10 μm 147
- Figure 4.3** Correlation dispersion displayed for A) ALT-ALP ($p < 0,05$, $\rho = 0,6353$); B) ALT-UA ($p < 0,01$, $\rho = 0,4716$); and C) AST-CK ($p = 0,0111$, $\text{cor} = 0,2998$) of *Crocodylus intermedius*, showing moderate correlation for A and B and low correlation for C. 147

Lista de tablas

Capítulo 1

Tabla 1.1 Ventajas y desventajas de los sitios de venopunción evaluados en las tres especies de tortugas..... 63

Tabla 1.2 Sangre de *Chelonoidis carbonaria* trascurridas 12 horas a partir del muestreo. A. Sangre anticoagulada con EDTA, B. Sangre anticoagulada con Heparina de sodio. Ningún tubo fue agitado previo a la fotografía 64

Capítulo 2

Tabla 2.1 Parámetros morfométricos de los Galápagos sabaneros (*Podocnemis vogli*) y Terecays (*Podocnemis unifilis*) en condiciones de cautiverio analizados en el presente estudio..... 81

Tabla 2.2 Valores hematológicos y de química sérica de los galápagos sabaneros (*P. vogli*, $n= 28$) 85

Tabla 2.3 Valores hematológicos y de química sérica de las tortugas Terecay (*P. unifilis*, $n= 21$) 86

Tabla 2.4 Parámetros hematológicos y de química sérica que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras de *Podocnemis vogli* y *P. unifilis*. 87

Capítulo 3

Tabla 3.1 Valores hematológicos y de química sérica de *Trachemys callirostris* muestreados en la Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF) 114

Tabla 3.2 Valores hematológicos y de química sérica de <i>Trachemys callirostris</i> muestreados en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS)	115
---	-----

Capítulo 4

Table 4.1 Hematological and biochemical reference values and reference intervals (RIs+ 90% IC) for <i>Crocodylus intermedius</i>	137
Table 4.2 Hematological and biochemical reference values and intervals for parameters with significant differences between groups.....	145
Table 4.3 Basic morphology and morphometric aspects for blood smears in <i>Crocodylus intermedius</i>	148

Listado de tablas suplementarias

Tabla suplementaria 2.1 Métodos de ensayo, precisión y calibración de los analitos utilizados	97
Tabla suplementaria 2.2 Comparación de los parámetros hematológicos y de química sérica entre sexos en <i>P. vogli</i>	98
Tabla suplementaria 2.3 Comparación de los parámetros hematológicos y de química sérica entre sexos en <i>P. unifilis</i>	99
Tabla suplementaria 2.4 Comparación de los valores hematológicos y de química sérica entre <i>P. vogli</i> y <i>P. unifilis</i> analizados en este estudio y otras especies de Podocnemididos.	100
Tabla suplementaria 2.5 Comparación de los valores hematológicos y de química sérica entre <i>P. vogli</i> y <i>P. unifilis</i> analizados en este estudio y otras especies de Podocnemididos.	102
Tabla suplementaria 3.1 Comparación de parámetros hematológicos y de química sérica entre grupos etarios (juveniles, adultos) de <i>Trachemys callirostris</i> muestreados en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) y la Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF).....	126
Tabla suplementaria 3.2 Comparación de los valores hematológicos y de química sérica entre <i>Trachemys callirostris</i> analizados en este estudio y otros estudios dentro del género	128
Tabla suplementaria 3.3 Comparación de parámetros hematológicos y de química sérica entre sexos de <i>Trachemys callirostris callirostris</i> presentes en la Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF).....	131
Tabla suplementaria 3.4 Comparación de parámetros hematológicos y de química sérica entre sexos de <i>Trachemys callirostris callirostris</i> presentes en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS).....	132

Supplementary table 4.1 Body weight (W; kg) and total length (L; cm) linear correlation for <i>Crocodylus intermedius</i> (n=41).	158
Supplementary table 4.2 P-values for intraindividual differences in <i>Crocodylus intermedius</i> with Wilcoxon or T-test. Significant differences as bold type letter.....	158
Supplementary table 4.3 P-values for sex and age differences in <i>Crocodylus intermedius</i> with Mann-Whitney test. Significant differences are highlighted with bold type numbers. Spaces without numeric values had insufficient data for comparison.	159
Supplementary table 4.4 Comparison between haematological and serum chemistry parameters between juveniles, females and males of <i>Crocodylus intermedius</i>	160
Supplementary table 4.5 Comparación de los valores hematológicos y de química sérica entre <i>Crocodylus intermedius</i> analizados en este estudio y otros crocodilidos dentro del mismo género	161

Introducción

Los reptiles constituyen un importante y abundante componente de muchos ecosistemas terrestres y acuáticos, teniendo papeles valiosos a nivel ecosistémico, incrementando la dinámica de los sedimentos en cuerpos de agua (bioturbación), actuando en el ciclado de nutrientes, polinización y dispersión de semillas (Cortes et al., 2014; Galindo-Urbe & Hoyos-Hoyos, 2007). De igual manera, también hacen parte activa de las cadenas tróficas, al ser presas y predadores de diversos organismos (Urbina-Cardona et al., 2015).

A pesar de su importante papel ecosistémico, estos organismos se encuentran en constante riesgo a causa de diversos factores, como pérdida de hábitat, degradación del suelo, introducción de especies invasoras, contaminación ambiental, tráfico ilegal y enfermedades (Gibbons et al., 2000; Urbina-Cardona et al., 2015). Adicionalmente, los reptiles sufren de grandes presiones antrópicas, ya que son capturados para ser consumidos, usados como mascotas o uso de su piel como materia prima; en otros casos, son sacrificados a causa del temor que generan sobre las comunidades (Moreno et al., 2016). Debido a esto, cerca de 1311 especies de reptiles a nivel mundial se encuentran bajo alguna categoría de amenaza (En peligro crítico [CR], En peligro [EN] y Vulnerable [VU]) en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (IUCN, 2019).

Colombia ocupa el cuarto puesto a nivel mundial en diversidad de reptiles, después de Australia, México y Brasil, contando con 627 especies registradas en el Reptile Database (Uetz et al., 2019). A pesar de esta alta diversidad, se estima que 44 especies de reptiles se encuentran bajo alguna categoría de amenaza: 1,7 % en peligro crítico (11 especies), 2,6 % en peligro (16 especies) y 2,7 % vulnerable (17 especies); donde las tortugas y los crocodilidos son los grupos más amenazados (Moreno et al., 2016), siendo el tráfico ilegal

una seria amenaza para los reptiles (Arroyave Bermúdez, 2015). Los reptiles son comercializados para su uso como fuente de alimento, mascotas, en la extracción de pieles y usos medicinales (Valencia-Aguilar et al., 2013). Adicionalmente, según la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), 39 especies de reptiles se encuentran relacionados en alguno de los tres apéndices de explotación y comercio internacional de especies silvestres en nuestro país (CITES, 2019).

En atención a esto, los centros de rehabilitación de fauna sometida al tráfico ilegal, además del cuidado y manejo médico, nutricional y biológico de estos animales, desarrollan programas de concientización y conservación de estas especies, al igual que planes de liberación. La evaluación médica de estos organismos es útil para conocer su estado de salud en cautiverio, y en el caso de los organismos recién extraídos, evaluar el estado de salud del ecosistema en el cual habitaba, por lo cual su estudio puede ser muy informativo para el seguimiento y control de potenciales enfermedades emergentes. Sin embargo, el conocimiento base necesario para interpretar los resultados obtenidos a partir de exámenes clínicos es escaso, por lo cual, se dificulta el diagnóstico acertado de posibles alteraciones fisiológicas consecuencia de enfermedades e infecciones subpatentes (Ryser-Degiorgis, 2013).

Dentro de los exámenes médicos rutinarios, los análisis sanguíneos son una fuente importante de información, indicando alteraciones fisiológicas, hepáticas o renales como consecuencia de heridas, enfermedades e infecciones, permitiendo determinar el estado de salud del individuo y, de esta manera, proponer el mejor tratamiento. A pesar de su importancia, muchas especies de vida silvestre no cuentan con intervalos de referencia de parámetros hematológicos y bioquímicos, y la extrapolación de estos resultados con valores establecidos para otras especies, puede conllevar a conclusiones erróneas acerca del estado de salud de un organismo (Ryser-Degiorgis, 2013). Por otra parte, en el caso de los reptiles, a pesar de las metodologías planteadas por diferentes investigadores (Redrobe & MacDonald, 1999; Sykes & Klaphake, 2015), la toma de muestra sanguínea se dificulta debido a que las venas no son fácilmente observables y la cercanía de éstas al

sistema linfático conlleva a que las muestras se hemodiluyan con linfa, afectando los valores hematológicos y de química sanguínea (Campbell, 2014); de igual manera, acorde a observaciones previas en nuestro grupo de investigación, la metodología de extracción de muestras sanguíneas de estos organismos puede variar dependiendo de la especie; en este sentido, la estandarización en la toma de muestras sanguíneas de calidad y la medición de los parámetros hematológicos y bioquímicos de la sangre de reptiles de vida silvestre de nuestro país, se convierte en una necesidad.

La información base disponible con respecto a los intervalos de referencia hematológicos y bioquímicos de sangre de reptiles son escasos; se han reportado los valores de referencia para algunas especies, principalmente aquellas que son usadas comúnmente como mascotas y de las cuales se tiene especial interés veterinario (Mader, 2006). En este sentido, los testudínidos son el grupo más investigado con respecto a estos parámetros en comparación con otros grupos de reptiles, sin embargo, estos estudios han sido realizados principalmente en regiones biogeográficas como la paleártica, neártica o etíope, donde las especies estudiadas, al igual que las condiciones ambientales y latitudinales, son diferentes (Andreani et al., 2014; Kelly et al., 2015; Lovely, Pittman, & Leslie, 2007)

A nivel del neotrópico el panorama es menos alentador, ya que estos estudios se restringen a algunas especies de tortugas como *Podocnemis expansa* (Martínez et al., 2007; Oliveira-Júnior et al., 2009; Rossini et al., 2012; Tavares-Dias et al., 2009), *Podocnemis unifilis* (Rojas & Varillas, 2013), *Phrynops geoffroanus* (Ferronato et al., 2009), *Eretmochelys imbricata* (Muñoz-Pérez et al., 2017), *Chelonoidis chathamensis* (Lewbart et al., 2018) y *C. denticulata* (Cabrera et al., 2011), y crocodilidos como *Caiman latirostris* (Zayas et al., 2011), *Crocodylus intermedius* (Manzanilla et al., 2011), *Caiman yacaré* (Koza et al., 2012) y *Caiman crocodilus* (Carlos Erazo et al., 2017; Grijalba Otálora et al., 2020). En Colombia solo se han reportado estudios hematológicos de tortugas de la especie *Trachemys callirostris* (Arcila, 2005; Carrascal et al., 2014), mientras que otras especies como *Podocnemis unifilis*, *P. expansa* o *Crocodylus intermedius*, al estar bajo categorías de amenaza y siendo sujetos de diferentes programas de conservación a nivel nacional, no cuentan con esta información.

Establecer intervalos de referencia hematológicos y de bioquímica de plasma y suero en reptiles y otros ectotermos es complejo debido a las profundas adaptaciones fisiológicas que pueden presentar en respuesta a un gran número de factores intrínsecos y extrínsecos (Campbell, 2015). Para el establecer estos intervalos se requiere un gran número de individuos que difícilmente pueden ser obtenidos a nivel silvestre, por lo cual, el análisis de estos parámetros en individuos en condiciones de cautiverio puede ser informativo y brindar herramientas al momento de analizar individuos silvestres o que han sido extraídos de su medio natural. Es importante resaltar que el procesamiento de muestras sanguíneas para análisis hematológicos en reptiles es engorroso, debido a que la medición de estos parámetros debe realizarse de forma manual, pues las células sanguíneas de estos organismos poseen núcleo, lo que impide la medición acertada en equipos automatizados.

En este sentido, debido a la carencia de información hematológica y de química sanguínea en los reptiles colombianos y los conocidos inconvenientes para obtener muestras óptimas para el estudio hematológico y bioquímico, se propone en el presente estudio estandarizar la toma de muestras sanguíneas en diferentes especies de quelonios, incluyendo variables como el sitio de venopunción y anticoagulante usado; por otro lado se propone determinar los intervalos de referencia para diferentes especies de reptiles, como *Crocodylus intermedius*, *Podocnemis vogli*, *P. unifilis* y *Trachemys callirostris*. Esta información es importante para conocer el estado de salud de estos organismos, permitirá tener un referente base para el diagnóstico y tratamiento de los organismos sometidos al tráfico ilegal y posibilitará la toma de decisiones en pro de la conservación de estas especies.

Referencias

- Andreani, G., Carpenè, E., Cannavacciuolo, A., Di Girolamo, N., Ferlizza, E., & Isani, G. (2014). Reference values for hematology and plasma biochemistry variables, and protein electrophoresis of healthy Hermann's tortoises (*Testudo hermanni* ssp.). *Veterinary Clinical Pathology*, 43(4), 573–583. <https://doi.org/10.1111/vcp.12203>
- Arcila, V. H. (2005). Hematología y química sérica en hembras quelonios

- (*Trachemys scripta callirostris*) en la ribera del río Lebrija, Puerto Wilches (Santander) Parte I. *Spei Domus*, 1(2).
- Arroyave Bermúdez, F. J. (2015). *El tráfico ilegal de reptiles en Colombia: una aplicación del análisis de redes a las relaciones ambientales*. Universidad Nacional de Colombia.
- Cabrera, M., Li, O., Gálvez, H., Sánchez, N., & Rojas, G. (2011). Valores hematológicos de la tortuga motelo (*Geochelone denticulata*) mantenida en cautiverio. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 22(2), 144–150.
- Campbell, T. W. (2014). Clinical Pathology. En D. R. Mader & S. J. Divers (Eds.), *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery* (1° ed., p. 462). <https://doi.org/10.1016/C2010-0-67117-3>
- Campbell, T. W. (2015). *Exotic Animal Hematology and Cytology* (Fourth Edi). <https://doi.org/10.1002/9781118993705>
- Carlos, N., Nuñez, Y., Quispe, D., & Capuñay, C. (2017). Valores Hematológicos y Bioquímica Sérica del Caimán Blanco (*Caiman crocodilus*) de Vida Libre en Madre de Dios, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(1), 189. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i1.11745>
- Carrascal, J., Negrete, H., Rojano, C., Álvarez, G., Chacón, J., & Linares, J. (2014). Caracterización hematológica de hicoteas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (28), 43. <https://doi.org/10.19052/mv.3180>
- CITES. (2019). Checklist of CITES species. Recuperado el 12 de mayo de 2019, de <https://cutt.ly/lpJqo0G>
- Cortes, A. M., Ruiz-Agudelo, C. A., Valencia-Aguilar, A., & Ladle, R. J. (2014). Ecological functions of neotropical amphibians and reptiles: a review. *Universitas Scientiarum*, 20(2), 229. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-2.efna>

- Ferronato, B. O., Genoy-puerto, A., Piña, C. I., Souza, F. L., Verdade, L. M., & Matushima, E. R. (2009). Notes on the hematology of free-living *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in polluted rivers of Southeastern Brazil. *Zoologia (Curitiba)*, 26(4), 795–798.
- Galindo-Uribe, D., & Hoyos-Hoyos, J. M. (2007). Relaciones Planta - Herpetofauna : Nuevas Perspectivas Para La Investigación. *Universitas Scientiarum*, 12(1), 9–34.
- Gibbons, J. W., Scott, D. E., Ryan, T. J., Buhlmann, K. A., Tuberville, T. D., Metts, B. S., ... Winne, C. T. (2000). The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians. *BioScience*, 50(8), 653–666.
- Grijalba Otálora, J. V., Forero Rojas, E. J., Contreras, A. F., Vargas, J. C., Andrade, R. J., & Andrade, R. J. (2020). Determination of Hematological Values of Common Crocodile (*Caiman crocodilus fuscus*) in Captivity in the Magdalena medio of Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 75–81. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.76045>
- IUCN. (2019). Status category summary by major taxonomic group. Recuperado el 20 de marzo de 2019, de RedList website: <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics>
- Kelly, T. R., McNeill, J. B., Avens, L., Hall, A. G., Goshe, L. R., Hohn, A. A., ... Harms, C. A. (2015). Clinical pathology reference intervals for an in-water population of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in Core Sound, North Carolina, USA. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115739>
- Koza, G. A., Mussart, N. B., Barboza, N. N., & Coppo, J. A. (2012). Respuesta bioquímica y morfométrica a la incorporación de pescado , pollo y carne vacuna en la dieta de *Caiman yacare* en cautiverio. *Revista veterinaria*, 23(2), 110–115.

- Lewbart, G. A., Griffioen, J. A., Savo, A., Muñoz-Pérez, J. P., Ortega, C., Loyola, A., ... Páez-Rosas, D. (2018). Biochemistry and hematology parameters of the San Cristóbal Galápagos tortoise (*Chelonoidis chathamensis*). *Conservation Physiology*, 6(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/coy004>
- Lovely, C. J., Pittman, J. M., & Leslie, A. J. (2007). Normal haematology and blood biochemistry of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the Okavango Delta, Botswana. *Journal of the South African Veterinary Association*, 78(3), 137–144. <https://doi.org/10.4102/jsava.v78i3.305>
- Mader, D. R. (2006). *Reptile medicine and surgery*. Saunders Elsevier.
- Manzanilla, A., Seijas, A., & Rossini, M. (2011). Valores hematológicos en ejemplares jóvenes de caimán del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) en Venezuela. *Revista Científica*, XXI(No 4), 360–356.
- Martínez, E., Hernández, O., Boede, E., Peñaloza, C., & Rodríguez, A. (2007). Inventario de la Tortuga Arrau, *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) en Zoológicos de Venezuela. Valores Referenciales del Hemograma y la Bioquímica Sérica. *Revista Científica*, XVII(5), 433–440.
- Moreno, L. A., Andrade, G. I., & Ruíz-Contreras, L. F. (2016). *Biodiversidad 2016. Estado y tendencias de la biodiversidad continental de Colombia*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Muñoz-Pérez, J. P., Lewbart, G. A., Hirschfeld, M., Alarcón-Ruales, D., Denking, J., Castañeda, J. G., ... Lohmann, K. J. (2017). Blood gases, biochemistry and haematology of Galápagos hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*). *Conservation Physiology*, 5(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/cox028>
- Oliveira-Júnior, A. A., Tavares-Dias, M., & Marcon, J. L. (2009). Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood

- cells. *Research in Veterinary Science*, 86(1), 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.05.015>
- Redrobe, S., & MacDonald, J. (1999). Sample Collection and Clinical Pathology of Reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 2(3), 709–730. [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30118-4](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30118-4)
- Rojas, G., & Varillas, L. (2013). Hemograma de la Tortuga Taricaya (*Podocnemis unifilis*). *Hospitales veterinarios*, 5(1), 13–15.
- Rossini, M., Blanco, P. A., Marín, E., Comerma-steffensen, S., & Zerpa, H. (2012). Research in Veterinary Science Haematological values of post-laying Arrau turtle (*Podocnemis expansa*) in the Orinoco River, Venezuela. *Research in Veterinary Science*, 92(1), 128–131. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.026>
- Ryser-Degiorgis, M.-P. (2013). Wildlife health investigations: needs, challenges and recommendations. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 223. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-223>
- Sykes, J. M., & Klaphake, E. (2015). Reptile Hematology. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(3), 661–680. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.014>
- Tavares-Dias, M., Oliveira-Junior, A. A., Silva, M. G., Marcon, J. L., & Barcellos, J. F. M. (2009). Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the Amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Veterinarski Arhiv*, 79(6), 601–610.
- Uetz, P., Freed, P., & Hošek, J. (2019). The Reptile Database. Recuperado el 13 de junio de 2019, de <http://www.reptile-database.org>
- Urbina-Cardona, N., Bernal, E., Giraldo-Echeverry, N., & Echeverry-Alcenda, A. (2015). El monitoreo de Herpetofauna en los procesos de restauración ecológica: indicadores y métodos. En *Monitoreo a procesos de restauración ecológica aplicado a ecosistemas terrestres* (p. 250). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4400.7129>

-
- Valencia-Aguilar, A., Cortés-Gómez, A. M., & Ruiz-Agudelo, C. A. (2013). Ecosystem services provided by amphibians and reptiles in Neotropical ecosystems. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management*, 9(3), 257–272. <https://doi.org/10.1080/21513732.2013.821168>
- Zayas, M. A., Rodríguez, H. A., Galoppo, G. H., Stoker, C., Durando, M., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2011). Hematology and Blood Biochemistry of Young Healthy Broad-Snouted Caimans (*Caiman latirostris*). *Journal of Herpetology*, 45(4), 516–524. <https://doi.org/10.1670/10-158.1>

Objetivos

Evaluar los parámetros hematológicos y de química sanguínea del cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) y tortugas acuáticas de los géneros *Podocnemis* y *Trachemys* mantenidos en condiciones ex-situ.

Objetivos específicos

- Estandarizar la metodología de recolección de muestras sanguíneas en tortugas de las especies *Trachemys callirostris*, *Podocnemis unifilis* y *Podocnemis vogli*.
- Determinar los parámetros hematológicos como hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos blancos y rojos y recuento diferencial de leucocitos de las especies muestreadas.
- Evaluar parámetros bioquímicos del perfil hepático y renal, y las concentraciones de glucosa, colesterol y proteínas totales en sangre de los individuos muestreados.
- Determinar intervalos de referencia de los parámetros evaluados en *Crocodylus intermedius*, *Podocnemis unifilis*, *P. vogli* y *Trachemys callirostris* mantenidos en condiciones ex-situ.
- Determinar si la presencia de hemoparásitos influye sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos analizados.

Marco teórico

Reptiles de Colombia

Colombia ocupa el cuarto puesto a nivel mundial en relación a diversidad y riqueza de reptiles con 617 especies reportadas, distribuidas en los órdenes Squamata (93,34%), Testudines (5,67%) y Crocodylia (0,97%) (Uetz, Freed, & Hošek, 2019). Los escamados o Squamata están representados por 258 especies de lagartos y 318 especies de serpientes, donde los lagartos se agrupan en 50 géneros y 14 familias, mientras que las serpientes se agrupan en 77 géneros y 10 familias. Por otra parte, los Testudines están conformados por 35 especies, agrupados en 17 géneros y 8 familias, mientras que los Crocodylia se componen de 6 especies agrupados en cuatro géneros y dos familias.

Orden testudines

Familia Podocnemididae

La familia Podocnemididae se compone de ocho especies distribuidas en tres géneros: *Podocnemis*, que incluye seis especies; *Erymnochelys* y *Peltocephalus*, con una especie cada uno. Todas las especies pertenecientes a los géneros *Podocnemis* y *Peltocephalus* se distribuyen al norte de Suramérica, específicamente en la región Amazónica, Llanos Orientales y valles del Magdalena y el Sinú en Colombia. Todos los miembros de la familia se distribuyen en Colombia, a excepción de la especie *Erymnochelys madagascariensis*, el cual se restringe a la isla de Madagascar (Páez, Morales-Betancourt, Lasso, Castaño-Mora, & Bock, 2012).

Los podocnemididos son tortugas moderadamente grandes, teniendo un largo de caparazón (LC) entre 20-25 cm (machos adultos de *Podocnemis erythrocephala*) a 80 cm (hembras adultas de *Podocnemis expansa*); están adaptadas a la vida acuática, por lo cual, su caparazón es aplanado e hidrodinámico, los ojos y las narinas están posicionados dorsalmente en el cráneo y poseen los miembros anteriores y posteriores completamente palmeados (Vitt & Caldwell, 2014). De igual manera, los podocnemididos se caracterizan por retraer el cuello de forma lateral (Pleurodira), no poseer un escudo nucal y por tener el dorso de la cabeza cubierto de escamas grandes y yuxtapuestas (Rueda-Almonacid et al., 2007)

Podocnemis unifilis

Morfología: Conocidas también como Terecay o Charapa, son tortugas dulceacuícolas con un tamaño medio de 40 cm y un peso aproximado de 5 a 12 kg para las hembras y un máximo de 4,5 kg para los machos. Morfológicamente se caracterizan por poseer el caparazón convexo y ovalado alcanzando su máxima anchura a nivel medio, posee 24 escudos marginales, cinco vertebrales y ocho costales, escudo nucal ausente, plastrón con 13 escudos incluyendo el intergular; adicionalmente, las poblaciones del Orinoco se caracterizan por poseer una o dos bárbulas, mientras que las poblaciones del Amazonas poseen dos bárbulas (Morales-Betancourt, Lasso, Páez, & Bock, 2015; Rueda-Almonacid et al., 2007). Las hembras poseen escamas en la cabeza de color marrón claro tanto dorsal como lateralmente, mientras que los machos tienen escamas más oscuras y retienen las manchas amarillas (aunque menos brillantes) típicas de los neonatos y juveniles; adicionalmente, el iris es negruzco en las hembras y verde-amarillento en machos juveniles (Rueda-Almonacid et al., 2007).

Distribución: Dentro de los miembros de la familia Podocnemididae, *Podocnemis unifilis* es la que presenta la distribución más amplia, encontrándose en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana, Guyana Francesa, Perú, Surinam y Venezuela; habitando las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco, y las subcuencas Apaporis, Atacuari, Caguán, alto y bajo Caquetá, alto y bajo Putumayo, Yarí (Amazonas) Arauca, Bitá, Casanare, Guainía, Guaviare, Inírida, alto y bajo Meta, Vaupés, Tomo, Vichada (Orinoco). En Colombia se

distribuye por los departamentos de Amazonas, Arauca, Caquetá, Guainía, Meta, Putumayo, Vaupés y Vichada (Páez et al., 2012)

Hábitat: Generalmente habita en caños secundarios tributarios de grandes ríos, sin mostrar preferencias por aguas negras o blancas. En época lluviosa migran hacia madrevejas, lagos y bosques inundados, donde los ejemplares inmaduros permanecen por largos periodos de tiempo, mientras que en verano, cuando es la época de anidamiento, habitan los grandes ríos (Rueda-Almonacid et al., 2007). La postura generalmente se da en playas en una gran variedad de sustratos, como arena, arcilla, greda, limo y gravilla (Morales-Betancourt et al., 2015).

Estatus ecológico y amenazas: Esta especie se encuentra catalogada dentro la categoría de En Peligro (EN) según el Libro Rojo de Reptiles de Colombia (Morales-Betancourt et al., 2015), sin embargo, según la RedList de la IUCN (v.2019) se encuentra dentro de la categoría de Vulnerable (VU) (IUCN, 2019) y adicionalmente, se clasifica dentro del apéndice II del CITES (CITES, 2019). La principal amenaza para esta especie es la explotación comercial y el consumo masivo de huevos, juveniles y adultos; esto se ve reflejado en las estadísticas de decomisos, ya que es la segunda especie más decomisada a nivel nacional y la primera en su área de distribución (Páez et al., 2012). Entre otras amenazas que afectan a los individuos de esta especie se incluyen la utilización de las playas por la expansión de la frontera agropecuaria, la pesca con mallas de ahorque, la construcción de represas hidroeléctricas o la contaminación de los ríos (Alho, 2011; Páez et al., 2012).

Podocnemis vogli

Morfología: Esta especie es conocida comúnmente como tortuga sabanera, se caracterizan por ser de tamaño pequeño, con una longitud media de 23 cm y máxima de 36 cm en el caso de las hembras, y de 17 cm y un máximo de 26 cm en los machos. El peso promedio de las hembras es de 2 kg, mientras que el de los machos es de 860 g. En estado adulto se caracterizan por poseer un caparazón liso, café claro a oscuro, en forma

oval y aplanado, no expandido posteriormente y ligera indentación nugal; poseen cinco placas vertebrales, cuatro pares de costales y 12 pares de marginales. Poseen dos a tres barbicelos mentonianos (Páez et al., 2012; Rueda-Almonacid et al., 2007). La cabeza de los adultos es color café, sin manchas claras (amarillas o blancas) sobre la escama interparietal, sin embargo, los jóvenes si poseen dichas coloraciones. (Páez et al., 2012).

Distribución: Se distribuye por Colombia y Venezuela. En Colombia se encuentra en los departamentos de Arauca, Casanare, Guaviare, Meta y Vichada. Habita principalmente la cuenta del Orinoco y las subcuencas Arauca, Casanare, Guaviare, Meta, Tomo, Bitá, Inírida y Vichada (Páez et al., 2012).

Hábitat: *Podocnemis vogli* habita principalmente en cuerpos lenticos, como lagunas, morichales, jagueyes, esteros, remansos y pequeños charcos y caños de las sabanas del Orinoco. Prefiere cuerpos de agua pequeños y poco profundos, con aguas turbias, fondos limosos y poca vegetación acuática (Rueda-Almonacid et al., 2007).

Estatus ecológico y amenazas: Esta especie se encuentra dentro de la categoría de Preocupación menor (LC) en el libro rojo de reptiles de Colombia (Morales-Betancourt et al., 2015), no se encuentra bajo alguna categoría dentro del IUCN y se ubica en el apéndice II del CITES (CITES, 2019). A pesar de que las poblaciones silvestres son numerosas, están siendo diezmadas debido a la reducción de poblaciones de tortugas más grandes.

Familia Emydidae

Esta familia se distribuye a través de Europa, Asia, África y América. Se compone de dos subfamilias: Emydinae y Deirochelyinae, repartidas en 10 géneros y 51 especies. El género *Trachemys* es el más diverso, con 16 especies descritas que se distribuyen desde el norte de Estados Unidos hasta Argentina. Los individuos de esta familia se caracterizan por poseer una cabeza lisa con pequeñas escamas divididas sobre la nuca y poseer escamas

en los miembros anteriores planas y yuxtapuestas. Su caparazón es bajo y arqueado, y el plastrón es grande y bien desarrollado. De igual manera, esta es una de las familias de tortugas más diversa, incluyendo especies acuáticas, semiacuáticas y terrestres, encontrándose en aguas salobres, ríos, lagos, caños y pantanos, hasta regiones áridas como los desiertos (Páez et al., 2012)

Trachemys callirostris

Morfología: También conocida como hicotea, esta es una especie de tortuga semiacuática, de tamaño moderado, pero que no sobrepasa los 35 cm, de igual manera puede alcanzar los 7 kg (Páez et al., 2012). Se caracteriza por poseer el iris amarillo y cabeza verde oliva, ornamentada con cintas longitudinales amarillas y manchas redondeadas amarillas sobre el mentón y mandíbulas (Rueda-Almonacid et al., 2007). La cabeza es grande, dorsalmente plana o cóncava, con hocico cónico, adicionalmente posee una ancha banda postorbital de color naranja o rojiza, que siempre está separada del borde del ojo; el caparazón es más ancho al nivel de las escamas marginales VII y VIII y más alto a nivel de la escama vertebral III, posee cinco escamas vertebrales, cuatro escamas pareadas costales y 12 escamas pareadas marginales, el plastrón es ancho y plano y con una muesca posterior (Páez et al., 2012). Los recién nacidos poseen una coloración más vivida y el plastrón tiene un color amarillo con un complejo patrón verde oscuro que se desvanece a medida que la tortuga envejece (Rueda-Almonacid et al., 2007).

Distribución: *T. callirostris* se distribuye por Colombia y Venezuela; en Colombia habita los departamentos de Antioquia, Atlántico, Bolívar, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, La Guajira, Magdalena, Santander y Sucre. Asimismo, habita las cuencas Caribe y Magdalena y las subcuencas Caribe (bajo río Sinú) (Castaño-M. 2002); Magdalena (bajo Cauca, San Jorge) (Páez et al., 2012).

Hábitat: La hicotea es generalista, puede ocupar cuerpos permanentes de aguas lóxicas de poca corriente o lenticas en zonas abiertas de elevaciones bajas (Páez et al., 2012). A pesar de esto prefiere vivir en las ciénagas de grandes ríos, con abundante vegetación

sumergida y flotante, así como ríos con sitios donde asolearse, con pastizales y pajonales ribereños donde pueda hacer sus nidos (Rueda-Almonacid et al., 2007).

Estatus ecológico y amenazas: En Colombia se encuentra categorizada como Vulnerable (VU), sin embargo, no se encuentra categorizada por el IUCN ni se encuentra en algún apéndice del CITES (Morales-Betancourt et al., 2015). La principal amenaza es la explotación comercial para el consumo humano, principalmente en época de cuaresma, de igual manera, miles de crías son capturadas para ser comercializadas como mascotas.

Orden Crocodylia

Este orden se compone por 23 especies en todo el mundo, agrupados en ocho géneros y tres familias: Crocodylidae, Alligatoridae y Gavialidae. Los crocodilidos habitan la mayor parte de los estuarios dulces o salobres, ríos y zonas pantanosas de todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rueda-Almonacid et al., 2007). Filogenéticamente están más estrechamente relacionados con las aves que con los saurios, compartiendo estructuras como una molleja muscular, adicionalmente construyen nidos y tienen cuidado parental. Los representantes de este orden poseen una cubierta protectora ósea u osteodermo, que se encuentra inmersa dentro de la piel. A diferencia de los saurios, los crocodilianos se caracterizan por presentar dientes visibles cuando la boca está cerrada y tener una abertura cloacal dispuesta longitudinalmente en la base de la cola (Rueda-Almonacid et al., 2007). En Colombia, solo se distribuyen seis especies de crocodilianos, los cuales se agrupan en cuatro géneros y dos familias, siendo junto con Brasil, los países con el mayor número de especies (Morales-Betancourt, Lasso, De La Ossa, & Fajardo-Patiño, 2013).

Familia Crocodylidae

En Colombia, la familia Crocodylidae está compuesta por el único género *Crocodylus* y dos especies: *Crocodylus intermedius* (cocodrilo del Orinoco) y *Crocodylus acutus* (caimán aguja). El cocodrilo del Orinoco, haciendo referencia a su nombre, es endémico de la

cuenca del Orinoco, mientras que el caimán aguja se distribuye por las cuencas del Caribe, Magdalena y Pacífico (Rueda-Almonacid et al., 2007).

Crocodylus intermedius

Morfología: Conocido comúnmente como caimán llanero, caimán del Orinoco o cocodrilo del Orinoco, son crocodilidos de gran tamaño, alcanzando una longitud máxima registrada de 6,78 metros en machos y 3,5 metros en hembras. La cabeza es larga y delgada, con el hocico muy estrecho, sin elevación preocular sobre el hocico, con forma cóncava a nivel de los dientes 4 a 7. El cuarto diente mandibular coincide con una hendidura en la maxila, quedando siempre descubierto aun cuando la boca está cerrada. Poseen una hilera de dos a seis (generalmente cuatro) placas post-occipitales, elípticas y aquilladas, seis placas cervicales elevadas de forma cuadrada-trapezoidal o elíptica, dispuestas en dos hileras y rodeadas por numerosas placas más pequeñas de forma ovalada. Las escamas del vientre carecen de osteodermos, pero poseen órganos sensoriales integumentarios dispuestos en 20 a 30 filas transversales. El color del dorso es gris claro en juveniles y grisáceo, amarillento o gris oscuro a negruzco en adultos, región ventral blanca, desde el hocico hasta el orificio anal, mientras que la cola presenta manchas oscuras (Morales-Betancourt et al., 2013; Rueda-Almonacid et al., 2007).

Distribución: El caimán llanero se distribuye a través de Colombia y Venezuela, sobre la cuenca del Orinoco y las subcuencas Arauca, Ariari, Ariporo, Bitá, Casanare, Cinaruco, Cravo Norte, Cravo Sur; Cuiloto, Cunimía, Cusiana, Duda, Ele, Elvita, Guachiría, Guarrojo, Guaviare, Guayabero, Güejar, Inírida, Lipa, Lozada, Manacacías, Meta, Muco, Orinoco (cauce principal), Planas, Pauto, Tomo, Tuparro, Uva, Vichada (Morales-Betancourt et al., 2013).

Hábitat: Generalmente se encuentra en los cursos de aguas de tierras bajas de la cuenca del Orinoco, presentando una mayor abundancia hasta una altura máxima de 400 m.s.n.m (Antelo, Ayarzagüena, & Castroviejo, 2008; Morales-Betancourt et al., 2013). Los individuos adultos generalmente prefieren aguas alejadas de la orilla, mientras que los

subadultos suelen preferir hábitats cubiertos por vegetación acuática, la cual usan como protección (Antelo et al., 2008; Morales-Betancourt et al., 2013). Los neonatos por su parte, ocupan áreas cercanas a los ríos, de aguas tranquilas y cubiertas por vegetación acuática o ribereña (Antelo et al., 2008).

Estatus ecológico y amenazas: *Crocodylus intermedius* se encuentra categorizado como en estado Crítico (CR) según el Libro Rojo de los Reptiles de Colombia y la Red List de la IUCN (IUCN, 2019; Morales-Betancourt et al., 2015); de igual manera, se encuentra dentro del apéndice I del CITES (CITES, 2019). A inicios del siglo XX la densidad poblacional de esta especie se vio reducida a causa de la cacería para la exportación de pieles (Morales-Betancourt et al., 2013). En la actualidad, la principal amenaza para esta especie es la caza dirigida ante el temor de un posible ataque a las poblaciones humanas o de animales domésticos; adicionalmente, el uso inadecuado de las redes de pesca causa la muerte accidental de estos individuos, sin mencionar que se presenta la extracción de los huevos para el consumo y la captura de crías para la venta como mascotas (Morales-Betancourt et al., 2015).

Hematología de reptiles

Los análisis hematológicos son una herramienta de gran importancia que permite detectar alteraciones en los componentes de la sangre, los cuales pueden ser causados por enfermedades o agentes patógenos. Este tipo de análisis clínico ha adquirido relevancia a nivel veterinario, especialmente al evaluar animales silvestres, los cuales pueden habitar hogares como mascotas, o estar presentes en zoológicos, parques de vida silvestre o centros de rehabilitación. Los reptiles no son la excepción a este tipo de análisis, siendo incluso objeto de estudio en valoraciones de salud e investigaciones de enfermedades a nivel silvestre (Stacy, Alleman, & Sayler, 2011).

La evaluación hematológica de rutina en reptiles incluye la determinación del hematocrito, concentración de hemoglobina, conteo de glóbulos rojos, índices eritrocitarios, conteo de

glóbulos blancos, conteo diferencial de leucocitos y valoración de la morfología celular (Nardini, Leopardi, & Bielli, 2013; Stacy et al., 2011), permitiendo detectar condiciones como anemia, enfermedades inflamatorias, parasitemias, desordenes hematopoyéticos y alteraciones hemostáticas (Nardini et al., 2013).

Los valores hematológicos pueden variar ampliamente en los reptiles, debido factores extrínsecos e intrínsecos. Dentro de los factores intrínsecos se incluye la especie, sexo, edad y estado fisiológico, mientras que los factores extrínsecos involucran la estación del año, temperatura, hábitat, dieta, enfermedades, estrés asociado con el cautiverio y el sitio de venopunción (Bryant, Fleming, Twomey, & Warren, 2012; Campbell, 2015; Carrascal et al., 2014; LaGrange, Kimble, MacGowan, & Williams, 2014; Rousselet et al., 2013). En este sentido, los intervalos de referencia hematológicos publicados proveen una línea base para la interpretación y correlación de hallazgos clínicos y hematológicos en pacientes reptiles. En la sangre periférica de los reptiles se pueden observar las siguientes células sanguíneas:

Eritrocitos

Los eritrocitos maduros de los reptiles son más grandes que los eritrocitos de aves, peces y mamíferos; tienen forma elipsoide alcanzando de 14 a 23 μm de largo y 8 a 14 μm de ancho, poseen un núcleo central, redondeado u ovalado conteniendo cromatina densa, adicionalmente, los márgenes del núcleo tienden a ser irregulares. El citoplasma se tiñe uniformemente de anaranjado a rosado con tinciones de Romanowsky, mientras que el núcleo es púrpura oscuro (ej.: Wright) (Campbell, 2015; Nardini et al., 2013). La vida media de los eritrocitos en reptiles, específicamente quelonios, puede alcanzar entre 600-800 días, con posibilidad de ser más largos a causa de la hibernación (Altland & Brace, 1962).

Los eritrocitos inmaduros son células que se caracterizan por ser más grandes y redondeados que los eritrocitos maduros, poseen citoplasma basofílico y una elevada relación núcleo:citoplasma (N:C). El núcleo es redondeado, posee cromatina heterogénea, la cual se irá condensando a medida que el eritrocito madura. Menos del 1 o 2% de los

eritrocitos inmaduros en extendido sanguíneo son considerados normales, sin embargo, el porcentaje puede incrementar a causa de pérdida sanguínea, consecuencia de hemorragia o la recolección de sangre (Perpiñán, 2017). Adicionalmente otras anomalías eritrocitarias como anisocitosis, policromasia y pioquilocitosis pueden estar presentes en reptiles sanos, pero su proporción puede verse exagerada en casos de enfermedad (Weiss & Wardrop, 2010).

Leucocitos

Los leucocitos de reptiles se dividen en dos grupos: granulocitos y agranulocitos. Los granulocitos pueden tener coloración acidófila y basófila, basados en la apariencia de los gránulos en los extendidos sanguíneos coloreados con tinciones Romanowsky; los acidófilos incluyen los heterófilos y eosinófilos, mientras que los basófilos tienen gránulos basofílicos. Los leucocitos mononucleares se componen por linfocitos y monocitos (Campbell, 2014, 2015). Los azurófilos son otro tipo de células sanguíneas exclusivas de los reptiles, sin embargo, su correcta clasificación aun es confusa (Nardini et al., 2013).

Heterófilos: Los heterófilos de los reptiles son funcionalmente análogos a los neutrófilos de los mamíferos, los cuales, junto con los monocitos, responden a la inflamación de tejidos y están involucrados en la fagocitosis, respondiendo a infecciones bacterianas y parasitarias (Eatwell, Hedley, & Barron, 2014; Weiss & Wardrop, 2010). Morfológicamente pueden ser muy variables, sin embargo, de manera general, se caracterizan por ser células grandes, redondeadas, con un diámetro entre 10-23 μm ; su núcleo se localiza marginalmente en la célula y puede tener forma redondeada a oval o ser multilobulado (Perpiñán, 2017); sus gránulos se caracterizan por tener forma de huso o ser elongados y por poseer coloración rojiza, naranja o marrón (Weiss & Wardrop, 2010). Los incrementos en el número de heterófilos pueden ser causados por inflamación, estrés o factores ambientales como la estación (Duguy, 1970).

Linfocitos: Son células redondeadas que varían en tamaño, teniendo un diámetro de 5-10 μm para las células más pequeñas, hasta más de 15 μm en el caso de los linfocitos más grandes. El núcleo es redondo, posicionado central o ligeramente excéntrico con respecto a la célula, teniendo una cromatina densa en linfocitos maduros; por otra parte, el citoplasma es homogéneo, careciendo de vacuolas y siendo ligeramente basofílicos (azul pálido), llegando a poseer gránulos azurofílicos (Martínez-Silvestre, Lavín, & Cuenca, 2011). Los linfocitos se caracterizan por poseer un núcleo grande en relación con el citoplasma, teniendo la mayor relación N:C entre los tipos de células sanguíneas, sin embargo, los linfocitos grandes tienen más volumen citoplasmático comparado con linfocitos pequeños (Campbell, 2015; Perpiñán, 2017). En algunas especies de reptiles, los linfocitos son las células más numerosas; a pesar de esto, la linfocitosis puede observarse en inflamación, cicatrización de heridas, enfermedades virales e infecciones parasitarias, mientras que la linfopenia está asociada a malnutrición o como respuesta secundaria a estrés o inmunosupresión (Eatwell et al., 2014; Thrall, Weiser, Allison, & Campbell, 2012; Weiss & Wardrop, 2010).

Eosinófilos: La morfología de los eosinófilos presentes en reptiles es similar a la de los mamíferos, su diámetro varía de 9-20 μm , poseen un citoplasma claro con gránulos eosinofílicos, redondos a poligonales; el núcleo es central o excéntrico, redondo, ovalado, elongado o bilobulado (Perpiñán, 2017; Stacy et al., 2011). En algunas especies de reptiles y con algunas tinciones, los gránulos de los eosinófilos tienen una apariencia menos brillante y más débil que los gránulos de los heterófilos, mientras que en organismos como las iguanas, los gránulos se caracterizan por adquirir una coloración azul con tinciones de Romanowsky (Harr et al., 2001; Perpiñán, 2017).

Se ha reportado que los eosinófilos se encuentran ausentes en algunas especies de reptiles, particularmente en serpientes, reportándose una falta de estos en la serpiente cascabel diamantino (*Crotalus adamanteus*) o víbora ratonera (*Pantherophis obsoletus*, conocida anteriormente como *Elaphae obsoleta quadrivittata*), sin embargo, se han hallado en cobras de la especie *Ophiophagus hannah* (Alleman, Jacobson, & Raskin, 1999; Salakij et al., 2002; Sykes & Klaphake, 2015).

Monocitos: Los monocitos son los leucocitos más grandes en sangre periférica de los reptiles, alcanzando un diámetro de 10-25 μm ; varían en forma, pueden ser redondeados o ameboides; el núcleo tiene una forma variable, llegando a ser redondeado, oval, reniforme o multilobulado y su cromatina está poco condensada y se tiñe más pálido que el núcleo de linfocitos; el citoplasma generalmente es de color azul grisáceo y puede contener vacuolas y finos gránulos eosinofílicos o azurofílicos (Campbell, 2014; Eatwell et al., 2014). Los eritrocitos son importantes para la formación de granulomas y células gigantes como respuesta a infecciones microbianas, adicionalmente, el porcentaje de monocitos incrementa durante la estimulación antigénica crónica, inflamación crónica y enfermedades bacterianas o parasitarias (Gregory, Latimer, Fontenot, Lamberski, & Campagnoli, 2004; Jacobson, 2007).

Basófilos: Los basófilos de los reptiles son generalmente células pequeñas, con diámetro de 7 a 12 μm , alcanzando 20 μm en algunas especies. Los basófilos se caracterizan por poseer numerosos gránulos redondos de color púrpura oscuro (metacromáticos) que generalmente cubren el núcleo. En general, las tortugas tienen mayor proporción de basófilos que otras especies de reptiles (Weiss & Wardrop, 2010), tal es el caso de la especie *Chelydra serpentina*, donde la proporción de basófilos alcanza 50-63% de los leucocitos en buen estado de salud (Mead, Borysenko, & Findlay, 1983). Se ha reportado que el porcentaje de basófilos podría verse afectado por infecciones virales y de hemoparásitos (Stacy et al., 2011); adicionalmente también se ha reportado que los basófilos pueden tener una función similar a los basófilos de mamíferos, expresando inmunoglobulinas de superficie y liberando histamina (Mead et al., 1983).

Azurófilos: Los azurófilos han sido considerados como un tipo de célula exclusivo de los reptiles, ya que se encuentra en bajas concentraciones la sangre de lagartos, quelonios y crocodilianos, y alta concentración en serpientes (Stacy et al., 2011). Son descritos como células de forma irregular que poseen un tamaño menor a los monocitos, su núcleo no es segmentado y puede tener forma redondeada, oval o bilobulada, mientras que el citoplasma es basofílico y más oscuro que el de los monocitos, de color azul a lavanda (Campbell, 2015). Son un tipo de célula controversial, ya que existe mucha confusión

acerca de la correcta clasificación de estas, llegándose a considerar como formas inmaduras de los monocitos, debido a su reducido tamaño y su similitud estructural y citoquímica (Campbell, 2015; Mader, 2006). Basados en esto, autores como Perpiñán y Campbell consideran que los azurófilos deben ser considerados como monocitos y no ser tenido en cuenta como un tipo celular diferente (Campbell, 2015; Perpiñán, 2017).

Trombocitos

A diferencia de las plaquetas de mamíferos, los cuales son fragmentos citoplasmáticos de megacariocitos, los trombocitos de reptiles, aves, anfibios y peces son nucleados y representan una línea celular diferente que se origina del tromboplasto en el tejido hematopoyético (Stacy et al., 2011). Su papel principal es la formación del tapón hemostático inicial a través de la adhesión y agregación, adicionalmente ellos secretan tromboplastina, la cual está involucrada en la polimerización del fibrinógeno en la formación de coágulos (Nardini et al., 2013). La morfología de los trombocitos es altamente variable entre y dentro de los individuos, algunos tienen características morfológicas similares a los linfocitos pequeños y su identificación puede ser desafiante, lo cual puede conllevar a errores en el conteo diferencial de leucocitos; también pueden tener forma elíptica a fusiforme, con un núcleo central, redondo y pequeño, con cromatina densa (Nardini et al., 2013). El citoplasma puede ser incoloro o virar a azul pálido y llegar a poseer gránulos azurofílicos (Weiss & Wardrop, 2010). Los trombocitos activados son comunes y aparecen como clúster de células con márgenes citoplasmáticos irregulares y vacuolas, de igual manera, cuando están agregados los trombocitos parecen carecer de citoplasma (Thrall et al., 2012).

Bioquímica sanguínea de reptiles

Los valores de referencia de pruebas bioquímicas sanguíneas solo se han establecido para pocas de las más de 10.000 especies de reptiles descritas en la actualidad (Thrall et al., 2012). Es necesario tener en cuenta que, debido a que los reptiles ejercen menos control

sobre sus mecanismos homeostáticos en comparación con aves o mamíferos, sus valores de referencia “normales” son a menudo más amplios y están sometidos a condiciones ambientales, como la temperatura, estación, área geográfica, hábitat, estado (cautivo vs libre); y factores fisiológicos como la especie, estado nutricional, estado reproductivo, género y la edad (Mcarthur, Wilkinson, & Meyer, 2004; Thrall et al., 2012). De igual manera, la recolección de la muestra, su manipulación y análisis también pueden ser fuentes de variación en los valores de referencia publicados; por lo cual, los valores publicados son generalmente usados como una guía para la interpretación de los resultados bioquímicos de sangre (Thrall et al., 2012).

Parámetros bioquímicos del perfil renal

Las pruebas bioquímicas para evaluar el estado renal en reptiles a menudo se basan en los paneles de diagnóstico disponibles para mamíferos, sin embargo, la detección de enfermedad renal en reptiles es más difícil que en mamíferos, debido a las diferencias fisiológicas de sus riñones. Las pruebas de laboratorio comunes son Nitrógeno úrico en sangre (BUN), ácido úrico, y creatinina (Mader & Divers, 2014).

La corteza renal de los reptiles posee solo nefronas simples, llamadas nefronas corticales, los cuales tienen un sistema tubular desprovisto del Asa de Henle, por lo cual, los reptiles son incapaces de concentrar su orina (Cooper & Jackson, 1982; Dantzler, 1996). Los desechos nitrogenados excretados por los riñones de los reptiles pueden incluir cantidades variables de ácido úrico, urea y amonio, dependiendo del medio ambiente del animal. Por ejemplo, las tortugas acuáticas que viven gran parte de su vida en el agua excretan cantidades equivalentes de amonio y urea, mientras que las que poseen hábitos anfibios excretan más urea; los cocodrilos excretan amonio y ácido úrico; los reptiles terrestres necesitan conservar el agua, por lo cual producen desechos nitrogenados insolubles en la forma de ácido úrico y sales de urato, las cuales son eliminadas en un estado semisólido (Dantzler, 1996). Aunque los riñones de los reptiles tienen actividades moderadas de lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), alanina

aminotransferasa (ALT) y creatinina quinasa (CK), la actividad en plasma de estas enzimas no incrementa cuando se presenta enfermedad renal (Mader & Divers, 2014)

Nitrógeno Ureico en Sangre (BUN): A diferencia de los mamíferos, las concentraciones de BUN y creatinina generalmente son pobres indicadores de enfermedad renal en la mayoría de los reptiles. A pesar de esto, el valor normal del BUN de los reptiles es menor que 10 mg/dL. En el caso de reptiles terrestres, la concentración de nitrógeno úrico es menor de 15 mg/dL, con la excepción de quelonios terrestres, los cuales típicamente tienen concentraciones de nitrógeno úrico que varían de 30 a 100 mg/dL, siendo considerado como un mecanismo para elevar la osmolaridad y reducir la pérdida de agua (Mader & Divers, 2014). El incremento en la concentración de ácido úrico es considerado como un indicador de un incremento en la ingesta de proteína dietaria, adicionalmente, si se presenta incremento en las concentraciones de ácido úrico, nitrógeno úrico y BUN disminuido, puede ser indicativo de deshidratación (Thrall et al., 2012).

Creatinina: La creatinina es el producto de desecho del clivaje de la creatina. La creatina es una sustancia presente en el músculo, la cual está involucrada en el metabolismo de alta energía, particularmente en la estabilización en las uniones de fosfato de alta energía no requeridos para uso inmediato (Kerr, 2002). La concentración de creatinina en sangre es considerada como una pobre indicadora de enfermedad renal en reptiles. En contraste, la concentración de creatinina en plasma puede tener un valor diagnóstico en la detección de enfermedad renal en algunas especies de reptiles (Mader & Divers, 2014).

Ácido úrico: El ácido úrico es principal producto de excreción del metabolismo de las proteínas en la mayoría de los reptiles; es producido en el hígado y el 95% es excretado por los túbulos renales. Los reptiles carnívoros parecen tener niveles más altos de ácido úrico que los herbívoros. El incremento en los niveles de ácido úrico puede deberse a una excreción reducida debido a una disminución en el flujo sanguíneo renal, mientras que niveles reducidos de ácido úrico pueden deberse a enfermedad hepática (Eatwell et al., 2014).

Parámetros del perfil hepático de los reptiles

Normalmente, las pruebas de laboratorio para evaluar el estado del hígado en mamíferos incluyen los perfiles bioquímicos de las enzimas hepáticas, bilirrubina y colesterol, sin embargo, pocos estudios han examinado la efectividad de estas pruebas bioquímicas para evaluar la enfermedad hepática en reptiles. Los reptiles carecen de la biliverdina reductasa, necesaria para producir bilirrubina, por lo cual la biliverdina es generalmente considerada como el producto principal del clivaje de la hemoglobina en reptiles; en este sentido, la medición de biliverdina sería útil pero no existen ensayos comerciales disponibles (Eatwell et al., 2014). Algunos de los compuestos que se han estudiado en el hígado de los reptiles son:

Alanina aminotransferasa (ALT): La ALT es una enzima poco específica encontrada en el hígado, riñones y otros tejidos, cataliza la transaminación reversible de la L-alanina y 2-oxoglutarato a piruvato y L-glutamato (Kaneko, Harvey, & Bruss, 2008); no siempre puede estar elevada en casos de enfermedad hepática, por lo cual no es considerado un parámetro informativo en reptiles; sin embargo, se ha sugerido que una elevada actividad plasmática de la ALT puede estar asociada con una dieta prolongada de comida no natural, la cual puede causar desordenes hepáticos en tortugas en cautiverio (Eatwell et al., 2014; Mader & Divers, 2014).

Fosfatasa Alcalina (ALP): Son un grupo de enzimas que hidrolizan un rango de monofosfatos y pirofosfatos a pH alcalino, así como en pH fisiológico (Kaneko et al., 2008). La ALP está ampliamente distribuida a través del cuerpo de los reptiles y la actividad plasmática de esta enzima no está considerada que sea específica de un órgano. Un incremento en los niveles de ALP puede reflejar un incremento en la actividad osteoblástica en vez de indicar una enfermedad hepatobiliar, adicionalmente un incremento en la ALP del plasma se ha asociado con hiperparatiroidismo y enfermedad ósea (Thrall et al., 2012).

Aspartato aminotransferasa (AST): Esta enzima cataliza la transaminación de L-aspartato y 2-oxoglutarato a oxalacetato y glutamato (Kaneko et al., 2008). La actividad

plasmática de AST no es considerada específica de algún órgano debido a que la actividad de esta enzima puede ser encontrada en muchos tejidos. En general, la actividad plasmática de la AST es inferior a 250 IU/L; sin embargo, un incremento en su actividad sugiere daño hepático o muscular, septicemia o toxemia. En tortugas sanas, el aumento en la AST puede ser causado por actividad muscular y heridas, debido a la agresión de los machos durante la temporada reproductiva (Thrall et al., 2012).

Lactato deshidrogenasa (LDH): La LDH es una enzima poco específica encontrada en el hígado, riñones y otros tejidos como músculo esquelético y cardíaco y pequeñas cantidades en el intestino. Es una enzima tetramérica con cinco isoenzimas que catalizan la conversión reversible de L-lactato a Piruvato en todos los tejidos (Kaneko et al., 2008). Su elevación puede indicar daño en diferentes tejidos, como hígado, músculo esquelético o cardíaco; un aumento en los niveles plasmáticos de este compuesto por encima de 700 IU/L está asociado con estomatitis, obstrucción gastrointestinal, prolapso cloacal, celiotomía, artritis séptica o falla renal. La hemólisis también puede conllevar a un aumento en la actividad de la LDH en plasma (Eatwell et al., 2014; McArthur et al., 2004).

Glutamato deshidrogenasa (GLDH): Es una enzima mitocondrial que cataliza la remoción de hidrógeno del L-glutamato para formar el ácido cetimínico que sufre hidrólisis espontánea a 2-oxoglutarato (Kaneko et al., 2008). Algunos reportes sugieren que la GLDH puede ser un indicador útil de necrosis hepatocelular en reptiles. Adicionalmente se han reportado tortugas sanas con un nivel plasmático de GLDH inferior a 20 IU/L (McArthur et al., 2004).

Evaluación de las proteínas séricas o plasmáticas

La concentración de proteínas plasmáticas totales en reptiles sanos se encuentra entre 3 y 7 g/dL. Se ha reportado que, durante la foliculogénesis, las hembras presentan un incremento en la concentración de proteínas totales; adicionalmente, los reptiles en estado de cautiverio pueden mostrar valores elevados de proteínas totales, esto probablemente

debido a dietas con alto contenido proteico administradas durante largos periodos de tiempo. La hiperproteinemia (>7 g/dL) puede ser causada por deshidratación o hiperglobulinemia asociada a enfermedades crónicas inflamatorias; mientras que hipoproteinemia (<3 g/dL) ha sido observada en reptiles con casos crónicos de desnutrición y parasitismo gastrointestinal (Mcarthur et al., 2004).

Dentro de las proteínas totales se encuentra la albumina, la cual es una proteína importante sintetizada en el hígado y que es clave en proveer una presión oncótica coloidal. Una reducción en los niveles de albumina resultará en el desplazamiento de fluidos desde la circulación al tejido intersticial (edema, ascitis). Un incremento en la concentración de albumina generalmente se relaciona con deshidratación y se asocia con un incremento en el hematocrito; adicionalmente, se ha reportado que la concentración de albumina puede incrementar en reptiles hembra activas reproductivamente a causa de la vitelogénesis; por otra parte, niveles reducidos de albumina pueden deberse a una reducción en la toma de aminoácidos (malnutrición, enfermedad intestinal) reducción en su producción (enfermedad hepática) o un aumento en la perdida de esta (enfermedad intestinal, enfermedad renal, hemorragia) (Eatwell et al., 2014)

Evaluación del metabolismo de la glucosa

De manera general, la concentración normal de glucosa de la mayoría de los reptiles se ubica entre 60 a 100 mg/dL, sin embargo, varía dependiendo de la especie, estado nutricional, condiciones ambientales y manipulación de la muestra. El páncreas de los reptiles posee células alfa y beta, que producirán insulina y glucagón respectivamente, sugiriendo que el metabolismo de la glucosa es similar al de los mamíferos y que estas hormonas están afectadas por la temperatura, un ejemplo de esto es que un aumento en la temperatura produce hipoglucemia en tortugas e hiperglucemia en cocodrilos (Thrall et al., 2012).

La hipoglucemia es generalmente causada por malnutrición e inanición, enfermedad hepatobiliar y septicemia, de igual manera, enfermedades pancreáticas también pueden ser la causa de hipoglucemia permanente. Los signos clínicos asociados con la hipoglucemia en reptiles incluyen temblor, pérdida de reflejo de enderezamiento, torpor y pupilas dilatadas (Mader & Divers, 2014). Por su parte la hiperglucemia en reptiles puede ser causado por el tratamiento médico con glucocorticosteroides, adicionalmente, puede ser indicativo de pancreatitis o de diabetes mellitus, sin embargo, esta última es poco común (Thrall et al., 2012).

Evaluación de daño muscular

Creatinina quinasa (CK): La creatinina quinasa (CK) es una enzima específica del músculo y es usada para evaluar el daño en células musculares. Esta enzima cataliza el intercambio de un grupo fosfato entre fosfato de creatina y ATP (Kaneko et al., 2008). El incremento en los niveles de CK plasmáticos puede ser resultado de daño en las células musculares o esfuerzo excesivo, de igual manera un aumento en la actividad de CK puede ser causada por heridas traumáticas, inyecciones intramusculares de medicamentos irritantes o fluidos e infecciones sistémicas que afectan el músculo esquelético o cardiaco. En caso de que parámetros como AST o LDH también se encuentren elevados, puede ser indicativo de enfermedad hepatobiliar (Thrall et al., 2012)

Anticoagulantes

Uno de los aspectos más relevantes al momento de realizar análisis hematológicos en reptiles es el anticoagulante usado, ya que este puede influir en los resultados obtenidos. Con base en lo anterior, los anticoagulantes usados en los análisis hematológicos en los reptiles son:

Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)

Este anticoagulante remueve el calcio, el cual es esencial para la coagulación. El calcio es precipitado como un oxalato soluble o unido a una forma no ionizada. Es usado principalmente para realizar conteos sanguíneos. Un exceso de EDTA puede afectar los eritrocitos y leucocitos, causando encogimiento y cambios degenerativos (Bain, Bates, & Laffan, 2017). En los reptiles, puede causar lisis de eritrocitos en algunas especies, por lo cual deja de ser el anticoagulante por elección (Muro, Cuenca, Pastor, Vinas, & Lavin, 1998).

Citrato trisódico

Es usado principalmente para estudios de coagulación, al igual que el EDTA, su principal mecanismo de acción es la remoción del calcio (Bain et al., 2017). En reptiles se ha demostrado que provoca cristalización de la hemoglobina en la mayoría de las especies, provocando eritrólisis y alteraciones de forma que dificultan el análisis citológico.

Heparina

Este anticoagulante actúa a través de la antitrombina, inactivando factores de coagulación y la trombina, con lo que evita la conversión del fibrinógeno a fibrina (Rodríguez, 2013). Es el anticoagulante de elección para almacenamiento de muestras sanguíneas de reptiles (Muro et al., 1998).

Referencias

- Alho, C. (2011). Environmental Effects of Hydropower Reservoirs on Wild Mammals and Freshwater Turtles in Amazonia: A Review. *Oecologia Australis*, 15(3), 593–604. <https://doi.org/10.4257/oeco.2011.1503.11>
- Alleman, A. R., Jacobson, E. R., & Raskin, R. E. (1999). Morphologic, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). *American Journal of Veterinary Research*, 60(4), 507–514.
- Altland, P. D., & Brace, K. C. (1962). Red cell life span in the turtle and toad. *American*

Journal of Physiology-Legacy Content, 203(6), 1188–1190.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1962.203.6.1188>

Antelo, R., Ayarzagüena, J., & Castroviejo, J. (2008). *Biología del cocodrilo o caimán del Orinoco (Crocodylus intermedius) en la Estación Biológica El Frío, Estado Apure (Venezuela)*. Asociación Amigo de Doñana.

Bain, B. J., Bates, I., & Laffan, M. A. (2017). *Dacie and Lewis Practical Haematology* (Twelfth Ed). <https://doi.org/10.1016/C2014-0-01046-5>

Bryant, G. L., Fleming, P. A., Twomey, L., & Warren, K. A. (2012). Factors Affecting Hematology and Plasma Biochemistry in the Southwest Carpet Python (*Morelia spilota imbricata*). *Journal of Wildlife Diseases*, 48(2), 282–294. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.2.282>

Campbell, T. W. (2014). Clinical Pathology. En D. R. Mader & S. J. Divers (Eds.), *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery* (1° ed., p. 462). <https://doi.org/10.1016/C2010-0-67117-3>

Campbell, T. W. (2015). *Exotic Animal Hematology and Cytology* (Fourth Ed). <https://doi.org/10.1002/9781118993705>

Carrascal, J., Negrete, H., Rojano, C., Álvarez, G., Chacón, J., & Linares, J. (2014). Caracterización hematológica de hicoteas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (28), 43. <https://doi.org/10.19052/mv.3180>

CITES. (2019). Checklist of CITES species. Recuperado el 12 de mayo de 2019, de <https://cutt.ly/lpJqo0G>

Cooper, J., & Jackson, O. (1982). *Diseases of the Reptilia*. San Diego, USA: Elsevier Science Publishing Co Inc.

Dantzler, W. H. (1996). Comparative aspects of renal urate transport. *Kidney International*, 49(6), 1549–1551. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.222>

Duguy, R. (1970). Number of Blood Cells and Their Variation. En *Biology of the Reptilia, Morphology* (pp. 93–109).

Eatwell, K., Hedley, J., & Barron, R. (2014). Reptile haematology and biochemistry. In

- Practice*, 36(1), 34–42. <https://doi.org/10.1136/inp.f7488>
- Gregory, C. R., Latimer, K. S., Fontenot, D. K., Lamberski, N., & Campagnoli, R. P. (2004). Chronic Monocytic Leukemia in an Inland Bearded Dragon, *Pogona vitticeps*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 14(2), 12–16. <https://doi.org/10.5818/1529-9651.14.2.12>
- Harr, K. E., Alleman, A. R., Dennis, P. M., Maxwell, L. K., Lock, B. A., Bennett, R. A., & Jacobson, E. R. (2001). *Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas*. 218(6), 915–921.
- IUCN. (2019). Status category summary by major taxonomic group. Recuperado el 20 de marzo de 2019, de RedList website: <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics>
- Jacobson, E. R. (2007). *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text* (1st Editio). Florida: CRC Press.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (Sixth edit). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3>
- Kerr, M. G. (2002). *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Biochemistry and Haematology* (Second Edi). Blackwell Science Ltd.
- LaGrange, S. M., Kimble, S. J. A., MacGowan, B. J., & Williams, R. N. (2014). Seasonal Variation in Hematology and Blood Plasma Chemistry Values of the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 50(4), 990–993. <https://doi.org/10.7589/2013-10-267>
- Mader, D. R. (2006). *Reptile medicine and surgery*. Saunders Elsevier.
- Mader, D. R., & Divers, S. J. (2014). *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery* (1° ed.). <https://doi.org/10.1016/C2010-0-67117-3>
- Martínez-Silvestre, A., Lavín, S., & Cuenca, R. (2011). Hematología y citología sanguínea en reptiles. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 31(3), 131–141.
- Mcarthur, S., Wilkinson, R., & Meyer, J. (2004). *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles* (S. McArthur, R. Wilkinson, & J. Meyer, Eds.).

<https://doi.org/10.1002/9780470698877>

- Mead, K., Borysenko, M., & Findlay, S. (1983). Naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, possess cytophilic surface antibody with reaginic function. *The Journal of Immunology*, *130*(1), 34–340.
- Morales-Betancourt, M., Lasso, C., De La Ossa, J., & Fajardo-Patiño, A. (2013). *Biología y conservación de los Crocodylia de Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAVH).
- Morales-Betancourt, M., Lasso, C., Páez, V., & Bock, B. (2015). *Libro rojo de reptiles de Colombia*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt (IAvH).
- Muro, J., Cuenca, R., Pastor, J., Vinas, L., & Lavin, S. (1998). Effects of Lithium Heparin and Tripotassium EDTA on Hematologic Values of Hermann's Tortoises (*Testudo hermanni*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *29*(1), 40–44.
- Nardini, G., Leopardi, S., & Bielli, M. (2013). Clinical Hematology in Reptilian Species. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, *16*(1), 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2012.09.001>
- Páez, V. P., Morales-Betancourt, M. A., Lasso, C. A., Castaño-Mora, O. V., & Bock, B. C. (2012). *Biología y conservación de la tortugas continentales de Colombia. Serie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia*. Bogotá, Colombia: IAVH.
- Perpiñán, D. (2017). Chelonian haematology 2. Identification of blood cells. *In Practice*, *39*(6), 274–283. <https://doi.org/10.1136/inp.j2361>
- Rodríguez, R. (2013). *VAM Vademécum académico de medicamentos* (Sixth Edit). McGraw-Hill.
- Rousselet, E., Stacy, N. I., LaVictoire, K., Higgins, B. M., Tociłowski, M. E., Flanagan, J. P., & Godard-Coding, C. A. J. (2013). Hematology and plasma biochemistry analytes in five age groups of immature, captive-reared loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *44*(4), 859–874.

- <https://doi.org/10.1638/2012-0162R1.1>
- Rueda-Almonacid, J., Carr, J., Mittermeier, R., Rodriguez-Mahecha, J., Mast, R., Vogt, R., ... Goettsch, C. (2007). *Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos de trópico. Serie de guías tropicales de campo No. 6*. Bogotá, Colombia: Conservación Internacional. Editorial Panamericana.
- Salakij, C., Salakij, J., Apibal, S., Narkkong, N.-A., Chanhom, L., & Rochanapat, N. (2002). Hematology, Morphology, Cytochemical Staining, and Ultrastructural Characteristics of Blood Cells in King Cobras (*Ophiophagus hannah*). *Veterinary Clinical Pathology*, 31(3), 116–126. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2002.tb00290.x>
- Stacy, N., Alleman, R., & Saylor, K. (2011, marzo). Diagnostic Hematology of Reptiles. *Clinics in Laboratory Medicine*, Vol. 31, pp. 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.10.006>
- Sykes, J. M., & Klaphake, E. (2015). Reptile Hematology. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(3), 661–680. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.014>
- Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R., & Campbell, T. W. (2012). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2nd editio). Wiley-Blackwell.
- Uetz, P., Freed, P., & Hošek, J. (2019). The Reptile Database. Recuperado el 13 de junio de 2019, de <http://www.reptile-database.org>
- Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2014). *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. (Fourth Edi). San Diego, CA, USA: Elsevier Inc.
- Weiss, D., & Wardrop, K. (2010). Schalm's Veterinary Hematology. En *Veterinary Hematology* (Sixth Edit). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.

1. Capítulo 1. Consideraciones para la venopunción y obtención de muestras para análisis hematológicos de tortugas de los géneros *Podocnemis*, *Trachemys* y *Chelonoidis*

Considerations for venipuncture and samples obtaining for hematological analysis of turtles of the *Podocnemis*, *Trachemys* and *Chelonoidis* genera

Chelonians are a group of vertebrates highly threatened by anthropogenic intervention, particularly the illegal trade, which makes them frequent residents of wildlife rescue and rehabilitation centers. Blood tests are an important source of information for the clinical assessment and medical diagnosis of these specimens; therefore, the quality of the blood sample is essential for the correct analysis and interpretation of hematological and blood chemistry results. The objective of this study was to evaluate different venipuncture points and the appropriate anticoagulant to be used in order to obtain and store blood samples from continental turtles for subsequent hematological and chemical blood tests. Eighty-two turtles of the species *Trachemys callirostris* (N= 43), *Podocnemis unifilis* (N= 8), and *Chelonoidis carbonaria* (N= 31), held in captivity in the Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) of the Universidad Nacional de Colombia, were sampled. Three venipuncture points were evaluated: the subcarapacial venous sinus, the dorsal coccygeal vein, and the jugular vein. Two anticoagulants were tested: sodium heparin and EDTA. The jugular vein is the best place to practice venipuncture as the blood samples obtained are free of hemodilution and enough to carry out hematological analyzes. In contrast, most of the samples hemodiluted were frequently obtained from the subcarapacial venous sinus. About the anticoagulants, EDTA caused hemolysis in *C. carbonaria* samples. Sodium heparin showed favorable results when conserving the blood samples of all species sampled. In conclusion, the jugular vein is the most convenient site for venipuncture; it allows us to obtain samples of good quality for hematological and chemical analyzes. Sodium heparin is the anticoagulant of choice for store blood samples from the three species evaluated.

Key words: Anticoagulants; Blood chemistry; *Chelonoidis carbonaria*; Hematology; *Podocnemis unifilis*; *Trachemys callirostris*.

Consideraciones para la venopunción y obtención de muestras para análisis hematológicos de tortugas de los géneros *Podocnemis*, *Trachemys* y *Chelonoidis*

Cristian C. Rodríguez-Almonacid^{1*}; Carolina M. Vargas-León²; Carlos A. Moreno-Torres³; Nubia E. Matta⁴.

1. Grupo de Estudio Relación Parásito-Hospedero, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, crrodrigueza@unal.edu.co
2. Departamento de Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, cmvargasl@unal.edu.co
3. Departamento de Salud Animal, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, camorenot@unal.edu.co
4. Grupo de Estudio Relación Parásito-Hospedero, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, nemattac@unal.edu.co.

* Autor de correspondencia

Este capítulo fue sometido a la *Revista MVZ Córdoba* en forma de Artículo original y se encuentra en revisión por parte de los pares evaluadores

1.1 Resumen

Los quelonios son un grupo de vertebrados altamente amenazado por la intervención antropogénica, principalmente el tráfico ilegal, el cual los hace frecuentes en centros de rescate y rehabilitación de fauna silvestre. Los análisis sanguíneos constituyen una fuente importante de información para la valoración clínica y diagnóstico médico de estos especímenes, por lo cual, la calidad de la muestra sanguínea es indispensable para el correcto análisis e interpretación de los resultados hematológicos y de química sanguínea. El objetivo de este estudio fue evaluar diversos puntos de venopunción, así como el anticoagulante adecuado para la obtención y conservación de muestras sanguíneas de tortugas de los géneros *Podocnemis*, *Trachemys* y *Chelonoidis* para ser utilizadas en pruebas de hematología y química sanguínea. Se muestrearon 82 tortugas de las especies *Trachemys callirostris* (N= 43), *Podocnemis unifilis* (N= 8), y *Chelonoidis carbonaria* (N= 31) mantenidas en cautiverio en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) de la Universidad Nacional de Colombia. Los puntos de venopunción evaluados fueron: el seno venoso subcaparacial, la vena coccígea dorsal y la vena yugular. Así mismo, se compararon dos anticoagulantes: heparina de sodio y EDTA. La vena yugular fue el sitio de venopunción donde se pudieron obtener muestras sanguíneas de mejor calidad, libre de hemodilución y en un volumen suficiente para realizar los análisis hematológicos. Por el contrario, el seno venoso subcaparacial fue el punto donde con mayor frecuencia se obtuvieron muestras de sangre hemodiluida. Por otra parte, la sangre de *C. carbonaria* presentó hemólisis cuando se almacenó en EDTA. La heparina de sodio mostró resultados favorables al conservar las muestras sanguíneas de las tres especies. La vena yugular es el sitio de venopunción óptimo para la obtención de muestras sanguíneas de calidad para realizar análisis hematológicos y de química sanguínea. La heparina de sodio fue el anticoagulante de elección para almacenar las muestras sanguíneas, ya que no causaron hemólisis en ninguna de las tres especies evaluadas.

Palabras clave: Anticoagulantes, *Chelonoidis carbonaria*, Hematología, *Podocnemis unifilis*, Química sanguínea, Sitio de venopunción, *Trachemys callirostris*

1.2 Introducción

Las tortugas, junto con los crocodilidos, 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 (Moreno, Andrade, & Ruíz-Contreras, 2016); esto sumado al impacto por la pérdida de hábitat, contaminación ambiental, tráfico ilegal y enfermedades infecciosas que afectan generalmente a los reptiles y que contribuyen a la drástica disminución de sus poblaciones (Gibbons et al., 2000). Colombia cuenta con 35 especies de tortugas, de las cuales el 94,3% poseen hábitos acuáticos (Uetz, Freed, & Hošek, 2019). Para 2015, el 40,5% de las especies de tortugas en Colombia se encontraban bajo alguna categoría de amenaza y, desafortunadamente, varias especies no se encuentran catalogadas debido a la falta de datos suficientes para este fin (Morales-Betancourt, Lasso, Páez, & Bock, 2015).

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 especímenes de este grupo 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. Finalizada esta etapa, se inicia el proceso de rehabilitación y posterior reintroducción de estos organismos en la naturaleza. La valoración médica de estos reptiles se realiza a través de exámenes físicos, imagenología, pruebas hematológicas y de bioquímica sanguínea (Hofmeyr, Henen, & Walton, 2017). Idealmente se debe contar con valores de referencia para los especímenes analizados; sin embargo, en la actualidad 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* (Arcila, 2005; Carrascal et al., 2014).

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, el comportamiento defensivo 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 (Naguib, 2016). La hemodilución con linfa es uno de los obstáculos más frecuentes cuando se trata de obtener muestras para procesamiento en el laboratorio clínico (Crawshaw & Holz, 1996); así mismo, otro factor extrínseco que afecta la calidad de la muestra es el anticoagulante utilizado (Muro, Cuenca, Pastor, Vinas, & Lavin, 1998).

Con base en lo anterior, el presente artículo tiene como objetivo evaluar diversos puntos de venopunción, así como el anticoagulante adecuado para la obtención y conservación de muestras sanguíneas de tortugas de los géneros *Podocnemis*, *Trachemys* y *Chelonoidis*; de tal forma que permitan un óptimo análisis de parámetros hematológicos y de química sanguínea.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Aspectos éticos

El presente estudio fue avalado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia mediante el acta 03-2019 del 01 de abril del 2019. El muestreo se realizó bajo la supervisión de médicos veterinarios especialistas en el área, garantizando la seguridad de los individuos muestreados.

1.3.2 Muestra

Los especímenes muestreados corresponden a tortugas de las especies *Podocnemis unifilis* (N=8), *Trachemys callirostris* (N=43) y *Chelonoidis carbonaria* (N=31) 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 a una temperatura ambiental artificial promedio de 30°C.

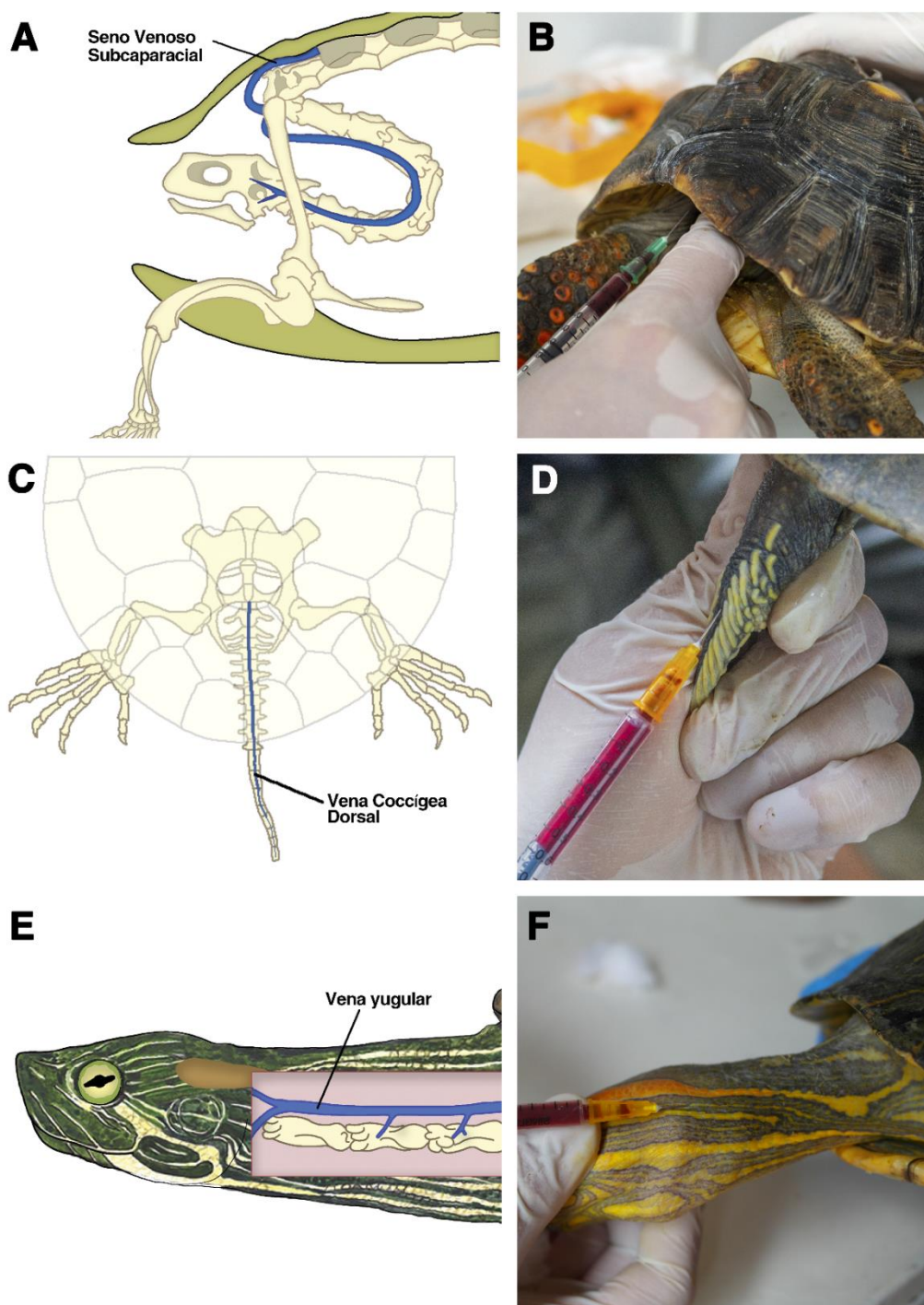
1.3.3 Evaluación de los puntos de venopunción

La venopunción fue realizada siguiendo las recomendaciones propuestas por Naguib (2016) y Perpiñán (2017) 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 tomada 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 fueron el seno venoso subcaparacial, la vena coccígea dorsal y la vena yugular.

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 (Innis & Knotek, 2020) (Fig. 1.1A). Para acceder a éste punto, se puede inducir la retracción de la cabeza del individuo en el caparazón o extenderla y cuidadosamente doblarla hacia abajo (Innis & Knotek, 2020). La aguja debe ser introducida sobre la línea media dorsal del cuello cerca del límite entre la piel y el caparazón en ángulo caudodorsal (Fig. 1.1B). Si la vertebra es tocada, la aguja debe ser moverse ligeramente en dirección craneal o caudal (Perpiñán, 2017).

La vena coccígea dorsal se encuentra en la línea media de la cola del animal (Fig. 1.1C), por lo que se debe efectuar la punción sobre este plano inclinando la aguja entre 45° y 60° (Innis & Knotek, 2020). 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 (Fig. 1.1D) (Redrobe & MacDonald, 1999).

Figura 1.1 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 *Podocnemis unifilis*, E. Localización de la vena yugular (Modificado de Innis & Knotek, 2020), F. Extracción de sangre a partir de la vena yugular en la tortuga de la especie *Trachemys callirostriscoccígea* dorsal, D. Extracción de sangre a partir de la vena coccígea dorsal en tortuga de la especie



La vena yugular se encuentra recorriendo el cuello del animal de forma antero-posterior, a la altura del tímpano (Fig. 1.1E) (Mans, 2008). La aguja debe insertarse superficialmente, paralela al cuello en dirección caudal (Fig. 1.1F) (Perpiñán, 2017).

1.3.4 Almacenamiento de muestras sanguíneas de quelonios

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, y Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Químicos Albor), a una concentración de 40 µl/ml de sangre. La sangre fue conservada a 4°C hasta la realización de los análisis hematológicos. Las muestras sanguíneas fueron procesadas en un periodo máximo de 18 horas.

1.4 Resultados

1.4.1 Evaluación de los puntos de venopunción

Los sitios de venopunción evaluados mostraron las siguientes características:

- *Seno venoso subcaparacial*: Este es un punto de fácil acceso para la obtención de sangre, especialmente en individuos muy activos donde la manipulación de extremidades o de la cabeza se dificulta. Si bien este punto presenta gran facilidad para la obtención de muestra, dada su cercanía a vasos linfáticos, incrementó la probabilidad de hemodilución con linfa, haciendo que la muestra no fuera idónea para análisis hematológicos o de química sanguínea.

- *Vena coccígea dorsal*: A partir de este punto se pudieron obtener muestras sanguíneas con cierta facilidad, sin embargo, algunas muestras no estuvieron exentas de

hemodilución; lo que generó que cerca del 40% de las muestras se contaminaran con linfa (Datos no mostrados).

- *Vena yugular*: La accesibilidad a esta vena fue difícil a causa de la naturaleza retráctil de la cabeza de las tortugas, especialmente aquellas pertenecientes al suborden Cryptodira, y la gran fuerza que las tortugas ejercen con el fin de ocultarla dentro del caparazón. Sin embargo, una vez se tuvo el control sobre la cabeza, la vena fue fácilmente observable y palpable. Las muestras sanguíneas obtenidas a partir de este punto fueron de buena calidad y en menos del 5% de los casos, la sangre se diluyó con linfa. Dicha vena 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.

Las muestras hemodiluidas con linfa presentaron una coloración rojiza pálida y clara, a diferencia de la sangre sin hemodilución, la cual presentó un color rojo oscuro. Estas observaciones son corroboradas al medir el hematocrito, donde las muestras con color claro, aparentemente hemodiluidas, en efecto presentaron un hematocrito más bajo.

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 microtubos con gel para separación de suero (análisis bioquímicos) o EDTA o Heparina de sodio (análisis hematológico).

Tabla 1.1 Ventajas y desventajas de los sitios de venopunción evaluados en las tres especies de tortugas.

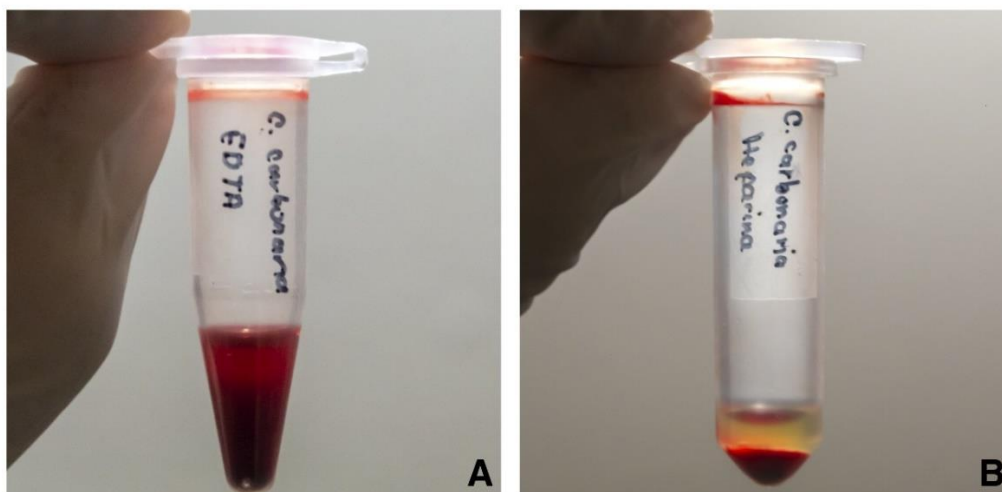
Especie Sitio de venopunción	<i>Trachemys callirostris</i>	<i>Podocnemis unifilis</i>	<i>Chelonoidis carbonaria</i>
Vena yugular	Ventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Vena fácilmente observable. • Nula hemodilución 	Ventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Buen volumen de sangre. • Nula hemodilución. 	Ventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Piel del cuello delgada. • Vena fácilmente observable. • Nula hemodilución
	Desventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Dificil manipulación de la cabeza (Cryptodira) • Es una especie agresiva. 	Desventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Posee una piel gruesa, lo que dificulta la visualización de la vena. 	Desventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Dificil manipulación de la cabeza (Cryptodira). • Posee gran fuerza en el cuello. • Se pueden formar hematomas.
Vena coccígea dorsal	Ventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Punto de fácil acceso. 	Ventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Punto de fácil acceso. • La cola es generalmente grande. 	Ventajas: <ul style="list-style-type: none"> • La cola es manipulable en individuos grandes. • Punto de fácil acceso.
	Desventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Algunas muestras presentan hemodilución. • La cola es generalmente pequeña. • La vena no es visible. • Podría causar trauma en la espina dorsal 	Desventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Algunas muestras presentan hemodilución. • La vena no es visible. • Podría causar trauma en la espina dorsal 	Desventajas: <ul style="list-style-type: none"> • 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	Ventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Punto de fácil acceso. 	Ventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Punto de fácil acceso. 	Ventajas: <ul style="list-style-type: none"> • Punto de fácil acceso.
	Desventajas: <ul style="list-style-type: none"> • La mayoría de las muestras presentan hemodilución. • El seno venoso no es visible. 	Desventajas: <ul style="list-style-type: none"> • La mayoría de las muestras presentan hemodilución. • El seno venoso no es visible. 	Desventajas: <ul style="list-style-type: none"> • La mayoría de las muestras presentan hemodilución. • El seno venoso no es visible.

1.4.2 Almacenamiento de muestras sanguíneas

El EDTA causó lisis en todas muestras de sangre de las tortugas de la especie *C. carbonaria*, lo cual impidió su procesamiento. La lisis pudo ser observada a simple vista

trascorridas 12 horas a partir del muestreo (Fig.1.2A). A diferencia de esta especie, no se observó lisis en la sangre proveniente de *T. callirostris* y *P. unifilis* cuando ésta era anticoagulada con EDTA. Por su parte la sangre con heparina de sodio no mostró efectos líticos en ninguna de las tres especies analizadas, por lo cual se sugiere el uso de este anticoagulante en quelonios de estas tres especies.

Tabla 1.2 Sangre de *Chelonoidis carbonaria* trascurridas 12 horas a partir del muestreo. A. Sangre anticoagulada con EDTA, B. Sangre anticoagulada con Heparina de sodio. Ningún tubo fue agitado previo a la fotografía



1.5 Discusión

De los sitios de venopunción evaluados, la vena yugular fue el punto de extracción más favorable, ya que permitió obtener las muestras sanguíneas sin hemodilución. La restricción de la cabeza puede ser una labor difícil debido a que estos animales poseen gran fuerza, lo que hace que su manipulación se dificulte. Adicionalmente, debido al comportamiento defensivo de estos organismos, como los pertenecientes a la especie *Trachemys callirostris*, los cuales son agresivos e imprimen gran fuerza en su mandíbula, pueden resultar peligrosos para el investigador, reportándose casos de amputación de extremidades a causa de mordeduras, además de infecciones subsiguientes (Johnson & Nielsen, 2016). Sin embargo, este punto de venopunción resulta favorable, ya que es posible observar la vena con facilidad y el flujo de sangre permite 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 punto 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; adicionalmente, la vena se hace más visible al inclinar la parte anterior del cuerpo de la tortuga cerca de 45° hacia abajo.

Previos reportes también muestran las ventajas de extraer sangre a partir de la vena yugular en quelonios, que incluyen la velocidad de recolección de la muestra y el bajo riesgo de inducir una infección (Gottdenker & Jacobson, 1995; Redrobe & MacDonald, 1999); así mismo, diferentes autores recomiendan dicho sitio dada la baja o nula posibilidad de hemodilución con linfa (Eatwell, Hedley, & Barron, 2014; Mans, 2008; Martínez-Silvestre, Lavín, & Cuenca, 2011; Naguib, 2016; Perpiñán, 2017), lo cual también se evidenció en este estudio.

La vena coccígea dorsal puede resultar una buena alternativa cuando se trabaja con individuos de gran tamaño, pues el acceso a la vena yugular en este tipo de organismos resulta más arduo debido a la gran fuerza de retracción de la cabeza. Sin embargo, vale la pena mencionar que, debido a la cercanía de esta vena con vasos linfáticos, la dilución con linfa es uno de los mayores riesgos de este sitio de punción. Adicionalmente, cabe resaltar, que esta opción no es recomendable con individuos de poca envergadura, en quienes la manipulación de la cola es más dispendiosa que la manipulación de la cabeza. De igual manera, 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 (Redrobe & MacDonald, 1999).

Estudios previos también evidenciaron los inconvenientes de usar este sitio de venopunción en tortugas. López-Olvera y colaboradores (2003) por ejemplo, observaron una marcada hemodilución en muestras obtenidas a partir de este punto, en comparación con muestras obtenidas de la vena braquial en la tortuga griega (*Testudo marginata*), lo

cual incidió negativamente en parámetros hematológicos y de química sanguínea (López-Olvera et al., 2003). Por otra parte, Medeiros y colaboradores (2012), hallaron diferencias significativas en el conteo de leucocitos y la cantidad de proteínas plasmáticas totales de muestras de sangre obtenidas del seno occipital y la vena coccígea dorsal de *Trachemys scripta elegans*, donde los valores obtenidos fueron menores en las muestras extraídas de este último punto a causa de la hemodilución (Medeiros et al., 2012). A diferencia de estos estudios, Perpiñán y colaboradores (2011) 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*) (Perpiñán, Armstrong, & Dórea, 2011).

El seno venoso subcaparacial mostró como ventaja su fácil acceso, sin embargo, se observó la mayor probabilidad de hemodilución en comparación con los otros dos puntos de venopunción evaluados. 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 (Crawshaw & Holz, 1996; López-Olvera et al., 2003), 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, habiendo sido usados previamente en otras investigaciones 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 (Campbell, 2014), en ciertas especies de quelonios se ha determinado que este anticoagulante causa lisis de las células sanguíneas, por lo cual, algunos autores han escogido a la heparina de litio como el anticoagulante de elección para conservar sangre (Muro et al., 1998). 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 (datos no mostrados); sin embargo, con esta misma sustancia no se observó lisis en las muestras de sangre de *P. unifilis* y *T. callirostris*, permitiendo las determinaciones paraclínicas.

Nuestros hallazgos coinciden con los reportados por Muro *et al.* (1998) y Perpiñán *et al.* (2011), donde también se observó que el EDTA presentaba efectos hemolíticos en tortugas de las especies *Testudo hermanni* y *Apalone spinifera*, respectivamente (Muro et al., 1998; Perpiñán et al., 2011). Estudios llevados a cabo por Lyman (1945) 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 (Lyman, 1945). 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. Este investigador 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 (Lyman, 1945).

La mayoría de 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* (Gradela et al., 2017; Kakizoe et al., 2007; Lewbart et al., 2018; Singh Rohilla & Tiwari, 2008; Zaias et al., 2006). 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 (Hawkey & Dennett, 1989). Dado el inconveniente que genera la heparina con algunas tinciones, se recomienda efectuar los extendidos sanguíneos, en lo posible, a partir de la sangre sin anticoagulante. Adicionalmente, acorde a lo planteado previamente por diferentes autores, se recomienda el uso de la heparina para el almacenamiento de muestras sanguíneas de tortugas que se usen para 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 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 seriamente afectada por la hemodilución con linfa, sin embargo, se debe tener en cuenta otros factores como el uso de anticoagulantes que puedan inhibir la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). 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.

Conflicto de intereses: Los autores de presente estudio declaramos que no existe conflicto de intereses con la publicación de este trabajo.

1.6 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.

1.7 Referencias

- Arcila, V. H. (2005). Hematología y química sérica en hembras quelonios (*Trachemys scripta callirostris*) en la ribera del río Lebrija, Puerto Wilches (Santander) Parte I. *Spei Domus*, 1(2).
- Campbell, T. W. (2014). Clinical pathology. En D. R. Mader & S. J. Divers (Eds.), *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery* (1° ed., pp. 70–92). <https://doi.org/10.1016/C2010-0-67117-3>
- Carrascal, J., Negrete, H., Rojano, C., Álvarez, G., Chacón, J., & Linares, J. (2014). Caracterización hematológica de hicoteas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (28), 43.

<https://doi.org/10.19052/mv.3180>

- Crawshaw, G. J., & Holz, P. (1996). Comparison of Plasma Biochemical Values in Blood and Blood-Lymph Mixtures from Red-eared Sliders, *Trachemys scripta elegans*. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 6(2), 7–9. <https://doi.org/10.5818/1076-3139.6.2.7>
- Eatwell, K., Hedley, J., & Barron, R. (2014). Reptile haematology and biochemistry. *In Practice*, 36(1), 34–42. <https://doi.org/10.1136/inp.f7488>
- Gibbons, J. W., Scott, D. E., Ryan, T. J., Buhlmann, K. A., Tuberville, T., Metts, B. S., ... Winne, C. T. (2000). The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians. *BioScience*, 50(8), 653–666. [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)
- Gottdenker, N. L., & Jacobson, E. R. (1995). Effect of venipuncture sites on hematologic and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). *American journal of veterinary research*, 56(1), 19–21.
- Gradela, A., Souza, V. N., Queiroz, M. M. de, Constantino, A. da C., Bandeira, C. G. C., Faria, M. D. de, ... Corrêa, F. M. (2017). Biometria corporal e parâmetros hematológicos de *Trachemys scripta elegans* e *Trachemys dorbignyi* (Testudines: Emydidae) criadas em cativeiro em Petrolina, Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(1), 83–90. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000100014>
- Hawkey, C. M., & Dennett, T. B. (1989). *A Colour Atlas Of Comparative Veterinary Hematology*. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.1989.tb00532.x>
- Hofmeyr, M. D., Henen, B. T., & Walton, S. (2017). Season, sex and age variation in the haematology and body condition of geometric tortoises *Psammobates geometricus*. *African Zoology*, 52(1), 21–30. <https://doi.org/10.1080/15627020.2017.1284575>
- Innis, C., & Knotek, Z. (2020). Tortoises and Freshwater Turtles. En J. Heatley & K. Russell (Eds.), *Exotic Animal Laboratory Diagnosis* (1° ed., pp. 255–289). Hoboken, USA: Wiley Blackwell.
- Johnson, R. D., & Nielsen, C. L. (2016). Traumatic Amputation of Finger From an Alligator Snapping Turtle Bite. *Wilderness & Environmental Medicine*, 27(2), 277–281. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2016.02.003>
- Kakizoe, Y., Sakaoka, K., Kakizoe, F., Yoshii, M., Nakamura, H., Kanou, Y., & Uchida, I. (2007). Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Zoo and Wildlife*

- Medicine*, 38(1), 77–84. <https://doi.org/10.1638/05-096.1>
- Lewbart, G. A., Griffioen, J. A., Savo, A., Muñoz-Pérez, J. P., Ortega, C., Loyola, A., ... Páez-Rosas, D. (2018). Biochemistry and hematology parameters of the San Cristóbal Galápagos tortoise (*Chelonoidis chathamensis*). *Conservation Physiology*, 6(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/coy004>
- López-Olvera, J. R., Montané, J., Marco, I., Martínez-Silvestre, A., Soler, J., & Lavin, S. (2003). Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). *Journal of Wildlife Diseases*, 39(4), 830–836. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.4.830>
- Lyman, R. A. (1945). The anti-haemolytic function of calcium in the blood of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 25(1), 65–73. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030250108>
- Mans, C. (2008). Venipuncture techniques in chelonian species. *Lab Animal*, 37(7), 303–304. <https://doi.org/10.1038/labon0708-303>
- Martínez-Silvestre, A., Lavín, S., & Cuenca, R. (2011). Hematología y citología sanguínea en reptiles. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 31(3), 131–141.
- Medeiros, N., Locatelli-dittrich, R., Schmidt, E., Alvares, A., Patrício, L., Lange, R. R., & de Souza, R. (2012). Efeito do sítio de venopunção nos parâmetros hematológicos em tigre-d'água-americano, *Trachemys scripta elegans*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(1), 37–40.
- Morales-Betancourt, M., Lasso, C., Páez, V., & Bock, B. (2015). *Libro rojo de reptiles de Colombia*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt (IAvH).
- Moreno, L. A., Andrade, G. I., & Ruíz-Contreras, L. F. (2016). *Biodiversidad 2016. Estado y tendencias de la biodiversidad continental de Colombia*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Muro, J., Cuenca, R., Pastor, J., Vinas, L., & Lavin, S. (1998). Effects of Lithium Heparin and Tripotassium EDTA on Hematologic Values of Hermann's Tortoises (*Testudo hermanni*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 29(1), 40–44.
- Naguib, M. (2016). How to take blood from a tortoise. *Companion Animal*, 21(7), 422–425. <https://doi.org/10.12968/coan.2016.21.7.422>
- Perpiñán, D. (2017). Chelonian haematology: 1. Collection and handling of samples. *In Practice*, 39(5), 194–202. <https://doi.org/10.1136/inp.j1692>
- Perpiñán, D., Armstrong, D. L., & Dórea, F. (2011). Effect of Anticoagulant and

Venipuncture Site on Hematology and Serum Chemistries of the Spiny Softshell Turtle (*Apalone spinifera*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 20(2–3), 74–78. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-20.2.74>

Redrobe, S., & MacDonald, J. (1999). Sample Collection and Clinical Pathology of Reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 2(3), 709–730. [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30118-4](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30118-4)

Singh Rohilla, M., & Tiwari, K. (2008). Simple method of blood sampling from Indian freshwater turtles for genetic studies. *Acta Herpetológica*, 3(1), 65–69. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-2485

Uetz, P., Freed, P., & Hošek, J. (2019). The Reptile Database. Recuperado el 13 de junio de 2019, de <http://www.reptile-database.org>

Zaias, J., Norton, T., Fickel, A., Spratt, J., Altman, N. H., & Cray, C. (2006). Biochemical and hematologic values for 18 clinically healthy radiated tortoises (*Geochelone radiata*) on St Catherines Island, Georgia. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(3), 321–325. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2006.tb00139.x>

2. Capítulo 2. Parámetros hematológicos y de química sanguínea de *Podocnemis vogli* (Müller, 1935) y *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) en condiciones de cautiverio.

Hematological and blood chemistry parameters of *Podocnemis vogli* (Müller, 1935) and *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) kept in captivity.

Neotropical region harbors seven out eight species of Podocnemididae family of the world; this family is seriously affected by anthropogenic factors, that is why almost all members are threatened according to IUCN red list. Biology and ecology of these species are little known, as well as hematological and serum chemistry reference intervals that allow clinical action and decision-making conservation programs. Based on this, the objective of this study is to evaluate the hematological and blood chemistry parameters of the Savannah side-necked turtle (*Podocnemis vogli*) and Yellow-spotted river turtle (*P. unifilis*) maintained in captivity at the Estación Biológica Tropical Roberto Franco (Villavicencio-Colombia), in order to propose reference intervals that allow the interpretation of these parameters in the veterinary medical evaluation of both species. For this, 50 turtles of the species *P. vogli* ($n=29$) and *P. unifilis* ($n=21$) were sampled to determine hematological and serum chemistry parameters. Assessed parameters showed similar values in both species studied; likewise, some parameters were similar to those reported for *P. expansa* in Venezuela and Brazil. In this study we report values and propose hematological and serum chemistry reference intervals for *P. vogli* and *P. unifilis*, which can be used in the clinical diagnosis of these reptiles and in future research. Moreover, an individual of *P. vogli* was found infected by blood parasites, so comparisons were made between the parameters of healthy individuals and the infected one. Extending the range of this type of study to other species, especially endemic ones, is desirable.

Keywords:

Turtles, Colombia, Neotropical, Reference Interval Values, *Podocnemis unifilis*, *Podocnemis vogli*

Parámetros hematológicos y de química sanguínea de *Podocnemis vogli* (Müller, 1935) y *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) en condiciones de cautiverio.

Cristian C. Rodríguez-Almonacid^{1*}; Gustavo Fuentes²; Carlos A. Moreno-Torres³; Nubia E. Matta ⁴.

1. Grupo de Estudio Relación Parásito-Hospedero, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, crrodriguez@unal.edu.co
2. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá D.C., Colombia, gafuentesr@unal.edu.co
3. Departamento de Salud Animal, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, camorenor@unal.edu.co
4. Grupo de Estudio Relación Parásito-Hospedero, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, nemattac@unal.edu.co.

* Autor de correspondencia

2.1 Resumen

La región neotropical alberga siete de las ocho especies de Podocnemididos del mundo, los cuales se han visto seriamente amenazados por factores antrópicos, razón por la cual la mayoría de los integrantes de esta familia se encuentran en alguna categoría de amenaza según los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN). La biología y ecología de estas especies es poco conocida, así como intervalos de referencia hematológicos y de química sanguínea que permita tomar medidas a nivel clínico y decisiones en programas de conservación de estas especies. Con base en esto, el objetivo de este artículo es evaluar los parámetros hematológicos y de química sanguínea del galápagu sabanero (*Podocnemis vogli*) y terecay (*P. unifilis*) mantenidas en la Estación Biológica Tropical Roberto Franco (Villavicencio-Colombia), con el fin de proponer intervalos de referencia que permitan la interpretación de estos parámetros en la evaluación médica veterinaria de estas especies. Para esto, 50 tortugas de las especies *P. vogli* ($n=29$) y *P. unifilis* ($n= 21$) fueron muestreadas, evaluándose parámetros hematológicos y de química sérica. Los parámetros analizados mostraron valores similares en ambas especies evaluadas; así mismo, algunos parámetros fueron similares a los reportados para *P. expansa* en Venezuela y Brasil. En este estudio reportamos valores y proponemos intervalos de referencia hematológicos y de química sérica para estas especies de tortugas, los cuales pueden ser usados en el diagnóstico clínico de estos reptiles y en futuras investigaciones. Además, un individuo de la especie *P. vogli* se encontró infectado por parásitos sanguíneos, por lo cual, se realizaron comparaciones entre sus parámetros hematológicos y los establecidos para los individuos sanos. Ampliar el rango de este tipo de estudios a otras especies, especialmente las endémicas, es deseable

Palabras clave: Tortugas, Colombia, Neotropical, Intervalos de referencia, *Podocnemis vogli*, *Podocnemis unifilis*.

2.2 Introducción

La familia Podocnemididae incluye tortugas pleurodiras de hábitos acuáticos que se caracterizan por no presentar escudo nuchal y poseer el dorso de la cabeza cubierto por escamas grandes y yuxtapuestas (Rueda-Almonacid, Carr, Mittermeier, Rodríguez-

Mahecha, Mast, Vogt, Rhodin, Ossa-Velásquez, Rueda, & Goettsch, 2007). Esta familia se compone por los géneros *Peltocephalus*, *Erymnochelys* y *Podocnemis*. El género *Podocnemis* incluye seis especies (*Podocnemis unifilis*, *P. vogli*, *P. erythrocephala*, *P. expansa*, *P. sextuberculata* y *P. lewyana*), mientras que los géneros *Peltocephalus* y *Erymnochelys* son monotípicos, incluyendo las especies *Peltocephalus dumerilianus* y *Erymnochelys madagascariensis* (Páez, Morales-Betancourt, Lasso, Castaño-Mora, & Bock, 2012). A excepción de *E. madagascariensis*, las especies de esta familia se distribuyen al norte de Suramérica, a través de la región Amazónica, los Llanos Orientales y los valles del Magdalena y Sinú de Colombia (Páez et al., 2012).

Los miembros de esta familia se han visto gravemente afectados por factores antropogénicos, puesto que son una fuente importante de carne, huevos, aceite y otros recursos para los habitantes locales, lo que ha conllevado a su sobreexplotación (Rueda-Almonacid, Carr, Mittermeier, Rodríguez-Mahecha, Mast, Vogt, Rhodin, Ossa-Velásquez, Rueda, & Goettsch, 2007). A causa de esto, cinco de las seis especies del género *Podocnemis* se encuentran dentro de las categorías de amenaza de la lista roja de la IUCN (IUCN, 2020). Amenazas como el tráfico ilegal han causado que los miembros de este grupo sean recurrentemente incautados por las autoridades competentes, dejándolas a disposición de centros de rescate especializados en cuidar estas especies, trabajar para reestablecer su salud y promover su conservación. Dentro de la evaluación sanitaria de una población de quelonios, se realizan exámenes físicos y evaluación de parámetros hematológicos y de química sanguínea, los cuales deben ser comparados con intervalos de referencia de especímenes sanos e identificar los individuos que requieren cuidado e intervención.

Los estudios enfocados en la biología de estos organismos son escasos y, aun mas, la información de referencia sobre la hematología y química sanguínea de estas especies, contándose sólo con algunos reportes para *P. expansa* y *P. unifilis* de Brasil y Perú, (Fonseca et al., 2016; Martínez, Hernández, Boede, Peñaloza, & Rodríguez, 2007; Oliveira-Júnior, Tavares-Dias, & Marcon, 2009; Rojas & Varillas, 2013; Rossini, Blanco, Marín, Comerma-Steffensen, & Zerpa, 2012; Santos, 2011). Esta información fisiológica

es determinante para evaluar el estado de salud, emitir diagnóstico, pronóstico y hacer seguimiento de eficiencia de tratamiento de poblaciones en cautiverio, así mismo, sirven como punto de referencia para investigaciones futuras. El sistema de información internacional de especies (ISIS) tiene valores hematológicos para ciertas especies de tortugas, sin embargo, es bien sabido que dichos valores varían de especie a especie y que esta variación puede estar asociada con múltiples caracteres, tanto intrínsecos como extrínsecos (Campbell, 2015).

Basado en lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo evaluar los parámetros hematológicos y de química sanguínea de *Podocnemis vogli* y *P. unifilis* mantenidas en condiciones *ex-situ*, con el fin de proponer intervalos de referencia que permitan la interpretación de estos parámetros en la evaluación médica veterinaria de estas especies. Puesto que las tortugas de este género comparten relaciones filogenéticas, estilos de vida y distribución geográfica con *P. expansa*, hipotetizamos que los parámetros hematológicos y bioquímicos serán similares a los reportados previamente para esta especie en Brasil y Venezuela.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Consideraciones éticas

El presente estudio fue avalado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia mediante el acta 03-2019 del 01 de abril del 2019. El muestreo se realizó bajo la supervisión de médicos veterinarios especialistas en el área, garantizando la seguridad de los individuos muestreados.

2.3.2 Población

El muestreo fue llevado a cabo en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco de la Universidad Nacional de Colombia, localizado en la ciudad de Villavicencio-Meta, Colombia (459 msnm), en septiembre del 2019. Las tortugas muestreadas correspondieron a las especies *P. vogli* (n=29) y *P. unifilis* (n=21). A cada individuo se le determinó el sexo y se le fueron tomadas medidas morfológicas, como longitud máxima del caparazón (MCL), ancho máximo del caparazón (MCW), largo máximo del plastrón (MPL), alto del caparazón (CH) y peso corporal.

2.3.3 Recolección de las muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas a partir de la vena yugular usando jeringas sin anticoagulante de 1 ml, acopladas a agujas calibre 25 de 1 pulgada de longitud. Para análisis hematológicos, 200 µl de sangre fueron depositados en viales plásticos que contenían heparina de sodio (100 UI/ml de sangre. Lique mine, Roche), esta fue almacenada a 4°C hasta su análisis. 100 µl de sangre fueron usados para la elaboración de cuatro extendidos sanguíneos, así como para la medición de microhematocrito; la sangre restante fue depositada en microtubos con gel separador de suero (TGSS) (Liuyang Sanli Medical Technology Development Co Ltd, China), centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos y el suero obtenido fue almacenado a -20°C hasta su análisis. Los extendidos sanguíneos fueron teñidos usando coloración de Wright o Giemsa para la realización de exámenes hematológicos y parasitológicos, respectivamente.

2.3.4 Hematología

El hematocrito se determinó mediante centrifugación del microhematocrito a 12.000 g durante 5 minutos (Martínez-Silvestre, Lavín, & Cuenca, 2011). La concentración de hemoglobina fue medida en laboratorio por medio de espectrofotometría, usando el equipo BTS-350 (Biosystem, España). El recuento de eritrocitos y leucocitos fue realizado manualmente usando la solución diluyente Natt-Herrick en cámara de Neubauer, a una

dilución 1:100 (Natt & Herrick, 1952). El recuento diferencial de leucocitos fue llevado a cabo sobre el extendido sanguíneo coloreado con Wright, contando 100 leucocitos bajo el objetivo de 100x y expresándose en forma de porcentaje (Eatwell et al., 2014). Simultáneamente, se revisaron los extendidos sanguíneos coloreados con Giemsa en búsqueda de hemoparásitos intra y extracelulares, para lo cual se usó el microscopio Olympus BX43. Las imágenes digitales de las células sanguíneas y los hemoparásitos fueron capturadas con la cámara digital Olympus DP27 y procesadas con el programa cellSens Standard 1,13 (Olympus, Tokyo, Japon).

2.3.5 Bioquímica sérica

Las proteínas plasmáticas totales (PPT) fueron medidas usando un refractómetro de mano (Scientific®). Los demás análisis de química sérica fueron realizados usando el espectrofotómetro Biosystem BTS-350 (Biosystem, España). Los analitos medidos fueron glucosa, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), albúmina, fosfatasa alcalina (ALP), colesterol, ácido úrico y creatinina. Los métodos de detección y medición se resumen en la Tabla suplementaria 2.1. Los reactivos y kits de medición usados correspondieron la casa comercial Spinreact (Spinreact, España). El coeficiente de variación (CV) de cada analito fue obtenido de los controles de calidad reportados por la compañía manufacturera en los insertos de los kits. No se realizaron análisis bioquímicos a partir de sangre total.

2.3.6 Análisis estadísticos

Se realizaron análisis estadísticos descriptivos para todos los parámetros evaluados, estos incluyeron media, mediana y desviación estándar (DE). Se usó el paquete XLSTAT (v 2020.1.3) para evaluar la normalidad de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilk, la cual fue corroborada a través de la realización de histogramas para cada parámetro. Igualmente, se usó este programa para determinar la presencia de valores atípicos a través de la prueba de Dixon, con un intervalo de confianza del 95%. Los datos atípicos fueron removidos manualmente y se repitieron las pruebas de normalidad.

Se realizaron pruebas T-student y Mann-Whitney-Wilcoxon para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre géneros y tamaños de los individuos y los parámetros evaluados, para esto se usó el programa R (v. 4.0.0). El establecimiento de los intervalos de referencia fue realizado siguiendo los lineamientos de la Sociedad Americana para Patólogos Clínicos Veterinarios (ASVCP) (Friedrichs et al., 2012); para esto, el intervalo de referencia del 95% fue calculado usando métodos paramétricos para aquellos parámetros con distribución normal, mientras que el cálculo del intervalo de referencia para parámetros con distribución no gaussiana fue realizado a través de métodos robustos siguiendo los lineamientos propuestos por la guía EP28-A3c del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) y usando el software MedCalc® (Schoonjans, Zalata, Depuydt, & Comhaire, 1995) (v. 19.4.0). Así mismo, los intervalos de confianza del 90% de los límites inferior y superior fueron obtenidos para cada parámetro. En los análisis estadísticos se incluyeron individuos físicamente sanos, tanto adultos como juveniles de ambos sexos y que no presentaran parásitos a nivel sanguíneo.

2.4 Resultados

2.4.1 Muestras

Se muestrearon un total de 50 tortugas de las especies *Podocnemis vogli* y *P. unifilis* presentes en la Estación Biológica Tropical Roberto Franco. Los datos morfométricos de las tortugas muestreadas se reportan en la Tabla 2.1. De manera general, para ambas especies, las hembras fueron significativamente más grandes que los machos en todos los parámetros morfológicos evaluados ($P < 0,05$); adicionalmente, las tortugas Terecay (*P. unifilis*) fueron más grandes que los Galápagos sabaneros (*P. vogli*).

Tabla 2.1 Parámetros morfométricos de los Galápagos sabaneros (*Podocnemis vogli*) y Terecay (*Podocnemis unifilis*) en condiciones de cautiverio analizados en el presente estudio.

A	Hembras (n = 17)			Machos (n = 11)		
	Media	DE	Rango	Media	DE	Rango
MCL (cm)	24,2	4,7	16,1 - 30,5	18,2	2,4	15,1 - 22,4
MCW (cm)	18,2	3,4	12,3 - 21,9	14,1	1,4	12,3 - 16,7
MPL (cm)	21,7	4,2	14,2 - 27,0	16,3	2,6	13,2 - 21,8
CH (cm)	8,2	1,6	5,9 - 10,8	6,7	0,8	5,4 - 8,2
Peso (kg)	2	1	0,6 - 3,4	0,9	0,3	0,7 - 1,6
B	Hembras (n = 15)			Machos (n = 6)		
	Media	DE	Rango	Media	DE	Rango
MCL (cm)	29,8	3,1	24,5 - 33,9	24,3	1,7	22,4 - 26,6
MCW (cm)	21,7	2,2	18,4 - 25,9	18,4	1,2	17,5 - 20,5
MPL (cm)	26,7	2,8	22 - 30	21,9	2	19,5 - 24,2
CH (cm)	10,6	1,1	8,7 - 12,5	9,3	0,6	8,3 - 10,1
Peso (kg)	3,2	0,9	1,8 - 4,6	1,9	0,5	1,3 - 2,5

(A) Galápagos sabaneros (*Podocnemis vogli*) y (B) Terecays (*P. unifilis*) de la Estación de Biología Tropical Roberto Franco, Villavicencio – Colombia. MCL: Longitud máxima del caparazón; MCW: Ancho máximo del caparazón; MPL: Longitud máxima del plastrón; CH: Altura del caparazón. Todos los parámetros mostraron diferencias significativas entre los sexos ($P < 0,05$).

2.4.2 Hematología y química sanguínea

Los análisis morfométricos de las células en sangre periférica mostraron que los eritrocitos maduros de *P. vogli* (24.4 μm X 15.7 μm) son ligeramente más pequeños que los observados en *P. unifilis* (25.6 μm X 18.1 μm). Los leucocitos mostraron caracteres morfológicos y de coloración similares a los previamente reportados para quelonios y otras especies de reptiles. Las células sanguíneas observadas en *P. vogli* y *P. unifilis* se muestran en la Figura 2.1 y 2.2.

Un individuo de la especie *P. vogli*, identificado con el código EBT044, se encontró infectado con un hemoparásito del género *Haemocystidium* (Figura 2.3), posteriores análisis moleculares, siguiendo la metodología de González y colaboradores (2019),

mostraron que este parásito coincidía genéticamente con *Haemocystidium pacayae*, descrito por Pineda-Catalan (2013) en Perú y reportado por González y colaboradores (2019) infectando esta misma especie de tortuga en Colombia.

Los valores hematológicos y de química sanguínea de *Podocnemis vogli* se reportan en la Tabla 2.2. El volumen corpuscular medio (VCM), el porcentaje de eosinófilos y la concentración de creatinina presentaron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras (Tabla 2.4). La Tabla 2.3 incluye los valores hematológicos y de química sanguínea de *P. unifilis*. Para esta especie, el porcentaje de monocitos y azurófilos, así como la concentración de AST, colesterol y creatinina presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos (Tabla 2.4). Adicionalmente, tras eliminar algunos datos atípicos presentes en diferentes parámetros, el *n* fue inferior a 20, por lo cual no es recomendable establecer intervalos de referencia para estos parámetros.

Figura 2.1 Células de la sangre periférica de *Podocnemis vogli* con tinción de Wright. A: Eritrocito maduro; B: Policromatófilo; C: Heterófilo; D: Linfocito inmaduro; E: Basófilo; F: Eosinófilo; G: Monocito; H: Azurófilo-like; I: Trombocitos. Barra: 10 μ m

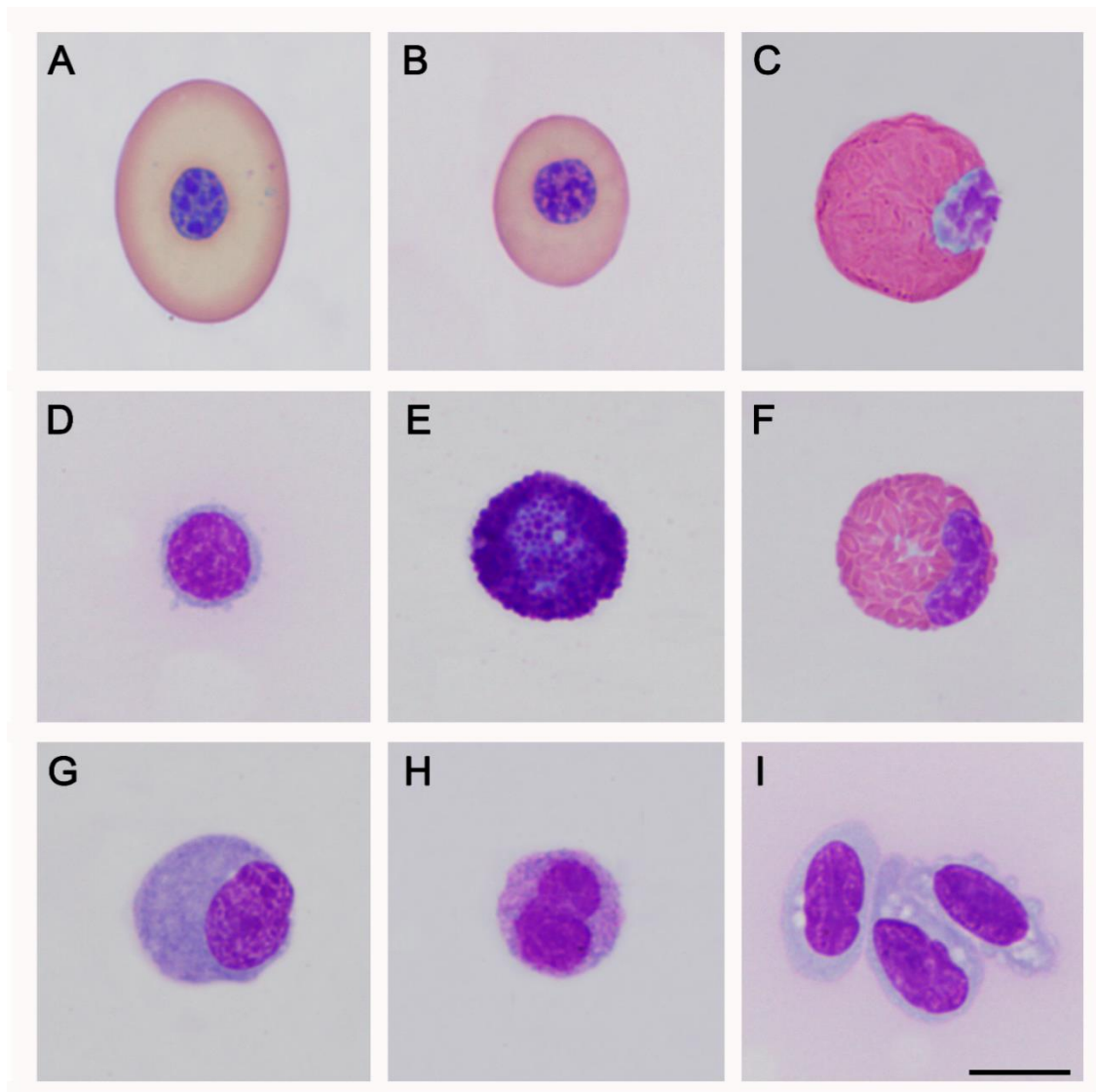


Figura 2.2 Células de la sangre periférica de *Podocnemis unifilis* con tinción de Wright. A: Eritrocito maduro; B: Policromatófilo; C: Heterófilo; D: Linfocito maduro; E: Basófilo; F: Eosinófilo; G: Monocito; H: Azurófilo-like; I: Trombocitos. Barra: 10 μ m

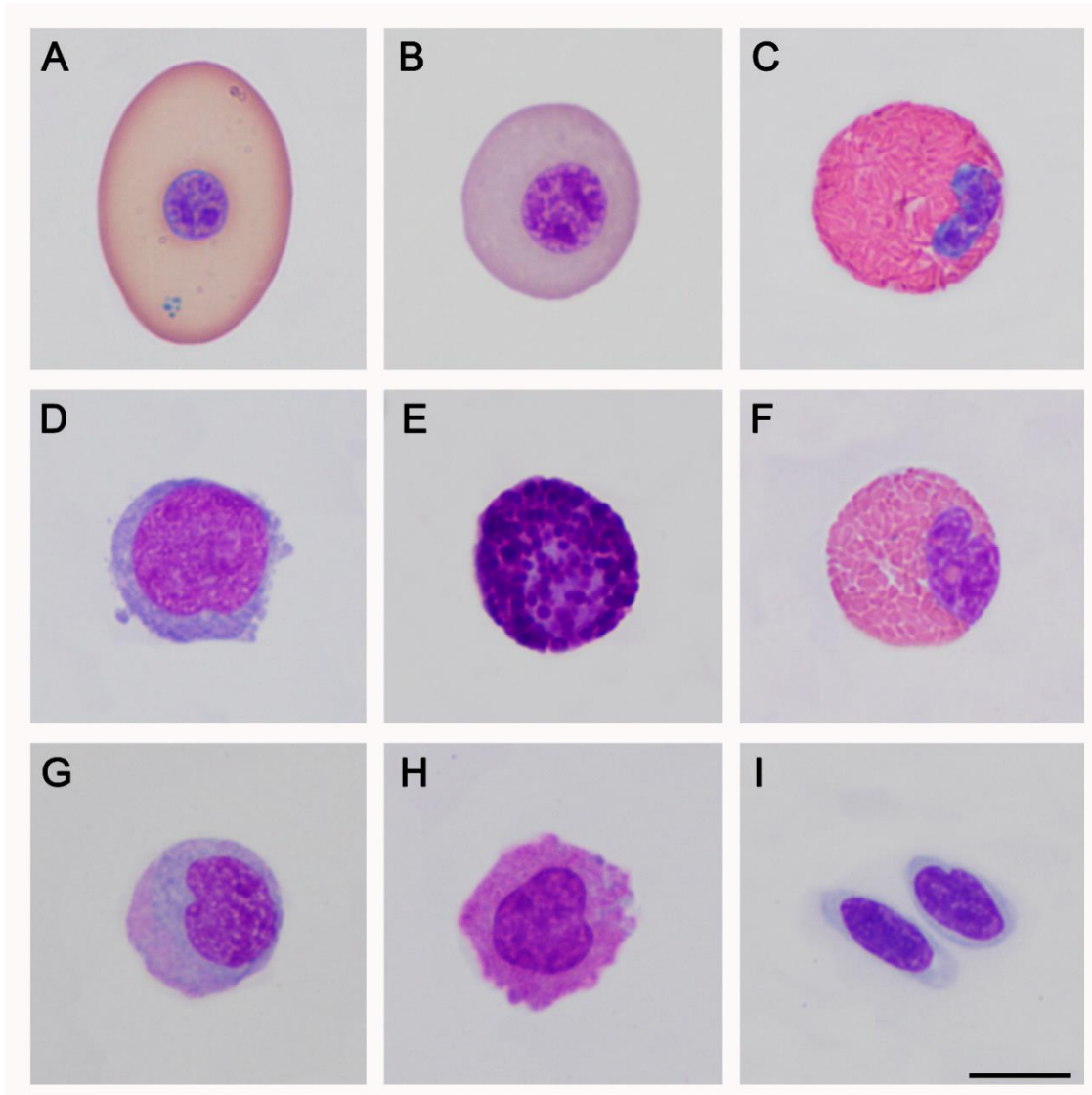


Figura 2.3 Estadios de *Haemocystidium pacayae* hallados en una tortuga de la especie *P. vogli* (EBT044). : Gametocito inmaduro; B: Microgametocito; C: Macrogametocito. Tinción de Giemsa. Barra: 10 µm

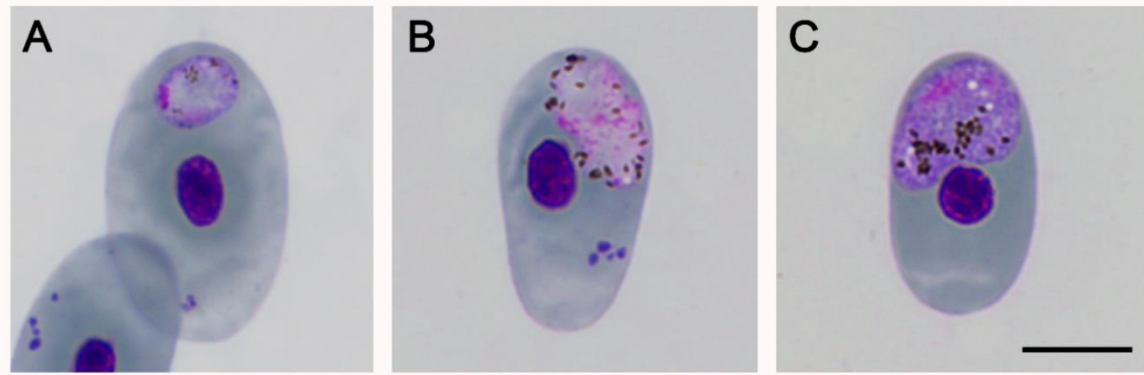


Tabla 2.2 Valores hematológicos y de química sérica de los galápagos sabaneros (*P. vogli*, n= 28)

Analitos	Media	DE	Mediana	Min - Max	LI (90% IC)	LS (90% IC)
Hematocrito (%)	24,8	2,5	24,2	21,0 - 30,0	19,9 (18,3 - 21,4)	29,6 (30,1 - 31,1)
PPT (g/dL)	4,2	1,2	4,3	1,5 - 7,0	1,9 (1,2 - 2,6)	6,5 (7,7 - 7,1)
Hemoglobina (g/dL)	6,5	1,4	6,2	4,2 - 9,7	3,7 (2,8 - 4,5)	9,2 (9,3 - 10,0)
RGR (10 ⁶ /µL)	0,23	0,07	0,23	0,12 - 0,37	0,09 (0,04 - 0,12)	0,37 (0,33 - 0,41)
RGB (10 ³ /µL)	3,55	1,20	3,41	1,39 - 5,55	1,19 (0,5 - 1,8)	5,91 (5,2 - 6,5)
VCM (fL)♦	1089	367	1025	635 - 2000	369 (143 - 596)	1810 (2000 - 2036)
HCM (pg)	324,1	129,0	298,6	135,1 - 608,3	65,8 (0 - 143,5)	582 (608 - 660)
CHCM (g/dL)	26,0	4,7	26,2	17,5 - 35,3	16,4 (13,1 - 19,6)	35,5 (35,2 - 38,7)
Heterófilos (%)	45,8	12,4	43,5	24,0 - 73,0	21,6 (14,8 - 28,3)	70,0 (73,2 - 76,7)
Linfocitos (%)	25,8	11,0	25,5	1,0 - 47,0	4,3 (0 - 10,2)	47,3 (47,3 - 53,2)
Eosinófilos (%)♦	16,9	6,2	15,5	5,0 - 28,0	4,7 (1,2 - 8,0)	29,0 (28,6 - 32,4)
Monocitos (%)	6,6	2,8	6,0	3,0 - 14,0	0,2 (0 - 1,7)	12,2 (14,7 - 14,1)
Basófilos (%)*	4,0	3,1	4,0	0,0 - 10,0		
Azurófilos (%)*	0,3	0,6	0,0	0,0 - 2,0		
Heterófilos (10 ³ /µL)	1,50	0,40	1,42	0,79 - 2,39	0,71 (0,46 - 0,89)	2,29 (2,00 - 2,42)
Linfocitos (10 ³ /µL)	0,84	0,36	0,84	0,03 - 1,54	0,14 (0 - 0,33)	1,55 (1,30 - 1,68)
Eosinófilos (10 ³ /µL)	0,55	0,20	0,51	0,16 - 0,92	0,15 (0,04 - 0,26)	0,95 (0,83 - 1,06)
Monocitos (10 ³ /µL)	0,22	0,09	0,20	0,10 - 0,46	0,01 (0 - 0,05)	0,40 (0,32 - 0,46)
Basófilos (10 ³ /µL)	0,13	0,10	0,11	0,0 - 0,33	0	0,33 (0,26 - 0,39)
Azurófilos (10 ³ /µL)*	0,01	0,02	0,00	0,0 - 0,07		
Glucosa (mg/dL)	68,0	14,3	67,0	47,0 - 99,0	39,9 (31,6 - 48,2)	96,2 (99,8 - 104,4)
Albumina (g/dL)	1,5	0,3	1,5	0,8 - 2,2	1,0 (0,78 - 1,12)	2,1 (2,9 - 2,2)
ALT (U/L)	4,9	1,6	5,0	1,0 - 8,0	1,7 (0,80 - 2,68)	8,0 (8,0 - 8,9)
AST (U/L)	129,1	36,5	123,0	79,0 - 215,0	57,6 (36,0 - 79,1)	200 (215 - 222)

Tabla 2.2 (Continuación)

Analitos	Media	DE	Mediana	Min - Max	LI (90% IC)	LS (90% IC)
ALP (U/L)	91,9	30,5	91,0	32,0 - 151,0	32,1 (14,5 - 49,7)	151 (151 - 169)
Colesterol (mg/dL)	120,0	32,8	115,5	43,0 - 177,0	55,6 (36,2 - 74,9)	184 (177 - 203)
Ácido Úrico (mg/dL)	1,1	0,3	1,0	0,6 - 1,8	0,4 (0,19 - 0,56)	1,7 (1,4 - 1,8)
Creatinina (mg/dL)♦*	0,3	0,1	0,3	0,2 - 0,4		

DE: Desviación estándar; LI: Límite inferior; LS: Límite superior; IC: Intervalo de confianza; PPT: Proteínas plasmáticas totales; RGR: Recuento de glóbulos rojos; RGB: Recuento de glóbulos blancos; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; ALP: Fosfatasa alcalina. Las diferencias significativas entre los sexos ($P < 0,05$) se denotan con un rombo negro (♦); para información específica véase el material suplementario 2.2. Para algunos parámetros no fue posible establecer un intervalo de referencia y el IC debido a la incapacidad del software de realizar un adecuado Bootstrap (*)

Tabla 2.3 Valores hematológicos y de química sérica de las tortugas Terecay (*P. unifilis*, $n = 21$)

Analitos	Media	DE	Mediana	Min - Max	LI (90% IC)	LS (90% IC)
Hematocrito (%)	23,0	4,3	24,0	14,0 - 30,0	14,7 (12,0 - 17,3)	31,4 (28,7 - 34,0)
PPT (g/dL)	4,05	0,79	4,10	2,4 - 5,6	2,51 (2,0 - 3,0)	5,60 (5,0 - 6,0)
Hemoglobina (g/dL)♣	6,38	1,28	6,70	4,0 - 8,7	3,88 (3,0 - 4,7)	8,89 (8,0 - 9,7)
RGR ($10^6/\mu\text{L}$)♣	0,165	0,031	0,163	0,110 - 0,218	0,11 (0,08 - 0,12)	0,23 (0,20 - 0,24)
RGB ($10^3/\mu\text{L}$)	3,330	1,113	3413,3	1,332 - 5,162	1,1 (0,42 - 1,87)	5,5 (4,7 - 6,2)
VCM (fL)♣	1413	318	1481	643 - 1935	790 (578 - 1001)	2036 (1824 - 2248)
HCM (pg)♣	388	77,2	363	276 - 580	237 (182 - 291)	540 (485 - 594)
CHCM (g/dL)♣	28,9	7,6	26,2	21,1 - 47,1	8,4 (3,7 - 16,6)	42,7 (34,8 - 50,1)
Heterófilos (%)	54,8	10,4	52,0	34,0 - 74,0	34,5 (27,9 - 41,0)	75,1 (68,5 - 81,6)
Linfocitos (%)	24,9	7,6	26,0	8,0 - 39,0	10,1 (5,3 - 14,8)	39,7 (34,9 - 44,4)
Eosinófilos (%)	8,7	5,7	8,0	1,0 - 19,0	0 (0 - 1,2)	19,7 (16,0 - 23,4)
Monocitos (%)♦*	6,5	3,5	6,0	2,0 - 12,0	-	-
Basófilos (%)♣	3,0	2,4	3	0 - 8,0	0 (0 - 0)	7,63 (6,0 - 9,1)
Azurófilos (%)♦*	0,6	0,7	0,0	0,0 - 2,0	-	-
Heterófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	1,89	0,84	1807,08	0,68 - 3,47	0,25 (0 - 0,79)	3,53 (2,9 - 4,0)
Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,81	0,34	779,22	0,29 - 1,42	0,14 (0 - 0,36)	1,48 (1,2 - 1,7)
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,30	0,21	287,49	0,03 - 0,68	0 (0 - 0,03)	0,71 (0,57 - 0,84)
Monocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,21	0,14	154,85	0,07 - 0,47	0 (0 - 0)	0,49 (0,35 - 0,61)
Basófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,08	0,07	0,07	0,00 - 0,25	0 (0 - 0)	0,23 (0,17 - 0,27)
Azurófilos ($10^3/\mu\text{L}$)*	0,02	0,03	0,00	0,00 - 0,09	-	-
Glucosa (mg/dL)	38,7	19,6	31,5	19,0 - 86,0	0 (0 - 3,09)	74,7 (56,7 - 93,7)
Albumina (g/dL)♣	1,5	0,2	1,5	1,1 - 1,9	1,14 (1,02 - 1,25)	1,81 (1,6 - 1,9)
ALT (U/L)♣*	5,9	4,0	5,0	1,0 - 13,0	-	-
AST (U/L)♦♣	95,9	30,3	87,0	52,0 - 166,0	19,0 (3,01 - 46,1)	154 (125 - 184)
ALP (U/L)♣	95,6	30,5	93,5	60,0 - 167,0	35,8 (14,9 - 56,7)	155 (134 - 176)
Colesterol (mg/dL)♦	90,9	41,0	79,5	35,0 - 166,0	10,6 (0 - 37,1)	171 (144 - 197)

Tabla 2.3 (Continuación)

Analitos	Media	DE	Mediana	Min - Max	LI (90% IC)	LS (90% IC)
Ácido Úrico (mg/dL)	1,3	0,3	1,1	1,0 - 2,0	0,33 (0,17 - 0,65)	1,90 (1,6 - 2,2)
Creatinina (mg/dL)♦*	0,2	0,1	0,2	0,1 - 0,4	-	-

DE: Desviación estándar; LI: Límite inferior; LS: Límite superior; IC: Intervalo de confianza; PPT: Proteínas plasmáticas totales; RGR: Recuento de glóbulos rojos; RGB: Recuento de glóbulos blancos; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; ALP: Fosfatasa alcalina. Las diferencias significativas entre los sexos ($P < 0,05$) se denotan con un rombo negro (♦); para información específica véase el material suplementario 2.3. Los parámetros con un $n < 20$ se indican con un trébol(♣). Para algunos parámetros no fue posible establecer el IC debido a la incapacidad del software de realizar un adecuado Bootstrap (*).

Tabla 2.4 Parámetros hematológicos y de química sérica que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras de *Podocnemis vogli* y *P. unifilis*.

<i>Podocnemis vogli</i>									
Parámetro	Hembras				Machos				p
	Media	DE	Min	Max	Media	DE	Min	Max	
VCM (fL)	1214,1	393,3	702,3	2000,0	872,5	181,6	635,1	1222,2	0,0119
Eosinófilos (%)	18,8	5,8	9	27	13,9	5,9	5	28	0,0411
Creatinina (mg/dL)	0,23	0,0	0,2	0,3	0,3	0,1	0,2	0,4	0,0146
<i>Podocnemis unifilis</i>									
Parámetro	Hembras				Machos				p
	Media	DE	Min	Max	Media	DE	Min	Max	
Monocitos (%)	5,3	3,2	2,0	12,0	9,5	2,3	6,0	12,0	0,01
Azurófilos (%)	0,3	0,6	0,0	0,5	1,2	0,8	0,0	1,8	0,02
AST (U/L)	84,3	20,6	52,0	134,0	121,0	34,5	83,0	166,0	0,01
Colesterol (mg/dL)	104,0	42,0	35,0	166,0	60,3	13,2	37,0	72,0	0,003
Creatinina (mg/dL)	0,3	0,1	0,1	0,4	0,2	0,1	0,2	0,4	0,008

2.5 Discusión

Este estudio reporta por primera vez valores e intervalos de referencia hematológicos y de química sanguínea para *Podocnemis vogli*; adicionalmente, se realizan nuevos reportes y se adiciona información acerca de la hematología de *P. unifilis*, publicándose por primera vez valores de química sanguínea para esta misma especie.

El dimorfismo sexual ha sido reportado previamente para miembros de la familia Podocnemididae, como *P. erythrocephala* y *P. unifilis* en Brasil (Bernhard & Vogt, 2012; Miorando, Giarrizzo, & Pezzuti, 2015). En concordancia, los parámetros morfológicos aquí evaluados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras de ambas especies, siendo estas últimas las más grandes. Estos resultados coinciden con las características descritas por otros autores para las dos especies estudiadas (Páez et al., 2012; Rueda-Almonacid, Carr, Mittermeier, Rodríguez-Mahecha, Mast, Vogt, Rhodin, Ossa-Velásquez, Rueda, & Mittermeier, 2007).

Los eritrocitos observados en la sangre periférica de ambas especies de tortugas, superan los 24 μm de largo y 15 μm de ancho, lo que los convierte en células relativamente grandes, superadas en tamaño por algunas pocas especies de quelonios, como *Platysternon megacephalum* (25,5 x 15,1 μm), *Aldabrachelys gigantea* (25 x 15,2 μm), *Dermochelys coriácea* (24,9 x 15,9 μm) y *Lepidochelys olivácea* (25,7 x 14,4 μm) (Frair, 1977b). Los tamaños de los eritrocitos fueron similares entre ambas especies, lo cual podría indicar que esta es una característica propia de los Podocnemididos, sin embargo, no existen más reportes de este tipo en los demás miembros de esta familia, lo que hace necesario la realización de estudios enfocados en la morfometría celular de estas especies para poder confirmar o refutar esta hipótesis. Adicional a esta característica morfológica, la mayoría de los individuos de ambas especies presentaron inclusiones eritrocitarias de tonalidad basófila y forma punteada, redondeada u ovalada a nivel del citoplasma (Fig. 2.1A, Fig. 2.3); las cuales habían sido reportadas previamente para otras especies de quelonios y pueden corresponder a remanentes de membranas consistentes con organelos degenerados, posiblemente mitocondrias (Alleman, Jacobson, & Raskin, 1992).

Los leucocitos observados en sangre periférica se muestran en las figuras 2.1 y 2.2. Morfológicamente coinciden con los reportes de leucocitos para otras especies de quelonios y de reptiles (Perpiñán, 2017b; Stacy, Alleman, & Sayler, 2011; Sykes & Klaphake, 2015); sin embargo, se lograron visualizar algunas células sanguíneas que concuerdan con las descripciones morfológicas de los azurófilos, a pesar de que estos son comúnmente observados en lagartos, serpientes y crocodilianos (Stacy et al., 2011). A

pesar de esto, se hace necesario llevar a cabo análisis por medio de otras técnicas como microscopia electrónica de transmisión para determinar si estas células correspondan a azurófilos, puesto que los reportes fotográficos de este tipo de células son bastante heterogéneos.

El 90% de los parámetros hematológicos y de química sérica evaluados en *P. vogli* no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras (Tabla suplementaria 2.2); sin embargo, parámetros como el volumen corpuscular medio (VCM), el porcentaje de eosinófilos y la concentración de creatinina, si presentaron dichas diferencias, a pesar de ello, esta desigualdad solo es evidente al comparar los promedios, pues los parámetros presentan un rango similar entre ambos sexos, a excepción del VCM, el cual fue más elevado en las hembras (Tabla 2.4). El VCM está influenciado por el porcentaje de hematocrito y el recuento de eritrocitos, sin embargo, tampoco observaron diferencias significativas en estos parámetros entre ambos sexos de *P. vogli*. Estudios previos mostraron una relación directamente proporcional entre el tamaño corporal de tortugas marinas de las especies *Caretta caretta*, *Chelonia mydas* y *Eretmochelys imbricata* y parámetros hematológicos como hematocrito, tamaño eritrocitario y volumen celular (Frair, 1977a), lo cual podría explicar la diferencia en el VCM entre los sexos.

Similar a lo observado en *P. vogli*, *P. unifilis* presenta una similitud del 83% de los parámetros evaluados entre machos y hembras, a excepción del porcentaje de monocitos y azurófilos, y la concentración de AST, colesterol y creatinina, los cuales si presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla suplementaria 2.3). La concentración de AST fue mayor en machos, lo cual puede estar relacionado con el incremento de la actividad y agresión presentado por algunas especies de tortugas de este sexo en época de apareamiento (Andreani et al., 2014; Dickinson, Jarchow, & Trueblood, 2002). Por otra parte, las hembras de *P. unifilis* mostraron una concentración de colesterol más elevada que los machos, lo cual se ha reportado que puede estar relacionado con procesos reproductivos, específicamente vitelogénesis y producción de huevos (Campbell, 2014; Zaias et al., 2006). Para los demás parámetros con diferencias significativas entre ambos sexos, se observó que estas desigualdades se encontraban al comparar los promedios,

pues los rangos de distribución de los datos fueron similares entre machos y hembras, lo cual puede estar acentuado por el bajo número de individuos muestreados de cada sexo. Por otra parte, la eliminación de datos atípicos para algunos parámetros analizados en *P. unifilis* causaron que estos tuvieran un n inferior a 20, por lo cual, según los lineamientos de la AVSCP, no es recomendable establecer intervalos de referencia; a pesar de esto, se proponen intervalos aproximados que deben ser tenidos en cuenta con precaución (Tabla 3).

Los valores hematológicos y de química sérica de ambas especies fueron similares entre sí, sin embargo, algunos parámetros como el recuento de glóbulos rojos, índices eritrocitarios, concentración de glucosa y AST mostraron una marcada diferencia. En *P. unifilis*, se observó un menor recuento de eritrocitos, porcentaje y recuento absoluto de eosinófilos y concentración de glucosa, AST y colesterol, en comparación con *P. vogli*, mientras que en esta última especie se observó un menor VCM y MCH. Teniendo en cuenta que el tamaño de los eritrocitos es inversamente proporcional al recuento de glóbulos rojos (Perpiñán, 2017a) y directamente proporcional a índices eritrocitarios como el VCM (Campbell, 2015), estas observaciones soportan los resultados mostrados previamente, donde, *P. vogli*, al tener eritrocitos más pequeños, se observó un recuento mayor de los mismos y un menor VCM y MCH, mientras que lo contrario fue observado en *P. unifilis*. Por otra parte, considerando que los individuos de ambas especies se encontraban bajo las mismas condiciones ambientales y las muestras fueron obtenidas y procesadas de la misma manera y en el mismo lapso, las diferencias observadas en parámetros como glucosa o AST pueden ser características de cada especie.

Previos estudios hematológicos realizados en *P. unifilis* de Perú mostraron el recuento de eritrocitos y leucocitos, así como el porcentaje de linfocitos mayor que los valores obtenidos para la misma especie en este estudio, mientras que los demás parámetros evaluados fueron menores (Rojas & Varillas, 2013). A pesar de que para ambas investigaciones se muestrearon tortugas en estado de cautiverio, las diferencias observadas pueden ser causadas por variaciones en las condiciones ambientales, técnicas de muestreo y/o procesamiento de muestras.

De manera general, para ambas especies, el recuento de glóbulos rojos mostró valores más bajos que los reportados previamente para *Podocnemis unifilis*, *P. expansa* y *P. erythrocephala* (Martínez et al., 2007; Oliveira-Júnior et al., 2009; Rojas & Varillas, 2013; Rossini et al., 2012; Santos, 2011). Por otra parte, para ambas especies estudiadas en este trabajo, parámetros hematológicos como hematocrito, concentración de proteínas plasmáticas totales y hemoglobina, e índices eritrocitarios como VCM y MCHC fueron similares a los reportados para *P. expansa* en Brasil (Oliveira-Júnior et al., 2009); así mismo parámetros de química sérica como glucosa, albúmina, colesterol, ácido úrico y creatinina también fueron similares a los reportados para *P. expansa* en Venezuela (Martínez et al., 2007). A pesar de estas similitudes, se observa una marcada heterogeneidad entre los diferentes valores hematológicos y de química sérica reportados para otras especies de Podocnemididos (Fonseca et al., 2016; Rojas & Varillas, 2013; Rossini et al., 2012; Santos, 2011), en los cuales las muestras sanguíneas fueron obtenidas de diferentes sitios de venopunción, los individuos muestreados se pertenecían a diferentes grupos etarios y se encontraban en estado de cautiverio o silvestre. Lo anterior demuestra una vez más, las dificultades al momento de evaluar y establecer intervalos de referencia de parámetros hematológicos y de química sanguínea en reptiles o demás animales ectotermos, ya que estos poseen diferentes adaptaciones fisiológicas en respuesta a un gran número de factores intrínsecos (especie, sexo, edad, estado fisiológico) y extrínsecos (estación, temperatura, hábitat, dieta, enfermedades, estrés por estado de cautiverio y sitio de venopunción), dificultando su estudio, análisis e interpretación (Campbell, 2015).

Pese a estos inconvenientes, establecer líneas base de parámetros hematológicos y bioquímicos para especies endémicas o en diferentes estados de amenaza, ya sea en estado de cautiverio o silvestre, son de gran relevancia, ya que pueden ser útiles para el diagnóstico médico veterinario, así como para tomar medidas en programas de conservación. En este sentido, los intervalos hematológicos aquí propuestos pueden tenerse en cuenta como una guía para la interpretación clínica, sin embargo, valores por fuera de estos rangos no necesariamente pueden ser indicativos de enfermedad, por lo cual es necesario tener cautela al momento de usarlos.

Por otra parte, una tortuga hembra de la especie *P. vogli* mostró presencia de hemoparásitos que concuerdan morfológica y molecularmente con la especie *Haemocystidium pacayae*, el cual había sido previamente identificado infectando *P. unifilis* en Perú (Pineda-Catalan et al., 2013) y posteriormente reportado en *P. vogli* en el departamento de Casanare, Colombia (González et al., 2019). Los resultados hematológicos y de química sérica de este individuo se encontraron dentro de los intervalos establecidos para los individuos sanos de la misma especie, a excepción de la concentración de colesterol, el cual mostró una concentración de 235 mg/dL, siendo más elevado que el intervalo de referencia propuesto (55,6-184,3 mg/dL). Este parámetro elevado puede estar relacionado con el estado reproductivo del individuo, en vez de relacionarse con la infección; sin embargo, estudios mas detallados acerca del impacto de infecciones por parásitos sanguíneos en reptiles deben ser adelantados.

En conclusión, este estudio establece líneas base de parámetros hematológicos y de química sérica para *Podocnemis vogli* y *P. unifilis*, los cuales pueden ser usados como referencia a nivel clínico y para investigaciones futuras, teniendo en cuenta los factores intrínsecos y extrínsecos que puedan alterarlos. El establecimiento de estos parámetros para tortugas acuáticas saludables es una prioridad para su conservación y manejo, pues esta información puede ser útil para tomar decisiones e identificar amenazas, agentes patógenos o factores ambientales que puedan estar amenazando a estas especies. Por otra parte, debido a los hábitos estas tortugas, individuos en estado silvestre de especies como *P. vogli* se encuentran comúnmente infectadas por parásitos sanguíneos, lo cual dificultaría el establecimiento de intervalos de referencia de estas especies sin caer en el sesgo que podría causar la infección; por esta razón, el desarrollo de este tipo de análisis de individuos en estado de cautiverio, los cuales no presentan infección por estos microorganismos, puede ser una herramienta eficaz para analizar estos parámetros y evaluar el impacto de estos microorganismos en la fisiología de las tortugas.

2.6 Agradecimientos

Los autores desean agradecer a los miembros de la Estación Biológica Tropical Roberto Franco por su ayuda durante la fase de campo, a los integrantes del grupo GERPH y al Laboratorio Clínico de Clínica de Animales de la Universidad Nacional de Colombia. Este trabajo fue financiado por la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia con el proyecto No 42105.

2.7 Referencias

- Alleman, A., Jacobson, E., & Raskin, R. (1992). Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *American Journal of Veterinary Research*, 53(9), 1645–1651.
- Andreani, G., Carpenè, E., Cannavacciuolo, A., Di Girolamo, N., Ferlizza, E., & Isani, G. (2014). Reference values for hematology and plasma biochemistry variables, and protein electrophoresis of healthy Hermann's tortoises (*Testudo hermanni* ssp.). *Veterinary Clinical Pathology*, 43(4), 573–583. <https://doi.org/10.1111/vcp.12203>
- Bernhard, R., & Vogt, R. C. (2012). Population Structure of the Turtle *Podocnemis erythrocephala* in the Rio Negro Basin, Brazil. *Herpetologica*, 68(4), 491–504. <https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-12-00008>
- Campbell, T. W. (2014). Clinical Pathology. En D. R. Mader & S. J. Divers (Eds.), *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery* (1° ed., p. 462). <https://doi.org/10.1016/C2010-0-67117-3>
- Campbell, T. W. (2015). *Exotic Animal Hematology and Cytology* (Fourth Edi). <https://doi.org/10.1002/9781118993705>
- CLSI. (2008). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Third Edition. En *CLSI document C28-A3c*. Wayne (PA): *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Dickinson, V. M., Jarchow, J. L., & Trueblood, M. H. (2002). Hematology and Plasma

- Biochemistry Reference Range Values for Free-Ranging Desert Tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), 143–153. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.1.143>
- Fonseca, L. A., Maia, N. L., Girardi, F. M., Carvalho Filho, W. P., Pimentel, F. G., & Braga, F. R. (2016). Evaluation of serum biochemical parameters in Amazon turtles (*Podocnemis expansa*) hatchlings kept in captivity. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 36(12), 1186–1189. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016001200008>
- Frair, W. (1977a). Sea turtle red blood cell parameters correlated with carapace lengths. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 56(4), 467–472. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(77\)90269-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(77)90269-9)
- Frair, W. (1977b). Turtle Red Blood Cell Packed Volumes, Sizes, and Numbers. *Herpetologica*, 33(2), 167–190.
- Friedrichs, K. R., Harr, K. E., Freeman, K. P., Szladovits, B., Walton, R. M., Barnhart, K. F., & Blanco-Chavez, J. (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 441–453. <https://doi.org/10.1111/vcp.12006>
- González, L., Pacheco, M., Escalante, A., Jiménez-Maldonado, A., Cepeda, A., Rodríguez-Fandiño, O., ... Matta, N. (2019). *Haemocystidium* spp., a species complex infecting ancient aquatic turtles of the family Podocnemididae: First report of these parasites in *Podocnemis vogli* from the Orinoquia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 10(October), 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.10.003>
- IUCN. (2020). IUCN Red List. Recuperado el 19 de mayo de 2020, de The IUCN Red List of Threatened Species website: <https://www.iucnredlist.org/>
- Martínez-Silvestre, A., Lavín, S., & Cuenca, R. (2011). Hematología y citología sanguínea en reptiles. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 31(3), 131–141.
- Martínez, E., Hernández, O., Boede, E., Peñalosa, C., & Rodríguez, A. (2007). Inventario de la Tortuga Arrau, *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) en Zoológicos de Venezuela. Valores Referenciales del Hemograma y la Bioquímica Sérica. *Revista Científica*, XVII(5), 433–440.

- Miorando, P., Giarrizzo, T., & Pezzuti, J. (2015). Population structure and allometry of *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) in a protected area upstream Belo Monte dam in Xingu River, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87(4), 2067–2079. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140321>
- Natt, M. P., & Herrick, C. A. (1952). A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. *Poultry Science*, 31(4), 735–738. <https://doi.org/10.3382/ps.0310735>
- Oliveira-Júnior, A. A., Tavares-Dias, M., & Marcon, J. L. (2009). Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Research in Veterinary Science*, 86(1), 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.05.015>
- Páez, V. P., Morales-Betancourt, M. A., Lasso, C. A., Castaño-Mora, O. V., & Bock, B. C. (2012). *Biología y conservación de la tortugas continentales de Colombia. Serie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia*. Bogotá, Colombia: IAVH.
- Perpiñán, D. (2017a). Chelonian haematology: 1. Collection and handling of samples. *In Practice*, 39(5), 194–202. <https://doi.org/10.1136/inp.j1692>
- Perpiñán, D. (2017b). Chelonian haematology 2. Identification of blood cells. *In Practice*, 39(6), 274–283. <https://doi.org/10.1136/inp.j2361>
- Pineda-Catalan, O., Perkins, S. L., Peirce, M. A., Engstrand, R., Garcia-Davila, C., Pinedo-Vasquez, M., & Aguirre, A. A. (2013). Revision of Hemoproteid Genera and Description and Redescription of Two Species of Chelonian Hemoproteid Parasites. *Journal of Parasitology*, 99(6), 1089–1098. <https://doi.org/10.1645/13-296.1>
- Rojas, G., & Varillas, L. (2013). Hemograma de la Tortuga Taricaya (*Podocnemis unifilis*). *Hospitales veterinarios*, 5(1), 13–15.
- Rossini, M., Blanco, P. A., Marín, E., Comerma-Steffensen, S., & Zerpa, H. (2012). Haematological values of post-laying Arrau turtle (*Podocnemis expansa*) in the Orinoco River, Venezuela. *Research in Veterinary Science*, 92(1), 128–131. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.026>

- Rueda-Almonacid, J., Carr, L., Mittermeier, R., Rodriguez-Mahecha, J., Mast, R., Vogt, R., ... Mittermeier, G. (2007). *Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. Serie de guías tropicales de campo N° 6.*
- Santos, M. (2011). *Propriedades do sangue e efeito do mergulho forçado sobre o perfil hematológico de Podocnemis erythrocephala (Spix, 1824) (Testudines, Podocnemididae) do Médio Rio Negro, Amazonas.* Universidade Federal do Amazonas.
- Schoonjans, F., Zalata, A., Depuydt, C. E., & Comhaire, F. H. (1995). MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 48(3), 257–262. [https://doi.org/10.1016/0169-2607\(95\)01703-8](https://doi.org/10.1016/0169-2607(95)01703-8)
- Stacy, N., Alleman, A., & Sayler, K. (2011). Diagnostic Hematology of Reptiles. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(1), 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2010.10.006>
- Sykes, J. M., & Klaphake, E. (2015). Reptile Hematology. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(3), 661–680. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2015.05.014>
- Zaias, J., Norton, T., Fickel, A., Spratt, J., Altman, N. H., & Cray, C. (2006). Biochemical and hematologic values for 18 clinically healthy radiated tortoises (*Geochelone radiata*) on St Catherines Island, Georgia. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(3), 321–325. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2006.tb00139.x>

2.8 Anexos

Tabla suplementaria 2.1 Métodos de ensayo, precisión y calibración de los analitos utilizados

Analito	Ensayo	Coefficiente de variación (%)	Estándar de calibración	Método
Glucosa	GOD-POD	1,45	Spintrol Normal LOT 1825N	Colorimétrico
Albúmina (g/dL)	Verde de bromocresol	6,20		Colorimétrico
ALT	NADH	1,90		Cinético UV
AST	NADH	5,9		Cinético UV
ALP	p- Nitrofenilfosfato	2,07		Cinético
Colesterol	CHOD-POD	2,14		Enzimático colorimétrico
Ácido úrico	Uricasa	4,71		Colorimétrico
Creatinina	Jaffe	3,97		Colorimétrico - Cinético

Tabla suplementaria 2.2 Comparación de los parámetros hematológicos y de química sérica entre sexos en *P. vogli*

Analito	Machos		Hembras		p-value
	Media	DE	Media	DE	
Hematocrito (%)	24,8	3,2	24,7	2,1	0,942
PPT (g/dL)	3,8	1,0	4,5	1,2	0,091
Hemoglobina (g/dL)	6,4	1,8	6,5	1,3	0,953
RGR ($10^6/\mu\text{L}$)	247272,7	86490,3	215294,1	61820,6	0,264
RGB ($10^3/\mu\text{L}$)	3718,5	1092,1	3434,5	1290,6	0,552
VCM (fL)♦	872,5	181,6	1214,1	393,3	0,012
HCM (pg)	301,3	156,2	315,7	143,3	0,562
CHCM (g/dL)	27,0	5,3	25,5	4,8	0,553
Heterófilos (%)	50,4	11,7	42,8	12,2	0,116
Linfocitos (%)	25,2	9,5	26,2	12,1	0,820
Eosinófilos (%)♦	13,9	5,9	18,8	5,8	0,041
Monocitos (%)	7,0	3,3	6,4	2,6	0,739
Basófilos (%)	3,2	3,1	4,5	3,1	0,285
Azurófilos (%)	0,4	0,7	0,3	0,6	0,634
Heterófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	1951,6	970,2	1481,8	712,7	0,151
Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	903,4	350,8	890,0	513,3	0,940
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	476,8	137,4	646,3	341,4	0,080
Monocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	255,7	124,0	219,0	114,5	0,430
Basófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	140,8	103,7	181,0	137,9	0,459
Azurófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	15,8	33,0	6,7	15,5	0,555
Glucosa (mg/dL)	71,7	14,5	65,6	14,2	0,308
Albumina (g/dL)	1,4	0,3	1,6	0,3	0,449
ALT (U/L)	5,0	1,2	4,8	1,9	0,754
AST (U/L)	124,1	33,7	132,7	39,2	0,580
ALP (U/L)	99,3	26,3	86,9	32,9	0,331
Colesterol (mg/dL)	110,1	36,3	127,0	29,4	0,221
Ácido Úrico (mg/dL)	1,1	0,4	1,0	0,3	0,402
Creatinina (mg/dL)♦	0,3	0,1	0,2	0,0	0,015

DE: Desviación estándar; LI: Límite inferior; LS: Límite superior; IC: Intervalo de confianza; PPT: Proteínas plasmáticas totales; RGR: Recuento de glóbulos rojos; RGB: Recuento de glóbulos blancos; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; ALP: Fosfatasa alcalina. Los parámetros con diferencias significativas entre los sexos ($P < 0,05$) se denotan con un rombo negro (♦).

Tabla suplementaria 2.3 Comparación de los parámetros hematológicos y de química sérica entre sexos en *P. unifilis*

Analito	Machos		Hembras		p-value
	Media	DE	Media	DE	
Hematocrito (%)	23,83	4,17	22,73	4,40	0,606
PPT (g/dL)	3,97	0,55	4,09	0,88	0,761
Hemoglobina (g/dL)	7,06	0,75	6,14	1,36	0,175
RGR (10 ⁶ /μL)	175000	22845	161964	32863	0,428
RGB (10 ³ /μL)	2842	1365	3493	1017	0,268
VCM (fL)	1360,59	334,96	1432,15	322,61	0,678
HCM (pg)	403,60	64,34	384,07	82,57	0,673
CHCM (g/dL)	31,39	9,63	28,04	6,96	0,547
Heterófilos (%)	51,83	7,19	56,00	11,38	0,419
Linfocitos (%)	21,83	7,52	26,13	7,46	0,249
Eosinófilos (%)	9,67	6,89	9,67	7,58	1
Monocitos (%)♦	9,50	2,26	5,27	3,15	0,008
Basófilos (%)	4,2	2,48998	2,6	2,261479	0,197
Azurófilos (%)♦	1,17	0,75	0,33	0,62	0,020
Heterófilos (10 ³ /μL)	1566,77	838,43	1999,85	836,62	0,330
Linfocitos (10 ³ /μL)	581,53	312,70	892,40	323,49	0,077
Eosinófilos (10 ³ /μL)	256,41	230,98	319,68	208,31	0,573
Monocitos (10 ³ /μL)	269,29	176,65	186,26	128,04	0,256
Basófilos (10 ³ /μL)	107,12	71,39	104,62	67,45	0,950
Azurófilos (10 ³ /μL)	34,97	39,31	10,92	19,58	0,099
Glucosa (mg/dL)	46,83	22,35	35,21	18,08	0,283
Albumina (g/dL)	1,52	0,10	1,45	0,19	0,468
ALT (U/L)	7,17	4,40	5,38	3,93	0,388
AST (U/L) ♦	121,00	34,50	84,31	20,60	0,010
ALP (U/L)	103,00	26,76	92,69	32,31	0,537
Colesterol (mg/dL)♦	60,33	13,25	104,00	42,04	0,003
Ácido Úrico (mg/dL)	1,14	0,15	1,36	0,37	0,457
Creatinina (mg/dL)♦	0,32	0,08	0,21	0,07	0,008

DE: Desviación estándar; LI: Límite inferior; LS: Límite superior; IC: Intervalo de confianza; PPT: Proteínas plasmáticas totales; RGR: Recuento de glóbulos rojos; RGB: Recuento de glóbulos blancos; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; ALP: Fosfatasa alcalina. Los parámetros con diferencias significativas entre los sexos ($P < 0,05$) se denotan con un rombo negro (♦).

Tabla suplementaria 2.4 Comparación de los valores hematológicos y de química sérica entre *P. vogli* y *P. unifilis* analizados en este estudio y otras especies de Podocnemididos.

Parámetro/Test	Este estudio (<i>P. vogli</i>) n=29			Este estudio (<i>P. unifilis</i>) n= 21			<i>P. expansa</i> , n=35 (Fonseca et al 2016)			<i>P. expansa</i> , n=20, (Rossini et al, 2012)			<i>P. erythrocephala</i> , n= 68 ♂ (Quara et al, 2011)		
	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min - Max	Media	SD	Min - Max	Media	SD	Min - Max
Hematocrito (%)	24,8	2,5	21,0 - 30,0	23,0	4,3	14,0 - 30,0	-	-	-	35,7	0,98	29 - 45	21,6	0,5	-
PPT (g/dL)	4,2	1,2	1,5 - 7,0	4,1	0,8	2,4 - 5,6	1,9	0,8	1,6 - 2,1	4,2	0,2	2,8 - 5,8	2,1	0,3	-
Hemoglobina (g/dL)	6,5	1,4	4,2 - 9,7	6,4	1,3	4,0 - 8,7	-	-	-	11,8	0,5	6,5 - 16,2	6,3	1,3	-
GR (x10 ⁶ Cel/uL)	0,22	0,07	0,12 - 0,37	0,16	0,03	0,11-0,21	-	-	-	0,9	0,1	0,52 - 1,5	0,4	0,1	-
GB (x10 ³ Cel/uL)	3,54	1,2	1,38- 5,55	3,3	1,1	1,33-5,16	-	-	-	5,7	0,6	1,8 - 12,9	-	-	-
MCV (fL)	856	549	635 - 2000	1413	318	643 - 1935	-	-	-	411,1	22,9	281 - 673	485,5	90,2	-
MCH (pg)	277	165	135 - 608	388	77,2	276 - 580	-	-	-	-	-	-	142,1	26,5	-
MCHC (g/dL)	22,4	9,9	17,5 - 35,3	28,9	7,6	21,1 - 47,1	-	-	-	32,7	1,4	20,3 - 48	29,1	3,3	-
Heterofilos (%)	45,8	12,4	24,0 - 73,0	54,8	10,4	34,0 - 74,0	-	-	-	71,4	2,4	48- 84	-	-	-
Linfocitos (%)	25,8	11	1,0 - 47,0	24,9	7,6	8,0 - 39,0	-	-	-	23,0	2,2	16 - 45	-	-	-
Eosinófilos (%)	16,9	6,2	5,0 - 28,0	9,7	7,2	1,0 - 30,0	-	-	-	3,0	0,4	1 - 4	-	-	-
Monocitos (%)	6,6	2,8	3,0 - 14,0	6,5	3,5	2,0 - 12,0	-	-	-	1,0	0,2	0 - 1,4	-	-	-
Basófilos (%)	4	3,1	0,0 - 10,0	3,0	2,4	0 - 8,0	-	-	-	1,6	0,3	1 - 2	-	-	-
Azurófilos (%)	0,3	0,6	0,0 - 2,0	0,6	0,7	0 - 2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abs Heter (x10 ³ Cel/uL)	1,66	0,84	0,49 - 3,77	1,89	0,83	0,67 - 3,46	-	-	-	4,1	0,5	2,8 - 9,7	-	-	-
Abs Linfo (x10 ³ Cel/uL)	0,89	0,44	0,038 - 1,89	0,81	0,34	0,29 - 1,42	-	-	-	1,5	0,2	0,3 - 3,8	-	-	-
Abs Eosinó (x10 ³ Cel/uL)	0,57	0,28	0,23 - 1,31	0,3	0,2	0,02 - 0,68	-	-	-	0,1	0,4	0,03-0,04	-	-	-
Abs Mono (x10 ³ Cel/uL)	0,23	0,11	0,05 - 0,47	0,2	0,1	0,06 - 0,47	-	-	-	0,1	0,0	0,02-0,06	-	-	-
Abs Basó (x10 ³ Cel/uL)	0,14	0,12	0,0 - 0,43	0,1	0,1	0,02 - 0,24	-	-	-	0,1	0,0	0,06-0,12	-	-	-
Abs Azuró (x10 ³ Cel/uL)	0,001	0	0-105	17,8	27,9	0 - 85,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa (mg/dL)	68	14,3	47,0 - 99,0	38,7	19,6	19,0 - 86,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Albúmina (g/dL)	1,5	0,3	0,8 - 2,2	1,5	0,2	1,1 - 1,9	-	-	-	-	-	-	1,0	0,3	-
ALT (U/L)	4,9	1,6	1,0 - 8,0	5,9	4,0	1,0 - 13,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AST (U/L)	129,1	36,5	79,0 - 215,0	95,9	30,3	52,0 - 166,0	75,5	33,6	63,1-87,8	-	-	-	-	-	-

Tabla suplementaria 2.4 (Continuación)

Parámetro\Test	Este estudio (<i>P. vogli</i>) n=29			Este estudio (<i>P. unifilis</i>) n= 21			<i>P. expansa</i> , n=35 (Fonseca et al 2016)			<i>P. expansa</i> , n=20, (Rossini et al, 2012)			<i>P. erythrocephala</i> , n= 68 ♂ (Quara et al, 2011)		
	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max
ALP (U/L)	91,9	30,5	32,0 - 151,0	95,6	30,5	60 - 167,0	-	-	-	154,6	4,73	-	-	-	-
Colesterol (mg/dL)	120	32,8	43,0 - 177,0	90,9	41,0	35,0 - 166,0	-	-	-	97,25	27,6	-	58,1	18,3	22,2-90,8
Ácido úrico (mg/dL)	1,1	0,3	0,6 - 1,8	1,3	0,3	1,0 - 2,0	-	-	-	1,23	0,55	-	-	-	-
Creatinina (mg/dL)	0,3	0,1	0,2 - 0,4	0,2	0,1	0,1 - 0,4	-	-	-	0,23	0,03	-	-	-	-

Tabla suplementaria 2.5 Comparación de los valores hematológicos y de química sérica entre *P. vogli* y *P. unifilis* analizados en este estudio y otras especies de Podocnemididos.

Parámetro/Test	Este estudio (<i>P. vogli</i>) n=29			Este estudio (<i>P. unifilis</i>) n= 21			<i>P. unifilis</i> , n=24 (Rojas & Varillas, 2013)			<i>P. expansa</i> , n<13 ♀ (Martínez , et al. 2007)			<i>P. expansa</i> , n=28 (Oliveira-Junior, et al. 2009)		
	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max
Hematocrito (%)	24,8	2,5	21,0 - 30,0	23,0	4,3	14,0 - 30,0	18,29	3,34	12-26	34,3	12,68	-	25,1	6,9	15-41
PPT (g/dL)	4,2	1,2	1,5 - 7,0	4,1	0,8	2,4 - 5,6	-	-	-	4,37	1,57	-	3,5	1,3	1,2-5,9
Hemoglobina (g/dL)	6,5	1,4	4,2 - 9,7	6,4	1,3	4,0 - 8,7	4,34	1,06	2,61-7,06	-	-	-	6,5	1,2	4,1-11,8
GR (x10 ⁶ Cel/uL)	0,22	0,07	0,12 - 0,37	0,16	0,03	0,11-0,21	0	0	0,14-0,39	0,47	0,18	-	0,28	0,07	0,16-0,45
GB (x10 ³ Cel/uL)	3,54	1,2	1,38- 5,55	3,3	1,1	1,33-5,16	5,697	1,658	3,33-9,87	3,08	1,26	-	6,07	2,34	2,48-10,4
MCV (fL)	856	549	635 - 2000	1413	318	643 - 1935	801	218	348-1357	-	-	-	922,3	150	625-1250
MCH (pg)	277	165	135 - 608	388	77,2	276 - 580	188	57,6	109-383	-	-	-	-	-	-
MCHC (g/dL)	22,4	9,9	17,5 - 35,3	28,9	7,6	21,1 - 47,1	24	5,46	15-37	-	-	-	26,2	5,4	13,4-43
Heterofilos (%)	45,8	12,4	24,0 - 73,0	54,8	10,4	34,0 - 74,0	20	7	8-32	-	-	-	48	8,6	35-63
Linfocitos (%)	25,8	11	1,0 - 47,0	24,9	7,6	8,0 - 39,0	73	7	64-89	-	-	-	15,4	3,6	9-23
Eosinófilos (%)	16,9	6,2	5,0 - 28,0	9,7	7,2	1,0 - 30,0	2	1	0-4	-	-	-	22,6	5,6	13-34
Monocitos (%)	6,6	2,8	3,0 - 14,0	6,5	3,5	2,0 - 12,0	3	1	1-6	-	-	-	-	-	-
Basófilos (%)	4	3,1	0,0 - 10,0	3,0	2,4	0 - 8,0	1	1	0-3	-	-	-	7,8	3	4-14
Azurófilos (%)	0,3	0,6	0,0 - 2,0	0,6	0,7	0 - 2,0	1	1	1-6	-	-	-	6,3	2,5	3-11
Abs Heter (x10 ³ Cel/uL)	1,66	0,84	0,49 - 3,77	1,89	0,83	0,67 - 3,46	-	-	-	1,96	0,13	-	2,88	1,06	1,01-5,14
Abs Linfo (x10 ³ Cel/uL)	0,89	0,44	0,038 - 1,89	0,81	0,34	0,29 - 1,42	-	-	-	1,05	0,13	-	0,86	0,33	0,34-1,40
Abs Eosinó (x10 ³ Cel/uL)	0,57	0,28	0,23 - 1,31	0,3	0,2	0,02 - 0,68	-	-	-	-	-	-	1,37	0,65	0,50-2,83
Abs Mono (x10 ³ Cel/uL)	0,23	0,11	0,05 - 0,47	0,2	0,1	0,06 - 0,47	-	-	-	0,04	0,02	-	-	-	-
Abs Basó (x10 ³ Cel/uL)	0,14	0,12	0,0 - 0,43	0,1	0,1	0,02 - 0,24	-	-	-	-	-	-	0,49	0,33	0,10-1,38
Abs Azuró (x10 ³ Cel/uL)	0,001	0	0-105	17,8	27,9	0 - 85,5	-	-	-	-	-	-	378	204	101-792
Glucosa (mg/dL)	68	14,3	47,0 - 99,0	38,7	19,6	19,0 - 86,0	-	-	-	48,54	15,6	-	91,3	17,7	63,3-134
Albúmina (g/dL)	1,5	0,3	0,8 - 2,2	1,5	0,2	1,1 - 1,9	-	-	-	1,92	0,38	-	-	-	-
ALT (U/L)	4,9	1,6	1,0 - 8,0	5,9	4,0	1,0 - 13,0	-	-	-	16,8	3,62	-	-	-	-
AST (U/L)	129,1	36,5	79,0 - 215,0	95,9	30,3	52,0 - 166,0	-	-	-	26,5	8,57	-	-	-	-

Tabla suplementaria 2.5 (Continuación)

Parámetro\Test	Este estudio (<i>P. vogli</i>) n=29			Este estudio (<i>P. unifilis</i>) n= 21			<i>P. unifilis</i> , n=24 (Rojas & Varillas, 2013)			<i>P. expansa</i> , n<13 ♀ (Martínez , et al. 2007)			<i>P. expansa</i> , n=28 (Oliveira-Junior, et al. 2009)		
	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max	Media	SD	Min-Max
ALP (U/L)	91,9	30,5	32,0 - 151,0	95,6	30,5	60 - 167,0	-	-	-	154,6	4,73	-	-	-	-
Colesterol (mg/dL)	120	32,8	43,0 - 177,0	90,9	41,0	35,0 - 166,0	-	-	-	97,25	27,6	-	58,1	18,3	22,2-90,8
Ácido úrico (mg/dL)	1,1	0,3	0,6 - 1,8	1,3	0,3	1,0 - 2,0	-	-	-	1,23	0,55	-	-	-	-
Creatinina (mg/dL)	0,3	0,1	0,2 - 0,4	0,2	0,1	0,1 - 0,4	-	-	-	0,23	0,03	-	-	-	-

3. Capítulo 3. Hematología y química sérica de la tortuga hicotea (*Trachemys callirostris callirostris*, Gray, 1855) en condiciones de cautiverio.

Hematology and serum chemistry of hicotea turtles (*Trachemys callirostris callirostris*, Gray, 1855) in captivity

Trachemys callirostris is a species of semi-aquatic turtle which is distributed in northern Colombia and Venezuela. Despite not being classified within the IUCN threat categories, this species suffers from strong anthropogenic pressures, leading it to occupy the first places in the number of seizure records nationwide and being a recurrent in animal rescue and rehabilitation centers. With the purpose of complementing the hematological and serum chemistry values reported for this species in Colombia, the aim of this study is to evaluate the hematological and serum chemistry of hicotea turtles (*Trachemys callirostris callirostris*) kept in *ex-situ* conditions and under different environmental conditions at two headquarters of Universidad Nacional de Colombia. To carry out this study, blood samples from 65 individuals maintained in captivity in Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS, $n= 42$) and Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF, $n = 23$) were taken and hematological and serum chemistry parameters were evaluated at laboratory. The reference intervals of the evaluated parameters were established. Eosinophils were the most abundant leukocytes, despite not detecting infection by gastrointestinal or blood parasites. Statistical analyzes did not show significant differences between males and females or between adults and juveniles in any of the hematological and serum chemistry parameters analyzed, however, they did show significant differences in most of the parameters evaluated between the two sampling locations. Additionally, no significant differences were observed between hematological parameters that may be associated with adaptations to the altitude difference.

Key words: Stress, URRAS, EBTRF, altitud, *Trachemys callirostris*, hicotea.

Hematología y química sérica de la tortuga hicotea (*Trachemys callirostris callirostris*, Gray, 1855) en condiciones de cautiverio.

Rodríguez-Almonacid, Cristian^{1*}; Vargas-León, Carolina²; Moreno-Torres, Carlos³; Matta, Nubia E⁴.

1. Grupo de Estudio Relación Parásito-Hospedero, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, crrodriguez@unal.edu.co
2. Departamento de Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, cmvargasl@unal.edu.co
3. Departamento de Salud Animal, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, camorennot@unal.edu.co
4. Grupo de Estudio Relación Parásito-Hospedero, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, nemattac@unal.edu.co.

* Autor de correspondencia

Este capítulo fue sometido en forma de artículo original a la Revista de Biología Tropical y se encuentra en evaluación por pares.

3.1 Resumen

Trachemys callirostris es una especie de tortuga semiacuática que se distribuye al norte de Colombia y Venezuela. A pesar de no encontrarse clasificada dentro de las categorías de amenaza del IUCN, esta especie sufre de fuertes presiones antrópicas, llevándola a ocupar los primeros lugares en el número de registros de incautaciones a nivel nacional y siendo recurrente en centros de rescate y rehabilitación animal. Con el propósito complementar los valores hematológicos y de química sérica reportados para esta especie en Colombia, el objetivo de este estudio es evaluar los parámetros hematológicos y de química sérica de tortugas hicoteas (*Trachemys callirostris callirostris*) mantenidas en condiciones *ex-situ* y bajo condiciones ambientales diferentes, en dos sedes de la Universidad Nacional de Colombia. Para llevar a cabo este estudio, se tomaron muestras sanguíneas de 65 individuos presentes en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS, $n=42$) y la Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF, $n=23$) y se evaluaron parámetros hematológicos y de química sérica a nivel de laboratorio. Se establecieron los intervalos de referencia de los parámetros evaluados. Los eosinófilos fueron los leucocitos más abundantes, a pesar de no detectarse infección por parásitos gastrointestinales o sanguíneos. Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre machos y hembras o entre adultos y juveniles en ninguno de los parámetros hematológicos y de química sérica analizados, sin embargo, sí mostraron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros evaluados entre ambas localidades de muestreo. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas entre parámetros hematológicos que puedan asociarse a adaptaciones a la diferencia altitudinal.

Palabras clave: Estrés, URRAS, EBTRF, altitud, *Trachemys callirostris*, hicotea

3.2 Introducción

La tortuga hicotea (*Trachemys callirostris*) es una de las dos especies del género *Trachemys* encontradas en Colombia, naturalmente se distribuye al norte de Suramérica, entre Colombia y Venezuela. Esta especie se compone de dos subespecies: *T. c. chichiriviche*, la cual se distribuye únicamente en Venezuela y *T. c. callirostris*, la cual se

distribuye en la región Caribe y valles interandinos al norte de Colombia y la cuenca del lago de Maracaibo en Venezuela (Rueda-Almonacid et al., 2007).

Esta especie ha sido sometida a fuertes presiones antrópicas, puesto que los pobladores locales asaltan los huevos en época de anidamiento, los juveniles son vendidos como mascotas y los adultos son consumidos a lo largo del año, siendo semana santa la época de mayor consumo (Bock, Páez, & Daza, 2010); por tal motivo, *Trachemys* es el género de tortugas mayormente incautado en Colombia (Arroyave, Romero Goyeneche, Bonilla Gómez, & Hurtado Heredia, 2014), haciéndola recurrente en centros de rescate y rehabilitación animal. Posterior a los procesos de incautación, dichos centros deben evaluar el estado de salud de los individuos que allí llegan, para así determinar los procedimientos médicos a seguir que permitan la reintroducción de dichos organismos a la vida silvestre. Para ello, el análisis de muestras sanguíneas es de suma importancia.

Los análisis hematológicos pueden ser utilizados como indicadores del estado fisiológico de quelonios, puesto que proveen información útil para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades, estrés, deshidratación o exposición a contaminantes (Christopher, Berry, Henen, & Nagy, 2003; Keller, Kucklick, Stamper, Harms, & McClellan-Green, 2004; Knotkova, Mazanek, Hovorka, Sloboda, & Knotek, 2005; Lutcavage, Lutz, Bossart, & Hudson, 1995; Muro et al., 1998; Tavares-Dias, Oliveira-Junior, Silva, Marcon, & Barcellos, 2009). Idealmente se debe contar con intervalos de referencia obtenidos de poblaciones saludables, con los cuales se deben realizar las comparaciones. Se han reportado los valores hematológicos y de química sanguínea de *Trachemys callirostris* (Arcila, 2005; Carrascal et al., 2014), sin embargo, los estudios de química sérica han enfocado exclusivamente a hembras (Rincón, 2004). En este sentido, el objetivo de este trabajo es evaluar los parámetros hematológicos y de química sérica de tortugas hicotreas (*Trachemys callirostris*) mantenidas en condiciones *ex-situ* en dos sedes de la Universidad Nacional de Colombia, en condiciones ambientales diferentes.

3.3 Materiales y metodos

3.3.1 Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia a través del acta 03-2019 del 1 de abril del 2019. Los muestreos fueron realizados bajo supervisión de veterinarios especializados, garantizando la seguridad de los individuos.

3.3.2 Localidades

Los muestreos fueron llevados a cabo en dos localidades, la primera fue la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (2.555 msnm, temperatura promedio: 14°C); las tortugas se encontraban a una temperatura ambiental artificial promedio de 30°C y los muestreos fueron realizados entre abril y julio del 2019. El segundo muestreo fue llevado a cabo en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) de la Universidad Nacional de Colombia, localizada en Villavicencio-Meta, Colombia (459 msnm, temperatura promedio: 25,5°C), estos muestreos fueron realizados en septiembre del 2019. Un total de 65 tortugas de la especie *Trachemys callirostris* fueron muestreadas, 42 individuos de URRAS y 23 de EBTRF. Se determinó el sexo para todos los individuos.

3.3.3 Obtención de muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas a partir de la vena yugular usando jeringas sin anticoagulante de 1 mL con agujas de calibre 25 y una pulgada de longitud. Parte de la sangre fue depositada en viales plásticos con heparina de sodio (100UI/mL, Liquemine, Roche) y fue almacenada a 4°C hasta la realización de los análisis hematológicos. Se realizaron extendidos sanguíneos usando sangre fresca, los cuales fueron teñidos con colorante Giemsa o Wright para diagnóstico parasitológico y examinación morfológica de

las células sanguíneas, respectivamente. El suero fue obtenido a partir de la centrifugación de la sangre restante usando microtubos con gel separador (TGSS, Liuyang Sanli Medical Technology Development Co Ltd, China) a 4.000 rpm durante 10 minutos y almacenado a -20°C hasta su análisis.

3.3.4 Análisis hematológico

El conteo de eritrocitos y leucocitos fue llevado a cabo manualmente en cámara de Neubauer con una dilución de sangre 1:100 en solución Natt-Herrick (Natt & Herrick, 1952). La concentración de hemoglobina fue determinada a través de espectrofotometría, usando el equipo BTS-350 (BioSystem S.A.; Barcelona, España). Los índices eritrocitarios como volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) fueron calculados siguiendo los lineamientos de Eatwell et al (2014). El conteo diferencial de leucocitos fue llevado a cabo sobre los extendidos sanguíneos coloreados con Wright, contando 100 leucocitos en el objetivo de 100x y expresándose como porcentaje (Eatwell, Hedley, & Barron, 2014); simultáneamente, los extendidos sanguíneos coloreados con Giemsa fueron examinados por hemoparásitos intra o extracelulares, para lo cual se utilizó el microscopio Olympus BX43. Las imágenes digitales de las células sanguíneas fueron capturadas con la cámara Olympus DP27 y procesadas con el software cellSens (v.1.13, Olympus Corporation, Tokyo, Japón).

3.3.5 Análisis de química sérica

Las proteínas plasmáticas totales fueron medidas usando un refractómetro de mano, los demás analitos fueron medidos a partir del suero usando el espectrofotómetro BTS-350 (BioSystem S.A.; Barcelona, España). Los analitos medidos fueron glucosa, albumina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), colesterol, ácido úrico y creatinina. Los kits de medición y reactivos usados pertenecen a la casa comercial Spinreact (Girona – España).

3.3.6 Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se tuvieron en cuenta individuos físicamente sanos, adultos y juveniles de ambos sexos, que no hubiesen estado bajo tratamiento médico durante tres meses previos al muestreo. Los análisis de estadística descriptiva (media, mediana, desviación estándar) fueron realizados usando el software MedCalc® (Schoonjans, Zalata, Depuydt, & Comhaire, 1995) (v. 19.4.0). Los valores atípicos fueron determinados a través de la prueba de Dixon con un intervalo de confianza del 95% usando el paquete XLSTAT (v. 2020.1.3), estos fueron removidos manualmente y se evaluó la normalidad de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilk.

Pruebas de T-student y Mann-Whitney-Wilcoxon fueron realizadas para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre sexos y entre las poblaciones de ambas localidades para los analitos con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente; para lo cual se usó el software R (v. 4.0.0). Por otra parte, con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre grupos etarios, se formaron grupos artificiales acorde al peso de los individuos de la siguiente manera: < 600 g (Grupo 1), 600 – 1200 g (Grupo 2), 1200 – 1800 g (Grupo 3) y >1800 g (Grupo 4); para lo cual se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) y pruebas de Klustal-Wallis, acompañados de la prueba de Scheffé y Conover, como pruebas post-hoc, respectivamente. Los intervalos de referencia y las diferencias entre grupos fueron determinados a través del software MedCalc® (Schoonjans et al., 1995) (v. 19.4.0) siguiendo los lineamientos de la Sociedad Americana para Patólogos Clínicos Veterinarios (ASVCP) (Friedrichs et al., 2012). En resumen, para datos con distribución normal, los intervalos de referencia fueron calculados usando métodos paramétricos; mientras que para datos no paramétricos, los intervalos se establecieron a través de métodos robustos, según los lineamientos propuestos por la guía EP28-A3c del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Adicionalmente, se determinaron los intervalos de confianza (90%) de los límites inferior y superior.

3.4 Resultados

3.4.1 Muestras

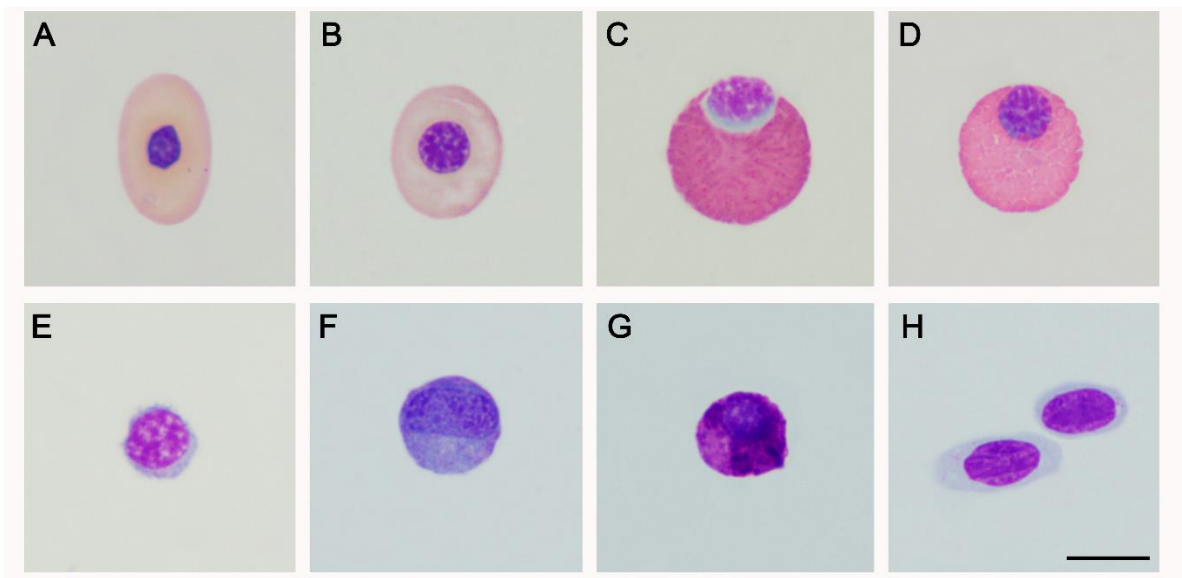
Se procesaron las muestras sanguíneas de 65 tortugas de la especie *Trachemys callirostris* presentes en la Estación Biológica Tropical Roberto Franco y la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres de la Universidad Nacional de Colombia. A través de los exámenes microscópicos de los extendidos sanguíneos se pudieron distinguir las diferentes líneas celulares que componen la sangre periférica de *Trachemys callirostris* (Fig. 1).

3.4.2 Análisis hematológico

Los eritrocitos observados presentaron forma elíptica con un núcleo central de forma redondeada (Fig. 1A), estos presentaron un tamaño promedio de 18,7 μm de largo y 11,9 μm de ancho; mientras que los eritrocitos inmaduros o policromatófilos, tuvieron una forma más redondeada, con un núcleo central menos compacto que en los eritrocitos maduros (Fig. 1B). Dentro de los leucocitos granulocíticos, los heterófilos se caracterizaron por poseer un núcleo generalmente excéntrico y gránulos de forma de bastón, los cuales, en algunos casos, son difíciles de diferenciar, estos gránulos presentaron una coloración rojiza intensa al ser teñido con colorante Wright (Fig. 1C); por otra parte, los eosinófilos también se caracterizaron por poseer un núcleo excéntrico, sin embargo, se diferenciaron por poseer gránulos redondeados, diferenciables entre sí en la mayoría de los casos, los cuales presentaban una coloración rosa clara (Fig. 1D); finalmente, los basófilos presentaron forma redondeada, caracterizándose por poseer abundantes gránulos de coloración basófila, que en la mayoría de casos, ocultan el núcleo (Fig. G), no obstante, también se observaron células que parecían corresponder a basófilos degranulados. Leucocitos agranulares o mononucleares como linfocitos se caracterizaron por poseer un tamaño generalmente pequeño, un núcleo poco compacto que abarca gran parte del área celular y un citoplasma ligeramente basófilo (Fig. 1E); mientras que los monocitos presentaron un tamaño variable, con un núcleo reniforme, redondeado u ovalado posicionado excéntricamente, mientras que el citoplasma presentaba una coloración azul-

grisácea, más oscura que la observada en los linfocitos (Fig. 1F). Finalmente, los trombocitos generalmente presentaron una forma alargada, con un núcleo compacto igualmente ovalado y citoplasma traslúcido, presentando algunas veces un ligero punteado cercano al núcleo (Fig. H), algunos trombocitos también presentaron forma circular, dificultando su diferenciación de leucocitos. No fueron observadas células que tuviesen características morfológicas de azurófilos. Las células mas abundantes en la sangre periférica de *Trachemys callirostris* fueron los eosinófilos, a pesar de no observarse la presencia de parásitos sanguíneos y gastrointestinales en los individuos analizados.

Figura 3.1 Células observadas en la sangre periférica de *Trachemys callirostris*. : Eritrocito maduro; B: Policromatófilo; C: Heterófilo; D: Eosinófilo; E: Linfocito; F: Monocito; G: Basófilo; H: Trombocitos. Tinción de Wright. Barra: 10 μ m



3.4.3 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en los parámetros evaluados entre machos y hembras de cada localidad, sin embargo, si se observaron diferencias al comparar la mayoría de los parámetros entre localidades. Los parámetros en los cuales no se observaron dichas diferencias entre las localidades de muestreo fueron el hematocrito, el porcentaje de basófilos y linfocitos, la concentración de hemoglobina, glucosa y creatinina y los índices eritrocitarios. Los valores hematológicos y de química sérica, así como los intervalos de los individuos muestreados en la Estación Biológica

Tropical Roberto Franco (EBTRF) y la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) se resumen en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 3.1 Valores hematológicos y de química sérica de *Trachemys callirostris* muestreados en la Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF)

Analitos	Media	DE	Min - Max	LI (90% IC)	LS (90% IC)	n
Hematocrito (%)	26,7	3,4	21,0 - 32,0	20,1 (18,0 - 22,2)	33,3 (31,2 - 35,4)	22
PPT (g/dL)	3,7	0,8	2,3 - 5,0	2,2 (1,7 - 2,6)	5,1 (4,6 - 5,5)	23
Hemoglobina (g/dL)	6,3	1,7	3,4 - 9,2	2,9 (1,8 - 4,0)	9,7 (8,6 - 10,7)	22
RGR (10 ⁶ /μL)	0,55	0,1	0,37 - 0,79	0,35 (0,29 - 0,41)	0,74 (0,67 - 0,80)	21
RGB (10 ³ /μL)	5,60	2,7	2,44 - 12,99	0 (0 - 1,198)	10,89 (8,22 - 12,99)	23
VCM (fL)	461	101	225 - 678	263 (202 - 323)	659 (598 - 719)	22
HCM (pg)	113,9	44	59,6 - 213	27,6 (0,46 - 54)	200 (173 - 227)	22
CHCM (g/dL)	24,4	7,5	14,2 - 38,3	10,1 (5,5 - 14,7)	39,2 (34,6 - 43,8)	21
Heterófilos (%)	21,2	15,4	4 - 66	0 (0 - 0)	49,1 (34,7 - 63,0)	23
Linfocitos (%)	19,7	9,9	4 - 43	0,3 (0 - 6,4)	39,1 (33,0 - 45,2)	22
Eosinófilos (%)	44,7	15,3	15 - 70	14,7 (5,4 - 23,9)	74,6 (65,4 - 83,8)	23
Monocitos (%)	5,3	3,1	1 - 14	0*	11,7*	23
Basófilos (%) ♦	5,0	4,9	0 - 15	0*	15,6*	21
Heterófilos (10 ³ /μL)	1,3	1,41	0,12 - 5,6	0 (0 - 0)	3,87 (2,13 - 5,05)	23
Linfocitos (10 ³ /μL)	1,05	0,79	0 - 3,7	0 (0 - 0)	2,61 (1,84 - 3,23)	23
Eosinófilos (10 ³ /μL)	2,45	1,24	0,5 - 6,1	0,02 (0 - 0,76)	4,87 (4,12 - 5,61)	23
Monocitos (10 ³ /μL)	0,27	0,14	0,04 - 0,47	0 (0 - 0,08)	0,55 (0,46 - 0,63)	23
Basófilos (10 ³ /μL)	0,20	0,20	0 - 0,61	0*	0,62*	23
Glucosa (mg/dL)	86,0	39,7	26 - 169	8,15 (0 - 32,1)	163,9 (139,9 - 187,8)	23
Albumina (g/dL)	1,2	0,3	0,7 - 1,8	0,72 (0,55 - 0,87)	1,75 (1,59 - 1,91)	23
ALT (U/L)	7,1	4,0	3 - 16	0*	14,60*	23
AST (U/L)	133	37	57 - 225	59,5 (36,8 - 82,1)	206 (184 - 229)	23
ALP (U/L)	254	78,8	145 - 464	99 (51 - 148)	408 (360 - 457)	22
Colesterol (mg/dL)	100	19,0	66 - 145	63,5 (52,0 - 74,9)	137 (126 - 149)	23
Ácido Úrico (mg/dL)	1,2	0,4	0,6 - 2,2	0,43 (0,18 - 0,67)	2,02 (1,77 - 2,25)	23
Creatinina (mg/dL)	0,3	0,1	0,2 - 0,5	-	-	23

DE: Desviación estándar; LI: Límite inferior; LS: Límite superior; IC: Intervalo de confianza; PPT: Proteínas plasmáticas totales; RGR: Recuento de glóbulos rojos; RGB: Recuento de glóbulos blancos; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; ALP: Fosfatasa alcalina. Las diferencias significativas entre los sexos ($P < 0,05$) se denotan con un rombo negro (♦). Para algunos parámetros no fue posible establecer el IC debido a la incapacidad del software de realizar un adecuado Bootstrap (*)

Tabla 3.2 Valores hematológicos y de química sérica de *Trachemys callirostris* muestreados en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS)

Analitos	Media	DE	Min - Max	LI (90% IC)	LS (90% IC)	n
Hematocrito (%)	27,9	5,2	17 - 38	17, 8 (15,4 - 20,1)	38,1 (35,7 - 40,3)	40
PPT (g/dL)	6,1	1,6	2,4 - 8,6	3,1 (2,1 - 3,8)	9,7 (8,9 - 10,2)	40
Hemoglobina (g/dL)	6,6	2,0	2,5 - 10,3	2,7 (1,83 - 3,63)	10,4 (9,5 - 11,3)	39
RGR (10 ⁶ /μL)	0,69	0,2	0,40 - 1,27	0,17 (0,08 - 0,30)	1,08 (0,93 - 1,21)	41
RGB (10 ³ /μL)	12,35	5,7	3,16 - 29,19	0 (0 - 1,96)	22,5 (19,43 - 26,34)	41
VCM (fL)	427	106	234 - 690	219 (170 - 268)	635 (586 - 684)	39
HCM (pg)	100,7	33,0	41,3 - 166,9	35,9 (20,7 - 51,1)	165 (150 - 180)	39
CHCM (g/dL)	23,6	5,8	7,8 - 39,1	12,3 (9,5 - 14,9)	34,9 (32,2 - 37,6)	38
Heterófilos (%)	28,8	12,9	12 - 59	0 (0 - 5,4)	55,5 (45,9 - 61,3)	41
Linfocitos (%)	19,8	8,4	5 - 38	3,2 (0 - 7,0)	36,3 (32,5 - 40,0)	41
Eosinófilos (%)	32,2	11,0	9 - 55	10,6 (5,7 - 15,4)	53,8 (48,9 - 58,6)	42
Monocitos (%)	8,9	4,3	1 - 19	0,5 (0 - 2,4)	17,2 (15,2 - 19,1)	40
Basófilos (%)	7,6	5,7	0 - 18	0 (0 - 0)	19,2 (16,8 - 21,4)	41
Heterófilos (10 ³ /μL)	3,72	3,11	0,95 - 16,93	0 (0 - 0)	9,46 (6,03 - 12,07)	40
Linfocitos (10 ³ /μL)	2,26	1,24	0,00 - 4,90	0 (0 - 0,02)	4,63 (3,95 - 5,36)	41
Eosinófilos (10 ³ /μL)	4,04	2,41	0,48 - 9,55	0 (0 - 0)	8,80 (7,13 - 10,21)	41
Monocitos (10 ³ /μL)	1,05	0,91	0 - 5,55	0 (0 - 0)	2,77 (1,90 - 3,66)	41
Basófilos (10 ³ /μL)	0,92	0,81	0,00 - 3,27	0 (0 - 0)	2,46 (1,97 - 2,94)	41
Glucosa (mg/dL) ♦	71,3	38,6	23 - 185	0 (0 - 5,2)	144,6 (117,7 - 166,5)	40
Albumina (g/dL)	2,2	0,52	1,1 - 3,4	1,16 (0,92 - 1,39)	3,18 (2,94 - 3,41)	40
ALT (U/L)	18,0	8,3	4 - 35	1,62 (0 - 5,56)	34,3 (30,3 - 38,2)	37
AST (U/L)	244	91,8	74 - 425	64,7 (21,8 - 107)	424,8 (381,9 - 467,5)	38
ALP (U/L)	195	106,6	28 - 422	0 (0 - 35,9)	404,6 (355,5 - 453,6)	39
Colesterol (mg/dL)	147	46,8	34 - 210	53,3 (29,7 - 79,6)	247,7 (229,2 - 269,7)	38
Ácido Úrico (mg/dL)	1,6	0,6	0,69 - 3,44	0,06 (0 - 0,41)	3,11 (2,59 - 3,43)	37
Creatinina (mg/dL)	0,33	0,08	0,2 - 0,5	-	-	35

DE: Desviación estándar; LI: Límite inferior; LS: Límite superior; IC: Intervalo de confianza; PPT: Proteínas plasmáticas totales; RGR: Recuento de glóbulos rojos; RGB: Recuento de glóbulos blancos; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; ALP: Fosfatasa alcalina. Las diferencias significativas entre los sexos ($P < 0,05$) se denotan con un rombo negro (♦)

3.5 Discusión

El presente estudio reporta valores hematológicos y de química sérica de dos poblaciones de *Trachemys callirostris* mantenidas bajo condiciones de cautiverio con una diferencia altitudinal aproximada de 2.000 msnm. Esta especie se distribuye en la cuenca media y baja del río Magdalena, al norte de Colombia y habita tierras bajas en cuerpos de agua lóticos de flujo lento y lénticos, incluidos habitats altamente contaminados (Bock et al., 2010). Los exámenes microscópicos de las células sanguíneas mostraron que tanto los leucocitos como los eritrocitos mostraron características morfológicas similares a los reportados previamente para *Trachemys callirostris* (Arcila, 2005; Carrascal et al., 2014) y *Trachemys scripta* (Hernández, Castro, Saavedra, Ramírez, & Orós, 2017). De manera general, el recuento de eritrocitos, y el porcentaje de hematocrito, linfocitos y monocitos fueron mas bajos a los reportados por Carrascal y colaboradores (2014) para individuos de la misma especie en estado de cautiverio y silvestre, mientras que la concentración de hemoglobina, los índices eritrocitarios y el porcentaje de eosinófilos y basófilos fueron más altos que los reportados por el mismo autor.

El tamaño promedio de los eritrocitos observados en *Trachemys callirostris* (18,7 x 11,9 μm) fue inferior a lo reportado por Carrascal et al. (2014) para la misma especie (24,2 x 14 μm), sin embargo fue similar al observado por Hernández (2015) para *T. scripta* (18,4 x 11,4 μm). Dentro de los leucocitos, los eosinófilos constituyeron la línea celular más abundante en las poblaciones de ambas localidades, lo cual concuerda con lo reportado previamente por Arcila (2005) para la misma especie, pero difiere de lo mostrado por Carrascal y colaboradores (2014), quienes reportaron en su estudio que los linfocitos eran los leucocitos más abundantes. Los eosinófilos pueden representar entre el 7 y 20% de los leucocitos en reptiles sanos (Stacy, Alleman, & Sayler, 2011) y porcentajes de eosinófilos más altos pueden estar asociados a infección de parásitos en reptiles; sin embargo, este parece ser un rasgo característico de esta especie, ya que los reportes hematológicos previos muestran un amplio rango del porcentaje de eosinófilos en sangre periférica (Arcila, 2005; Carrascal et al., 2014), sin mencionar que en los individuos muestreados no se observó la presencia de parásitos gastrointestinales o sanguíneos (datos no mostrados). Morfológicamente, usando la tinción de Wright, tanto los eosinófilos como los heterófilos

pueden ser confundidos en los análisis microscópicos, debido a su similitud y coloración, por lo cual se analizaron los extendidos sanguíneos coloreados con Giemsa con el fin de corroborar nuestros resultados. Las observaciones realizadas sobre estos leucocitos mostraron que los heterófilos, al ser teñidos con colorante Giemsa, presentaron gránulos carentes de color o translucidos, a diferencia de la tinción con Wright, donde estos se observaban de color rojizo; mientras que los gránulos de los eosinófilos presentaron una coloración similar en ambas técnicas de tinción (Imagen suplementaria 3.1). Estas observaciones corroboran los conteos diferenciales realizados sobre extendidos sanguíneos colorados con Wright, donde los eosinófilos fueron los leucocitos más abundantes. Estudios de citoquímica podrían complementar este tipo de análisis hematológicos en esta especie.

Por otra parte, algunos parámetros de la química sérica como la concentración de glucosa, ALT y ácido úrico, fueron más bajos y la concentración de AST fue más elevada que las reportadas previamente para la misma especie (Rincón, 2004). Adicionalmente, los valores e intervalos de referencia de química sérica obtenidos en el presente estudio, específicamente aquellos de los individuos de URRAS, fueron similares a los establecidos para *Trachemys scripta*, mientras que otros parámetros hematológicos como hematocrito, recuento de glóbulos rojos y concentración de hemoglobina, presentaron valores e intervalos más bajos comparados con los mismos parámetros de *T. scripta* (Mader, 2006) (Tabla suplementaria 3.2).

Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre machos y hembras de cada localidad; sin embargo, al comparar los valores entre ambas localidades de muestreo, se observaron diferencias significativas en la mayoría de parámetros, tanto hematológicos como de química sérica, razón por la cual se plasmaron los resultados de cada localidad en tablas distintas (Tabla 1 y 2). Las principales diferencias se observan en la concentración de proteínas plasmáticas totales (PPT), recuento de leucocitos, recuentos absolutos de leucocitos y concentración de albúmina, ALT y AST, las cuales fueron más elevadas en los individuos de URRAS en comparación con los de la EBTFR. Las proteínas plasmáticas totales fueron más elevadas en los individuos de URRAS, alcanzando una

concentración media de 6,1 g/dL, este valor es similar al reportado por Crawshaw & Holz (1996) para *T. scripta* (5,26 g/dL), sin embargo, los intervalos de referencia calculados para los individuos de la EBTRF en este mismo parámetro, son más similares a los establecidos previamente para *T. scripta* (Mader, 2006).

Se ha reportado que tanto la leucocitosis y como el aumento en la proporción Heterófilos: Linfocitos (H: L) puede ser causada por estresores externos en animales silvestres (Davis, Maney, & Maerz, 2008). Teniendo en cuenta que los individuos presentes en URRAS han permanecido en cautiverio durante menor tiempo en comparación con aquellos presentes en la EBTRF y que, adicionalmente, mantienen contacto visual y directo constante con humanos, lo que actuaría como estresor externo, podría representar la causa por la cual se observó un mayor recuento de leucocitos en los individuos de URRAS. Carrascal y colaboradores (2014) también observaron un mayor recuento de leucocitos en individuos en cautiverio de la especie *Trachemys callirostris* en comparación con aquellos en estado silvestre (Carrascal et al., 2014). Es necesario resaltar que las instalaciones en las cuales se encuentran los individuos en URRAS también son diferentes, ya que incluyen estanques plásticos con poca profundidad de agua; mientras que los estanques de la EBTRF son mas grandes y profundos, permitiéndoles esconderse bajo el agua.

En los reptiles, el aumento en los niveles de corticosteroides a causa del estrés también ha mostrado afectaciones en la respuesta inmune, reducción del crecimiento, mayor degradación de proteínas, hiperglicemia y alteraciones a nivel del hígado, tal como aumento de la gluconeogénesis, la degradación de lípidos, y aumento de la concentración de glucógeno hepático (Warwick, Frye, & Murphy, 1995). Por otra parte, diversos efectos neurológicos y fisiológicos de la depresión causada por estrés leve crónico impredecible (CUMS) han sido reportados usando modelos murinos, incluyendo alteraciones en el metabolismo hepático y la expresión de genes, causando un aumento en las concentraciones de enzimas hepáticas como la ALT y AST (Jia et al., 2016). En este sentido, el estrés asociado al cautiverio y el constante contacto con humanos podría estar causando fluctuaciones en los niveles de las hormonas adrenales como los corticosteroides, que a su vez podría estar conllevando a diferentes respuestas al estrés,

incluyendo un aumento en el recuento de leucocitos (Davis et al., 2008; Warwick et al., 1995), y por ende, el aumento de los recuentos absolutos de cada línea celular leucocitaria, así como una mayor liberación de albúmina y enzimas hepáticas como ALT y AST observadas en los individuos presentes en URRAS. En contraste, no se observaron elevadas concentraciones de glucosa en sangre como posible consecuencia de dicho estrés.

Previos estudios hematológicos llevados a cabo en lagartos han mostrado diferencias significativas asociadas a altitudes altas y bajas, observándose un mayor hematocrito, recuento de glóbulos rojos y hemoglobina en los individuos presentes a mayor altitud, como respuesta a la baja presión de oxígeno (Lu et al., 2015). A pesar de la diferencia de aproximadamente 2000 msnm entre ambas localidades de estudio, al comparar estos parámetros hematológicos solo se observó diferencias significativas en el recuento de eritrocitos, presentándose levemente más elevado en los individuos de URRAS (2600 msnm) (Tabla 2). En este sentido, los resultados evidencian una poca fluctuación de los parámetros hematológicos a causa de las variaciones altitudinales en *T. callirostris*, indicando posiblemente que la concentración de hemoglobina dentro de los eritrocitos es suficiente para compensar la baja presión de oxígeno sanguíneo a 2600 msnm, lo cual podría ser explicado en parte por los hábitos acuáticos de estas tortugas y su adaptación a prolongadas apneas, suficiente para sopesar estos cambios, sin necesidad de aumentar considerablemente la concentración de hemoglobina o la cantidad de eritrocitos en el torrente sanguíneo.

Por otra parte, los análisis comparativos por grupos etarios no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de cada grupo, lo cual concuerda con lo reportado previamente por Carrascal y colaboradores (2014) para *T. callirostris*. Diferentes estudios si han mostrado diferencias en parámetros hematológicos entre quelonios adultos y juveniles; para la especie *Terrapene carolina* se han observado que individuos juveniles presentaban menores recuentos de eritrocitos (Stanley & Kline, 1931); por otra parte, para *Chelonoidis cathamensis* se ha reportado un mayor número de leucocitos y una menor concentración de proteínas totales en individuos juveniles (Lewbart

et al., 2018); así mismo, se ha observado un mayor un mayor recuento de glóbulos blancos, eosinófilos y monocitos y concentración de albúmina en individuos juveniles de la especie *Astrochelys yniphora*, en comparación con adultos (López et al., 2017). Debido a la homogeneidad observada en los parámetros evaluados entre adultos y juveniles, se hace necesario realizar estos mismos estudios en poblaciones silvestres para determinar si en existen estas diferencias hematológicas.

En conclusión, el presente estudio reporta nuevos valores hematológicos y de química sérica para *Trachemys callirostris*, que, junto con los reportados previamente por diferentes autores, permitirá ampliar la información disponible para esta especie. De manera general, los eosinófilos fueron los leucocitos mas abundantes en los individuos muestreados en ambas localidades y no se halló una posible causa clínica asociada a los valores obtenidos; en este sentido, se hace necesario realizar este tipo de estudios en poblaciones silvestres para determinar si este podría ser un caracter de esta especie, así mismo se sugiere la realización de otro tipo de pruebas, como la citoquímica, para conocer las características de los eosinófilos y heterófilos observados en esta especie. Por otra parte, los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en los parámetros hematológicos y de química sérica entre machos y hembras, ni entre adultos y juveniles, sin embargo, si se observaron estas diferencias al comparar los valores hallados en ambas localidades de muestreo, probablemente consecuencia de estresores externos. En este sentido, la identificación de diferentes factores estresantes, la medición de hormonas indicadoras de este estrés, como los corticosteroides en reptiles, y la determinación de los efectos fisiológicos del estrés en este tipo de animales, permitirá un diagnóstico más acertado de diferentes patologías y adicionalmente servirá como una herramienta preventiva para evitar consecuencias fatales.

La necesidad de establecer intervalos de referencia hematológicos y de química sérica en animales silvestres ha impulsado el aumento en los reportes de este tipo en la literatura científica actual, sin embargo, su establecimiento puede ser desafiante por diferentes factores, como el limitado número de individuos capturados en campo o las restricciones de acceso a diferentes sitios de muestreo. Debido a esto, el desarrollo de este tipo de

estudios con individuos en estado de cautiverio puede brindar información de vital importancia para establecer estos intervalos, sin mencionar que, junto con estudios relacionados llevados a cabo en individuos de la misma especie, se pueden establecer intervalos de referencia a largo plazo, que permitan ser usados como línea base para la evaluación del estado de salud de las poblaciones silvestres y realizar seguimientos para determinar patrones asociados a diferentes rangos geográficos o condiciones ambientales.

3.6 Agradecimientos

Los autores desean agradecer a los miembros de la Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF) y la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) por su colaboración, así como a los integrantes del grupo GERPH y del Laboratorio Clínico de Clínica de Animales de la Universidad Nacional de Colombia. Este trabajo fue financiado por la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia con el proyecto No 42105.

3.7 Referencias

- Arcila, V. H. (2005). Hematología y química sérica en hembras quelonios (*Trachemys scripta callirostris*) en la ribera del río Lebrija, Puerto Wilches (Santander) Parte I. *Spei Domus*, 1(2).
- Arroyave, F. J., Romero Goyeneche, O. Y., Bonilla Gómez, M. A., & Hurtado Heredia, R. G. (2014). Tráfico ilegal de tortugas continentales (Testudinata) en Colombia: Una aproximación desde el análisis de redes. *Acta Biológica Colombiana*, 19(3), 381. <https://doi.org/10.15446/abc.v19n3.41590>
- Bock, B., Páez, V., & Daza, J. (2010). *Trachemys callirostris* (Gray 1856) – Colombian Slider, Jicotea, Hicotea, Galapago, Morrocoy de Agua. En *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises* (pp. 042.1-042.9). <https://doi.org/10.3854/crm.5.042.callirostris.v1.2010>
- Boers, K. L., Allender, M. C., Novak, L. J., Palmer, J., Adamovicz, L., & Deem, S. L. (2020). Assessment of hematologic and corticosterone response in free-living

- eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*) at capture and after handling. *Zoo Biology*, 39(1), 13–22. <https://doi.org/10.1002/zoo.21518>
- Carrascal, J., Negrete, H., Rojano, C., Álvarez, G., Chacón, J., & Linares, J. (2014). Caracterización hematológica de hicoteas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (28), 43. <https://doi.org/10.19052/mv.3180>
- Christopher, M. M., Berry, K. H., Henen, B. T., & Nagy, K. A. (2003). *CLINICAL DISEASE AND LABORATORY ABNORMALITIES IN FREE-RANGING DESERT TORTOISES IN CALIFORNIA (1990 – 1995)*. 39(1), 35–56.
- CLSI. (2008). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Third Edition. En *CLSI document C28-A3c*. Wayne (PA): *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Crawshaw, G. J., & Holz, P. (1996). Comparison of Plasma Biochemical Values in Blood and Blood-Lymph Mixtures from Red-eared Sliders, *Trachemys scripta elegans*. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 6(2), 7–9. <https://doi.org/10.5818/1076-3139.6.2.7>
- Davis, A. K., Maney, D. L., & Maerz, J. C. (2008, octubre). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Functional Ecology*, Vol. 22, pp. 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>
- Eatwell, K., Hedley, J., & Barron, R. (2014). Reptile haematology and biochemistry. *In Practice*, 36(1), 34–42. <https://doi.org/10.1136/inp.f7488>
- Friedrichs, K. R., Harr, K. E., Freeman, K. P., Szladovits, B., Walton, R. M., Barnhart, K. F., & Blanco-Chavez, J. (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 441–453. <https://doi.org/10.1111/vcp.12006>
- Hernández, J. D. (2015). *CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CITOQUÍMICA Y ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS Y ESTUDIO HEMATOLÓGICO EN Trachemys scripta scripta*. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

- Hernández, J. D., Castro, P., Saavedra, P., Ramírez, P., & Orós, J. (2017). Morphologic and Cytochemical Characteristics of the Blood Cells of the Yellow-Bellied Slider (*Trachemys scripta scripta*). *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 46(5), 446–455. <https://doi.org/10.1111/ahe.12289>
- Jia, H. M., Li, Q., Zhou, C., Yu, M., Yang, Y., Zhang, H. W., ... Zou, Z. M. (2016). Chronic unpredictable mild stress leads to altered hepatic metabolic profile and gene expression. *Scientific Reports*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep23441>
- Keller, J. M., Kucklick, J. R., Stamper, M. A., Harms, C. A., & McClellan-Green, P. D. (2004). Associations between Organochlorine Contaminant Concentrations and Clinical Health Parameters in Loggerhead Sea Turtles from North Carolina, USA. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1074–1079. <https://doi.org/10.1289/ehp.6923>
- Knotkova, Z., Mazanek, S., Hovorka, M., Sloboda, M., & Knotek, Z. (2005). Haematology and plasma chemistry of Bornean river turtles suffering from shell necrosis and haemogregarine parasites. *Veterinární Medicína*, 50(No. 9), 421–426. <https://doi.org/10.17221/5643-VETMED>
- Lewbart, G. A., Griffioen, J. A., Savo, A., Muñoz-Pérez, J. P., Ortega, C., Loyola, A., ... Páez-Rosas, D. (2018). Biochemistry and hematology parameters of the San Cristóbal Galápagos tortoise (*Chelonoidis chathamensis*). *Conservation Physiology*, 6(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/coy004>
- López, J., Waters, M., Routh, A., Rakotonanahary, T. F., Woolaver, L., Thomasson, A., ... Steinmetz, H. W. (2017). HEMATOLOGY AND PLASMA CHEMISTRY OF THE PLOUGHSHARE TORTOISE (*Astrochelys yniphora*) IN A CAPTIVE BREEDING PROGRAM. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 48(1), 102–115. <https://doi.org/10.1638/2016-0201.1>
- Lu, S., Xin, Y., Tang, X., Yue, F., Wang, H., Bai, Y., ... Chen, Q. (2015). Differences in Hematological Traits between High- and Low-Altitude Lizards (Genus *Phrynocephalus*). *PLOS ONE*, 10(5), e0125751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125751>
- Lutcavage, M. E., Lutz, P. L., Bossart, G. D., & Hudson, D. M. (1995). Physiologic and clinicopathologic effects of crude oil on loggerhead sea turtles. *Archives of*

Environmental Contamination and Toxicology, 28(4), 417–422.
<https://doi.org/10.1007/BF00211622>

Mader, D. R. (2006). *Reptile Medicine and Surgery*. <https://doi.org/10.1016/B0-7216-9327-X/X5001-9>

Muro, J., Ramis, A., Pastor, J., Velarde, R., Tarres, J., & Lavin, S. (1998). Chronic rhinitis associated with herpesviral infection in captive spur-thighed tortoises from Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 34(3), 487–495. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-34.3.487>

Natt, M. P., & Herrick, C. A. (1952). A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. *Poultry Science*, 31(4), 735–738. <https://doi.org/10.3382/ps.0310735>

Rincón, M. (2004). *Análisis de química sérica en quelonios hembras, especie Trachemys scripta callirostris en la rivera del rio Lebrija (Puerto Wilches, Santander)*. Universidad Cooperativa de Colombia.

Rueda-Almonacid, J., Carr, J., Mittermeier, R., Rodriguez-Mahecha, J., Mast, R., Vogt, R., ... Goettsch, C. (2007). *Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos de trópico. Serie de guías tropicales de campo No. 6*. Bogotá, Colombia: Conservación Internacional. Editorial Panamericana.

Schoonjans, F., Zalata, A., Depuydt, C. E., & Comhaire, F. H. (1995). MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 48(3), 257–262. [https://doi.org/10.1016/0169-2607\(95\)01703-8](https://doi.org/10.1016/0169-2607(95)01703-8)

Stacy, N., Alleman, R., & Sayler, K. (2011). Diagnostic Hematology of Reptiles. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(1), 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.10.006>

Stanley, E., & Kline, L. (1931). Comparative erythrocyte counts of representative vertebrates. *Proceedings of the Indiana Academy of Science*, 41, 417–418.

Tavares-Dias, M., Oliveira-Junior, A. A., Silva, M. G., Marcon, J. L., & Barcellos, J. F. M. (2009). Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the Amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Veterinarski Arhiv*, 79(6), 601–610.

Warwick, C., Frye, F. L., & Murphy, J. B. (1995). Health and Welfare of Captive Reptiles. En *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1007/978-94-011-1222-2>

3.8 Anexos

Tabla suplementaria 3.1 Comparación de parámetros hematológicos y de química sérica entre grupos etarios (juveniles, adultos) de *Trachemys callirostris* muestreados en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) y la Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF)

Parámetro	Grupo	URRAS						ANOVA/ Klusal Wallis	EBTRF						ANOVA/ Klusal Wallis
		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3			Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		
		Media	SD	Media	SD	Media	SD	p	Media	SD	Media	SD	Media	SD	p
Hematocrito (%)		28,75	4,15	26,85	6,44	27,00	5,87	0,550	25,25	1,89	28,43	3,41	25,70	3,34	0,121*
PPT (g/dL)		6,07	1,13	6,05	2,22	6,27	1,87	0,644*	3,24	0,71	4,09	0,66	3,52	0,78	0,234
Hemoglobina (g/dL)		6,70	1,64	6,65	2,42	6,00	2,09	0,747	5,25	2,61	6,59	1,30	6,64	1,67	0,548
RGR (10 ⁶ /μL)		0,73	0,23	0,67	0,19	0,60	0,10	0,376*	0,53	0,14	0,56	0,06	0,52	0,07	0,076
RGB (10 ³ /μL)		13,87	5,77	11,44	6,18	8,80	1,54	0,121	7,13	3,91	4,69	1,38	5,40	2,78	0,499
VCM (fL)		427,34	111,45	416,32	111,11	452,53	88,71	0,632	429,38	62,13	485,30	114,95	466,41	113,59	0,745
HCM (pg)		100,50	35,34	100,59	30,35	101,48	36,53	0,998	103,80	53,58	114,66	39,27	121,83	47,00	0,707
CHCM (g/dL)		23,54	6,14	24,36	5,78	22,17	5,19	0,752	24,25	10,70	23,49	5,34	26,39	7,85	0,689
Heterófilos (%)		29,27	13,84	29,25	13,45	28,00	9,96	0,998*	20,40	11,67	15,43	5,71	26,10	21,03	0,585
Linfocitos (%)		19,59	9,30	17,33	6,01	23,67	8,78	0,330	28,00	13,23	20,00	4,04	14,56	9,11	0,098
Eosinófilos (%)		32,68	10,76	32,08	11,91	28,00	9,86	0,653	31,80	12,11	49,29	6,60	47,50	18,93	0,209
Monocitos (%)		8,95	4,30	9,23	4,94	8,40	2,41	0,936	7,60	4,72	4,43	2,99	4,60	1,78	0,281
Basófilos (%)		8,05	5,55	6,54	6,19	9,83	4,36	0,485	8,75	5,80	7,83	4,79	1,70*	2,36	0,022*
Heterófilos (10 ³ /μL)		4,13	3,27	3,62	3,52	2,44	0,84	0,332*	1,31	0,68	0,68	0,21	1,75	2,03	0,446*
Linfocitos (10 ³ /μL)		2,52	1,23	1,90	1,36	2,09	0,93	0,350	1,78*	1,10	0,95	0,35	0,71*	0,67	0,029*
Eosinófilos (10 ³ /μL)		4,58	2,47	3,86	2,57	2,46	0,93	0,154	2,62	2,22	2,31	0,70	2,39	1,06	0,938
Monocitos (10 ³ /μL)		1,26	1,13	0,91	0,52	0,61	0,40	0,197*	0,41	0,05	0,21	0,13	0,25	0,14	0,054
Basófilos (10 ³ /μL)		1,03	0,84	0,76	0,92	0,84	0,32	0,465*	0,32	0,28	0,26	0,18	0,09	0,09	0,092*

Tabla suplementaria 3.1 (Continuación)

Parámetro	Grupo	URRAS						ANOVA/ Klusal Wallis p	EBTRF						ANOVA/ Klusal Wallis p
		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3			Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		
		Media	SD	Media	SD	Media	SD	p	Media	SD	Media	SD	Media	SD	p
Glucosa (mg/dL)		63,13	32,06	67,39	25,27	113,50	58,08	0,074*	104,80	43,77	88,29	38,43	73,20	40,03	0,520
Albumina (g/dL)		2,17	0,37	2,29	0,70	1,95	0,61	0,436	1,34	0,22	1,30	0,22	1,13	0,31	0,438
ALT (U/L)		18,15	7,33	16,90	10,65	17,50	8,36	0,848*	6,00	2,35	7,43	3,65	7,70	5,21	0,921*
AST (U/L)		270,47	92,30	219,75	82,74	184,17	46,90	0,067	119,20	12,58	142,14	27,35	126,90	46,35	0,203
ALP (U/L)		237,65*	92,23	137,58*	104,80	170,33	117,76	0,013*	212,00	48,30	299,43	108,63	232,90	49,76	0,180
Colesterol (mg/dL)		153,50	34,95	131,00	49,25	151,80	79,62	0,415	94,40	9,76	114,00	23,69	94,90	16,31	0,174
Ácido Úrico (mg/dL)		1,61	0,60	1,74	0,82	1,53	0,78	0,874*	1,16	0,41	1,24	0,46	1,22	0,42	0,785*
Creatinina (mg/dL)		0,32	0,06	0,31	0,07	0,37	0,12	0,557*	0,34	0,05	0,30	0,06	0,32	0,08	0,343*

Grupo 1: < 600 g; Grupo 2: 600 – 1200 g; Grupo 3: 1200 – 1800 g y Grupo 4: >1800 g. Los asteriscos (*) señalan los grupos estadísticamente diferentes. Los análisis realizados por Klusal-Wallis se denotan con un diamante (♦)

Tabla suplementaria 3.2 Comparación de los valores hematológicos y de química sérica entre *Trachemys callirostris* analizados en este estudio y otros estudios dentro del género

Analito	Este estudio <i>T. callirostris</i> - EBTRF			Este estudio <i>T. callirostris</i> - URRAS			<i>T. callirostris</i> - Cautiverio (n=44, Carrascal et al. 2014)		<i>T. callirostris</i> - Silvestre (n=25, Carrascal et al. 2014)		<i>T. callirostris</i> (n=200, Arcila et al. 2005)	<i>T. scripta</i> (Mader, 2006)	
	Media	DE	Min - Max	Media	DE	Min - Max	Media	DE	Media	DE	Min - Max	Media	Min-Max
Hematocrito (%)	26,7	3,4	21,0 - 32,0	27,9	5,2	17 - 38	32,6	3,7	25	2,8	8 - 26	29	16 - 47
PPT (g/dL)	3,7	0,8	2,3 - 5,0	6,1	1,6	2,4 - 8,6	-	-	-	-	-	4,5	2,8 - 6,6
Hemoglobina (g/dL)	6,3	1,7	3,4 - 9,2	6,6	2,0	2,5 - 10,3	3,8	1,4	5,2	0,95	0,7 - 9,9	8,0	-
GR (x10 ⁶ Cel/uL)	0,55	0,10	0,4 - 0,8	0,69	0,20	0,40 - 1,27	0,99	0,06	0,79	0,1	-	0,8	0,3 - 2,2
GB (x10 ³ Cel/uL)	5,60	2,70	2,4 - 13,0	12,35	5,71	3,16 - 29,19	14,7	4,6	8,5	1	-	13	3,5 - 25
MCV (fL)	461	101	225 - 678	427	106	234 - 690	330,2	49,7	321	12,4	-	-	179-1000
MCH (pg)	113,9	44,0	59,6 - 213,3	100,7	33,0	41,3 - 166,9	28,8	7,6	66,4	12,5	-	-	95 - 308
MCHC (g/dL)	24,4	7,5	14,2 - 38,3	23,6	5,8	7,8 - 39,1	13,2	2,2	21,2	2,8	-	31	-
Heterofilos (%)	21,2	15,4	4,0 - 66,0	28,8	12,9	12,0 - 59,0	30	3,2	29,8	3,7	22 - 54	-	-
Linfocitos (%)	19,7	9,9	4,0 - 43,0	19,8	8,4	5,0 - 38,0	27,6	3,6	33,9	2,8	0 - 10	-	-
Eosinófilos (%)	44,7	15,3	15,0 - 70,0	32,2	11,0	9,0 - 55,0	29	2,6	18,5	3,9	31 - 59	-	-
Monocitos (%)	5,3	3,1	1,0 - 14,0	8,9	4,3	1,0 - 19,0	10	4,1	14,5	2,8	0 - 10	-	-
Basófilos (%)	5,0	4,9	0,0 - 15,0	7,6	5,7	0,0 - 18,0	3,3	1,4	3,3	0,2	4 - 22	-	-
Heterófilos (10 ³ /μL)	1,30	1,41	0,12 - 5,60	3,72	3,11	0,95 - 16,93	-	-	-	-	-	-	-
Linfocitos (10 ³ /μL)	1,05	0,79	0,00 - 3,70	2,26	1,24	0,00 - 4,90	-	-	-	-	-	-	-
Eosinófilos (10 ³ /μL)	2,45	1,24	0,50 - 6,10	4,04	2,41	0,48 - 9,55	-	-	-	-	-	-	-
Monocitos (10 ³ /μL)	0,27	0,14	0,04 - 0,47	1,05	0,91	0 - 5,55	-	-	-	-	-	-	-
Basófilos (10 ³ /μL)	0,20	0,20	0,00 - 0,61	0,92	0,81	0,00 - 3,27	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa (mg/dL)	86,0	39,7	26,0 - 169,0	71,3	38,6	23,0 - 185,0	-	-	-	-	-	67	20 - 138
Albumina (g/dL)	1,2	0,3	0,7 - 1,8	2,2	0,52	1,1 - 3,4	-	-	-	-	-	1,8	0,8 - 2,5
ALT (U/L)	7,1	4,0	3,0 - 16,0	18,0	8,3	4,0 - 35,0	-	-	-	-	-	16	1 - 66
AST (U/L)	133,1	37,5	57,0 - 225,0	244,7	91,8	74,0 - 425,0	-	-	-	-	-	230	0 - 522
ALP (U/L)	254	78,8	145 - 464	195	106,6	28,0 - 422	-	-	-	-	-	212	81 - 677
Colesterol (mg/dL)	100,7	19,0	66,0 - 145,0	147,1	46,8	34,0 - 210,0	-	-	-	-	-	167	106 - 227
Ácido úrico (mg/dL)	1,2	0,4	0,6 - 2,2	1,66	0,69	0,69 - 3,44	-	-	-	-	-	1,2	0,3 - 3,2
Creatinina (mg/dL)	0,3	0,1	0,2 - 0,5	0,33	0,08	0,20 - 0,50	-	-	-	-	-	0,3	0,2 - 0,5

Tabla suplementaria 3.3 Comparación de parámetros hematológicos y de química sérica entre sexos de *Trachemys callirostris callirostris* presentes en la Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF)

Analito	Machos		Hembras		p-value
	Media	DE	Media	DE	
Hematocrito (%)	24,40	2,51	27,41	3,34	0,078
PPT (g/dL)	3,22	0,64	3,81	0,75	0,101
Hemoglobina (g/dL)	5,40	2,29	6,59	1,50	0,182
RGR (10 ⁶ /μL)	0,55	0,13	0,55	0,09	0,954
RGB (10 ³ /μL)	6,51	3,81	5,28	2,26	0,350
VCM (fL)	426,73	66,21	477,25	107,74	0,336
HCM (pg)	102,65	46,48	117,23	44,19	0,528
CHCM (g/dL)	23,89	10,47	24,56	7,07	0,877
Heterófilos (%)	20,17	10,46	21,59	17,06	0,972
Linfocitos (%)	26,00	12,81	17,38	7,80	0,067
Eosinófilos (%)	34,33	12,48	48,29	14,79	0,052
Monocitos (%)	6,83	4,62	4,71	2,26	0,150
Basófilos (%)♦	10,00	5,74	3,44	3,50	0,005
Azurófilos (%)	1,20	0,66	1,33	1,61	0,354
Heterófilos (10 ³ /μL)	1,58	1,10	0,86	0,58	0,054
Linfocitos (10 ³ /μL)	2,46	2,03	2,44	0,90	0,977
Eosinófilos (10 ³ /μL)	0,36	0,13	0,25	0,14	0,094
Monocitos (10 ³ /μL)	0,36	0,26	0,15	0,14	0,117
Basófilos (10 ³ /μL)	98,17	42,39	81,76	39,19	0,397
Azurófilos (10 ³ /μL)	1,32	0,20	1,21	0,28	0,389
Glucosa (mg/dL)	5,50	2,43	7,71	4,40	0,341
Albumina (g/dL)	119,17	11,25	138,00	42,41	0,301
ALT (U/L)	198,60	51,46	270,59	78,97	0,071
AST (U/L)	91,67	11,00	103,88	20,41	0,181
ALP (U/L)	1,15	0,36	1,25	0,43	0,601
Colesterol (mg/dL)	0,35	0,05	0,31	0,07	0,147
Ácido Úrico (mg/dL)	24,40	2,51	27,41	3,34	0,078
Creatinina (mg/dL)	3,22	0,64	3,81	0,75	0,101

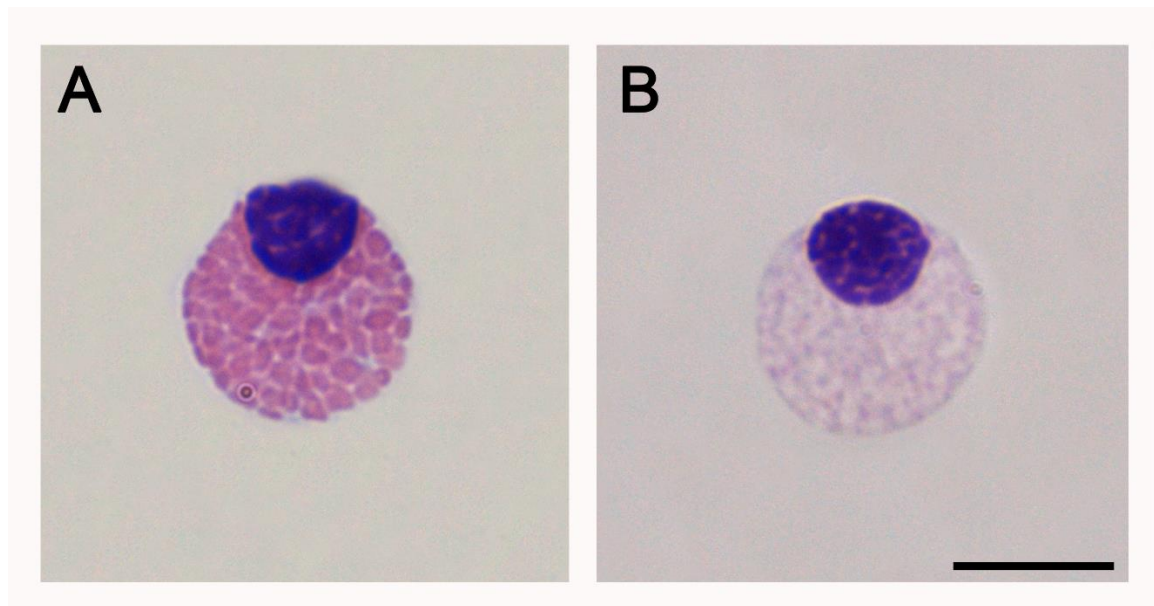
DE: Desviación estándar; LI: Límite inferior; LS: Límite superior; IC: Intervalo de confianza; PPT: Proteínas plasmáticas totales; RGR: Recuento de glóbulos rojos; RGB: Recuento de glóbulos blancos; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; ALP: Fosfatasa alcalina. Los parámetros con diferencias significativas entre los sexos ($P < 0,05$) se denotan con un rombo negro (♦).

Tabla suplementaria 3.4 Comparación de parámetros hematológicos y de química sérica entre sexos de *Trachemys callirostris callirostris* presentes en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS).

Analito	Machos		Hembras		p-value
	Media	DE	Media	DE	
Hematocrito (%)	30,0	6,0	28,6	3,5	0,468
PPT (g/dL)	6,2	1,7	6,7	1,2	0,435
Hemoglobina (g/dL)	7,0	1,7	6,9	1,8	0,978
RGR (10 ⁶ /μL)	0,7	0,2	0,7	0,2	0,836
RGB (10 ³ /μL)	12,0	5,3	14,6	6,4	0,413
VCM (fL)	439,6	131,2	417,9	106,8	0,654
HCM (pg)	103,5	31,7	101,5	35,3	0,851
CHCM (g/dL)	23,1	3,9	24,3	4,7	0,515
Heterófilos (%)	28,2	13,1	28,4	14,9	0,921
Linfocitos (%)	20,9	10,4	18,8	7,7	0,564
Eosinófilos (%)	30,9	13,0	34,8	10,2	0,397
Monocitos (%)	9,3	3,2	8,6	5,0	0,692
Basófilos (%)	8,1	5,3	6,6	6,0	0,517
Azurófilos (%)	3,3	1,7	4,6	4,5	0,760
Heterófilos (10 ³ /μL)	2,3	1,6	2,5	1,1	0,760
Linfocitos (10 ³ /μL)	4,0	2,9	4,8	2,1	0,431
Eosinófilos (10 ³ /μL)	1,1	0,6	1,2	1,4	0,678
Monocitos (10 ³ /μL)	1,0	0,8	0,9	0,9	0,568
Basófilos (10 ³ /μL) ♦	51,3	18,7	72,7	26,7	0,030
Azurófilos (10 ³ /μL)	2,2	0,4	2,2	0,6	0,862
Glucosa (mg/dL)	18,4	8,1	18,0	9,3	0,918
Albumina (g/dL)	242,7	82,4	246,7	99,2	0,799
ALT (U/L)	198,1	88,8	199,2	119,6	0,980
AST (U/L)	150,4	41,4	156,9	48,2	0,565
ALP (U/L)	1,6	0,6	1,8	0,7	0,477
Colesterol (mg/dL)	0,3	0,1	0,3	0,1	0,831
Ácido Úrico (mg/dL)	30,0	6,0	28,6	3,5	0,468
Creatinina (mg/dL)	6,2	1,7	6,7	1,2	0,435

DE: Desviación estándar; LI: Límite inferior; LS: Límite superior; IC: Intervalo de confianza; PPT: Proteínas plasmáticas totales; RGR: Recuento de glóbulos rojos; RGB: Recuento de glóbulos blancos; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; ALP: Fosfatasa alcalina. Los parámetros con diferencias significativas entre los sexos ($P < 0,05$) se denotan con un rombo negro (♦).

Figura suplementaria 3.1 Eosinófilo (A) y heterófilo (B) de *Trachemys callirostris* coloreado con Giemsa. Nótese la carencia de color de los gránulos de los heterófilos. Barra: 10 μm .



4. Capítulo 4. Hematology and biochemistry reference intervals, and morphological description of peripheral blood cells for captive *Crocodylus intermedius* (Graves, 1918) in Colombia.

Intervalos de referencia hematológicos y de bioquímica sérica, y descripción morfológica de células sanguíneas periféricas de *Crocodylus intermedius* (Graves, 1918) en cautiverio en Colombia

El cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*, Graves, 1918) es considerado como el crocodiliano más amenazado de Suramérica. Debido a la falta de información necesaria para comprender las variaciones fisiológicas en cocodrilos neotropicales, el objetivo de este estudio fue proponer intervalos de referencia hematológicos y de química sérica, así como una descripción morfológica de células sanguíneas periféricas de *Crocodylus intermedius* en condición de cautiverio. Se recolectaron muestras de sangre de 326 individuos clínicamente sanos mantenidos en cautiverio en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco, Villavicencio - Colombia. Se generaron valores e intervalos de referencia hematológicos y de bioquímica sérica para la especie; además, se remuestrearon 16 individuos con un intervalo de tiempo de cinco años; estos datos fueron comparados. Se observaron diferencias significativas entre el sexo y la edad en los parámetros hematológicos y de química sérica. Algunos análisis bioquímicos mostraron una correlación moderada entre ellos, como ALT-ALP y ALT-UA. Se realizaron descripciones morfológicas de células sanguíneas periféricas. La información aquí presentada es una base valiosa para mejorar los programas nacionales de reintroducción al instituir la evaluación de la salud de poblaciones *ex-situ* indudablemente invaluable.

Palabras clave: Cocodrilo del Orinoco, *Crocodylus intermedius*, hematología, bioquímica, caracterización de células sanguíneas, Colombia.

Hematology and biochemistry reference intervals, and morphological description of peripheral blood cells for captive *Crocodylus intermedius* (Graves, 1918) in Colombia.

Barajas-Valero, Steven^{1,2,*a}; Rodríguez-Almonacid, Cristian^{1,*a}; Rojas-Sereno, Zulma³; Moreno-Torres, Carlos²; Matta, Nubia E¹.

1. Grupo de Estudio Relación Parásito-Hospedero, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia
2. Departamento de Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia; Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia,
3. Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello, Santiago de Chile.

^a These authors contributed equally

* Correspondence authors

hsbarajasv@unal.edu.co

crrodriguez@unal.edu.co

4.1 Abstract

The Orinoco crocodile (*Crocodylus intermedius*, Graves, 1918) is considered the most threatened crocodylian of South America. Due to the lack of information necessary to understand the physiological variations in neotropical crocodiles, the objective of this study was to propose baseline hematological and serum chemistry reference intervals, as well as morphological description of peripheral blood cells of captive *Crocodylus intermedius*. Blood samples were collected from 326 clinically healthy individuals maintained in captivity at Estación de Biología Tropical Roberto Franco, Villavicencio - Colombia. Hematology and biochemistry reference values and reference intervals were generated for the species; additionally, 16 individuals were sampled and resampled with a time interval of five years; these data were compared. Significant differences between sex and age were observed in hematological and serum chemistry parameters. Some biochemical analytes showed a moderate correlation between them, such as ALT-ALP and ALT-UA. Morphological descriptions of peripheral blood cells were made. The information presented here is a valuable basis for improving the national reintroduction programs by instituting the health evaluation of undoubtedly priceless ex- situ populations.

Keywords

Orinoco crocodile, *Crocodylus intermedius*, hematology, biochemistry, blood cell characterization, Colombia.

4.2 Introduction

The Orinoco crocodile (*Crocodylus intermedius*, Graves, 1954) is distributed in the Orinoquia basin at the wetlands of Colombia and Venezuela and is one of the six crocodylian species found in Colombia (Barahona-Buitrago & Bonilla-Centeno, 1999; Medem, 1983). This species is considered the most threatened neotropical crocodylian, because of historical overexploitation and other anthropic interventions (Clavijo & Anzola, 2013; Medem, 1981; Morales-Betancourt, Lasso, De La Ossa, & Fajardo-Patiño, 2013). It is

classified as Critical (CR) in the red list of the IUCN and in the Appendix I by CITES (Balaguera-Reina, Espinosa-Blanco, Antelo, Morales-Betancourt, & Seijas, 2018; Morales-Betancourt, Lasso, Páez, & Bock, 2015).

A national *ex-situ* conservation program has successfully achieved reproduction and has raised animals; where 101 individuals have been reintroduced into various Orinoquean watersheds (Anzola & Antelo, 2015; Balaguera-Reina et al., 2018; Moreno-Arias & Ardila-Robayo, 2020). Despite the fact that conservation programs were established in 1970, simultaneously with national legal protection (Ministerio de Agricultura, 1968; Ministerio de Medio Ambiente, 1997), research on *C. intermedius* focused primarily on ecology and population status with few medical-veterinary reports, however health panels and sanitary protocols are still missing for *C. intermedius* as for other crocodylian species in Colombia (Boede & Sogbe, 2000; Manzanilla, Seijas, & Rossini, 2011; Pachón, Pulido, & Moreno, 2010).

Crocodylians are globally maintained in controlled facilities for conservation or other purposes, and veterinary diagnostics have relied mainly on *post-mortem* examination (Lovely, Pittman, & Leslie, 2007). Frequent routine examination is not practical or recommended for adult individuals although blood tests must be performed at least once annually for preventive medical programs (PMP) (Fleming & Fontenot, 2015). Additionally, such tests could offer more information than a clinical examination or routine observations, since reptiles and especially crocodylians do not exhibit early signs of discomfort or disease and specialized evaluations are required (Nevarez, 2019).

The lack and sometimes unavailability of baseline information leads to a limited or unsuccessful application of diagnostic tools of clinical pathology in reptiles (Albert Martínez-Silvestre, Lavin, & Cuenca, 2013). The establishment of hematological and cytological reference intervals in wildlife is essential for obtaining baseline criteria for health controls applied in either *in-situ* or *ex-situ* conditions (Maceda-Veiga et al., 2015). Such testing is useful for reintroduction surveillance and immunological or environmental toxicology

studies, etc. (Chung, Cheng, Chin, Lee, & Chi, 2009; Davis, Maney, & Maerz, 2008; Dzul-Caamal et al., 2016).

Hematology and blood biochemistry of *Crocodylus* have been studied primarily in the African and Australian regions (Lovely et al., 2007; Millan, Janmaat, Richardson, Chambers, & Fomiatti, 1997; Scheelings, Williamson, & Reina, 2016; Stacy & Whitaker, 2000), however, for *C. intermedius*, this type of information is scarce (Manzanilla et al., 2011), and there are no studies for Colombian populations.

To understand the physiological processes of this endangered species and improve surveillance for illness, the aim of this study was to propose baseline reference data and reference intervals for hematology, serum biochemistry, and a peripheral blood cell description for captive *Crocodylus intermedius* in Colombia, taking into account factors such as sex and age.

4.3 Methods and materials

4.3.1 Ethical statements

The methodology used for this study was approved by Sciences Faculty ethics committee of Universidad Nacional de Colombia through N° 03-2019 of April 1st, 2019. The sampling was made under the supervision of veterinarians, guaranteeing the safety of the individuals sampled.

4.3.2 Population

Blood samples from 326 clinically healthy *C. intermedius* were collected in two periods over six years of study (2010-2013 and 2019-2020). All individuals were held in captivity and

sampled at the Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF) of Universidad Nacional de Colombia, which is located in Villavicencio, Meta (Lat: 4.13°, Long: -73.63°), at 419 MAMSL (1374.67 FAMSL). Local temperature oscillates between 20-32 °C, with an average annual rainfall of 4,008 mm and with a unimodal rainfall regime, and average relative humidity of 76%. Sex and age were recorded for all individuals. While the first phase both juvenile and subadults were sampled, during the second field phase, blood samples were obtained only from subadults. Moreover, morphometry and weight data were documented for 41 individuals in the second phase. Sixteen individuals were sampled twice during the six-year period.

4.3.3 Sampling

Individuals were captured and physically restrained following recommendations of Vliet (2014). Blood was obtained from the ventral coccygeal vein using 5 mL syringes without anticoagulant, with a 21 G x 1½ -inch needle. Four thin blood films per individual were prepared, fixed, and stained. The remaining blood was divided in two aliquots, one of them placed in plastic vials previously prepared with sodium heparin (Liquemine, Roche) and stored at 4° C, while the other was deposited in tubes with serum separating gel (Liu yang Sanli Medical Technology Development Co Ltd., China), centrifugated at 4.000 rpm per 10 minutes, and the serum was stored at -20° C for subsequent analysis.

4.3.4 Hematology

Blood films were stained using Romanowsky-type dyes (Wright and Giemsa). Microscopic evaluation was carried out with an Olympus CX41 microscope (Olympus Corp., Tokyo, Japan). Red blood cell counts (RBC) and white blood cell counts (WBC) were performed manually in a Neubauer chamber using Natt-Herrick solution (1:100 dilution; Natt & Herrick, 1952). A differential leukocyte count was performed on wright-stained blood smears by actual counting of 100 leukocytes with 100x objective (Eatwell, Hedley, & Barron, 2014). Packed cell volume (PCV) was determined using the microhematocrit method (Martínez-

Silvestre, Lavín, & Cuenca, 2011), while the hemoglobin (HGB) concentration was measured by spectrophotometry, using the BTS-350 equipment (Biosystem, Spain). RBC indices were calculated following the formulas previously published by Eatwell et al. (2014).

4.3.5 Serum chemistry analyses

Total proteins were determined using a hand refractometer. Other serum biochemistry analyses were performed by spectrophotometry using Biosystem BTS-350 equipment (Biosystem, Spain), and Spinreact kit (Spinreact, Spain). Measured analytes included glucose (GLU), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), albumin (ALB), alkaline phosphatase (ALP), cholesterol (CHOL), uric acid (UA), creatinine (CREA), creatinine kinase (CK), lactate (LACT) and lactate dehydrogenase (LDH).

4.3.6 Intraindividual analysis

To determine if there were differences between hematological and serum chemistry parameters within the same individual in juvenile and adult stage (five years interval), intraindividual comparisons among PCV, TP, RBC's, MCV, WBC's, ALT and leukocyte's relative and absolute counts were made.

4.3.7 Peripheral blood cell characterization

Digital microphotographs of blood cells were obtained at 100x objective using an Olympus DP27 digital camera and processed with cellSens Standard 1.13 software (Olympus, Tokyo, Japan). Measurements were processed with ImageJ® software (Schneider et al. 2012). Cell area and cell diameter were measured for mature erythrocytes, polychromatophils, thrombocytes, heterophiles, lymphocytes, eosinophils, monocytes, and basophils.

4.3.8 Statistical analysis

Reference intervals (RIs) for hematology and serum biochemistry data were generated in accordance with the American Society of Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) guidelines (Friedrichs et al., 2012). To verify data distribution, Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov with Lilliefors correction tests were applied according to the sample size. Outlier detection was performed through Tukey test with the Carling modification and Robust Kernel-Based Local Outlier Detection (RKOF) index. The values 2,5% and 97,5% were considered as lower and upper limits of the RI, respectively. Ninety percent confidence intervals (CI) for each one of the limits were calculated. Mann-Whitney test for independent samples was implemented for sex and age (juvenile and adult) group comparison.

Intraindividual comparisons were developed by Wilcoxon paired samples testing for non-parametric data or a T-paired test for parametric data. According to variable distribution, a correlation analysis was made comparing CK-AST; CK-LDH; CREA-UA; ALT-LDH; ALT-ALP; ALT-UA; ALT-CHOL analytes, using Rho-Spearman or Pearson tests. Simple and multiple linear regression for hematology and biochemical analytes of weight and total length morphometrics was explored. All analyses were developed by RStudio® (v4.0.0) software. Statistical significance for all analyses was set at $P < 0,05$.

4.4 Results

4.4.1 Population

A total of 326 clinically healthy individuals (249 adults and 77 juveniles; 254 of them females, 52 males and 12 not sex-identified) were sampled. The average weight was $50,14 \pm 10,6$ kg (Min: 30,6; Max: 72,5 kg) and the mean total length was $224,03 \pm 20$ cm (Min: 139,1 cm; Max. 258 cm). Body weight and total length showed direct proportional correlation ($P = 5,45e-09$, $\rho = 0,77$; Supplementary table 4.1).

4.4.2 Hematology and serum chemistry analyses

Hematological and serum biochemistry RIs for all *C. intermedius* were established (Table 4.1). Heterophils were the most frequent leukocytes (50-70%), followed by lymphocytes (up to 57%) and basophils (up to 17%). Significant differences between sexes were observed, where females had higher values for PCV ($P=<0,01$), CK ($P=0,029$), MCHC ($P=0,043$), HGB ($P=<0,01$), ALP ($P=0,026$), CREA ($P=0,013$), RBC's ($P=0,041$) and WBC's ($P=0,014$; Supplementary table 4.3). Significant differences between ages for TP ($P=<0,01$) and RBC's ($P=0,019$; Supplementary table 4.3) were observed, where adults had higher values for both analytes. Most of those differences were within the established ranges in this study, for those groups with substantial differences, we present RIs separately (Table 4.2).

4.4.3 Peripheral blood cell characterization

Morphological and morphometric description of peripheral blood cells of *C. intermedius* using Giemsa (G) and Wright (W) stains are shown in Table 4.3. Azurophils are rarely seen and difficult to differentiate from monocytes and mature lymphocytes and could be easily missed in deficient stained smears (under or overstained), however, this was not the case (Figure 4.1). One adult exhibited vacuolated thrombocytes with slight nucleus displacement (Figure 4.2).

4.4.4 Intraindividual analysis

Intraindividual analysis showed significant differences for TP ($P=<0,01$) and RBC's ($P=<0,01$), although all parameters were within the normal established range. For both parameters, values were higher when individuals were juvenile (Supplementary table 4.2).

4.4.5 Correlations

Moderate correlations were found between ALT-ALP ($P<0,01$, $\rho=0,63$; Figure 4.3A) and ALT-UA ($P<0,01$, $\rho=0,47$; Figure 4.3C), and a weak correlation was detected for AST-CK ($P=0,01$, $\rho=0,29$; Figure 4.3B). No lineal model could explain the hematological or biochemical variables in the function of body weight or total length.

Table 4.1 Hematological and biochemical reference values and reference intervals (RIs+ 90% IC) for *Crocodylus intermedius*

Analyte	Mean	SD	LL (90% CI)	UL (90% CI)	Min-Max	n	p-value
PCV (%)	26,3	3,7	19,0 (18 - 19)	33,0 (32 - 34)	17 - 36	314	<0,01
TP (g/dl)	7,0	1,4	6,4 (4 - 4,4)	9,8 (9,6 - 10)	3,9 - 10,2	318	<0,01
HGB (g/dl)	8,2	1,2	5,8 (5,2 - 6)	10,5 (10 - 11)	5,1 - 12,1	117	<0,01
RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	1,1	0,4	0,6 (0,57 - 0,66)	2,1 (2,02 - 2,19)	0,47 - 2,28	269	0
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	6,8	2,5	3,1 (2,6 - 3,1)	11,4 (10,9 - 11,6)	2,2 - 15,1	307	0,03
MCV (fl)	263	76,7	134 (115 - 139)	417 (404 - 455)	100 - 592	273	0,01
MCH (pg)	10,1	2,5	6,8 (5,7 - 6,9)	16,4 (14,3 - 17,4)	5,7 - 17,4	84	0,03
MCHC (g/dl)	33,1	5,4	23,1 (21 - 24)	42,3 (41 - 44)	22,1 - 50,4	114	0,73 ^c
H (%)	60,8	12,1	33,0 (28 - 34)	81,0 (80 - 82)	20 - 83	301	<0,01
H (cel/ μl)	4104	1947,1	980 (866 - 1066)	8406 (7992 - 9013)	300 - 9595	309	0,01
L (%)	27,2	10,5	11,0 (9 - 12)	50,0 (48 - 52)	6 - 65	301	<0,01
L (cel/ μl)	1721	744,4	613 (539 - 689)	3424 (3372 - 3501)	304 - 3690	304	0
E (%)	3,6	3,3	0 (0 - 0)	11,0 (10 - 12)	0 - 16	307	0
E (cel/ μl)	189	150,5	0 (0 - 0)	694 (488 - 688)	0 - 622	301	0
M (%)	1,7	3,4	0 (0 - 1)	13,0 (11 - 16)	0 - 20	276	0
M (cel/ μl)	54	85,8	0 (0 - 0)	277 (266 - 331)	0 - 346	275	0
B (%)	6,6	4,2	0 (0 - 1)	16,0 (16 - 18)	0 - 20	304	0
B (cel/ μl)	405	245,6	0 (0 - 60)	979 (899 - 1039)	0 - 1092	303	<0,01
A ^a (%)	0,0	0,2	0 (0 - 0)	3,0 (0 - 0)	0 - 3	311	0
A ^a (cel/ μl)	1,8	18,3	0 (0 - 0)	279,0 (0 - 0)	0 - 280	312	0
GLU (mg/dl)	128,1	23,5	81,9 (66 - 93)	174,2 (164 - 190)	92 - 186	39	0,12 ^c
ALB (g/dl)	2,0	0,3	1,4 (1,4 - 1,6)	2,7 (2,6 - 2,8)	1,4 - 3	134	<0,01
ALT (u/l)	40,6	21,1	18,9 (14,8 - 20)	100,0 (90 - 100)	11,5 - 100	191	0
AST (u/l)	103	64,6	59,6 (37 - 66)	354 (306 - 395)	25 - 260	134	<0,01

Table 4.1 (Continuation)

Analyte	Mean	SD	LL (90% CI)	UL (90% CI)	Min-Max	n	p-value
ALP (u/l)	181	79,5	27,3 (25 - 30)	240 (230 - 250)	37 - 400	136	0.54 ^c
CHOL (mg/dl)	253	40,3	176 (166 - 180)	322 (316 - 342)	164 - 357	193	0.14 c
UA (mg/dl)	4,4	1,7	1,2 (0,4 - 1,7)	7,7 (7,1 - 8,4)	1,8 - 7,9	73	0.16 ^c
CREA (mg/dl)	0,5	0,1	0,4 (-)	0,7 (-)	0,4 - 0,7	127	0
CK (u/l)	1825	1288	332 (187 - 348)	4789 (4532 - 5915)	187 - 5915	89	<0,01
LACT (mg/dl)	66,2	41,8	17,9 (17 - 18)	127,3 (116 - 177)	16 - 178	34	<0,01
LDH ^b (u/l)	21,5	10,4	-	-	4 - 47,1	20	0.80 ^c

SD: Standard deviation; LL: Lower limit (percentile 2,5); UL: Upper limit (percentile 97,5); CI: Confidence interval; Min-Max: Minimum and maximum observed values; n: Number of observations; p-value: p-value for normality test. Absent CIs coincide with RIs values. RBC's indices MCV: Mean corpuscular volume; MHC: Mean hemoglobin concentration; MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration. ^a 90% CI could not be calculated because of data distribution. ^b RI is not presented due to the small sample size. ^c Parameters with Gaussian distribution.

Table 4.2 Hematological and biochemical reference values and intervals for parameters with significant differences between groups

Analyte	Group	Mean	SD	LL (90% CI)	UL (90% CI)	Min-Max	n	p-value
TP (g/dl)	Juveniles	6,1	1,1	4 (3,5 - 4,4)	8,2 (7,8 - 8,7)	4 - 8	77	0,06
	Adults	7,3	1,3	4,7 (4,5 - 5,0)	10 (9,7 - 10,2)	3,9 - 10,2	241	<0,01
RBC (10 ⁶ /μl)	Juveniles	1,04	0,42	0,7 (0,56 - 0,83)	2 (1,86 - 2,13)	0,7 - 2,0	77	<0,01
	Adults	1,15	0,47	0,6 (0,5 - 0,69)	2 (1,9 - 2,1)	0,5 - 2	200	<0,01
ALP (u/l)	Females	190	85,9	22,2 (0 - 46,7)	358 (336 - 386)	37 - 400	97	0.12 ^a
	Males	152	49,7	55,2 (25,9 - 75,4)	250 (229 - 279)	42 - 257	35	0.45 ^a
CK (u/l)	Females	2629	2213	312 (187 - 348)	7448 (7235 - 7933)	187 - 8065	65	0
	Males	1564	1224	352 (328 - 363)	4946 (2920 - 5915)	328 - 5915	27	0.32 ^a

SD: Standard deviation; LL: Lower limit; UL: Upper limit; CI: Confidence interval; Min-Max: Minimum and maximum observed values; n: number of observations; p-value: p-value for normality test. ^a Parameters with Gaussian distribution.

Figure 4.1 Peripheral blood cells of *Crocodylus intermedius*. A: Mature erythrocyte; B: Polychromatophil; C: Heterophil; D: Mature lymphocyte; E: Basophil; F: Eosinophil; G: Monocyte; H: Azurophil-like; I: Thrombocytes. Bar: 10 μm .

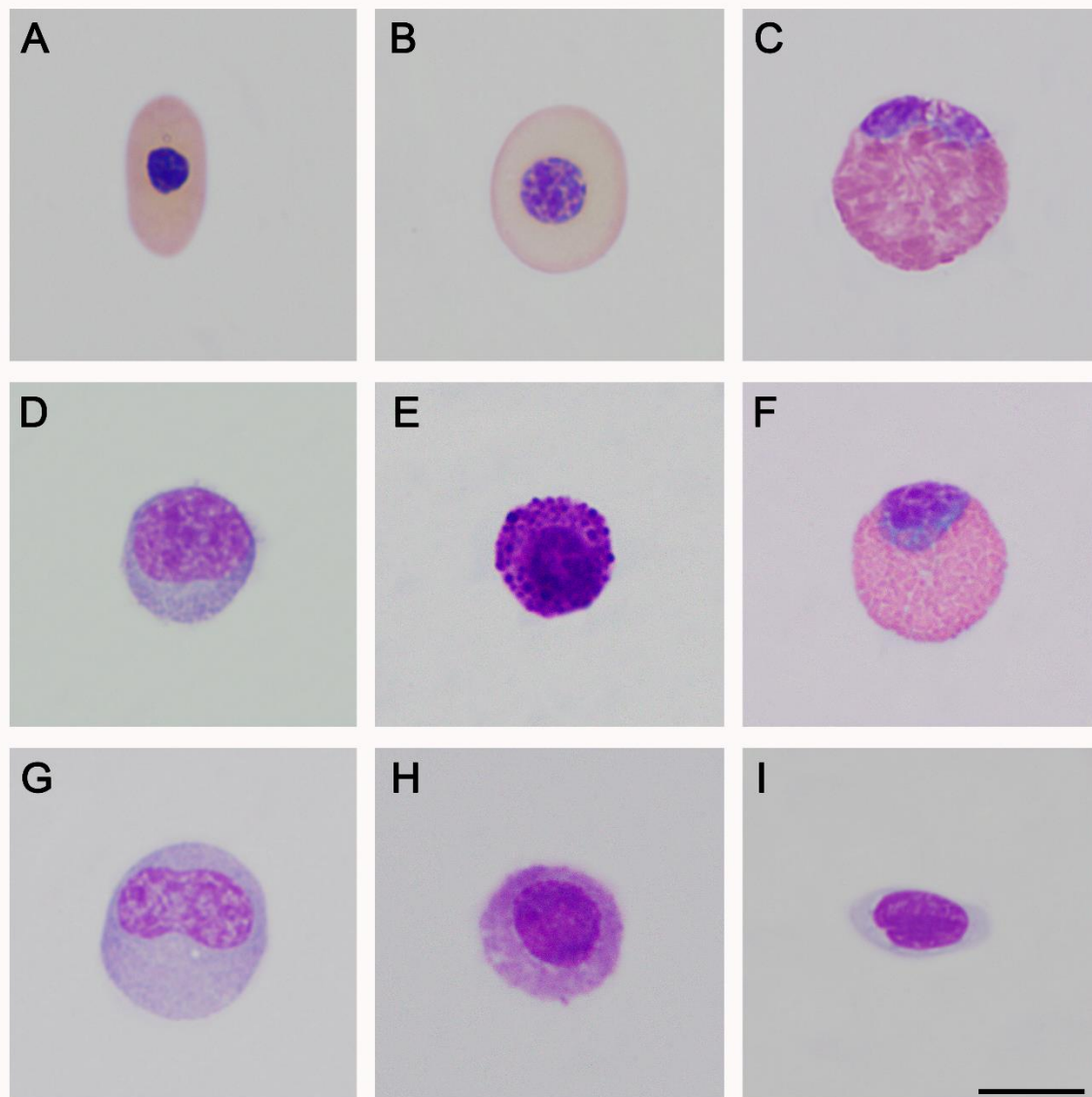


Figure 4.2 Thrombocytes of *Crocodylus intermedius* that showed an irregular appearance. Cytoplasm with the large colorless vacuole (arrowhead), note the deformed and slightly displaced nucleus (asterisk), and the normal coloration of thrombocyte cytoplasm. Bar: 10 μ m.

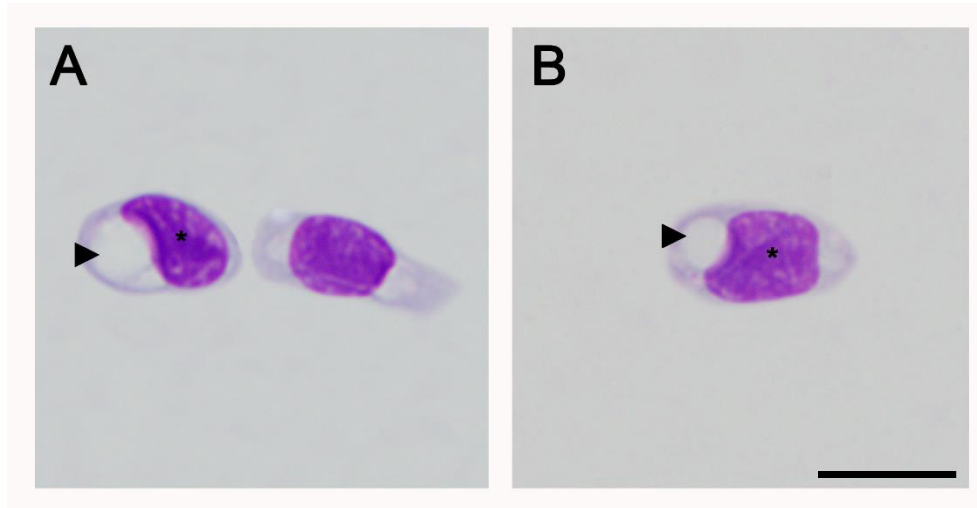


Figure 4.3 Correlation dispersion displayed for A) ALT-ALP ($p < 0,05$, $\rho = 0,6353$); B) ALT-UA ($p < 0,01$, $\rho = 0,4716$); and C) AST-CK ($p = 0,0111$, $\rho = 0,2998$) of *Crocodylus intermedius*. showing moderate correlation for A and B and low correlation for C.

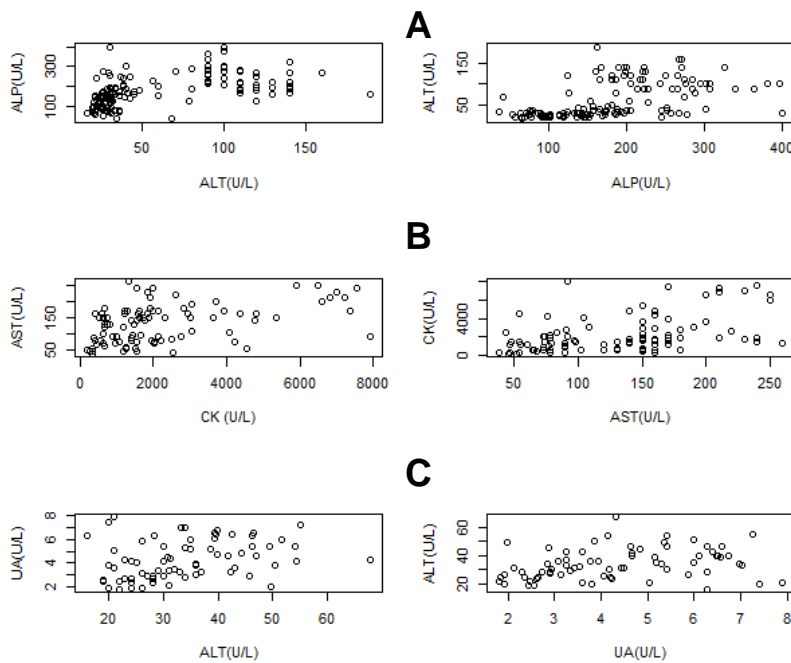


Table 4.3 Basic morphology and morphometric aspects for blood cells of *Crocodylus intermedius*.

Cell line	Cell	Cytologic description and characteristics					
		Cytoplasm	Stain		Nucleus	Stain	
			G	W		G	W
RBC's	Erythrocyte	Most frequent cell group. Typical ellipsoidal shape. LxW: 16,0 x 8,24 μm CA: 108,8 \pm 14,4 μm	Pale cream tone	Cream pink	Centrally located, round shaped and dense chromatin.	Dark basophilic	
	Polychromat.	Sporadically seen. Round shaped, bigger than mature erythrocytes. LxW: 16,0 x 11,4 μm CA: 148,1 \pm 8,87 μm	Pale grey	Light cream yellow-pink	Round to amorphous, centrally located, chromatin slightly condenses.	Faint basophilic	
Granulocyte WBC's	Heterophil	Most frequent leukocyte. Spherical shape. Fusiform granules, overlapping, then poorly differentiated. D: 16,6 μm CA: 207,9 \pm 0,7 μm	Deep magenta granules, colorless cytoplasm	Frequently colorless	Elliptical or round shaped, peripherally located, usually not lobulated.	Dark basophilic	
	Eosinophil	Scarcely seen. Spherical shape. Contain copious amounts of rounded granules. D: 14,8 μm CA: 165,2 \pm 29,4 μm	Eosinophilic granules. Colorless cytoplasm		Single or bilobulated peripherally located. Could be partially covered by granules.	Light basophilic tone	
	Basophil	Scarce to moderate presentation. Spherical shape. Big rounded and copious granules. D: 12,7 μm CA: 122,6 \pm 23,5 μm	Dark basophilic granules. Colorless cytoplasm		Centrally located. Partially or totally covered by granules.	Dark basophilic	
Agranulocyte WBC's	Lymphocyte	Spherical, scarce cytoplasm, pseudopodia. Huge size variations. D: 10,1 μm CA: 75,8 \pm 9,5 μm	Deep blue tone		Occupying most of the cellular area (NCR:1,38). Round shaped.	Dark basophilic	
	Monocyte	Biggest leukocyte. Plentiful cytoplasm, diverse size vacuoles. Pseudopodia. D: 15,3 μm CA: 179,8 \pm 39,3 μm	Faint blue-grey tone		Centrally located, U shaped, chromatin slightly condenses.	Faint basophilic	
Thrombocyte	Elliptic shape, scarce cytoplasm. Clumping commonly observed. LxW: 12,6 x 5,8 μm CA: 58,5 \pm 1,51	Colorless	Faint blue-grey tone	Centrally located, slightly oval, chromatin moderately condenses. "coffee grain" appearance.	Faint basophilic		

Giemsá (G) and Wright (W) stain characteristics, Mean and standard deviation for Cell area (CA); Maximum cell diameter (L: length), Minimum cell diameter (W: Width), Diameter (D).

4.5 Discussion

This study analyzed hematology, serum chemistry and blood cell morphometrics of Orinoco crocodiles (*Crocodylus intermedius*) maintained in captivity and is the first investigation of the hematology for this species in Colombia. No other hematological study of crocodylians has been published with a population of more than 300 individuals. Previous hematologic reports of *C. intermedius* focused on juvenile individuals from Venezuela (Manzanilla et al., 2011).

Most of the reference intervals shown here are similar to those reported for lizards (Divers & Camus, 2020) and for other species of *Crocodylus* (Lovely et al., 2007; Manzanilla et al., 2011; Millan et al., 1997; Padilla, Weber, & Jacobson, 2011; Scheelings et al., 2016; Stacy & Whitaker, 2000); however, some differences were noted. The RBC upper limit was higher in this study compared to the same one observed in *Crocodylus moreletti* (Padilla et al., 2011), *C. niloticus* (Lovely et al., 2007), *C. palustris* (Stacy & Whitaker, 2000) or *C. porosus* (Millan et al., 1997). Higher RBC values have been observed in older crocodiles (Lovely et al., 2007), whereby, values observed in some individuals could be related with age. WBC showed similar values and ranges to captive individuals of *C. niloticus* and *C. moreletti* (Lovely et al., 2007; Millan et al., 1997) and wild *C. johnstoni* (Scheelings et al., 2016), however are lower than observed in wild *C. niloticus* and *C. moreletti* (Lovely et al., 2007; Millan et al., 1997). In general, lower WBC were observed in captive crocodiles, in contrast with observations of turtles and other reptiles, were stress related with captivity caused higher leucocytes counts (Carrascal et al., 2014; Davis et al., 2008). Within leukocytes, heterophils were the most abundant cell, similar to previous reports of *C. palustris* and juvenile *C. intermedius* (Manzanilla et al., 2011; B. Stacy & Whitaker, 2000), but different from observations made in other species like *C. johnstoni*, *C. niloticus*, *C. moreletti* or *C. porosus*, where lymphocytes were the most predominant leukocytes, ranging up to 80% (Lovely et al., 2007; Millan et al., 1997; Padilla et al., 2011; Scheelings et al., 2016) (Supplementary table 4.5).

Statistical analyses showed significant differences in hematological parameters between males and females (Supplementary table 4.3, 4.4), where RBC, PCV, hemoglobin

concentration, and MCHC were significantly higher in females. These results were similar to those previously reported for *C. niloticus* and *C. moreletti* (Lovely et al., 2007; Padilla et al., 2011); additionally, females also showed higher white blood cell counts (WBC), which differ from other reports of *C. moreletti*, *C. niloticus* and *C. palustris*, where males showed a slight to markedly higher WBC (Lovely et al., 2007; Padilla et al., 2011; Stacy & Whitaker, 2000). Significant differences in total protein, RBC, and PCV were observed between young and adult *C. intermedius*; those were higher in juveniles; intraindividual analyses also showed significant differences in the same parameters. Previous reports of *C. niloticus* showed significant differences between adults and juveniles in some hematological parameters such as PCV, hemoglobin, total protein, globulin, and AST concentrations; however, higher values of these analytes were observed in adults (Lovely et al., 2007).

Mean concentration of glucose observed in this study was similar to reported in American crocodile (*Crocodylus acutus*) (Dessauer, 1970), however these values and reference intervals were slightly higher than observed in other freshwater crocodiles, such as *C. moreletti*, *C. johnstoni*, *C. palustris* and *C. niloticus* (Lovely et al., 2007; Padilla et al., 2011; Scheelings et al., 2016; Stacy & Whitaker, 2000), but lower than observed in farmed *C. porosus* (Millan et al., 1997). It is necessary to highlight that glucose levels may vary markedly with species, nutrition, environmental conditions and season, and increased levels could be result of stress, elevated temperatures and, rarely, diabetes mellitus (Eatwell et al., 2014); in this way, glucose concentrations observed may be caused by feeding habits and stress. Additionally, total protein concentrations and reference intervals also were higher than the same parameter from all other species of crocodiles. Albumin concentration represented 20-40% of the total protein (TP), slightly lower compared with percentages (40-60%) mentioned by Martínez-Silvestre et al. (2013) for some reptile species, while it was higher than values found in *C. johnstoni* and adult *C. palustris* (Scheelings et al., 2016; B. Stacy & Whitaker, 2000). Elevated total proteins, and specially, elevated albumin concentration, is related with dehydration (Joseph, 2015), however although total proteins were higher than other crocodile species, other indicators like PCV or albumin concentration did not show elevated values that would demonstrate a possible dehydration.

Normal reptile proposed values for ALT are lower or equal to 20 U/L, while previous reports for the genus *Crocodylus* had documented upper limits near 60 U/L (Lovely et al., 2007). However, our results show an upper limit of 100 U/L. ALT is described as a non-organ specific related enzyme for reptiles, it might not be elevated in cases of liver disease and elevations of this parameter do not always indicate hepatic disease (Eatwell et al., 2014), so it is difficult to determine the clinical relevance for future studies in *C. intermedius*. Uric acid (AU) was considerably higher than values presented by Scheelings et al. (2014) and Lovely et al. (2007) for *C. johnstoni* and *C. niloticus*, respectively. Nevertheless, Stacy et al. (2000) showed similar results for this parameter in *C. palustris*. Considering that hematological studies of *C. johnstoni* and *C. niloticus* were made in wild populations while *C. palustris* studies were developed in captive individuals, the differences could be related to feeding habits and husbandry conditions.

On the other hand, correlation analysis between serum chemistry parameters were made, these correlations had not been previously reported in any *Crocodylus* genera. Moderate correlations between ALT-ALP and ALT-UA were observed. These results could indicate that ALT, by itself, may not be very informative about specific tissue damage, but the joint analysis with ALP and uric acid can provide information about liver or kidney disorders, respectively. As preliminary data, these correlations should be considered for further studies to understand their clinical relevance and applicability. Unlike the studies carried out by Manzanilla et al. (2011), who found negative correlations for total length versus hemoglobin and total length versus WBC, analyses made in this study did not show correlations between body morphometry and hematological or biochemical values. Similar results were reported by Scheelings et al. (2016), who also did not find any correlations.

Statistical analysis showed significant differences in serum chemistry parameters such as concentration of creatinine kinase (CK), alkaline phosphatase (ALP) and creatinine between sexes, higher in females; however, previous reports of crocodile species did not show differences between males and females in these parameters (Lovely et al., 2007; Padilla et al., 2011; B. Stacy & Whitaker, 2000).

The characterization of peripheral blood cells showed that erythrocytes, leukocytes, and thrombocytes were morphologically similar to those reported for crocodilians and other reptile species (Canfield, 1985; Rossini, García, & Gisela, 2010; Stacy, Alleman, & Saylor, 2011; Zayas et al., 2011). Azurophil-like cells were found; these cells shared morphological characteristics with azurophils previously reported for other reptile species. Because they were rarely detected in our analysis, we did not consider them in our morphological description. Despite the still controversial existence of azurophils in crocodilians, we consider that a cytochemical analysis is ideal to distinguish those cells. Some thrombocytes showed large, colorless vacuoles and were considered abnormal, because only one individual showed it. Clear vacuoles have been described in lizard thrombocytes as glycogen storage since they are Schiff's periodic acid (PAS) positive stained (Carvalho et al., 2006). *Progarnia* infections also have been described as thrombocyte-specific pathogens in crocodilians, generating morphological variations (Lainson, 2012); however, due to the lack of internal structures, a possible infection is discarded as an explication. Supplementary studies must be performed to clarify our isolated finding.

In conclusion, this is the first study about hematology, serum chemistry and blood cell morphometrics of Colombian populations of *Crocodylus intermedius*. Additionally, this work complements previous reports for juvenile individuals of the same species. Significant differences were observed in hematological and serum chemistry values between sexes and adults and juveniles. As observed in other reptile species, reference values obtained in this study were wider than other animal taxons, which can be influenced by environmental factors, diet, husbandry or stress (Martínez-Silvestre et al., 2013; Stacy et al., 2011). The information presented here is an important source of information for this species and is a valuable basis for improving the national reintroduction programs as instituting sanitary assessments of undoubtedly priceless *ex-situ* populations.

4.6 Acknowledgments

The authors wish to thank to members of Estación Biológica Tropical Roberto Franco for their help in the field phase, to the members of GERPH group and the Clinic Laboratory of Clínica de Pequeños Animales from Universidad Nacional de Colombia for their collaboration during the development of laboratory procedures. This work was funded by the Investigation Division of Universidad Nacional de Colombia with the project N° 42105.

4.7 References

- Anzola, L., & Antelo, R. (2015). First data of natural recovery of any Orinoco crocodile *Crocodylus intermedius* population: Evidence from nesting. *The Herpetological Bulletin*, 134, 10–14.
- Balaguera-Reina, S. A., Espinosa-Blanco, A., Antelo, R., Morales-Betancourt, M., & Seijas, A. (2018). *Crocodylus intermedius*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T5661A3044743.en>
- Barahona-Buitrago, S., & Bonilla-Centeno, O. (1999). Evaluación del Status Poblacional Del Caimán Llanero (*Crocodylus intermedius* Graves, 1819) en un Subareal de Distribución en el Departamento de Arauca (Colombia). *Academia Colombiana de Ciencias*, 23, 445–451.
- Boede, E., & Sogbe, E. (2000). Enfermedades en caimanes del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) y caimanes de la costa (*Crocodylus acutus*) mantenidos en zocriaderos venezolanos. *Revista Científica*, X(4), 328–338.
- Canfield, P. J. (1985). Characterization of the Blood Cells of Australian Crocodiles (*Crocodylus porosus* [SCHNEIDER] AND *C. johnstoni* [KREFFT]). *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, 14(3), 269–288. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1985.tb00284.x>
- Carrascal, J., Negrete, H., Rojano, C., Álvarez, G., Chacón, J., & Linares, J. (2014). Caracterización hematológica de hicoteas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (28), 43.

<https://doi.org/10.19052/mv.3180>

- Carvalho, R., Antoniazzi, M., Jared, C., Silva, A., Santos, A., & Egami, M. (2006). Morphological, cytochemical, and ultrastructural observations on the blood cells of the reptile *Tupinambis merianae* (Squamata). *Comparative Clinical Pathology*, 15(3), 169–174. <https://doi.org/10.1007/s00580-006-0628-0>
- Chung, C., Cheng, C., Chin, S., Lee, A., & Chi, C. (2009). Morphologic and Cytochemical Characteristics of Asian Yellow Pond Turtle (*Ocadia sinensis*) Blood Cells and their Hematologic and Plasma Biochemical Reference Values. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(1), 76–85. <https://doi.org/10.1638/2008-0023.1>
- Clavijo, J., & Anzola, F. (2013). Elementos claves para la conservación in situ de *Crocodylus intermedius* derivados del seguimiento de metapoblaciones y hábitats en Arauca, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 5(2), 560. <https://doi.org/10.24188/recia.v5.n2.2013.465>
- Davis, A. K., Maney, D. L., & Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Functional Ecology*, Vol. 22, pp. 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>
- Dessauer, H. C. (1970). Blood Chemistry of Reptiles: Physiological and Evolutionary Aspects. *Biology of the Reptilia*, 1–72.
- Divers, S. J., & Camus, M. S. (2020). Lizards. In *Exotic Animal Laboratory Diagnosis* (pp. 319–346). <https://doi.org/10.1002/9781119108610.ch18>
- Dzul-Caamal, R., Hernández-López, A., Gonzalez-Jáuregui, M., Padilla, S. E., Girón-Pérez, M. I., & Vega-López, A. (2016). Usefulness of oxidative stress biomarkers evaluated in the snout scraping, serum and Peripheral Blood Cells of *Crocodylus moreletii* from Southeast Campeche for assessment of the toxic impact of PAHs, metals and total phenols. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 200, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.05.006>
- Eatwell, K., Hedley, J., & Barron, R. (2014). Reptile haematology and biochemistry. *In Practice*, 36(1), 34–42. <https://doi.org/10.1136/inp.f7488>
- Fleming, G. J., & Fontenot, D. K. (2015). Crocodylians (Crocodiles, Alligators, Caiman,

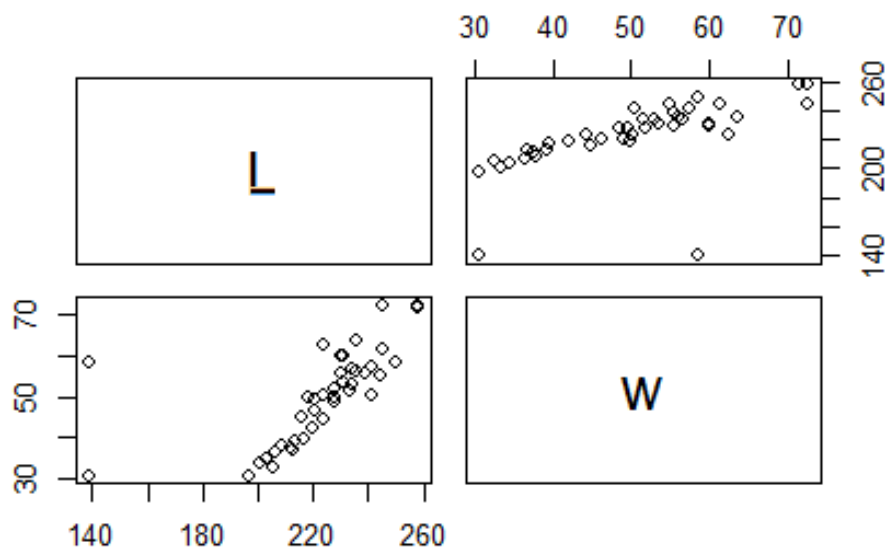
- Gharial). In V. 8 (Ed.), *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine* (pp. 38–49). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-7397-8.00005-0>
- Friedrichs, K. R., Harr, K. E., Freeman, K. P., Szladovits, B., Walton, R. M., Barnhart, K. F., & Blanco-Chavez, J. (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 441–453. <https://doi.org/10.1111/vcp.12006>
- Joseph, V. (2015). Reptile Clinical Pathology. *ExoticsCon 2015 Pre-Conference Proceedings*, 155–162. ExoticsCon.
- Lainson, R. (2012). *Atlas of protozoan parasites of the Amazonian fauna of Brazil*.
- Lovely, C. J., Pittman, J. M., & Leslie, A. J. (2007). Normal haematology and blood biochemistry of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the Okavango Delta, Botswana. *Journal of the South African Veterinary Association*, 78(3), 137–144. <https://doi.org/10.4102/jsava.v78i3.305>
- Maceda-Veiga, A., Figuerola, J., Martínez-Silvestre, A., Viscor, G., Ferrari, N., & Pacheco, M. (2015). Inside the Redbox: Applications of haematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. *Science of The Total Environment*, 514, 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.004>
- Manzanilla, A., Seijas, A., & Rossini, M. (2011). Valores hematológicos en ejemplares jóvenes de caimán del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) en Venezuela. *Revista Científica*, XXI(No 4), 360–356.
- Martínez-Silvestre, A., Lavín, S., & Cuenca, R. (2011). Hematología y citología sanguínea en reptiles. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 31(3), 131–141.
- Martínez-Silvestre, Albert, Lavín, S., & Cuenca, R. (2013). La bioquímica sanguínea en clínica de reptiles. *Revista Consulta de Difusión Veterinaria*, 200, 31–40.
- Medem, F. (1981). *Los Crocodylia de Suramérica: Los Crocodylia de Colombia, Volumen I*. Bogotá D.C: Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas y Proyectos especiales “Francisco José de Caldas”, Colciencias.
- Medem, F. (1983). *Los Crocodylia de Suramérica: Los Crocodylia de Colombia, Volumen II*. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia.

- Millan, J. M., Janmaat, A., Richardson, K. C., Chambers, L. K., & Fomiatti, K. R. (1997). Reference ranges for biochemical and haematological values in farmed saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) yearlings. *Australian Veterinary Journal*, *75*(11), 814–817. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1997.tb15660.x>
- Ministerio de Agricultura. (1968). *Resolución 411 de 1968*. Colombia.
- Ministerio de Medio Ambiente. (1997). *RESOLUCION 676 DEL 21 DE JULIO DE 1997*. Colombia.
- Morales-Betancourt, M., Lasso, C., De La Ossa, J., & Fajardo-Patiño, A. (2013). *Biología y conservación de los Crocodylia de Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAVH).
- Morales-Betancourt, M., Lasso, C., Páez, V., & Bock, B. (2015). *Libro rojo de reptiles de Colombia*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt (IAvH).
- Moreno-Arias, R. A., & Ardila-Robayo, M. C. (2020). Journeying to freedom: the spatial ecology of a reintroduced population of Orinoco crocodiles (*Crocodylus intermedius*) in Colombia. *Animal Biotelemetry*, *8*(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40317-020-00202-2>
- Natt, M. P., & Herrick, C. A. (1952). A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. *Poultry Science*, *31*(4), 735–738. <https://doi.org/10.3382/ps.0310735>
- Nevarez, J. G. (2019). Differential Diagnoses by Clinical Signs—Crocodilians. In *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery* (Third Edit, pp. 1276-1282.e2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48253-0.00136-7>
- Pachón, D., Pulido, A., & Moreno, C. (2010). Aislamiento e identificación de microorganismos entéricos en muestras ambientales y cloacales en *Crocodylus intermedius* y testudines de la Estación de Biología Tropical Roberto Franco en Villavicencio, Colombia. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, *57*(1), 23–24.

- Padilla, S. E., Weber, M., & Jacobson, E. R. (2011). Hematologic and plasma biochemical reference intervals for Morelet's crocodiles (*Crocodylus moreletii*) in the northern wetlands of Campeche, Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(3), 511–522. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.3.511>
- Rossini, V., García, C., & Gisela, C. (2010). Descripción Morfológica de las Células Sanguíneas de la Baba (*Caiman crocodilus crocodilus*) en Vida Silvestre. *Revista de La Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*, 51(2), 63–70.
- Scheelings, T. F., Williamson, S. A., & Reina, R. D. (2016). Hematology and Serum Biochemistry for Free-ranging Freshwater Crocodiles (*Crocodylus johnstoni*) in Western Australia. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(4), 959–961. <https://doi.org/10.7589/2015-03-064>
- Stacy, B., & Whitaker, N. (2000). Hematology and blood biochemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(3), 339–347. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0339:HABBOC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0339:HABBOC]2.0.CO;2)
- Stacy, N., Alleman, R., & Sayler, K. (2011). Diagnostic Hematology of Reptiles. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(1), 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2010.10.006>
- Vliet, K. A. (2014). Crocodilian Capture and Restraint. In *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia* (pp. 313–323). <https://doi.org/10.1002/9781118792919.ch18>
- Zayas, M. A., Rodríguez, H. A., Galoppo, G. H., Stoker, C., Durando, M., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2011). Hematology and Blood Biochemistry of Young Healthy Broad-Snouted Caimans (*Caiman latirostris*). *Journal of Herpetology*, 45(4), 516–524. <https://doi.org/10.1670/10-158.1>

4.8 Supplementary material

Supplementary table 4.1 Body weight (W; kg) and total length (L; cm) linear correlation for *Crocodylus intermedius* (n=41).



Supplementary table 4.2 P-values for intraindividual differences in *Crocodylus intermedius* with Wilcoxon or T-test. Significant differences as bold type letter.

Analyte	Normality (Shapiro-Wilk)	P-value
PCV	0,01	0,04
TP	0,25	0,00049
RBC (0,43	0,00009
WBC	0,04	0,64
MCV	0,36	0,55
H	0,06	0,22
L	0,54	0,49
E	0,41	0,48
M	0,15	0,08
B	0,69	0,19
Abs H	0,21	0,44
Abs L	0,11	0,58
Abs E	0,08	0,33
Abs M	0,09	0,07
Abs B	0,36	0,17
ALT	0,003	1

Abs: Absolut count of heterophils, lymphocytes, eosinophils, monocytes and basophils.

Supplementary table 4.3 P-values for sex and age differences in *Crocodylus intermedius* with Mann-Whitney test. Significant differences are highlighted with bold type numbers. Spaces without numeric values had insufficient data for comparison.

Analyte	Sex	Age
	Female vs Male	Adult vs Juvenile
PCV	0,0006	0,89
Hemoglobin	0,0034	0,64
Total protein	0,05	0,0002
Hemoglobin	0,003	0,64
RBC	0,04	0,01
WBC	0,01	0,44
MCV	0,13	0,25
MCHC	0,04	-
Albumin	0,09	-
ALT	0,38	0,30
AST	0,40	0,23
ALP	0,02	0,18
Uric acid	0,24	0,84
Creatinin Kinase	0,02	0,19
Lactate	0,84	-
Creatinine	0,01	0,44

ALP: Alkaline phosphatase

Supplementary table 4.4 Comparison between haematological and serum chemistry parameters between juveniles, females and males of *Crocodylus intermedius*

Analyte	Juvenile		Female		Male		p-value
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
PCV (%)	26,0	4,8	26,7	3,4	24,5	3,1	0,00
Total protein (g/dl)	6,2	1,2	7,5	1,3	6,7	1,1	0,00
Hemoglobin (g/dl)	8,2	0,9	8,4	1,2	7,7	1,2	0,01
RBC (10 ⁶ /μl)	1,0	0,4	1,2	0,5	1,0	0,3	0,00
WBC (10 ³ /μl)	6578,4	2452,0	7017,9	2459,0	6056,2	2649,9	0,01
MCV (fl)	272,6	62,3	254,0	82,3	291,9	68,7	0,02
MCH (pg)	105,7	23,9	99,8	25,4	105,0	21,8	0,51
MCHC (g/dl)	35,5	7,7	33,5	5,6	31,5	4,3	0,10
Heterophils (%)	59,1	12,8	61,4	13,0	53,8	16,4	0,01
Lymphocytes (%)	27,7	10,6	26,9	10,7	32,7	15,2	0,12
Eosinophils (%)	3,2	3,0	3,5	3,4	5,0	3,5	0,01
Monocytes (%)	1,6	2,2	2,0	3,9	1,6	3,0	0,30
Basophils (%)	8,4	4,6	6,2	4,2	6,9	4,8	0,00
Azurophils (%)	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,3	0,46
Heterophils (10 ³ /μL)	3988,5	1963,7	4437,5	2014,0	3331,7	2042,9	0,00
Lymphocytes (10 ³ /μL)	1753,7	822,4	1800,4	869,1	1961,1	1311,1	0,90
Eosinophils (10 ³ /μL)	192,4	173,9	211,1	196,4	262,9	202,4	0,12
Monocytes (10 ³ /μL)	106,9	152,6	153,3	293,2	116,5	269,8	0,28
Basophils (10 ³ /μL)	547,5	345,3	394,2	251,3	381,3	280,2	0,00
Azurophils (10 ³ /μL)	0,0	0,0	2,3	21,8	2,8	18,2	0,47
Glucose (mg/dl)	92,0		130,3	23,0	122,2	24,4	0,17
Albumin (g/dl)	1,8	0,4	2,1	0,3	2,0	0,3	0,01
Globulin (g/dL)	6,1	1,4	6,4	1,6	5,2	1,6	0,00
ALT (U/L)	40,2	25,1	56,0	36,4	55,0	44,7	0,25
AST (U/L)	130,4	89,0	106,8	67,0	90,0	52,9	0,53
ALP (U/L)	169,3	84,4	192,4	85,8	152,7	49,7	0,06
Cholesterol (mg/dL)	248,6	47,3	255,9	38,4	282,9	53,5	0,03
Uric acid(mg/dL)	4,3	1,0	4,6	1,8	3,7	1,6	0,38
Creatinina (mg/dL)	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,01
Creatinine kinase (U/L)	3436,0	2343,4	2551,2	2157,2	1564,2	1224,0	0,03
Lactate (mg/dL)	102,2		65,0	36,1	65,2	49,3	0,73
LDH (U/L)			25,5	13,2	19,1	10,2	0,25

Bold values indicate parameters with statistical different according to ANOVA or Klustal-Wallis test (p-value <0,05).

Supplementary table 4.5 Comparison of haematological and serum chemistry values between *Crocodylus intermedius* analyzed in this study and other crocodylians within the same genus

Analyte	This study (<i>Crocodylus intermedius</i> , n= 326)		<i>C. intermedius</i> (Juv) Wild (n= 80) ^a		<i>C. johnstoni</i> Wild (n= 39) ^b		<i>C. porosus</i> Captivity (n= 39) ^c		<i>C. palustris</i> Captivity (n= 16) ^d	
	Mean ± SD	Min-Max	Mean ± SD	Min-Max	Mean ± SD	Min-Max	Mean	Min-Max	Mean ± SD	Min-Max
PCV (%)	26,3 ± 3,7	17 - 36	24,7 ± 2,5	-	23,1 ± 3,4	18,0 - 32,0	-	17 - 41	22,4 ± 4,0	17 - 29
TP (g/dl)	7,0 ± 1,4	3,9 - 10,2	-	-	3,96 ± 1,4	1,5 - 7,0	-	4,1 - 7,0	-	-
HGB (g/dl)	8,2 ± 1,2	5,1 - 12,1	8,27 ± 1,6	-	-	-	-	4,7 - 12,2	7,55 ± 1,34	5,2 - 9,7
RBC (10 ⁶ /μl)	1,1 ± 0,4	0,47 - 2,28	-	-	-	-	-	0,6 - 1,3	0,71 ± 0,14	0,48 - 0,95
WBC (10 ³ /μl)	6,8 ± 2,5	2,2 - 15,1	6,60 ± 1,0	-	8,0 ± 3,9	2,2 , 17,5	-	6,4 - 25,7	-	-
MCV (fl)	263,0 ± 76,7	100 - 592	-	-	-	-	-	240 - 311	323,6 ± 68,3	232 - 492
MCH (pg)	10,1 ± 2,5	5,7 - 17,4	-	-	-	-	-	72 - 92	108,6 ± 22,0	78,8 - 163
MCHC (g/dl)	33,1 ± 5,4	22,1 - 50,4	-	-	-	-	-	261 - 319	33,6 ± 0,44	33,0 - 34,1
Heterophils (%)	60,8 ± 12,1	20 - 83	55,8 ± 8,8	-	-	-	-	-	-	-
Heterophils (10 ³ /μl)	4,10 ± 1,94	0,3 - 9,5	-	-	1,3 ± 1,3	0,1 - 6,8	-	0,8 - 7,4	5,15 ± 1,71	3,33 - 9,72
Lymphocytes (%)	27,2 ± 10,5	6 - 65	31,8 ± 10,2	-	-	-	-	-	-	-
Lymphocytes (10 ³ /μl)	1,72 ± 0,74	0,3 - 3,6	-	-	5,1 ± 2,5	1,4 - 9,8	-	4,5 - 21,6	3,01 ± 1,11	1,2 - 4,93
Eosinophils (%)	3,6 ± 3,3	0 - 16	8,3 ± 5,6	-	-	-	-	-	-	-
Eosinophils (10 ³ /μl)	0,18 ± 0,15	0 - 0,62	-	-	0,7 ± 0,5	0,0 - 1,6	-	0,0 - 0,7	0,33 ± 0,17	0,15 - 0,6
Monocytes (%)	1,7 ± 3,4	0 - 20	1,6 ± 1,9	-	-	-	-	-	-	-
Monocytes (10 ³ /μl)	0,05 ± 0,085	0 - 0,34	-	-	1,0 ± 0,8	0,0 - 2,7	-	0,0 - 1,2	0,09 ± 0,08	0 - 0,26
Basophils (%)	6,6 ± 4,2	0 - 20	3,0 ± 2,1	-	-	-	-	-	-	-
Basophils (10 ³ /μl)	0,40 ± 0,24	0 - 1,09	-	-	0,0 ± 0,1	0,0 - 0,6	-	0,0 - 0,7	0,03 ± 0,07	0 - 0,17
Azurophils ^a (%)	0,0 ± 0,2	0 - 3	-	-	-	-	-	-	-	-
Azurophils ^a (10 ³ /μl)	0,001 ± 0,001	0 - 0,28	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU (mg/dl)	128,1 ± 23,5	92 - 186	-	-	64,8 ± 18	36,0 - 111	-	81,0 - 217	58,3 ± 7,23	50 - 74
ALB (g/dl)	2,0 ± 0,3	1,4 - 3	-	-	0,77 ± 0,3	0,0 - 1,5	-	1,4 - 2,3	1,11 ± 0,14	0,9 - 1,3
ALT (u/l)	40,6 ± 21,1	11,5 - 100	-	-	-	-	-	11 - 51	57,7 ± 14,0	44 - 97
AST (u/l)	103,3 ± 64,6	25 - 260	-	-	36,5 ± 12,8	19,0 - 74,0	-	23 - 157	50,9 ± 9,12	30 - 65

Supplementary table 4.6 (Continuation)

Analyte	This study (<i>Crocodylus intermedius</i> , n= 326)		<i>C. intermedius</i> (Juv) Wild (n= 80) ^a		<i>C. johnstoni</i> Wild (n= 39) ^b		<i>C. porosus</i> Captivity (n= 39) ^c		<i>C. palustris</i> Captivity (n= 16) ^d	
	Mean ± SD	Min-Max	Mean ± SD	Min-Max	Mean ± SD	Mean ± SD	Min-Max	Mean ± SD	Min-Max	Mean ± SD
ALP (u/l)	181,1 ± 79,5	37 - 400	-	-	-	-	-	31 - 180	44,7 ± 10,3	30 - 66
CHOL (mg/dl)	253,5 ± 40,3	164 - 357	-	-	-	-	-	42,5 - 278	236,7 ± 21,9	192 - 262
UA (mg/dl)	4,4 ± 1,7	1,8 - 7,9	-	-	1,1 ± 0,42	0,4 - 1,89	-	2,8 - 16,6	3,86 ± 1,3	2,4 - 7,0
CREA (mg/dl)	0,5 ± 0,1	0,4 - 0,7	-	-	-	-	-	0,22 - 0,57	0,43 ± 0,11	0,3 - 0,6
CK (u/l)	1825 ± 1288	187 - 5915	-	-	1086 ± 1243	109 - 4448	-	-	-	-
LACT (mg/dl)	66,2 ± 41,8	16 - 178	-	-	-	-	-	-	-	-
LDH ^b (u/l)	21,5 ± 10,4	4 - 47,1	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Wild juvenile *Crocodylus intermedius*, (Manzanilla et al., 2011)

^b Wild *Crocodylus johnstoni* (Scheelings et al., 2016)

^c Captive *Crocodylus porosus* (Millan et al., 1997)

^d Captive *Crocodylus palustris* (Stacy & Whitaker, 2000)

Supplementary table 4.7 (Continuation)

Analyte	This study (<i>Crocodylus intermedius</i> , n= 326)		<i>C. niloticus</i> Wild (n= 38) ^e		<i>C. niloticus</i> Captivity (n= 44) ^e		<i>C. moreletti</i> Captivity (n= 47) ^f		<i>C. moreletti</i> Wild (n= 45) ^f	
	Mean ± SD	Min-Max	Mean	Min-Max	Mean	Min-Max	Mean	Min-Max	Mean	Min-Max
PCV (%)	26,3 ± 3,7	17 - 36	17,9	14 - 22	27,2	24 - 31	24,5	23,2 - 25,7	24,6	22,7 - 26,4
TP (g/dl)	7,0 ± 1,4	3,9 - 10,2	4,12	2,8 - 5,7	5,3	-	-	-	-	-
HGB (g/dl)	8,2 ± 1,2	5,1 - 12,1	7,1	4,7 - 9,5	8,7	7,8 - 9,5	-	-	-	-
RBC (10 ⁶ /μl)	1,1 ± 0,4	0,47 - 2,28	0,59	0,35 - 1	0,92	0,6 - 1,31	1,1	1,02 - 1,17	1,04	0,92 - 1,16
WBC (10 ³ /μl)	6,8 ± 2,5	2,2 - 15,1	11,28	3,75 - 26,22	6,4	4,0 - 11,5	8,3	8,0 - 8,5	9,9	9,4 - 10,4
MCV (fl)	263,0 ± 76,7	100 - 592	312,2	200 - 465	306,7	206 - 440	-	-	-	-
MCH (pg)	10,1 ± 2,5	5,7 - 17,4	123,2	83,8 - 220,9	97,9	65,3 - 153	-	-	-	-
MCHC (g/dl)	33,1 ± 5,4	22,1 - 50,4	39,6	29,0 - 47,5	31,9	29,0 - 38,3	-	-	-	-
Heterophils (%)	60,8 ± 12,1	20 - 83	20,5	4 - 39	13,4	6 - 20	-	-	-	-
Heterophils (10 ³ /μl)	4,10 ± 1,94	0,3 - 9,5	2,09	0,45 - 3,66	-	-	2,27	2,21 - 2,42	2,96	2,68 - 3,24
Lymphocytes (%)	27,2 ± 10,5	6 - 65	62	44 - 85	82,2	73 - 95	-	-	-	-
Lymphocytes (10 ³ /μl)	1,72 ± 0,74	0,3 - 3,6	7,20	1,65 - 17,83	-	-	3,93	3,73 - 4,14	4,33	4,06 - 4,59
Eosinophils (%)	3,6 ± 3,3	0 - 16	4,9	0 - 17	4,4	2 - 8	-	-	-	-
Eosinophils (10 ³ /μl)	0,18 ± 0,15	0 - 0,62	0,53	0 - 2,14	-	-	0,26	0,21 - 0,32	0,26	0,21 - 0,33
Monocytes (%)	1,7 ± 3,4	0 - 20	0,9	0 - 10	2,5	1 - 7	-	-	-	-
Monocytes (10 ³ /μl)	0,05 ± 0,085	0 - 0,34	0,09	0 - 0,79	-	-	0,08	0,05 - 0,11	0,28	0,22 - 0,33
Basophils (%)	6,6 ± 4,2	0 - 20	5,9	0 - 16	-	-	-	-	-	-
Basophils (10 ³ /μl)	0,40 ± 0,24	0 - 1,09	0,69	0 - 2,9	-	-	1,5	1,44 - 1,72	1,80	1,62 - 1,92
Azurophils ^a (%)	0,0 ± 0,2	0 - 3	5,1	0 - 21	-	-	-	-	-	-
Azurophils ^a (10 ³ /μl)	0,001 ± 0,001	0 - 0,28	0,6	0 - 3,93	-	-	0,15	0,11 - 0,18	0,26	0,19 - 0,33
GLU (mg/dl)	128,1 ± 23,5	92 - 186	68,4	32,4 - 86,4	82,3	-	64,3	58,9 - 69,7	77,7	67,4 - 88,1
ALB (g/dl)	2,0 ± 0,3	1,4 - 3	1,4	1,1 - 1,9	1,9	-	-	-	-	-
ALT (u/l)	40,6 ± 21,1	11,5 - 100	43,9	15 - 63	13,1	-	17,8	13,1 - 22,5	20,2	15,0 - 25,4
AST (u/l)	103,3 ± 64,6	25 - 260	66,5	14 - 211	16,6	-	-	-	-	-

Supplementary table 4.8 (Continuation)

Analyte	This study (<i>Crocodylus intermedius</i> , n= 326)		<i>C. niloticus</i> Wild (n= 38) ^e		<i>C. niloticus</i> Captivity (n= 44) ^e		<i>C. moreletti</i> Captivity (n= 47) ^f		<i>C. moreletti</i> Wild (n= 45) ^f	
	Mean ± SD	Min-Max	Mean	Min-Max	Mean	Min-Max	Mean	Min-Max	Mean	Min-Max
ALP (u/l)	181,1 ± 79,5	37 - 400	21,1	3 - 72	-	-	-	-	-	-
CHOL (mg/dl)	253,5 ± 40,3	164 - 357	212,2	0 - 381,2	-	-	283	249 - 316	228,7	196 - 260
UA (mg/dl)	4,4 ± 1,7	1,8 - 7,9	2,0	0,67 - 5,04	4,03	-	1,95	1,51 - 2,33	4,48	3,13 - 5,84
CREA (mg/dl)	0,5 ± 0,1	0,4 - 0,7	0,38	0,19 - 0,63	-	-	2,74	2,44 - 3,04	2,76	2,22 - 3,3
CK (u/l)	1825 ± 1288	187 - 5915	-	-	-	-	-	-	-	-
LACT (mg/dl)	66,2 ± 41,8	16 - 178	-	-	-	-	-	-	-	-
LDH ^b (u/l)	21,5 ± 10,4	4 - 47,1	-	-	-	-	-	-	-	-

^e Wild and captive *Crocodylus niloticus*, (Lovely et al., 2007)

^f Wild and captive *Crocodylus moreletti* (Padilla et al., 2011)

5. Discusión general

5.1 Discusión

Los análisis hematológicos de reptiles son escasos en Latinoamérica, restringiéndose a algunas especies de lagartos, crocodilidos y tortugas marinas, terrestres y dulceacuícolas. En Colombia, los únicos estudios enfocados en este campo se enfocan en la tortuga hikota (*Trachemys callirostris*), donde se han analizado individuos en condiciones *in-situ* y *ex-situ* (Arcila, 2005; Carrascal et al., 2014; Rincón, 2004).

Con el presente estudio se generó la siguiente información nueva: 1) Se propusieron valores e intervalos de referencia hematológicos y de química sérica para tortugas *Podocnemis vogli* mantenidas en condiciones de cautiverio; 2) Se reportaron nuevos valores e intervalos de referencia hematológicos y de química sérica, así como descripción morfológica de células sanguíneas de poblaciones colombianas de cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) criados en cautiverio; 3) Se brindaron nuevos reportes hematológicos para *Podocnemis unifilis* y se reportaron por primera vez valores de química sanguínea para esta misma especie; 4) Se reportaron valores hematológicos y de química sérica de dos poblaciones de *Trachemys callirostris* mantenidas en cautiverio a diferentes altitudes; y 5) Se brindaron recomendaciones para la obtención y almacenamiento de muestras sanguíneas a partir de quelonios de las especies *Trachemys callirostris*, *Podocnemis unifilis* y *Chelonoidis carbonaria*, a través de la evaluación de diferentes sitios de venopunción y anticoagulantes.

De manera general, la morfología de las células sanguíneas observadas en todas las especies analizadas fueron similares a las reportadas previamente en otros reptiles (Perpiñán, 2017; Stacy, Alleman, & Sayler, 2011), sin embargo se observaron algunas diferencias relacionadas con el tamaño de los eritrocitos. *Podocnemis vogli* y *P. unifilis* fueron las especies que presentaron los eritrocitos más grandes, superando los 24,4 μm X 15,7 μm ; seguidos por *Trachemys callisrostris* (18,7 X 11,9 μm) y *Crocodylus intermedius* (16,0 x 8,24 μm). Dentro de los reptiles, los eritrocitos más grandes son encontrados en quelonios y crocodilidos, mientras que los más pequeños son hallados en lagartos (Arikan

& Çiçek, 2014). Se ha determinado que el tamaño de estas células tiene relación inversamente proporcional con parámetros hematológicos como el recuento total de eritrocitos y directamente proporcional con el volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (Eatwell, Hedley, & Barron, 2014). Esto fue observado en las especies analizadas, donde *C. intermedius* reportó los recuentos de glóbulos rojos más elevados, mientras que ambas especies de *Podocnemis* presentaron los recuentos mas bajos.

Con respecto a los leucocitos, se observó un mayor recuento en *Crocodylus intermedius*, seguido por *Trachemys callirostris* y *Podocnemis* spp, similar a lo observado con los eritrocitos. Adicionalmente, dentro de *T. callirostris* se observó un mayor recuento de leucocitos en los individuos presentes en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) en comparación con los presentes en la Estación Biológica Tropical Roberto Franco (EBTRF) de la Universidad Nacional de Colombia, el cual se encuentra a una elevación aproximada de 2.600 msnm; es necesario resaltar que los individuos de esta dependencia no se encontraron infectados por parásitos, pero están en contacto constante con humanos y otros animales, lo cual podrían desencadenar un estrés permanente. Diferentes estudios llevados a cabo en reptiles han demostrado que factores estresantes pueden desencadenar un aumento de corticosteroides, los cuales causan alteraciones a nivel fisiológico, como leucocitosis, mayor degradación de proteínas, hiperglicemia y alteraciones hepáticas (Davis, Maney, & Maerz, 2008; Warwick, Frye, & Murphy, 1995). En este sentido, los altos valores en el recuento de leucocitos, y elevados valores en la concentración de ALT y AST observados en los individuos de URRAS pueden ser consecuencia del cautiverio y factores estresantes; sin embargo, es necesario resaltar que no se observó hiperglicemia en los individuos de URRAS (Tabla 3.2). El cautiverio y las condiciones de cría también puede causar diferentes respuestas fisiológicas en los reptiles, como elevada concentración de glucosa o ácido úrico, tal como lo observado en *C. intermedius* y otras especies de crocodilidos (Lovely, Pittman, & Leslie, 2007; Scheelings, Williamson, & Reina, 2016).

Por otra parte, los recuentos diferenciales mostraron que los heterófilos fueron los leucocitos más abundantes en *P. vogli*, *P. unifilis* y *C. intermedius*, en concordancia con otros reportes de reptiles (Campbell, 2015; Stacy et al., 2011; Sykes & Klaphake, 2015). Para resaltar, en *T. callirostris* los leucocitos más abundantes observados en este estudio fueron los eosinófilos. La eosinofilia en reptiles se ha asociado con infecciones parasitarias a nivel gastrointestinal (Hidalgo-Vila et al., 2011; Stacy et al., 2011), sin embargo análisis de parásitos gastrointestinales, así como de parásitos sanguíneos no mostraron infección en los individuos de la especie *T. callirostris* analizados en ambas localidades de muestreo; adicionalmente, análisis microscópicos de los extendidos sanguíneos usando tinción de Giemsa fueron llevados a cabo para descartar una posible confusión al momento de diferenciar heterófilos de eosinófilos. En este sentido, teniendo en cuenta que los individuos analizados se encontraban físicamente sanos, y que estas observaciones ya habían sido reportadas previamente para *T. callirostris* (Arcila, 2005), el elevado recuento de eosinófilos observado puede ser un rasgo característico de esta especie. Sugerimos estudio de citoquímica en esta especie y otras dentro del género *Trachemys*.

Solo se observó diferencias significativas en la concentración de AST y colesterol entre machos y hembras de *P. unifilis*, lo cual puede estar relacionado con procesos reproductivos. A pesar de esto, las comparaciones en parámetros hematológicos y de química sérica entre machos y hembras no mostraron diferencias estadísticamente significativas en las demás especies de quelonios analizadas, contrastando con algunos estudios realizados en otros quelonios como *Testudo hermanni* o *Psammobates geometricus*, donde si se han observado estas diferencias en parámetros como recuentos de glóbulos rojos, concentración de hemoglobina, hematocrito, ALT, AST, urea y ácido úrico (Andreani et al., 2014; Hofmeyr, Henen, & Walton, 2017). Adicionalmente, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre diferentes grupos etarios en *Trachemys callirostris*, así como en poblaciones mantenidas en diferentes altitudes. Esta homogeneidad en los parámetros hematológicos observada entre adultos y juveniles de quelonios puede ser causada por las condiciones de cautiverio, ya que el estrés al que están sometidos estos individuos puede causar respuestas fisiológicas que estarían enmascarando diferencias innatas en parámetros como hematocrito, recuento de glóbulos rojos, blancos o concentración de glucosa, como las observadas por Rousselet et al. (2013) en *Caretta caretta*. La no observación de diferencias estadísticas en parámetros como

hemoglobina, hematocrito o recuento de glóbulos rojos, entre individuos localizados a altitudes bajas y altas, puede estar relacionado con las adaptaciones de estos quelonios a prolongadas apneas, sin embargo, se hacen necesarios exámenes más especializados, como la medición de saturación de oxígeno, para determinar si la altitud puede causar fluctuaciones en la disponibilidad y uso de oxígeno por parte de estos individuos. A diferencia de lo observado en quelonios, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras de *Crocodylus intermedius* en parámetros como hematocrito, hemoglobina, fosfatasa alcalina, creatinina, creatinina quinasa y recuento de leucocitos.

Una tortuga de la especie *P. vogli* se encontró infectada por el hemosporidio *Haemocystidium pacayae*, adquirido probablemente mientras el individuo se encontraba en estado silvestre. Los parámetros hematológicos del individuo infectado no mostraron alteraciones que puedan relacionarse con la infección por este hemoparásito, sin embargo, se hace necesarios estudios detallados en población silvestre y análisis como histopatología para determinar su impacto en diferentes tejidos como hígado o bazo.

Los valores hematológicos y de química sérica, así como los intervalos de referencia aquí propuestos constituyen una herramienta informativa eficaz, que permitirá ser tomados como base para evaluar el estado de salud de tortugas de los géneros *Trachemys* y *Podocnemis*, así como del cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*). Adicionalmente, estos estudios facilitarán y permitirán la toma de medidas clínicas y en pro de la conservación de los individuos analizados, específicamente aquellos que fueron sujetos al tráfico ilegal y/o que se encuentran en proceso de reintroducción a sus correspondientes hábitats. Por otra parte, los resultados aquí mostrados pueden ser complementados a futuro con análisis de poblaciones silvestres, así como con la utilización de técnicas citoquímicas y de microscopía que permitan caracterizar a profundidad las células sanguíneas de estos organismos. Sin duda alguna, la información plasmada en este documento amplia y genera información de base sobre hematología de quelonios y crocodrilos distribuidos a nivel nacional y latinoamericano.

5.2 Referencias

- Andreani, G., Carpenè, E., Cannavacciuolo, A., Di Girolamo, N., Ferlizza, E., & Isani, G. (2014). Reference values for hematology and plasma biochemistry variables, and protein electrophoresis of healthy Hermann's tortoises (*Testudo hermanni* ssp.). *Veterinary Clinical Pathology*, 43(4), 573–583. <https://doi.org/10.1111/vcp.12203>
- Arcila, V. H. (2005). Hematología y química sérica en hembras quelonios (*Trachemys scripta callirostris*) en la ribera del río Lebrija, Puerto Wilches (Santander) Parte I. *Spei Domus*, 1(2).
- Arikan, H., & Çiçek, K. (2014). Haematology of amphibians and reptiles: A review. *North-Western Journal of Zoology*, 10(1), 190–209.
- Campbell, T. W. (2015). *Exotic Animal Hematology and Cytology* (Fourth Ed.). <https://doi.org/10.1002/9781118993705>
- Carrascal, J., Negrete, H., Rojano, C., Álvarez, G., Chacón, J., & Linares, J. (2014). Caracterización hematológica de hicoteas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (28), 43. <https://doi.org/10.19052/mv.3180>
- Davis, A. K., Maney, D. L., & Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Functional Ecology*, Vol. 22, pp. 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>
- Eatwell, K., Hedley, J., & Barron, R. (2014). Reptile haematology and biochemistry. *In Practice*, 36(1), 34–42. <https://doi.org/10.1136/inp.f7488>
- Hidalgo-Vila, J., Martíñez-Silvestre, A., Ribas, A., Casanova, J. C., Pérez-Santigosa, N., & Díaz-Paniagua, C. (2011). Pancreatitis Associated with the Helminth *Serpinema microcephalus* (Nematoda: Camallanidae) in Exotic Red-Eared Slider Turtles (*Trachemys scripta elegans*). *Journal of Wildlife Diseases*, 47(1), 201–205. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.201>
- Hofmeyr, M. D., Henen, B. T., & Walton, S. (2017). Season, sex and age variation in the haematology and body condition of geometric tortoises *Psammobates geometricus*. *African Zoology*, 52(1), 21–30. <https://doi.org/10.1080/15627020.2017.1284575>

- Lovely, C. J., Pittman, J. M., & Leslie, A. J. (2007). Normal haematology and blood biochemistry of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the Okavango Delta, Botswana. *Journal of the South African Veterinary Association*, 78(3), 137–144. <https://doi.org/10.4102/jsava.v78i3.305>
- Perpiñán, D. (2017). Chelonian haematology 2. Identification of blood cells. *In Practice*, 39(6), 274–283. <https://doi.org/10.1136/inp.j2361>
- Rincón, M. (2004). *Análisis de química sérica en quelonios hembras, especie Trachemys scripta callirostris en la rivera del rio Lebrija (Puerto Wilches, Santander)*. Universidad Cooperativa de Colombia.
- Rousselet, E., Stacy, N. I., LaVictoire, K., Higgins, B. M., Tociłowski, M. E., Flanagan, J. P., & Godard-Codding, C. A. J. (2013). Hematology and plasma biochemistry analytes in five age groups of immature, captive-reared loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(4), 859–874. <https://doi.org/10.1638/2012-0162R1.1>
- Scheelings, T. F., Williamson, S. A., & Reina, R. D. (2016). Hematology and Serum Biochemistry for Free-ranging Freshwater Crocodiles (*Crocodylus johnstoni*) in Western Australia. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(4), 959–961. <https://doi.org/10.7589/2015-03-064>
- Stacy, N., Alleman, A., & Sayler, K. (2011). Diagnostic Hematology of Reptiles. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(1), 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2010.10.006>
- Sykes, J. M., & Klaphake, E. (2015). Reptile Hematology. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(3), 661–680. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2015.05.014>
- Warwick, C., Frye, F. L., & Murphy, J. B. (1995). Health and Welfare of Captive Reptiles. In *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1007/978-94-011-1222-2>

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Dentro de los sitios de venopunción evaluados, la vena yugular fue la que mostró mejores resultados al notarse una menor probabilidad de hemodilución con linfa, por lo cual es recomendable obtener muestras sanguíneas a partir de este punto. Las muestras hemodiluidas generalmente presentan un color rojizo pálido, mientras que la sangre optima presenta una coloración roja oscura. Estas observaciones deben ir acompañadas de pruebas de laboratorio, como medición de hematocrito, concentración de hemoglobina o recuento de glóbulos rojos, los cuales se verán reducidos en las muestras hemodiluidas. Con respecto al anticoagulante, el EDTA causó lisis en eritrocitos de las tortugas de la especie *Chelonoidis carbonaria*, debido a esto y a previos reportes donde se corroboran estas observaciones en otras especies de quelonios, es recomendable usar la heparina de sodio o de litio como anticoagulante de elección para realizar análisis hematológicos.

El presente estudio reporta por primera vez valores e intervalos de referencia hematológicos y de química sérica para *Podocnemis vogli*, adicionalmente también se realizan nuevos reportes de valores hematológicos para *P. unifilis* y se reportan por primera vez valores e intervalos de química sanguínea para esta misma especie. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras para AST y colesterol de *P. unifilis*, lo cual puede estar relacionado con procesos reproductivos, como agresividad en machos y vitelogénesis o producción de huevos en hembras. El individuo infectado por el hemoparásito *Haemocystidium pacayae* no mostró parámetros hematológicos o de química sérica diferenciales que puedan relacionarse con la infección.

Por otra parte, el 66% de los parámetros hematológicos y de química sérica de *Trachemys callirostris* mostraron diferencias significativas entre las localidades de muestreo. Dichas diferencias pueden ser causadas por aumentos en los niveles de hormonas adrenales como corticosteroides, consecuencia de estrés constante al que están sometidos los individuos. El prolongado contacto de estos individuos con estresores externos puede conllevar a alteraciones fisiológicas mas graves, con consecuencias mortales. En este

sentido, el manejo del estrés de individuos silvestres que se encuentran en recuperación se hace necesario. No se observaron alteraciones en los parámetros hematológicos como posible consecuencia a la diferencia altitudinal entre los sitios de muestreo.

Se mostraron los valores y se establecieron por primera vez los intervalos de referencia hematológicos y de química sérica para poblaciones colombianas de cocodrilos adultos y juveniles de la especie *Crocodylus intermedius*. Estos reportes complementan estudios previos realizados a individuos juveniles de la misma especie distribuidos en Venezuela. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras y entre individuos adultos y juveniles para algunos de los parámetros hematológicos evaluados, los cuales son consistentes con los reportados previamente para otras especies de crocodilidos dentro de este género.

Los valores e intervalos de referencia aquí reportados pueden ser usados como referencia al evaluar el estado de salud de individuos de las especies analizadas, teniendo en cuenta que los reptiles presentan profundas adaptaciones a las condiciones ambientales y que estos parámetros pueden verse afectados por diferentes factores intrínsecos y extrínsecos, por lo cual, deben tenerse en cuenta al momento de evaluar el diagnóstico clínico de estas especies.

6.2 Recomendaciones

- (1) Se recomienda realizar estudios de hematología y química sérica en poblaciones silvestres de las especies evaluadas en el presente estudio, con el fin de evaluar diferencias y determinar el impacto fisiológico causado por el cautiverio en estos organismos.
- (2) Se recomienda la realización de estudios enfocados en analizar la hematología y química sanguínea de organismos infectados por parásitos sanguíneos y gastrointestinales, los cuales permitirán comprender el impacto de estos

microorganismos a nivel fisiológico, pues a la fecha, no se ha determinado efectos patogénicos asociados a estos.

Glosario

Analito: Sustancia a ser medida.

Coefficiente de variación (CV): Desviación estándar relativa

Curva Gaussiana. Distribución Gaussiana. Curva normal. Distribución normal: Se refiere a una distribución simétrica en forma de campana cuya forma viene dada por una ecuación específica (llamada ecuación normal) en la que la media y la desviación estándar son variables.

Desviación estándar: Estadística que describe la dispersión o extensión de un conjunto de medidas sobre el valor medio de una distribución gaussiana o normal.

Intervalo de confianza (IC): Intervalo o rango de valores el cual contiene el parámetro de la población con una probabilidad especificada.

Intervalo de referencia: Rango estadístico particular, en lugar de todo el rango de valores de referencia observados. Se usa comúnmente para caracterizar el rango de resultados de prueba esperados para un grupo definido de individuos.

Media: Promedio aritmético de un set de valores. Es una medida de tendencia central de distribución de un set de resultados replicados.

Muestra: Parte representativa de una población que es usada en el análisis.

Valores atípicos: Valores discrepantes. Valores que no concuerdan con el patrón de la mayoría de otros datos.

Valores de referencia: Todos los valores observados para una determinación particular al muestrear una población de individuos en estados de salud definidos.

Variable. Una cantidad de interés, cuyo valor o magnitud fluctúa o cambia.

7. Anexo

Molecular and morphological description of the first *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) species infecting a neotropical turtle, with an approach to its phylogenetic relationships

Germán A. Gutierrez-Liberato^{1,2}, Ingrid A. Lotta-Arévalo¹, Cristian C. Rodríguez-Almonacid¹, Mario Vargas-Ramírez^{3,4}, Nubia E. Matta¹.

¹ Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

² Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

³ Facultad de Ciencias, Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF), Universidad Nacional de Colombia, Villavicencio, Meta.

⁴ Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

* Correspondence authors: Nubia Estela Matta Camacho. E-mail: nemattac@unal.edu.co

Este artículo hace parte del trabajo de grado de maestría de Germán Gutierrez. Mi contribución con este proyecto incluye apoyo en la fase de campo y diagnóstico.

Parasitology

cambridge.org/par

Research Article

Cite this article: Gutierrez-Liberato GA, Lotta-Arévalo IA, Rodríguez-Almonacid CC, Vargas-Ramírez M, Matta NE (2021). Molecular and morphological description of the first *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) species infecting a neotropical turtle, with an approach to its phylogenetic relationships. *Parasitology* 1–13. <https://doi.org/10.1017/S0031182021000184>

Received: 1 September 2020

Revised: 20 January 2021

Accepted: 20 January 2021

Key words:


18S rRNA; Adeleorina; Chelonian blood parasites; Haemogregarines; *Hepatozoon* new species

Q7

Author for correspondence:

Nubia E. Matta,
E-mail: nemattac@unal.edu.co

Molecular and morphological description of the first *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) species infecting a neotropical turtle, with an approach to its phylogenetic relationships

Germán A. Gutierrez-Liberato^{1,2} , Ingrid A. Lotta-Arévalo¹,
Cristian C. Rodríguez-Almonacid¹, Mario Vargas-Ramírez^{3,4} and Nubia E. Matta¹

¹Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Carrera 30 No. 45-03, Bogotá 111321, Colombia; ²Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Carrera 30 No. 45-03, Bogotá 111321, Colombia; ³Facultad de Ciencias, Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF), Universidad Nacional de Colombia, Carrera 33 #33 –76, Villavicencio 500005 Meta, Colombia and ⁴Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Carrera 30 No. 45-03, Bogotá 111321, Colombia

Abstract

Haemogregarines (Adeleorina) have a high prevalence in turtles. Nevertheless, there is only one *Hepatozoon* species described that infects Testudines so far; it is *Hepatozoon fitsimensi* which infects the African tortoise *Kinixys belliana*. Colombia harbours a great diversity of chelonians; however, most of them are threatened. It is important to identify and characterize chelonian haemoparasite infections to improve the clinical assessments, treatments and the conservation and reintroduction programs of these animals. To evaluate such infections for the Colombian wood turtle *Rhinoclemmys melanosterna*, we analysed blood from 70 individuals. By using the morphological characteristics of blood stages as well as molecular information (18S rRNA sequences), here we report a new *Hepatozoon* species that represents the first report of a hepatozoid species infecting a semi-aquatic continental turtle in the world. Although the isolated lineage clusters within the phylogenetic clades that have morphological species of parasites already determined, their low nodal support makes their position within each group inconclusive. It is important to identify new molecular markers to improve parasite species identification. In-depth research on blood parasites infecting turtles is essential for increasing knowledge that could assess this potential unknown threat, to inform the conservation of turtles and for increasing the state of knowledge on parasites.

Introduction

Among Haemogregarines, those belonging to the *Hepatozoon* genus (Miller, 1908) are the most common parasites reported infecting mammals (Wenyon, 1926; Clark, 1958; Desser, 1990), birds (Hoare, 1924; Merino *et al.*, 2014; Valkiūnas *et al.*, 2016), amphibians (da Costa *et al.*, 1973; Netherlands *et al.*, 2018) and reptiles-like snakes (Ball *et al.*, 1967; Smith *et al.*, 1994), lizards (Mackerras, 1962; Desser, 1997) and crocodiles (Carini, 1909; Soares *et al.*, 2017); but they are rarely seen in chelonians (Cook *et al.*, 2009). Haemogregarines are heteroxenous coccidians, their life cycle involves blood-sucking invertebrate vectors (fleas, ticks and mosquitoes, etc.) where sexual development occurs and various vertebrates are intermediate hosts, where the merogonic and gamontogonic cycle take place (Smith, 1996; Telford, 2009).

Hepatozoon is a highly diverse group of parasites that has been described in almost all vertebrates around the globe (Smith, 1996; Telford, 2009). However, the description and characterization of these organisms are not exempt from difficulties. At the morphological level, descriptions are based on the traits of the gamonts that frequently are the only visible structures in the blood films. Nevertheless, at this stage, only a few morphologic characters are available that are often poorly distinctive (Ball, 1967; Telford, 2009; Cook *et al.*, 2014; Dvořáková *et al.*, 2015; Hayes and Smit, 2019). Also, since for some species, there is little knowledge on the development of the parasite, it may occur that early stages that are rare in blood films might be mistakenly taken as gamonts of different species (Smith, 1996). Therefore, for species identification, some authors have recommended that when characterizing the development of the parasites throughout their life cycle, it is good to include morphological characters from other stages different from gamonts (Ball *et al.*, 1967; Smith, 1996; O'Dwyer *et al.*, 2013).

To improve our understanding of the phylogenetic relationships of Adeleorina parasites, genetic information has been included using the 18S rRNA (Barta *et al.*, 2012; Maia *et al.*, 2016). This molecular marker has a slow rate of evolution; hence it is widely used for the reconstruction of deep phylogenetic relationships at the higher taxonomic levels such as classes or orders (Hwang and Kim, 1999). Notwithstanding the above, for this particular case and using this gene, the phylogenetic relationships within the adeleorinid parasites have been mostly clarified (Barta *et al.*, 2012; Karadjian *et al.*, 2015). In fact, the analysis using these

Q1

Q2

Q3

Q4

Q5

Q6

Q7

Q8

Q9

Q10

Q11

Q12

Q13

Q14

Q15

Q16

Q17

Q18

Q19

Q20

Q21

Q22

Q23

Q24

Q25

Q26

Q27

Q28

Q29

Q30

Q31

Q32

Q33

Q34

Q35

Q36

Q37

Q38

Q39

Q40

Q41

Q42

Q43

Q44

Q45

Q46

Q47

Q48

Q49

Q50

Q51

Q52

Q53

Q54

Q55

Q56

Q57

Q58

Q59

Q60

Q61

Q62

Q63

Q64

Q65

Q66

Q67

Q68

Q69

sequences have shown that *Hepatozoon* is a paraphyletic group that includes some species of other genera such as *Karyolysus* (Karadjian *et al.*, 2015; Cook *et al.*, 2016) and it is closely related to *Hemolivia* (Kvičerová *et al.*, 2014). This suggests that the scope of the marker for this group could be slightly broader, providing information for the resolution of the genus or even species (Cook *et al.*, 2015; Borges-Nojosa *et al.*, 2017; Netherlands *et al.*, 2018). In the course of the last decades, the genetic information from the sequences of 18s rRNA has not only allowed the delimitation of some species but has played an important role in genus reassignment for at least two of the parasites described in the Testudines: *Haemogregarina parvula*, which was assigned to the *Hemolivia* (Cook *et al.*, 2015) and *Haemogregarina fitsimensi*, which after being placed in the *Hepatozoon* clade becomes the only species of this genus described as infecting chelonians (Cook *et al.*, 2009).

During the past decade, many studies have characterized the apicomplexan parasites that infect reptiles of tropical regions of South America (i.e. O'Dwyer *et al.*, 2013; Pineda-Catalan *et al.*, 2013; Borges-Nojosa *et al.*, 2017; Matta *et al.*, 2018; Ungari *et al.*, 2018; González *et al.*, 2019). Despite this, knowledge about Haemogregarines, particularly in Testudines, is still scarce. Here, we explore the hemoparasites associated with *Rhinoclemmys melanosterna*, a semi-aquatic turtle inhabiting forested areas in the presence of lentic water bodies (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007). The turtle is distributed from the east coast of Panama, part of the Caribbean coast of Colombia, following the course of the Magdalena River to the Middle Magdalena region and throughout the Pacific coast region to north western Ecuador (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007). Although the species is currently not included in any threat category either globally or in Colombia, the implications of the deep phylogeographic structure revealed for the species by Vargas-Ramírez *et al.* (2013), suggest the presence of seven evolutionary significant units (ESU) that should have conservation status.

The goals of this study were (i) to perform the morphological description and molecular characterization of the first hepatozoid species parasitizing a continental turtle in the neotropics; and (ii) to elucidate the phylogenetic relationship with other species of the genus and other adeleorinid coccidias, while discussing the suitability of the use of morphological characters and 18s rRNA sequences for the description of new species. Additionally, we discuss advances in the use of new molecular markers for species identifications of *Hepatozoon*. This study registered a new host and increases the knowledge about parasitic fauna that infect turtles in Colombia, which has been poorly studied, despite the ecological importance of its charismatic hosts. In this sense, we expect this new information to be useful for the identification of unknown threat factors that should be taken into account in the generation of conservation strategies for Testudines.

Materials and methods

Sample collection and blood film examination

Analysed samples were obtained from individuals captured in the wild, as well as individuals held in captivity in rescue animal centres (Fig. 1, Table 1). Wild turtles were sampled from eight sites in four departments in their natural range of distribution (Fig. 1). At all localities, turtles were found near bodies of water (i.e. swamps, lagoons and marshes) inside of or near forested areas. Forty-six tissue samples from those individuals for polymerase chain reaction (PCR) identification procedures came from the Banco de ADN y Tejidos de la Biodiversidad (BTBC), of the Genetics Institute, Universidad Nacional de Colombia. Meanwhile, captive individuals were sampled from two places outside their range of distribution; the animals had been seized from illegal wildlife trafficking. The turtles sampled in the Unidad de Rescate y

Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) in Bogotá at 2600 meters above sea level (m.a.s.l.), were kept in plastic pools inside rooms with controlled environmental conditions. The average temperature of the enclosure was 30°C with a 12/12 photoperiod. The turtles from the Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) in Villavicencio at 459 m.a.s.l., animals were held in artificial ponds, surrounded by vegetation; and the temperature varied from 24 to 26°C, and the relative humidity ranged between 79 and 95%.

From all individuals, about 1 mL of blood was taken from the subcarapacial venous sinus and did not exceed 1% of the body weight. Three thin blood films were made and the remaining blood sample was stored in ethanol 96% for further molecular analyses. The blood films were quickly dried using a fan, fixed with methanol for 5 min and stained with Giemsa at 4% as proposed by Rodríguez and Matta (2001).

The blood films obtained from the individuals sampled in Yondó (Antioquia) and URRAS (Bogotá) were analysed using an Olympus CX41 microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) at a magnification of 100× and photographs were taken using the Olympus DP27 integrated camera and the CellSens software (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). The Haemogregarines were identified to genus using morphological and morphometric characteristics (Telford, 2009; Cook *et al.*, 2015; Javanbakht *et al.*, 2015). Parasitaemia was established by the relationship between the number of infected erythrocytes in a total of 10 000 screened erythrocytes. This resulted from the close observation of 100 optical fields at 1000 magnification.

DNA extraction and 18s rRNA amplification

DNA was extracted from blood samples preserved in absolute ethanol using the DNeasy Blood and Tissue extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany). 18S rRNA gene amplification was performed using the primers set HepF300/HepR900 (Ujvari *et al.*, 2004) to obtain a fragment of approximately 600 base pairs (bp). The original protocol was modified by adding five cycles with an annealing temperature of 50°C for 45 s prior to the 35 cycles of amplification that were indicated. The PCR products were visualized in a 1.5% agarose gel, cleaned using differential precipitation with ammonium acetate protocol (Bensch *et al.*, 2000) and sequenced in both directions using a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Phylogenetic analysis

Three alignments using sequences of different lengths were generated to estimate the phylogenetic relationships of the new *Hepatozoon* species described here, as well as the lineages of *Haemogregarina* sp. reported in this study. All databases included 59 sequences of 18s rRNA of *Hepatozoon* (43 lineages), *Hemolivia* sp. (5), *Karyolysus* sp. (1), *Haemogregarina* sp. (8, including lineages here reported) and *Dactylosoma* sp. (2, used as out-group). In the first alignment, full-size sequences up to 1800 bp were analysed while in the second and third databases, lineages of 1000 and 585 bp, respectively, were used (Table 2). Such alignments were constructed in MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) and were aligned with MAFFT (Katoh *et al.*, 2002), available at <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>.

The phylogenetic reconstructions were estimated using both Bayesian inference (BI) as well as Maximum Likelihood (ML). The BI analyses were carried out using MrBayes version 3.1.2 (Ronquist *et al.*, 2012), and implemented in the platform CIPRES Science Gateway V 3.3 (Miller *et al.*, 2010). These analyses were performed under the general time-reversal model (GTR+I+G) suggested by jModelTest 2.1.1 (Darriba *et al.*,

70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135

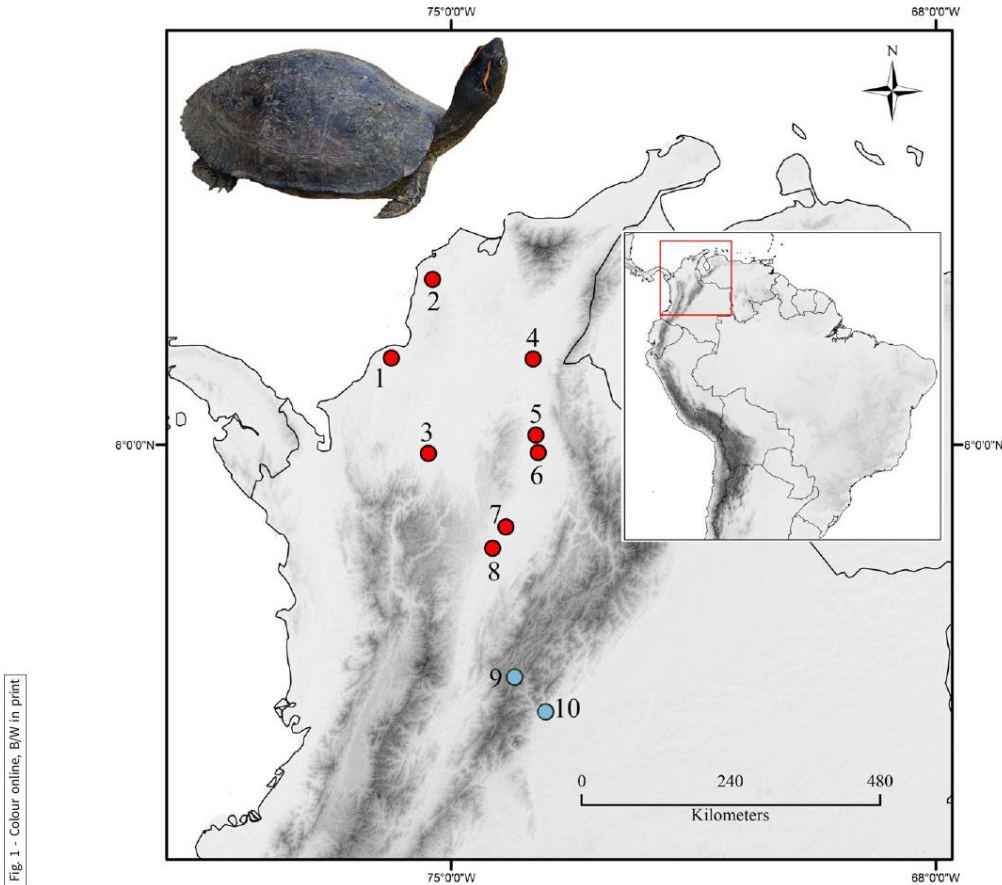


Fig. 1. The geographical location of the sampling places. Names and coordinates are provided in Table 1, according to the numbering. Red dots (dark grey in printed version) indicate the places where free-living turtles were captured and sampled and the blue dots (Light grey dots) correspond to rescue animal centres. Inset Photo: Female *Rhinoclemmys melanosterna* from Arjona, Bolívar.

2012) as the best of 88 models according to the corrected information criterion of Akaike (AIC). For BI two independent Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulations were run simultaneously; using 5×10^6 generations sampled every 500 generations. Convergence was reached when the average standard deviation of the posterior probability was less than 0.01 and was also assessed using the software Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2013). After discarding 25% of the trees as burn-in, 37 500 trees were used to build the majority rule consensus tree, which was visualized and edited using FigTree version 1.3.1 (Rambaut and Drummond, 2010).

The ML analyses were performed using the software PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2009) using the same model mentioned above, leaving the 'estimated' option for the proportion of invariable sites and the gamma shape parameter. In this phylogenetic analysis nodal supports were calculated using 1000 bootstrap replicates.

Genetic distances between taxa were calculated for both alignments, whereas between and within genera were estimated only for the first alignment using the Kimura two-parameter substitution model implemented in the software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

Results

Sample collection and blood film examination

Samples of 70 turtles *R. melanosterna* were screened for blood parasites. Although PCR tested all individuals, only 24 had a blood smear available for microscopic analysis. The other 46 samples came from the BTBC, which has a different purpose and does not collect blood films (Fig. 1, Table 1). Eight samples were positive (overall prevalence: 11.42%) four of them were screened by microscopy, but all the samples were positive by PCR. Seven infected with *Haemogregarina* sp. (prevalence: 10%) and one that corresponds to a single infection of the new *Hepatozoon* species (prevalence: 1.42%).

Taxonomic summary

Suborder: Adeleorina Léger, 1911
Family: Hepatozoidae Wenyon, 1926
Genus: *Hepatozoon* Miller, 1908
Hepatozoon (*H.*) *simidi* sp. nov

136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201

Table 1. Localities and report of infection of the studied individuals of the Colombian wood turtle *Rhinoclemmys melanosterna*

Locality	Coordinates			<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Haemogregarina</i> sp.
	N	W	n(n _{mic})		
Antioquia					
3. Caucasia ^a	7.87128	-75.327	10 (0)	0	0
8. Puerto Berrio ^a	6.5002	-74.399	1 (0)	0	0
7. Yondó ^a	6.8057	-74.206	4 (4)	1*	3
Bolívar					
2. Arjona ^a	10.267	75.336	12 (0)	0	0
Cesar					
4. Chimichagua ^a	7.87128	-75.327	1 (0)	0	0
6. Terraplen ^a	7.88283	-73.744	7 (0)	0	0
5. Loma Corredor ^a	8.1358	-73.775	2 (0)	0	0
Córdoba					
1. Lórica ^a	9.2442	-75.864	10 (0)	0	4
Cundinamarca					
9. Bogotá Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) ^b	4.6397	-74.083	13 (13)	0	0
Meta					
10. Villavicencio Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) ^b	4.14009	-73.634	10 (7)	0	0
Total			70 (24)	1	7
Prevalence by genus				1.42	10
Overall prevalence of infection	11.42				

N, total number of samples; n_{mic}, number of samples examined by microscopy; *, individual infected with *H. simidi* sp. nov.

^aLocalities where the turtles were captured from the wild.

^bAnimal rescue centres where animals were held in captivity.

Type host: *Rhinoclemmys melanosterna* Gray, 1861 (Geoemydidae) Colombian wood turtle.

Type locality: free-living environment in 'El Silencio' natural reserve (6.8057N, -74.206W), Middle Magdalena river valley rain forest, municipality of Yondó, Antioquia, Colombia.

Type material: Hapantotype, three blood smears from *R. melanosterna* were deposited at the biological collection 'Grupo de Estudio Relación Parásito Hospedero' (GERPH), at the Department of Biology, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Site of infection: mature erythrocytes

Prevalence: One individual was positive (1.42%) for *Hepatozoon simidi* sp. nov.

Parasitemia: the parasitemia for *Hepatozoon simidi* sp. nov. was 0.68%.

Distribution: This species was found only in the type locality.

Vector: Unknown.

DNA sequences: the 18S rRNA lineage RM4 (585 bp) obtained from type host *R. melanosterna* was deposited in GenBank under accession N°MT754271.

Etymology: The species name refers to the word 'simidi', which is used by the 'Embera' native group to name 'turtle.' These native people live in a part of the geographical area of Colombia, where *R. melanosterna* is found.

Description of blood stages

The morphology found reflects different stages of development of the parasite. **Immature gamonts** (Fig. 2A–H) are cylindrical with a straight central axis and rounded ends, or slightly curved 'bean-

like' (Fig. 2E–H). Interestingly, it should be noted that 100% of the gamonts cause the host cell nucleus to be pushed aside. A capsule may surround the parasite (Fig. 2B, E, H); the pale-blue cytoplasm has a granular appearance and sometimes possesses fine vacuoles and granules of different sizes (Fig. 2C, D, G, H). A round vacuole is often seen at one end of the parasite (Fig. 2A and D). Uncondensed chromatin is observed at the central (Fig. 2A) or subcentral position (Fig. 2B).

Mature gamonts, this stage shows larger parasites (Fig. 2I–L; Table 2), which causes a great deformation of infected cells. The chromatin is condensed and the nucleus host at a central position in the parasite body is displaced to a lateral (Fig. 2J) or polar position (Fig. 2L) or even expelled from the host cell (Fig. 2I). The parasite shows an intense blue-stained cytoplasm, irregular in appearance. Multiple pigment granules with variable affinities for the dye from pink to purple (Fig. 2J and L) are mainly distributed around the parasite nucleus (Fig. 2K) but can also be found dispersed throughout the entire body of the gamont (Fig. 2I and L). In at least 70% of the mature parasites, clear space between the parasite and RBC's cytoplasm is observed; it could be a capsule or parasitophorous vacuole (Fig. 2K, L).

Remarks

To date, *Hepatozoon fitsimensi* is the only parasite that has been found parasitizing chelonian hosts (Cook et al., 2009). The species described here is the second *Hepatozoon* species reported in a cryptodiran turtle species and the first species reported in a freshwater turtle species of the family Geoemydidae. Despite the phylogenetic proximity with *H. fitsimensi* hosts, gamonts of *H.*

Table 2. Morphometric measurements of gamonts and host cells of *Hepatozoon simidi* sp. nov. Measurements of *H. fitsimensi*, *H. colubri* and *H. rarefaciens* are provided for comparison

	<i>Hepatozoon simidi</i> sp. nov. <i>Rhinoclemmys melanosterna</i> (Geoemydidae)	<i>Hepatozoon fitsimensi</i> <i>Kinixys belliana</i> (Testudinidae) ^a	<i>Hepatozoon colubrid</i> <i>Python</i> <i>reticulatus Erythrolamprus</i> <i>aesculapii</i> (Squamata, Pythonidae, Colubridae) ^{b,c} .	<i>Hepatozoon</i> <i>rarefaciens</i> <i>Drymarchon corais</i> (Squamata, Colubridae) ^d
<i>Uninfected erythrocytes</i>				
Cell area	145.96–190.2 (158.49 ± 14.16)			
Cell length	15.99–18.14 (17.216 ± 0.774)			17
Cell width	10.33–12.80 (11.045 ± 0.789)			10
Nucleus area	15.64–26.99 (20.674 ± 3.875)			
Nucleus length	3.94–5.88 (5.046 ± 0.620)			
Nucleus width	4.38–5.63 (4.985 ± 0.457)			
Cell area	194.11–244.82 (226.7 ± 7.19)			
Cell length	21.16–23.24 (22.32 ± 0.76)			
Cell width	11.17–12.79 (12.04 ± 0.58)			
Nucleus area	22.23–25.13 (23.732 ± 1.23)			
Nucleus length	3.62–6.98 (4.456 ± 1.42)			
Nucleus width	3.67–7.33 (6.031 ± 1.39)			
Immature gamonts	n = 26	n = 12		
<i>Host cell-parasite complex</i>				
Area	194.8–291.0 (229.72 ± 10.82)			
Length	19.59–24.97 (21.77 ± 1.57)			
Width	10.70–16.27 (12.43 ± 1.81)			
<i>Parasite</i>				
Parasite area	79.08–126.08 (104.02 ± 11.63)			
Parasite length	15.17–19.20 (16.97 ± 1.08)	14.3–19.6 (17.8 ± 1.2)	5–6 ^b	11–22 (15.4)
Parasite width	6.27–8.75 (7.11 ± 0.51)	1.6–3.0 (2.3 ± 0.4)		3–10 (5.5)
Parasite nucleus length	3.61–6.99 (5.88 ± 0.75)	1.4–2.8 (2.0 ± 0.4)		
Parasite nucleus width	3.61–6.51 (4.82 ± 0.84)	0.7–1.0 (0.9 ± 0.1)		
Mature gamonts	n = 34	n = 36		
<i>Host cell-parasite complex</i>				
Area	207.35–314.43 (262.30 ± 12.85)			
Length	21.13–25.75 (23.39 ± 0.56)			
Width	11.73–14.48 (13.28 ± 0.63)			
<i>Parasite</i>				
Parasite area	90.83–129.29 (110.13 ± 7.50)			
Parasite length	15.85–18.70 (17.42 ± 0.59)	17.1–17.7 (17.5 ± 0.3)	9–9.5 ^b /15–17 ^c	
Parasite width	6.64–8.05 (7.25 ± 0.36)	3.3–4.3 (3.9 ± 0.5)	3.8–4.7 ^c	
Parasite nucleus length	3.05–5.12 (3.98 ± 0.42)	4.5–5.0 (4.8 ± 0.3)		
Parasite nucleus width	4.99–7.51 (6.04 ± 0.49)	2.4–3.2 (2.9 ± 0.4)		

Measurements are given in μm or μm^2 . Minimum and maximum values and mean \pm s.d. are provided.

^aAccording to Cook *et al.* (2009).

^bAccording to Bömer (1901).

^cAccording to Han *et al.* (2015).

^dAccording to Ball *et al.* (1967).

simidi sp. nov. are similar to *Hepatozoon rarefaciens*, a parasite that has been found infecting colubrid snakes in Canada. However, *H. rarefaciens* gamonts are slightly shorter and slender than *H. simidi* sp. nov. (Table 3). Unfortunately, there are no genetic lineages from *H. rarefaciens* available for comparison.

Hepatozoon simidi sp. nov. can distinguish from *H. fitsimensi* and other *Hepatozoon* species by combining their morphological features with the nuclear molecular marker's information. For this species, it is noteworthy that the mature gamonts' width is almost twice the width of most of the genus species already described;

6

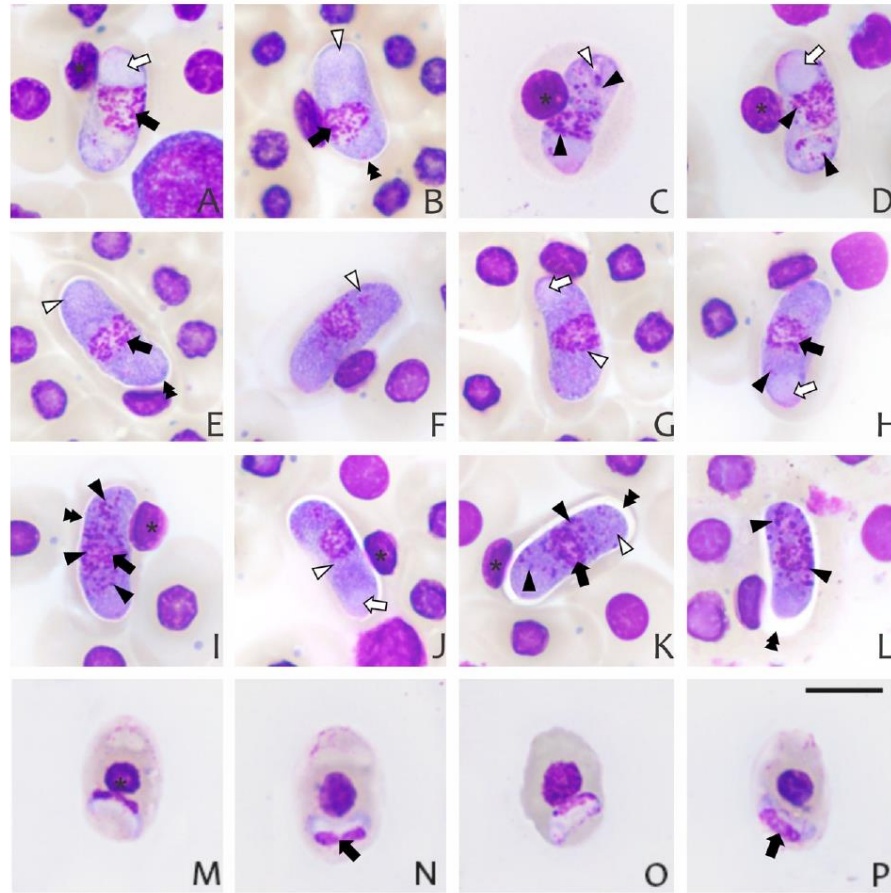
Germán A. Gutierrez-Liberato *et al.*

Fig. 2 - Colour online. B/W in print

Fig. 2. *Hepatozoon simidi* sp. nov. (A–L) and *Haemogregarina* sp. (M–P) found in the Colombian Wood Turtle (*Rhinoclemmys melanostema*). Young gamonts (A–H), and mature gamonts (I–L) of *Hepatozoon simidi* sp. nov. from the bloodstream of the type host. Black arrows indicate the parasite nucleus, whereas the white arrows show the vacuole-like patches at the tip of parasite structures. Black arrowheads indicate the granules and white arrowheads, the tiny vacuoles in the cytoplasm. Asterisks are located over the host cell nucleus. Giemsa-stained blood films. Scale bar = 10 μ m.

and gamonts possessed equally wide ends that give a characteristic appearance of a slightly curved cylinder (Table 3).

Phylogenetic analysis

Using sequences with different lengths, three phylogenetic hypotheses were generated and different rearrangements of clades and taxa were observed. Overall, both tree-building methods for phylogenetic reconstruction showed almost the same topology. *Hepatozoon* parasites appear into four different clades (Fig. 3, clades A–E), and *Karyolysus* was included in one of them (Fig. 3, clade E). In the phylogenetic reconstruction using full-length sequences (Fig. 3A), *Haemogregarina* (clade II) parasites diverge from a clade that includes *Hepatozoon*, *Karyolysus* and *Hemolivia*, depicted in clade I. In such clade I, *Hemolivia* lies basal to *Hepatozoon* clades from amphibia (Fig. 3, clade A) and reptile (clades B and C).

Hepatozoon simidi sp. nov. was located in a small clade (Fig. 3, clade C) along with *H. colubri* in all hypotheses performed (Fig. 3 and Fig. S1) with a low nodal support. This small clade was placed in a polytomy that included lineages from other reptiles, and the clade of amphibian *Hepatozoon* (Fig. 3, clades A and B), whose genetic divergences ranged between 0.03 (clade B vs clade C) and 0.05 (clade A vs clade C- Table S1). Furthermore, the new *Hepatozoon* species was separated by its sister taxa *H. colubri* by a genetic distance of 0.019; and from the second most closely related *H. fitzsimonsi* by a divergence of 0.03 (Table 4).

Haemogregarina lineages amplified in this study were placed basal of two distinct clades including parasite species reported infecting old-world Testudines (Fig. 3 clades G, H and I). The genetic distance between neotropical and old-world parasites of this genus ranged between 0.49 (clade G vs clade H) and 0.082 using 585 bp sequences (Fig. S1 B, clade G vs clade I), or 0.076 using sequences of 1000 bp (Fig. S1 A, clade G vs clade I);

334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399

Table 3. 18S rRNA sequences aligned to construct the phylogenetic hypothesis. Sequence length used in each phylogenetic hypothesis of Fig. 3 and Fig. S1 are provided

Clade	Host	Parasite	GenBank No	Sequence lengths (bp)		
				Fig. 3A	Fig. S1 A	Fig.S1 B
Dactylosomatidae (Outgroup)	<i>Pelophylax lessonae</i> (syn. <i>esculentus</i>)	<i>Dactylosoma ranarum</i>	HQ224957	1808	1122	580
	<i>Ptychadena anchietae</i>	<i>Dactylosoma kermitti</i>	MN879398	1737	1122	580
<i>Haemogregarina</i>	<i>Platysternon megacephalum</i>	<i>Haemogregarina pellegrini</i>	KM887509	1412	1125	583
	<i>Mauremys caspica</i>	<i>Haemogregarina stepanowi</i>	KF992697	1421	1124	582
	<i>Sacalia quadriocellata</i>	<i>Haemogregarina sacaliae</i>	KM887507	1418	1124	582
	<i>Chelydra serpentina</i>	<i>Haemogregarina balli</i>	HQ224959	1817	1126	584
	<i>Podocnemis unifilis</i>	<i>Haemogregarina</i> sp.	MW246122	1423	1125	583
	<i>Rhinoclemmys melanosterna</i>	<i>Haemogregarina</i> sp. RM1	MT754268	585	585	584
	<i>Rhinoclemmys melanosterna</i>	<i>Haemogregarina</i> sp. H14	MT754269	583	583	583
	<i>Rhinoclemmys melanosterna</i>	<i>Haemogregarina</i> sp. H10	MT754270	582	582	582
<i>Hepatozoon</i>	<i>Lamprophis fuliginosus</i> Boie	<i>Hepatozoon ayorgbor</i>	EF157822	1773	1127	585
	<i>Boiga irregularis</i>	<i>Hepatozoon boiga</i>	AF297085	1996	1127	589
	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Hepatozoon canis</i>	MH615006	1816	1124	582
	<i>Elaphe carinata</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	KF939620	1470	1088	585
	<i>Martes martes</i>	<i>Hepatozoon marten</i>	EF222257	1757	1124	582
	<i>Abrothrix olivaceus</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	FJ719817	1738	1127	585
	<i>Podarcis bocagei</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	JX531954	1365	1041	582
	<i>Caiman crocodilus</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	MW246123	1394	1127	585
	<i>Cerdocyon thous</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	KC127679	1028	798	600
	<i>Panthera tigris tigris</i>	<i>Hepatozoon felis</i>	HQ829446	1094	831	582
	<i>Hemidactylus mabouia</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	KM234615	1356	1029	585
	<i>Felis silvestris silvestris</i>	<i>Hepatozoon silvestris</i>	KX757032	1669	1135	593
	<i>Sus scrofa leucomystax</i>	<i>Hepatozoon apri</i>	LC314791	1007	930	582
	<i>Hepatozoon procyonis</i>	<i>Nasua nasua</i>	MF685409	1060	1015	583
	<i>Hyperolius marmoratus</i>	<i>Hepatozoon thori</i>	MG041603	1640	1127	585
	<i>Amietia delalandii</i>	<i>Hepatozoon theileri</i>	MG041605	1673	1127	585
	<i>Arixalus forasini</i>	<i>Hepatozoon tenuis</i>	MG041596	1701	1127	585
	<i>Hyperolius marmoratus</i>	<i>Hepatozoon involucreum</i>	MG041591	1658	1127	585
	<i>Ctenosaura pectinata</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	MG456821	1409	1089	585
	<i>Sauromalus</i> sp.	<i>Hepatozoon</i> sp.	MG456822	1411	1089	586
	<i>Heloderma horridum</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	MG456823	1378	1089	585
	<i>Haemaphysalis bancrofti</i>	<i>Hepatozoon ewingi</i>	MG593275	1680	1027	585
	<i>Gallotia galloti</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	MG787248	1696	1024	582
	<i>Tarentola delalandii</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	MG787251	1698	1125	582
	<i>Spalerosophis diadema</i>	<i>Hepatozoon aegypti</i>	MH198742	1315	948	469
	<i>Caiman crocodilus</i>	<i>Hepatozoon caimani</i>	MF435048	1429	1065	585
	<i>Algyroides marchi</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	JX531944	1368	1041	582
	<i>Philodryas nattereri</i>	<i>Hepatozoon musa</i>	KX880079	1384	1021	542
	<i>Lithobates</i> (ex. <i>Rana</i>) <i>clamitans</i>	<i>Hepatozoon clamatae</i>	HQ224963	1655	1127	585
	<i>Lithobates catesbeianus</i>	<i>Hepatozoon catesbianae</i>	AF130361	1824	1133	586
	<i>Amblyomma maculatum</i>	<i>Hepatozoon americanum</i>	AF176836	1413	1140	597
	<i>Sclerophrys pusilla</i>	<i>Hepatozoon ixoxo</i>	MG041604	1631	1127	585

(Continued)

Table 3. (Continued.)

Clade	Host	Parasite	GenBank No	Sequence lengths (bp)		
				Fig. 3A	Fig. S1 A	Fig.S1 B
	<i>Nerodia sipedon sipedon</i>	<i>Hepatozoon sipedon</i>	JN181157	1807	1125	585
	<i>Grandisonia alternans</i>	<i>Hepatozoon seychellensis</i>	KF246565	590	590	585
	<i>Sciurus vulgaris</i>	<i>Hepatozoon sciuri</i>	MN104640	1492	1127	585
	<i>Philodryas patagoniensis</i>	<i>Hepatozoon</i> sp.	MN003368	1329	944	465
		<i>Hepatozoon ophisauri</i>	MN723845	1721	1127	585
	<i>Ursus thibetanus japonicus</i>	<i>Hepatozoon ursi</i>	EU041718	1207	1124	582
	<i>Panthera pardus pardus</i>	<i>Hepatozoon luiperdje</i>	MN793004	1002	998	582
	<i>Zamenis longissimus</i>	<i>Hepatozoon colubri</i>	MN723844	1609	1127	585
	<i>Rhinoclemmys melanosterna</i>	<i>Hepatozoon simidi</i> sp. nov.	MT754271	584	585	585
<i>Hemolivia</i>	<i>Rhinella marina</i>	<i>Hemolivia stellata</i>	KP881349	1816	1125	583
	<i>Kinixys zombensis</i>	<i>Hemolivia parvula</i>	KR069083	1052	1052	582
	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	<i>Hemolivia</i> sp.	KU667309	1051	1007	585
	<i>Kinixys belliana</i>	<i>Hepatozoon fitsimensi</i> ^{a,b}	KR069084	1034	1032	585
	<i>Testudo graeca</i>	<i>Hemolivia mauritanica</i>	KF992710	1418	1129	583
	<i>Egernia stokesii</i>	<i>Hemolivia mariae</i>	KF992712	1373	1124	582
	<i>Rhinoclemmys pulcherrima</i>	<i>Hemolivia</i> sp.	KF992714	1421	1124	582
<i>Karyolysus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>Karyolysus lacazei</i>	MK497254	1442	1124	582

Table S1). Indeed, divergences within *Haemogregarina* parasites may reach values of 0.096 when comparing lineage (MT754270 with *Haemogregarina sacaliae*, Table 4, Fig. 3 and Fig. S1).

Discussion

Sample collection and blood film examination

This is the first report of an *Hepatozoon* parasite infecting a neotropical continental turtle, *R. melanosterna*, distributed in northwestern South America. In the Neotropics other species of *Rhinoclemmys* have been previously reported infected with Hemogregarines: in Costa Rica, the black river turtle (*Rhinoclemmys funerea*) was found infected with *Haemogregarina* sp. and probably *Hepatozoon* sp., (Rossow et al., 2013) and in Nicaragua, the Central American wood turtle (*Rhinoclemmys pulcherrima*) infected with *Hemolivia* sp. (Kvičerová et al., 2014). Genetic distances with the latest were for *H. simidi* sp. nov. of 0.04 (Table 4), which is between *Haemogregarina* sp. RM1 and *Hemolivia* sp. from *R. pulcherrima*; while for *Haemogregarina* lineages H10 and H14 were 0.09 and 0.05, respectively (Table 4).

At the genetic level, the closest taxon to *H. simidi* is *H. colubri* (Börner, 1901), a parasite isolated from *Zamenis longissimus* (Zechmeisterová, unpublished results) and other Colubridae (Pessoa, 1967), and also from Phytionidae (Börner, 1901). The next closest is *H. fitsimensi*. There are few morphological details on *H. colubri*; however, according to the original description, the parasites seem to be shorter and slender than *H. simidi* sp. nov. (Table 4).

Hepatozoon parasites can be transmitted by many blood-sucking arthropods. To the successful transmission of a heteroxenous parasite, there should be a spatiotemporal coincidence of the parasite, the host and the vector (Eldridge, 2004). Besides, some heteroxenous parasites may be transmitted horizontally or even vertically by facultative vias without the participation of true

vectors (Kauffman et al., 2017). *Rhinoclemmys melanosterna* is a semi-aquatic turtle that prefers swampy environments and is rarely found far away from such water bodies, so the habitat preference shown by this turtle may make transmission difficult if the vectors are ticks [as it is supposed for *H. fitsimensi*; (Cook et al., 2009)], or blood-sucking dipterans (Smith, 1996). An alternative pathway for the transmission of *Hepatozoon* in reptiles is the ingestion of infective stages through predation (Ball, 1967; Landau et al., 1972). Although *R. melanosterna* is mainly herbivorous, occasionally eats small fishes, frogs or tadpoles (Rueda-Almonacid et al., 2007); thereby the infection by ingestion of an infected animal, as well as the possibility of this host species being an intermediate in a more complex life cycle, cannot be ruled out.

To date, only *H. fitsimensi* has been described in a Testudine host using molecular and morphological data. Although there are few distinctive characters in the gamonts that can be used in the description of the *Hepatozoon* species (Ball et al., 1967), such parasite structures of *H. simidi* sp. nov. found in *R. melanosterna* were compared to those present in *H. fitsimensi*, revealing many distinctive features that the species in this description possesses. This parasite is even larger than others belonging to the *Haemogregarina*'s group (Table 3, Fig. 2), that cause marked hypertrophy of the host cell from early stages. Also, the presence of large granules dispersed throughout the parasite is distinctive. The nature of these granules is still unknown; however, similar granules have been reported in haemosporidians as volutine granules (Valkiūnas, 2005; Lotta et al., 2019). Electronic micrography studies are desirable for characterizing the morphological features, as well as to define more microscopic details that eventually can be used as diagnostic morphological characters.

Phylogenetic analysis

In agreement with previous studies, our phylogenetic reconstructions revealed *Karyolysus* lineages within *Hepatozoon*, making it a

466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531

Table 4. Genetic distance calculated using K2P model of substitutions, between 18SrRNA lineages of Adeleorina parasites for the three different alignments in Fig. 3 and Fig. S1

Species	Genetic distance (d ± s.d.)		
	Full-length sequences (Fig. 3)	1000 bp (Fig. S1A)	585 pb (Fig. S1B)
<i>Hepatozoon</i> species from amphibians (Clade A)			
<i>Hepatozoon tenuis</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. nov.	0.059 ± 0.010	0.059 ± 0.010	0.059 ± 0.010
<i>Hepatozoon theileri</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. nov.	0.055 ± 0.010	0.055 ± 0.010	0.055 ± 0.010
<i>Hepatozoon catesbiana</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. nov.	0.061 ± 0.010	0.061 ± 0.010	0.059 ± 0.010
<i>Hepatozoon ixoxo</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. nov.	0.063 ± 0.010	0.063 ± 0.010	0.063 ± 0.011
<i>Hepatozoon clamata</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. nov.	0.065 ± 0.010	0.065 ± 0.010	0.065 ± 0.011
<i>Hepatozoon involucrum</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. nov.	0.065 ± 0.010	0.065 ± 0.010	0.065 ± 0.011
<i>Hepatozoon thori</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. nov.	0.066 ± 0.010	0.066 ± 0.010	0.066 ± 0.011
<i>Hepatozoon</i> species from reptiles (Clade B)			
<i>Hepatozoon boiga</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.074 ± 0.012	0.076 ± 0.011	0.07 ± 0.011
<i>Hepatozoon sciuri</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.044 ± 0.009	0.044 ± 0.009	0.044 ± 0.009
<i>Hepatozoon ayorgbor</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.031 ± 0.007	0.031 ± 0.007	0.031 ± 0.007
<i>Hepatozoon seychellensis</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.044 ± 0.009	0.044 ± 0.009	0.044 ± 0.009
<i>Hepatozoon ophisauri</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.031 ± 0.007	0.031 ± 0.007	0.031 ± 0.007
<i>Hepatozoon caimani</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.037 ± 0.008	0.037 ± 0.008	0.037 ± 0.008
<i>Hepatozoon</i> species from reptiles (Clade C)			
<i>Hepatozoon colubri</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.019 ± 0.006	0.019 ± 0.006	0.019 ± 0.006
<i>Hepatozoon</i> species from other Testudines			
<i>Hepatozoon fitzsimonsi</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.030 ± 0.007	0.030 ± 0.008	0.030 ± 0.007
<i>Hepatozoon</i> species from mammals (Clade D)			
<i>Hepatozoon felis</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.033 ± 0.007	0.033 ± 0.008	0.033 ± 0.008
<i>Hepatozoon apri</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.046 ± 0.010	0.046 ± 0.009	0.046 ± 0.009
<i>Hepatozoon procyonis</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.050 ± 0.010	0.050 ± 0.009	0.050 ± 0.010
<i>Hepatozoon ursi</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.052 ± 0.009	0.052 ± 0.009	0.052 ± 0.009
<i>Hepatozoon canis</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.052 ± 0.010	0.059 ± 0.010	0.059 ± 0.011
<i>Hepatozoon</i> species from reptiles (Clade E)			
<i>Karyolysus lacazei</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.041 ± 0.008	0.041 ± 0.008	0.041 ± 0.008
<i>Hepatozoon_sp</i> (JX531944) vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.048 ± 0.009	0.048 ± 0.009	0.048 ± 0.009
<i>Hepatozoon_sp</i> (JX787251) vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.071 ± 0.012	0.071 ± 0.012	0.071 ± 0.011
<i>Hemolivia</i> (clade F)			
<i>Hemolivia stellata</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.033 ± 0.008	0.033 ± 0.007	0.033 ± 0.007
<i>Hemolivia párvula</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.035 ± 0.008	0.035 ± 0.007	0.035 ± 0.008
<i>Hemolivia mariae</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.037 ± 0.008	0.037 ± 0.008	0.037 ± 0.008
<i>Hemolivia sp</i> in <i>R. pulcherrima</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.037 ± 0.008	0.037 ± 0.008	0.037 ± 0.008
<i>Hemolivia mauritanica</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.035 ± 0.007	0.035 ± 0.007	0.035 ± 0.007
<i>Haemogregarina</i> sp. (clades G, H, I)			
<i>Haemogregarina</i> sp. RM1 vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.052 ± 0.009	0.052 ± 0.010	0.052 ± 0.010
<i>Haemogregarina balli</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.067 ± 0.011	0.067 ± 0.011	0.067 ± 0.011
<i>Haemogregarina</i> sp (MW246122) vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.072 ± 0.011	0.072 ± 0.012	0.070 ± 0.011
<i>Haemogregarina</i> sp. H10 vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.097 ± 0.013	0.097 ± 0.013	0.097 ± 0.013
<i>Haemogregarina</i> sp. H10 vs <i>Haemogregarina</i> (MW246122)	0.059 ± 0.010	0.059 ± 0.011	0.059 ± 0.011
<i>Haemogregarina</i> sp. H10 vs <i>Haemogregarina sacaliae</i>	0.096 ± 0.013	0.096 ± 0.014	0.096 ± 0.013
<i>Haemogregarina</i> sp. H10 vs <i>Haemogregarina</i> sp. RM1	0.086 ± 0.013	0.086 ± 0.013	0.086 ± 0.013
<i>Haemogregarina</i> sp. RM1 vs <i>Haemogregarina</i> (MW246122)	0.057 ± 0.010	0.057 ± 0.011	0.057 ± 0.009

(Continued)

532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597

Table 4. (Continued.)

Species	Genetic distance (d ± s.d.)		
	Full-length sequences (Fig. 3)	1000 bp (Fig. S1A)	585 pb (Fig. S1B)
<i>Haemogregarina</i> sp. RM1 vs <i>Haemogregarina sacaliae</i>	0.050 ± 0.010	0.050 ± 0.009	0.050 ± 0.009
<i>Dactylosoma</i> (outgroup)			
<i>Dactylosoma ranarum</i> vs <i>Hepatozoon simidi</i> sp. Nov	0.069 ± 0.011	0.069 ± 0.010	0.071 ± 0.010

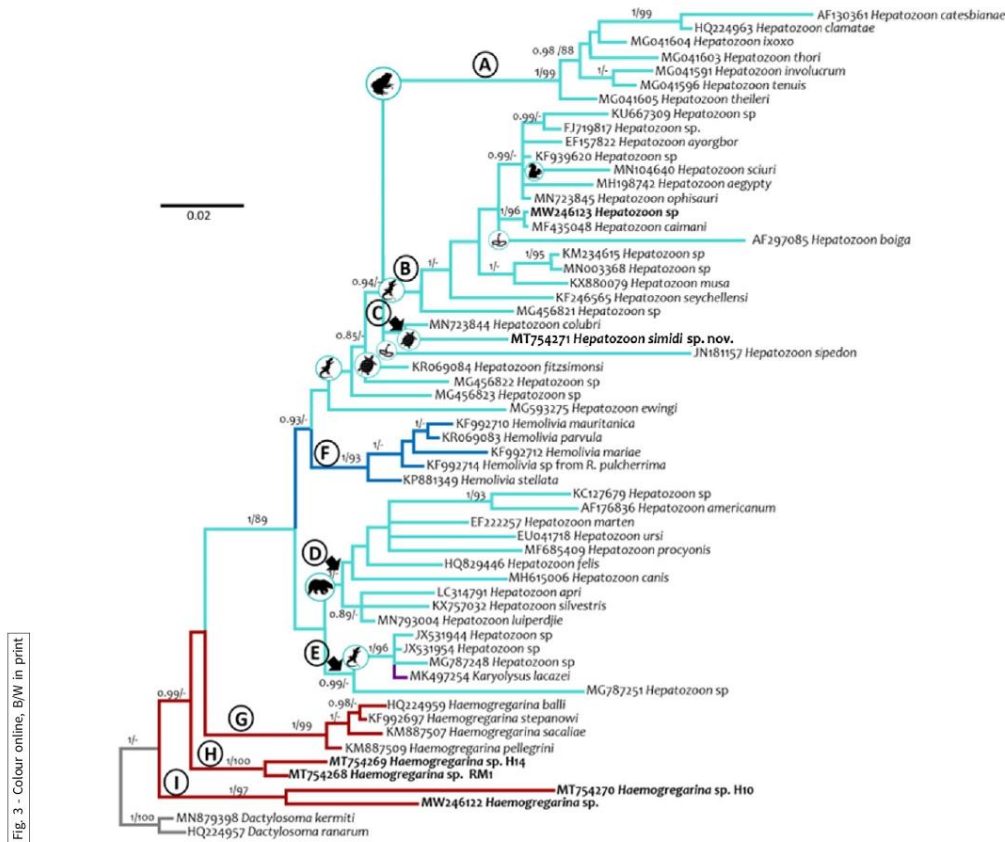


Fig. 3 - Colour online, B/W in print

Fig. 3. Phylogenetic hypothesis obtained using Bayesian inference and maximum likelihood constructed from 18S rRNA sequences of 1800 bp. The lineages obtained in this study are highlighted in bold font. Branches colour indicates the parasite genus as follows: green (light grey in printed version) for *Hepatozoon* sp., blue (medium grey) for *Hemolivia* sp., purple (white) for *Karyolysus* sp., red (black) for *Haemogregarina* and grey (Dark grey) for the outgroup (*Dactylosoma* sp.). The silhouettes located near the clade nodes indicate the host from which the parasites were isolated: a frog for amphibians, a lizard for reptiles, a turtle for turtles and tortoises, and a bear for mammals. Bootstrap values and posterior probabilities are shown above the nodes. Nodal supports below 80/0.8 are not shown. The branch lengths are proportional to the amount of change. Scale bar indicating substitutions per site is provided.

paraphyletic genus (Barta et al., 2012; Karadjian et al., 2015; Cook et al., 2016). Furthermore, *H. simidi* sp. nov. was consistently placed as part of a polytomy, including some other reptile and anuran parasite species, with low nodal support, most probably due to the size of the sequence analysed.

Using sequences of 18S rRNA, several authors have proposed that an interspecific genetic distance of above 1% could be enough to differentiate species, bearing in mind the low

evolutionary rate mentioned (Cook et al., 2015; Borges-Nojosa et al., 2017; Netherlands et al., 2018). Based on the large genetic distance found between the lineage MT754271 (*H. simidi* sp. nov.) with the closest lineages belonging to the genus *Hepatozoon* isolated from reptiles (2% with *H. colubri* and 3% with *H. fitsimensi* from the tortoise *Kinixys belliana*), we might conclude that this parasite lineage represents an undescribed parasite species.

598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663

It is important to mention that the lineage of *H. simidi* sp. nov. fall in the clade identified as *Bartazoon* genus proposed by Karadjian *et al.* (2015). However, the *Bartazoon* genus has specific features in the sporogonic development in the invertebrate vector, described widely in Karadjian *et al.* (2015). Unfortunately, we have no information about sporogonic development or even a possible vector that allows us to give bases to designate this new species to the *Bartazoon* genus.

As for *Haemogregarina* parasites, high genetic distances found between the different lineages analysed, either from the old world and neotropical hosts, might be revealing a high diversity within this parasite genus that remains to unveil. In turn, it can also be indicative of the low number of taxa of this genus used to build the phylogenetic hypothesis.

Here we described a new parasite species belonging to the genus *Hepatozoon*. The description of *H. simidi* sp. nov. was based on both morphological and molecular approaches, and this is the first report of Adeleorinid hemoparasite infections in *R. melanosterna* from Colombia. To a more accurate description of new parasite species belonging to this group, it would be ideal to have information about the vector's development stages and tissue stages in the vertebrate (Ball *et al.*, 1967; Smith, 1996). Besides, new molecular markers would improve phylogenetic relationships. The mitochondrial genome has been seen as a good candidate given the evolution rate of the genes encoded there (Escalante *et al.*, 1998; Pacheco *et al.*, 2017) as well as their widespread use in other apicomplexa groups of parasites (Bensch *et al.*, 2000; Martinsen *et al.*, 2008; Perkins, 2008; Ogedengbe *et al.*, 2011; Witsenburg *et al.*, 2012; Borner *et al.*, 2016; González *et al.*, 2019 among others). In this regard, recent advances have been achieved for the mitochondrial genome sequencing of *Hepatozoon catesbiana* and *Hepatozoon griseisciuri* (Léveillé *et al.*, 2014, 2020), from which high genetic divergences have been found within the nominal taxa.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0031182021000184>.

Acknowledgements. We thank Professors Favio González and Luis Fernando García of the Universidad Nacional de Colombia for their advice and assistance with this research project. A special acknowledgment goes to Paola González, friend and a member of the GERPH research group for her kind help during the development of the manuscript. Also, thanks to the staff of the reserve 'El Silencio' of the Biodiversa Foundation in Yondó, Antioquia, to the professor Carlos Moreno leader of the 'Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres' (URRAS) in Bogotá, and the 'Estación de Biología Tropical Roberto Franco' (EBTRF) in Villavicencio for their collaboration during the field work.

Financial support. This study was supported by the 'Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación' MINCIENCIAS (Project code 1101-776-57872) and the 'Dirección de Investigación' of the Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Conflicts of interest. The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical standards. Specimens were collected under the collection permit 255 of 2014 issued by the National Environmental Licenses Authority (ANLA) to the Universidad Nacional de Colombia by resolution. All specimens captured were released after the blood sample collection. Sampling methods were approved by the 'Institutional Bioethics committee of the Fundación Universitaria-Unitrópico' on May 22 of 2017 and the Bioethics Committee of the science Faculty of the Universidad Nacional de Colombia, by act 03-2019.

References

Ball GH (1967) Some blood sporezoans from East African reptiles. *The Journal of Protozoology* **14**, 198–210.

- Ball GH, Chao J and Telford Jr SR (1967) The life history of *Hepatozoon Rarefaciens* (Sambon and Seligmann, 1907) from *Drymarcon Corais* (Colubridae), and its experimental transfer to *Constrictor Constrictor* (Boidae). *The Journal of Parasitology* **897**–909. Q2 664
665
666
- Barta JR, Ogedengbe JD, Martin DS and Smith TG (2012) Phylogenetic position of the adeleorinid coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **59**, 171–180. 667
668
669
670
- Bensch S, Stjerne M, Hasselquist D, Örjan Ö, Hansson B, Westerdahl H and Pinheiro RT (2000) Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* Mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **267**, 1583–1589. 671
672
673
674
675
- Borges-Nojosa DM, Borges-Leite MJ, Maia JP, Zanchi-Silva D, da Rocha Braga R and Harris DJ (2017) A new species of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina) from the snake *Philodryas Nattereri* Steindachner (Squamata: Dipsadidae) in northeastern Brazil. *Systematic Parasitology* **94**, 65–72. 676
677
678
679
- Börner C (1901) Untersuchungen über Hämosporidien. I. Ein Beitrag zur Kenntnis des genus *Haemogregarina* Danilewsky. *Z. Wiss. Zool. Abt. A* **69**, 398–416. 680
681
682
- Borner J, Pick C, Thiede J, Kolawole OM, Kingsley MT, Schulze J, Cottontail VM, Wellinghausen N, Schmidt-Chanasit J and Bruchhaus I (2016) Phylogeny of haemosporidian blood parasites revealed by a multi-gene approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **94**, 221–231. 683
684
685
686
- Carini A (1909) Sur une hémogregarine du *Caiman Latirostris* Daud. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **2**, 471–472. 687
688
- Clark GM (1958) *Hepatozoon griseisciuri* n. sp.; a new species of *Hepatozoon* from the grey squirrel (*Sciurus carolinensis* Gmelin, 1788), with studies on the life cycle. *The Journal of Parasitology* **44**, 52–63. 689
690
- Cook CA, Smit NJ and Davies AJ (2009) A redescription of *Haemogregarina Fitzsimonsi* Dias, 1953 and some comments on *Haemogregarina parvula* Dias, 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) from southern African tortoises (Cryptodira: Testudinidae), with new host data and distribution records. *Folia Parasitologica* **56**, 173–179. 691
692
693
694
695
- Cook CA, Lawton SP, Davies AJ and Smit NJ (2014) Reassignment of the land tortoise haemogregarine *Haemogregarina Fitzsimonsi* Dias 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to the genus *Hepatozoon* Miller 1908 (Adeleorina: Hepatozoidae) based on parasite morphology, life cycle and phylogenetic analysis of 18S rDNA sequence fragments. *Parasitology*. doi: 10.1017/S003118201400081X. Q3 700
701
- Cook CA, Netherlands EC and Smit NJ (2015) First *Hemolivia* from southern Africa: reassigning chelonian *Haemogregarina parvula* Dias, 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to *Hemolivia* (Adeleorina: Karyolyssidae). *African Zoology* **50**, 165–173. 702
703
704
- Cook CA, Netherlands EC and Smit NJ (2016) Redescription, molecular characterisation and taxonomic re-evaluation of a unique African monitor lizard haemogregarine *Karyolysus paradoxa* (Dias, 1954) n. comb. (Karyolyssidae). *Parasites & Vectors* **9**, 347. 705
706
707
708
- da Costa SCG, Pessoa SB, de Pereira NM and Colombo T (1973) The life history of *Hepatozoon Leptodactyli* (Lesage, 1908) Pessoa, 1970: a parasite of the common laboratory animal: the frog of the genus *Leptodactylus*. *Memoirs do Instituto Oswaldo Cruz* **71**, 1–8. 709
710
711
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posada D (2012) Jmodeltest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**, 772. 712
713
- Davies A and Johnston M (2000) The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptiles. *Advances in Parasitology* **45**, 1–107. Q4 714
715
- Desser SS (1990) Tissue "cysts" of *Hepatozoon Griseisciuri* in the grey squirrel, *Sciurus carolinensis*: the significance of these cysts in species of *Hepatozoon*. *The Journal of parasitology*, 257–259. doi: 10.2307/3283027. 716
717
718
- Desser SS (1997) Blood parasites of the iguanid lizard, *Ctenosaura similis* from Costa Rica, with a description of *Hepatozoon Gamezi* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **44**, 162–167. 719
720
- Dvořáková N, Kvičerová J, Hostovský M and Široký P (2015) Haemogregarines of freshwater turtles from Southeast Asia with a description of *Haemogregarina Scalliae* sp. n. and a redescription of *Haemogregarina pellegrini* Laveran and Pettit, 1910. *Parasitology* **142**, 816–826. 721
722
723
724
725
- Eldridge BF (2004) The epidemiology of arthropod borne diseases. In Eldridge BF and Edman JD (eds), *Medical Entomology: A Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods*. New York, USA: Springer, pp. 165–185. 726
727
728
729

- Escalante AA, Freeland DE, Collins WE and Lal AA (1998) The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 8124–8129.
- González LP, Pacheco MA, Escalante AA, Maldonado ADJ, Cepeda AS, Rodríguez-Fandiño OA, Vargas-Ramírez M and Matta NE (2019) *Haemocystidium* spp., a species complex infecting ancient aquatic turtles of the family Podocnemididae: First report of these parasites in *Podocnemis Vogli* from the Orinoquia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **10**, 299–309.
- Guindon S, Delsuc F, Dufayard J-F and Gascuel O (2009) Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. In Posada D. (ed), *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. New Jersey, USA: Humana Press, pp. 113–137.
- Han H, Wu Y, Dong H, Zhu S, Li L, Zhao Q, Wu D, Pei E, Wang Y and Huang B (2015) First report of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from king ratsnakes (*Elaphe carinata*) in Shanghai, with description of a new species. *Acta Parasitologica* **60**, 266–274.
- Hayes PM and Smit NJ (2019) Molecular insights into the identification and phylogenetics of the cosmopolitan marine fish blood parasite, *Haemogregarina bigemina* (Adeleorina: Haemogregarinidae). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **8**, 216–220.
- Hoare CA (1924) *Hepatozoon adiei*, n. sp. A blood parasite of an Indian eagle. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **18**, 63–66.
- Hwang U-W and Kim W (1999) General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology* **37**, 215–228.
- Javanbakht H, Široký P, Mikulíček P and Sharifi M (2015) Distribution and abundance of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and its vector *Hyalomma aegyptium* in tortoises of Iran. *Biologia* **70**, 229–234.
- Karadjan G, Chavatte J-M and Landau I (2015) Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* n. g., reassignment of *Hepatozoon Argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. *Parasite* (Paris, France). doi: 10.1051/parasite/2015031.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K and Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**, 3059–3066.
- Kauffman KL, Sparkman A, Bronikowski AM and Palacios MG (2017) Vertical transmission of *Hepatozoon* in the garter snake *Thamnophis elegans*. *Journal of Wildlife Diseases* **53**, 121–125.
- Kumar S, Stecher G and Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870–1874.
- KvičeroVá J, Hypša V, Dvořáková N, Mikulíček P, Jandzik D, Gardner MG, Javanbakht H, Tiar G and Široký P (2014) *Hemolivia* and *Hepatozoon*: haemogregarines with tangled evolutionary relationships. *Protist* **165**, 688–700.
- Landau I, Michel J, Chabaud A and Brygoo E (1972) Cycle biologique d'*Hepatozoon Domerguei*; discussion sur les caractères fondamentaux d'un cycle de Coccidie. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **38**, 250–270.
- Léveillé AN, Ogedengbe ME, Hafeez MA, Tu H-HA and Barta JR (2014) The complete mitochondrial genome sequence of *Hepatozoon Catesbiana* (Apicomplexa: Coccidia: Adeleorina), a blood parasite of the green frog, *Lithobates* (Formerly *Rana*) *clamitans*. *Journal of Parasitology* **100**, 651–657.
- Léveillé AN, Baneth G and Barta JR (2019) Next generation sequencing from *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Coccidia: Adeleorina): complete apicoplast genome and multiple mitochondrion-associated sequences. *International Journal for Parasitology* **49**, 375–387.
- Léveillé AN, El Skhawny N and Barta JR (2020) Multilocus sequencing of *Hepatozoon Cf. griseisciuri* Infections in Ontario eastern gray squirrels (*Sciurus carolinensis*) uncovers two genotypically distinct sympatric parasite species. *Parasitology Research* **119**, 713–724.
- Lotta IA, Valkiūnas G, Pacheco MA, Escalante AA, Hernández SR and Matta NE (2019) Distinguishing *Leucocytozoon* Parasite diversity in the neotropics: descriptions of two new species and shortcomings of molecular diagnostics for leucocytozoids. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **9**, 159–173.
- Mackerras MJ (1962) The life of a *Hepatozoon* (Sporozoa: Adeleidea) of varanid lizards in Australia. *Australian Journal of Zoology* **10**, 35–44.
- Maia JP, Carranza S and Harris DJ (2016) Comments on the systematic revision of adeleid haemogregarines: are more data needed? *Journal of Parasitology* **102**, 549–552.
- Martinsen ES, Perkins SL and Schall JJ (2008) A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **47**, 261–273.
- Matta NE, González LP, Pacheco MA, Escalante AA, Moreno AM, González AD and Calderón-Espinosa ML (2018) *Plasmodium* parasites in reptiles from the Colombia Orinoco-Amazon basin: a re-description of *Plasmodium Kentropyxi* Lainson R, Landau I, Paperna I, 2001 and *Plasmodium Carmelinoi* Lainson R, Franco CM, da Matta R, 2010. *Parasitology Research* **117**, 1357–1370.
- Merino S, Martínez J, Masello JF, Bedolla Y and Quillfeldt P (2014) First molecular characterization of a *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidea) infecting birds and description of a new species infecting storm petrels (Aves: Hydrobatidae). *The Journal of Parasitology* **100**, 338–343.
- Miller MA, Pfeiffer W and Schwartz T (2010) Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. *Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees*, 1–8. doi: 10.1109/GCE.2010.5676129.
- Netherlands EC, Cook CA, Du Preez LH, Vanhove MP, Brendonck L and Smit NJ (2018) Monophyly of the species of *Hepatozoon* (Adeleorina: Hepatozoidea) parasitizing (African) anurans, with the description of three new species from hyperoliid frogs in South Africa. *Parasitology* **145**, 1039–1050.
- O'Dwyer LH, Moço TC, dos Santos Paduan K, Spenassato C, da Silva RJ and Ribolla PEM (2013) Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidea) from Rattlesnakes (*Crotalus Durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. *Experimental Parasitology* **135**, 200–207.
- Ogedengbe JD, Haner RH and Barta JR (2011) DNA Barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology* **41**, 843–850.
- Pacheco MA, Matta NE, Valkiūnas G, Parker PG, Mello B, Stanley Jr, CE, Lentino M, Garcia-Amado MA, Cranfield M and Kosakovsky Pond SL (2017) Mode and rate of evolution of haemosporidian mitochondrial genomes: timing the radiation of avian parasites. *Molecular Biology and Evolution* **35**, 383–403.
- Perkins SL (2008) Molecular systematics of the three mitochondrial protein-coding genes of malaria parasites: corroborative and new evidence for the origins of human malaria. *DNA Sequence* **19**, 471–478.
- Pessoa S (1967) Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. III: novas observações sobre hemogregarinas de serpentes das famílias Colubridae e Crotalidae. *Revista Brasileira de Biologia* **27**, 159–164.
- Pineda-Catalan O, Perkins SL, Peirce MA, Engstrand R, Garcia-Davila C, Pineda-Vasquez M and Aguirre AA (2013) Revision of hemoprotozoan genera and description and redescription of two species of chelonian hemoprotozoan parasites. *The Journal of Parasitology* **99**, 1089–1098.
- Rambaut A and Drummond A (2010) FigTree v1. 3.1 Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Rambaut A, Suchard M, Xie D and Drummond A (2013) Tracer 1.6. Edinburgh, UK: University of Edinburgh.
- Rodríguez OA and Matta NE (2001) Blood parasites in some birds from eastern plains of Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**, 1173–1176.
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA and Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**, 539–542.
- Rossov JA, Hernandez SM, Sumner SM, Altman BR, Crider CG, Gammage MB, Segal KM and Yabsley MJ (2013) Haemogregarine infections of three species of aquatic freshwater turtles from two sites in Costa Rica. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **2**, 131–135.
- Rueda-Almonacid JV, Carr JL, Mittermeier RA, Rodríguez-Mahecha JV, Mast RB, Vogt RC, Rhodin AG, de la Ossa-Velásquez J, Rueda JN and Mittermeier CG (2007) Las tortugas y los coccidarios de los países andinos del trópico. *Serie de gutas tropicales de campo* **6**, 412–423.
- Smith TG (1996) The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: adeleina). *The Journal of Parasitology*, 565–585. doi: doi: 10.2307/3283781.

- Smith T, Desser S and Martin D** (1994) The development of *Hepatozoon Sipedon* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, the Northern water snake (*Nerodia Sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex Pipiens* and *C. territans*, and in an intermediate host, the Northern leopard frog (*Rana Pipiens*). *Parasitology Research* **80**, 559–568.
- Soares P, Borghesan TC, Tavares LER, Ferreira VL, Teixeira MMG and Paiva F** (2017) *Hepatozoon caimani* Carini, 1909 (Adeleina: Hepatozoidae) in wild population of *Caiman Yacare* Daudin, 1801 (Crocodylia: Alligatoridae), Pantanal, Brazil. *Parasitology Research* **116**, 1907–1916.
- Telford Jr SR** (2009) *Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text*. CRC Press.
- Q6 Ujvari B, Madsen T and Olsson M** (2004) High prevalence of *Hepatozoon* Spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. *Journal of Parasitology* **90**, 670–672.
- Úngari LP, Santos ALQ, O'Dwyer LH, da Silva MRL, de Melo Fava NN, Paiva GCM, de Pinto RMC and Cury MC** (2018) *Haemogregarina podocnemis* sp. nov.: description of a new species of *Haemogregarina* Danilewsky 1885 (Adeleina: Haemogregarinae) in free-living and captive yellow-spotted river turtles *Podocnemis Unifilis* (Testudines: Podocnemididae) from Brazil. *Parasitology Research* **117**, 1535–1548.
- Valkūnas G** (2005) *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Valkūnas G, Mobley K and Iezhova TA** (2016) *Hepatozoon ellisgreineri* N. sp. (Hepatozoidae): description of the first avian apicomplexan blood parasite inhabiting granulocytes. *Parasitology Research* **115**, 609–613.
- Vargas-Ramirez M, Carr JL and Fritz U** (2013) Complex phylogeography in *Rhinoclemmys Melanosterna*: conflicting mitochondrial and nuclear evidence suggests past hybridization (Testudines: Geoemydidae). *Zootaxa* **3670**, 238–254.
- Wenyon CM** (1926) *Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists*, vol. 2. London, UK: Tindall & Cox.
- Witsenburg F, Salamin N and Christe P** (2012) The evolutionary host switches of *Polychromophilus*: a multi-gene phylogeny of the bat malaria genus suggests a second invasion of mammals by a haemosporidian parasite. *Malaria Journal* **11**, 53.