
NOTAS

ALGUNOS PARAMETROS HEMATOLOGICOS EN *Liolaemus wiegmanni* (SAURIA: TROPIDURIDAE). NUMERO DE ERITROCITOS, NUMERO DE LEUCOCITOS Y FORMULA LEUCOCITARIA. MORFOLOGIA DE CELULAS SANGUINEAS Y DE MEDULA OSEA

SUSANA CEBALLOS DE BRUNO¹

¹ Cátedra de Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.N.L.Pam. Uruguay 151. 6300 Santa Rosa. La Pampa. Argentina.

La hematología provee un importante número de datos sobre los distintos elementos de la sangre, entre ellos la morfología y el número absoluto y relativo de las distintas líneas celulares. Estos datos están directamente relacionados a las funciones que cumplen dichos elementos; transporte de gases respiratorios en los eritrocitos, funciones de defensa en los leucocitos y hemostasis en las plaquetas. Por lo cual su conocimiento brinda un panorama fisiológico que tanto biólogos como veterinarios utilizan para establecer el estado de salud de los animales.

Por este motivo este tipo de análisis es más frecuente en el hombre y animales domésticos que en el resto de los animales. Sin embargo dado el interés zoológico y en algunos casos económico que presentan muchos animales silvestres, se han comenzado a realizar también en ellos. En cuanto a los reptiles existen trabajos de investigadores extranjeros correspondientes a especies que no se encuentran en el país o bien con datos parciales (Hutchinson *et al.* 1965), Duguay (1978). En el presente trabajo se presentan los resultados que sobre morfología, número de eritrocitos y leucocitos, fórmula leucocitaria, plaquetas y estudio de médula ósea se realizaron en *Liolaemus wiegmanni* (Sauria: Tropiduridae). En relación al panorama hematológico de los reptiles en general ya desde los primeros

trabajos, Babuder (1929) se han señalado la variabilidad en los conteos celulares que acompaña el ciclo vital, la polimorfía en algunas líneas leucocitarias y la aparición en sangre de formas seniles e inmaduras de las distintas progenies celulares.

Los estudios se llevaron a cabo sobre 33 ejemplares de *Liolaemus wiegmanni*, capturados en la zona de Santa Rosa, entre los años 1985 y 1987. Los especímenes fueron capturados a lo largo del año y no fueron mantenidos en cautividad, realizándose las extracciones de sangre el mismo día de la captura.

TOMA DE MUESTRAS: Los animales fueron sacrificados con eter; en los de mayor tamaño la sangre se extrajo por punción cardíaca a tórax abierto. La extracción debe realizarse en las aurículas ya que la punción de los ventrículos por la excitabilidad cardíaca produce el vaciamiento de los mismos. En los ejemplares de menor tamaño se procedió a la sección del cuello cargándose la pipeta cuenta-glóbulos directamente de la sangre que fluye, mezcla de sangre venosa y arterial.

Cantidad a extraer: variable de acuerdo al tamaño, en los de mayor tamaño de 0,5 a 1 cc., en los de menor tamaño solo algunas gotas. Se utilizaron jeringas descartables de 1 cc. y agujas 25/8. Como anticoagulante se usó una solución al 10% de Oxalato de Amonio (6 partes) y Oxalato de Potasio (4 partes). Con esta solución se baña la jeringa a utilizar así como el frasco donde se recogerá la sangre. En este último caso es conveniente secar a estufa el anticoagulante. El conteo de glóbulos rojos se efectuó por los métodos comunes de laboratorio hematológico (Coffin, 1977). Mientras que el conteo de glóbulos blancos debe ser necesariamente indirecto pues al ser todas las células nucleadas no pueden diferenciarse los leucocitos del resto, en la preparación en fresco. situación señalada por Troiano *et al.* (1986) para la tortuga terrestre argentina. Si bien se han propuesto otros métodos indirectos para estos casos (Coffin, 1977), se prefirió el método propuesto por Will (com. per.). Técnica: sobre el frotis coloreado se cuentan mil eritrocitos y el número de leucocitos y trombocitos correspondiente, obtenido este número parcial, se obtendrá el número total de leucocitos utilizando

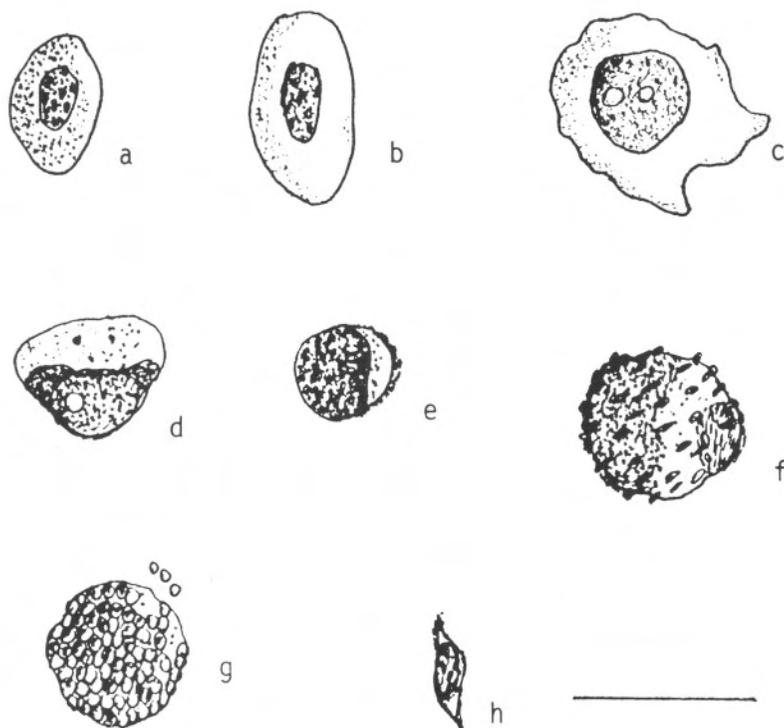


Figura 1. Morfología de células. a. Eritrocitos inmaduro (sangre circulante y médula); b. Eritrocito maduro (sangre circulante); c. Célula tipo "stem cell" (médula); d. Metamielocito heterófilo (médula y sangre circulante); e. Linfocito (sangre circulante); f. Heterófilo con partícula fagocitada (sangre circulante); g. Basófilo (sangre circulante) y h. Trombocito maduro (sangre circulante). La línea corresponde a 15 μ .

el valor del conteo de rojos, por ejemplo si se contaron 9 leucocitos en los 1.000 eritrocitos y el conteo de rojos fué de 900.000, el cálculo es el siguiente: 9×900.000 sobre $1.000 = 8.100$ leucocitos por mm^3 . La fórmula leucocitaria se realiza del mismo modo que en mamíferos. Las observaciones en médula ósea se realizaron en fémur (región epifisaria) y en vértebras caudales. En ambos casos se realizaron improntas del material, previa sección del hueso. Todos los preparados se colorearon con mezcla panóptica (Nazim: 1 p. de Giemsa, 2 p. de May Grünwald, 3 p. alcohol). Las observaciones se llevaron a cabo con objetivo de inmersión (1.000 X) y las medidas se tomaron con ocular micrométrico.

Morfología de células circulantes: Fig. 1, a, b, c, d, e, f, g y h.

ERITROCITOS MADUROS: de forma oval con extremos redondeados. Citoplasma eosinófilo. Núcleo oval orientado en el sentido longitudinal de la célula, con cromatina en masas. Medidas promedio: $12 \times 5 \mu$. Fig. 1, b.

ERITROCITOS JUVENILES: células más pequeñas y redondeadas, citoplasma levemente basófilo. El núcleo es redondeado y la relación núcleo-citoplasma alta. Medidas promedio: $9 \times 44,5 \mu$. Fig. 1, a.

ERITROCITOS SENILES: células grandes de forma redondeada y contornos difusos. El núcleo es poco cromofílico y de aspecto tenue. Medidas pro-

medio: hasta 20 μ . Núcleos libres; pueden ser la vía final de cualquiera de las progenies pero son asimilados a eritrocitos que terminan su ciclo.

LEUCOCITOS AGRANULOCITOS :

LINFOCITOS: de forma redondeada, con escaso citoplasma basófilo que aparece como una media-luna alrededor del núcleo. Este es casi siempre excéntrico y muy cromofílico, su forma es redondeada. La relación núcleo-citoplasma es elevada. Medidas: variables desde 3,8 a 14,9 μ . Fig. 1, e.

MONOCITOS: células de acentuado polimorfismo, en general redondeadas con citoplasma de aspecto espumosos y escasa basofilia. El núcleo es redondeado, poco compacto y más pequeño que el del linfocito. Es frecuente hallar formas macrofágicas de mayor tamaño, citoplasma vacuolar y partículas e incluso núcleos fagocitados en su interior. Medidas promedio: 17 x 14 μ .

LEUCOCITOS GRANULOCITOS: se han identificado granulocitos heterófilos y basófilos. No se han localizado los neutrófilos y eosinófilos que citan algunos autores para otras especies de reptiles (Saint-Girons, 1978; Duguy, 1978). Por lo cual *Liolaemus* se asemeja a los cuadros de heterofilia señalados por Will (1979).

HETERÓFILO: en general células redondeadas, con escaso citoplasma eosinófilo cubierto en mayor o menor medida por granulaciones cilíndricas o redondeadas de hasta 1 micra de longitud, refringentes y coloreadas de naranja oscuro-lacra. El núcleo que a veces está enmascarado por las granulaciones puede presentar forma arriñonada o bilobulada. El heterófilo sufre cambios durante la hibernación, presentando escasas granulaciones de color oscuro, núcleo multilobulado, escaso tamaño celular e incluso desgranulaciones similares a las descritas por Will, R. (1977) Medidas: muy variables de acuerdo al ciclo vital, la media: 14x 10 μ , Fig. 1, f.

BASÓFILO: célula redondeada cuya semejanza con una mora es mencionada por Saint Girons (1978). Las granulaciones son redondeadas, poco refringentes y de color violeta oscuro, el núcleo es poco visible. Medidas promedio: 10,5 μ , Fig. 1, g.

TROMBOCITOS: también mencionados como células fusiformes, spind-cellen, corresponden a las plaquetas de los mamíferos. Son células lábiles que en los frotis aparecen agrupadas y comúnmente deformadas. Tienen escaso cito-

plasma basófilo colocado en los extremos del núcleo, lo que les da un aspecto característico. El núcleo es a veces la única parte visible de la célula y presenta acentuada cromofilia. Medidas promedio: 6,5 x 5,5 μ , Fig. 1, h.

Morfología de las células de médula ósea. Fig. 1, a, c, d y h.

CÉLULA INDIFERENCIADA: Célula grande de forma redondeada y citoplasma basófilo y sin gránulos. El núcleo es de cromatina laxa con nucléolos. Medidas promedio: 20 x 19 μ . Esta células son escasas en todos los preparados y su morfología es semejante a la "stem cell" (Fernandez Surribas, 1980) o a la "célula madre" (Golde, 1992; Sackman Muriel, 1978) Fig. 1, c.

ERITROBLASTO: células de hallazgo muy frecuente, con las características del eritrocito juvenil descripto para sangre circulante. Fig. 1, a.

LINFOBLASTO (Linfocito inmaduro): esta célula se diferencia del linfocito maduro por su mayor tamaño: 15 μ , su mayor cantidad de citoplasma basófilo y su núcleo de menor cromofilia y con cromatina laxa.

MIELOCITO: célula redondeada, citoplasma de escasa basofilia, núcleo grande y sin lobulaciones. Medidas promedio 12,5 μ .

METAMIELOCITO: de menor tamaño que el anterior con aparición de gránulos en el citoplasma. En la mayoría de los casos éstos son de color naranja oscuro que darán origen al heterófilo, en el caso del metamielocito basófilo, muy infrecuente, éstas serán poco refringentes y de color oscuro. En ambos casos, la identificación se hace teniendo en cuenta el carácter de escotado del núcleo. Fig. 1, d.

TROMBOCITOS INMADUROS: de forma oval y mayor tamaño: 7,5 a 8 μ . Presentan más cantidad de citoplasma y núcleo menos compacto.

NÚMERO DE ERITROCITOS. Tabla 1. (Rango, Media, Desviación Standard).

Los meses de conteo más alto fueron durante el verano (1.800.000) en concordancia con la muda y los más bajos luego de la hibernación (510.000). La media fué de 1.050.000 eritrocitos por mm^3 .

NÚMERO DE LEUCOCITOS. Tabla 1. (Rango, Media, Desviación Standard).

Los meses de conteo más alto fueron durante la época de la hibernación (45.000). La media fué de 19.138 leucocitos por mm^3 .

FÓRMULA LEUCOCITARIA. Tabla 2. (Rango , Media)

Para la determinación de variaciones por sexo y edad, se realizó Test de Anova con los siguientes resultados:

Machos y hembras: ($F=0,484$), se asume que no existen diferencias significativas.

Eritrocitos por mm^3	Leucocitos por mm^3
Rango 510.000-1.800.000	6.600-45.000
Media 1.050.000	19.138
Desv. St. 258.311	12.400

Tabla 1. Número de Eritrocitos

Fórmula leucocit. (%)	Rango	Media
Heterófilos	23-90	50
Linfocitos	10-60	36
Monocitos	4-32	7
Basófilos	4-15	7

Tabla 2. Fórmula leucocitaria

Adultos y jóvenes: ($F=0,000$), se asume que no existen diferencias significativas.

En el agrupamiento por estación (Fig. 2) el escaso número de muestras del invierno no permitió realizar análisis de Varianza, sin embargo se grafican las distintas medias obtenidas.

SERIE ROJA. MORFOLOGÍA

No se aprecian diferencias con la descripción que realizan para reptiles, Szarski *et al.* (1966), Hutchinson (1965) y Saint Girons (1978). Las dimensiones son algo menores que las halladas por Peña-Roche (1939) para *Liolaemus pictus* y *Liolaemus nigromaculatus* con eritrocitos de $18,7 \mu$. En *Teius teyou*, Ceballos de Bruno y Giamello (1986) hallan también glóbulos más grandes, 15μ .

Número: comparando con las especies de *Liolaemus* mencionados anteriormente, encontramos que la media también es menor, Peña Roche (*op.cit*) halla valores promedio de 1.650.000 eritrocitos por mm^3 . Con respecto a los datos de Duguy (1978) que menciona conteos en *Lacerta* sp., estos pueden asimilarse. En relación a la variación anual *Liolaemus* presenta un notable aumento durante el verano, hecho constatado por Duguy (*op.cit*) para *Lacerta muralis*. Se presentan descensos durante la hi-

bernación, de manera similar a lo hallado por Ceballos de Bruno y Giamello (1986) para *Teius teyou*.

No se han hallado variaciones respecto a sexo y edad, con lo cual estas especies se asemejan a *Lacerta* sp. que tampoco los presenta y se diferencian de *Anguis* sp. y *Cordylus* sp. que presentan variaciones considerables.

SERIE BLANCA, MORFOLOGÍA

GRANULOCITOS: Por las técnicas comunes de laboratorio no se han podido reconocer más que dos líneas, una el heterófilo que según Will (1978) sería la única línea acidófila que ha persistido en gran parte de los escamosos y la otra el basófilo. En cuanto al heterófilo presenta la morfología y variaciones durante la hibernación descritas por ese autor. Los granulocitos basófilos son fácilmente identificables y de idéntica morfología a la señalada por todos los autores.

AGRANULOCITOS: El linfocito responde a la descripción general y no presenta dificultad para su identificación. En cuanto al monocito es una línea polimórfica que al igual que el heterófilo sufre cambios a lo largo del ciclo anual. Se han hallado desde formas inmaduras hasta la transición hacia el macrófago, en ambos casos no serían consideradas patologías (Will, 1977). Trombocitos: no presentan variaciones apreciables con lo mencionado por otros autores.

NUMERO: la media de 19.138 leucocitos por mm^3 , sería similar a la encontrada por Pienaar (1963, citado por Duguy, 1978) y ligeramente mayor que la que Will (1979) acepta como normal para *Lacerta* sp.: 16.500 leucocitos por mm^3 . Las variaciones estacionales son similares a las descritas por estos autores: marcada leucocitosis invernal realizada a expensas del heterófilo y descenso linfocitario.

HEMATOPOYESIS: al igual que en mamíferos y aves se realiza en médula ósea, con áreas menores en hígado y ganglios (Corrato, 1987). Las pautas de diferenciación de las distintas progenies también son similares a las mencionadas para estas clases. La diferencia estaría dada en la ausencia del megacarioblasto y el pasaje a sangre de formas inmaduras. Así mismo hay persistencia en sangre de formas seniles, que no serían retiradas totalmente por el bazo (hemocitresis) sino que persisten en sangre circulante, hasta ser

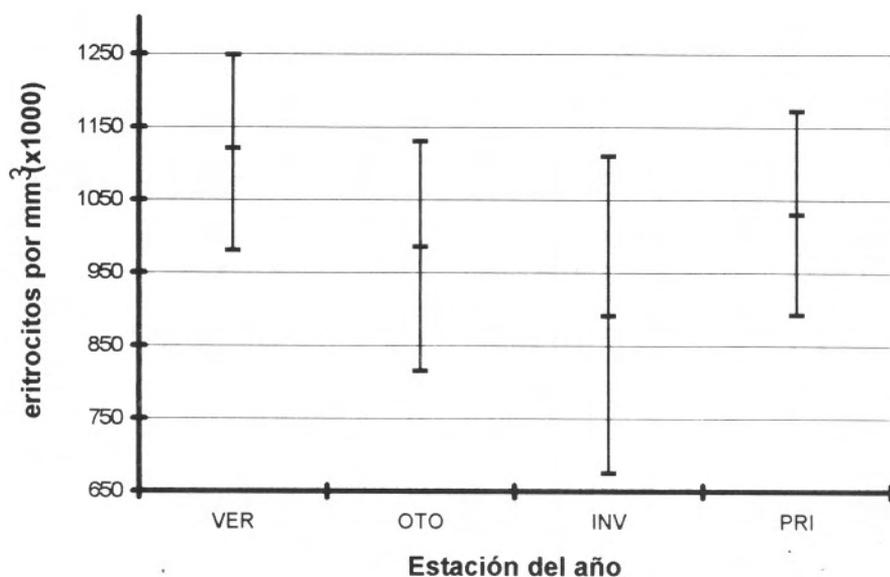


Figura 2. Agrupamiento por estación, de eritrocitos por mm^3 .

destruidas y fagocitadas por heterófilos y macrófagos.

CONCLUSIONES:

1) El número total de eritrocitos sufre variaciones durante el ciclo anual, con aumentos en verano y descensos durante la hibernación. La media es de 1.050.000 glóbulos por mm^3 .

2) El número total y la fórmula leucocitaria sufren variaciones durante el ciclo anual, con aumentos del número total realizado a expensas del heterófilo durante la época invernal y descenso concomitante de los linfocitos. La media es de 19.138 leucocitos por mm^3 .

3) La hematopoyesis se cumple en médula ósea y en sangre circulante. Hay persistencia en ella de formas seniles.

Literatura Citada

BABUDER, B. 1929. Variazioni stagionali della formula ematica di *Lacerta muralis*. *Natura*, 20 (3): 92-102

CEBALLOS DE BRUNO, S. & S. GIAMELLO. 1986. Contribución al estudio eritrocitario en algunos reptiles de La Pampa. *Actas III Jor. Pam. Cien. Nat.* (4): 133-143

COFFIN, D. 1977. Laboratorio clínico en medicina veterinaria. Impresiones Modernas (ed.) La Prensa Médica Mexicana. México 335 pp.

CORRATO, A & B.FERNANDEZ 1987. Organografía microscópica animal. Ed. Alhambra. Argentina 235 pp.

DUGUY, R. 1978. Number of blood cells and their variations, en Carl Gans (ed.). *Biology of the Reptilia*, Academic Press, N.Y. 374 pp.

FERNANDEZ SURRIBAS, J. & L.VON LOWESEWITCH. 1984. Lecciones de Histología veterinaria. Sistema Linfático comparado Ed. Hemisferio Sur. Argentina. 76 pp

GOLDE, W. 1992. La Célula Madre. *Inv. y Cienc.* 185 : 22-29

HUTCHINSON, V.& H. SZARSKI. 1965. Number of erythrocytes in some amphibians and reptiles. *Copeia* (3) : 373-375

PEÑA ROCHE, E. 1939. Contribución al estudio de la morfología comparada de la fauna chilena. *Bol. Soc. Biol. Concepción*. Chile (13) : 133-146

SACKMAN MURIEL, F. 1992. Leucemias. *Medicine*. 1º Serie. (9) : 649-662

- SAINT-GIRONS, M.CH. 1978. Morphology of the circulating blood cells, en Carl Gans (ed.). *Biology of the Reptilia*. Academic Press. N.Y. 374 pp.
- SZARSKI, H. & G. CZOPEK. 1966. Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles. *Bull. Ac. Pol. Sci.* CI II Vol IV (6): 433-437
- TROIANO, J.C. & E. VAUTIER. 1986. Algunas observaciones en sangre de la tortuga terrestre argentina. *Cuad. Herp.* 2 (1):1-10
- WILL, R. 1977. Die polymorphie des heterophilien und des azurophilien granulocyten der Squamata. 83-87. En H. Reichenbach Klinke. *Fisch und Umwelt* 4. (Beitrage zur Histop. der Fische) Stuttgart. N. Y. Fischer
- WILL, R. 1978. La transformación morfológica de las células fagocitantes viejo principio filogenético. Parte I: El monocito. *Not. Med. Vet.* 1978. (2) : 204-211
- WILL, R. 1979. La Transformación morfológica de las células fagocitantes viejo principio filogenético. Parte II : El granulocito heterófilo (demostrado en el ejemplo de los lagartos : Reptiles, Squamata, Lacertidae). *Not. Med. Vet.* 1979 (1) : 49-58.