

**VALORES HEMATOLOGICOS Y DE PROTEÍNA TOTAL EN TORTUGAS TERRESTRES (*Chelonoidis chilensis*) EN CAUTIVERIO EN LAS CIUDADES DE ASUNCION Y SAN LORENZO, PARAGUAY**

*HEMATOLOGIC VALUES IN CAPTIVITY TERRESTRIAL TURTLES (*Chelonoidis chilensis*) IN ASUNCION AND SAN LORENZO CITIES, PARAGUAY*

**Pedrozo Prieto R.<sup>1</sup>, Vetter Hiebert R.<sup>2</sup>, Quintana Ruiz Díaz A.<sup>2</sup>, Fernández Gebhardt R.<sup>2</sup>, Villalba Falcón R.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción - Facultad de Ciencias Veterinarias - Departamento de Patología y Clínica - División Patología Clínica - San Lorenzo - Paraguay

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción - Facultad de Ciencias Veterinarias - Departamento de Recursos Faunísticos y Medio Natural - San Lorenzo - Paraguay

**RESUMEN:** La tortuga terrestre *Chelonoidis chilensis* es una especie propia de la Argentina, el Paraguay y el sur de Bolivia. El objetivo del presente trabajo fue determinar los valores hematológicos de las tortugas *Chelonoidis chilensis* que viven en cautiverio en las ciudades de Asunción y San Lorenzo, Paraguay. Se obtuvieron muestras de sangre: 1mL de sangre con heparina sódica de un total de 40 animales del Jardín Botánico y Zoológico de Asunción y de animales que acudían a consultar en el Hospital Veterinario "Prof. Dr. José Vicente Núñez" de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Nacional de Asunción. Los hemogramas fueron realizados por métodos manuales en el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la misma Universidad. Se determinó promedio y desviación estándar DE de las distintas variables utilizando el paquete estadístico Infostat versión estudiantil. Los resultados encontrados fueron los siguientes. Para la serie roja, promedio y DE, recuento de eritrocitos  $0,31 \times 10^6 \pm 0,14 / \mu\text{L}$ , Hematocrito  $17 \pm 5,47 \%$  y Hemoglobina  $4,4 \pm 1,7 \text{ g/dL}$ . Volumen Corpuscular Medio (VCM)  $581 \pm 157,21 \text{ fL}$ , Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)  $26 \pm 4,97 \text{ g/dL}$ , Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)  $147 \pm 42,52 \text{ pg}$ . En cuanto a la serie blanca, promedio y DE Leucocitos totales  $5.330 \pm 4437 / \mu\text{L}$ . Fórmula leucocitaria: heterófilos  $66 \pm 22,47 \%$ ; linfocitos  $26 \pm 21,01 \%$ ; eosinófilos  $5 \pm 6,92 \%$ ; monocitos  $2 \pm 2,68 \%$ ; y basófilos  $1 \pm 2,87 \%$ . Recuento de trombocitos  $33.000 \pm 15788 / \mu\text{L}$ , y Proteína Total fue de  $3,1 \pm 1,23 \text{ g/dL}$ . Los resultados de esta investigación servirán como herramienta de comparación para la evaluación clínica y del estado general de las tortugas terrestres en nuestro medio.

**Palabras clave:** valores hematológicos, proteína total, *Chelonoidis chilensis*, Paraguay.

**ABSTRACT:** The tortoise *Chelonoidis chilensis* is a specie of Argentina, Paraguay and southern Bolivia. The aim of this study was to determine the hematological values of *Chelonoidis chilensis* turtles living in captivity in the cities of Asuncion and San Lorenzo, Paraguay. Blood samples were obtained: 1 mL of blood with sodium heparin from a total of 40 animals of the Botanical Garden and Zoo of Asuncion and animals that came to consult at the Veterinary Hospital "Prof. Dr. José Vicente Núñez" of the Faculty of Veterinary Sciences, National University of Asuncion. Blood counts were performed by manual methods in Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the same University. Average and standard deviation of the different variables was determined using the statistical package Infostat student version. The results were as follows. For the red series, average and SD, erythrocyte count  $0.31 \times 10^6 \pm 0.14 / \mu\text{L}$ , Hematocrit  $17 \pm 5.47\%$  and Hemoglobin  $4.4 \pm 1.7 \text{ g / dL}$ . MCV Mean Corpuscular Volume  $581 \pm 157.21 \text{ fL}$ , Corpuscular hemoglobin concentration MCHC  $26 \pm 4.97 \text{ g / dL}$ , HCM  $147 \pm 42.52 \text{ pg}$ . As for the white series, average and standard deviation total leukocyte  $5330 \pm 4437 / \mu\text{L}$ . Leukocyte formula: heterophil  $66 \pm 22.47\%$ ; lymphocytes  $26 \pm 21.01\%$ ; eosinophil  $5 \pm 6.92\%$ ; monocytes  $2 \pm 2.68\%$ ; and basophils  $1 \pm 2.87\%$ . Platelet count  $33,000 \pm 15788.26 / \mu\text{L}$ , and Total Protein was  $3.1 \pm 1.23 \text{ g / dL}$ . The results from this investigation will serve as a tool for the comparison and clinical evaluation of the tortoises in our médium and their general health status.

**Keywords:** hematologic values, total protein, *Chelonoidis chilensis*, Paraguay

doi: 10.18004/compend.cienc.vet.2016.06.02.28-35

**Dirección para correspondencia:** Prof. Dra. Raquel Pedrozo Prieto - Laboratorio de Patología y Clínica - Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Asunción - Casilla de Correo N° 1061 - Ruta Mcal. Estigarribia Km 10,5 - Campus Universitario - San Lorenzo - Paraguay.

**E-Mail:** rpedrozo@vet.una.py

**Recibido:** 03 de agosto de 2016 / **Aceptado:** 10 de noviembre de 2016

## INTRODUCCION

*Chelonoidis* es un género de tortugas terrestres endémicas en las Islas Galápagos, América del Sur y en la parte más meridional de América Central. Durante muchas décadas, se colocaron en la especie *Chelonoidis chilensis* (Gray, 1870) todas las tortugas sudamericanas que iban desde el Chaco seco de Bolivia, Paraguay y norte de Argentina hacia el sur hasta la región monte de la Patagonia norteaña (Argentina) (1). Es mayormente encontrada en Argentina, pero también en Bolivia y Paraguay (2).

Hasta ahora, es debatido el número de especies en el complejo *Chelonoidis chilensis*, algunos autores reconociendo tres especies *C. chilensis*, *C. petersi* y *C. donosobarrosi* (3), otros autores dos especies *C. petersi* las del norte y *C. chilensis* las del sur (4) o una sola especie *C. chilensis* (5).

La variabilidad genética observada en el complejo sudamericano *Chelonoidis chilensis* apoya la existencia de una sola especie *C. chilensis* (Gray 1870) (1, 6), con una gran variabilidad fenotípica (6), siendo *C. donosobarrosi* (Freiberg, 1973) y *C. petersi* (Freiberg, 1973) sinónimos de *C. Chilensis*.(1).

Las hembras alcanzan 32 cm de largo y los machos 26 cm. Tanto en el tamaño y coloración general como en el diseño de las placas, la especie muestra una enorme variación fenotípica. Las patas son de color grisáceo oscuro con fuertes escamas córneas. Es una especie fundamentalmente herbívora, pues se alimenta con hojas, pastos, frutas, tubérculos, y cactus. Complementa su dieta con algunos invertebrados, en especial, caracoles(4).

En cuanto a su situación de conservación, las poblaciones de *C. chilensis* están incluidas en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora (CITES) (6). En él se mencionan especies que no necesariamente están amenazadas con la extinción, pero en las que el comercio debe ser controlado para evitar su uso incompatible con la supervivencia (7), y son consideradas vulnerables por las Comisiones de Conservación de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, Lista Roja 2011) (6). Se considera a una especie "vulnerable" cuando no está críticamente en peligro, pero enfrenta un alto riesgo de extinción en el medio salvaje, en un futuro a mediano plazo (8).

Los factores más relevantes que ponen en riesgo la integridad de sus poblaciones son la caza extractiva multipropósito (predominantemente mascotismo) y la reducción, modificación y destrucción del hábitat por la expansión de la frontera agrícola. (6, 2). En Argentina a partir del año 2012 se la asignó a la categoría vulnerable (9) sin que mediara alguna mejora evidente de la situación. (6). En Paraguay, su estado de conservación es de "Preocupación Menor" (10).

A este panorama, debe agregarse el desconocimiento de la biología y ecología de las poblaciones presentes en Argentina. El escaso conocimiento existente hasta el momento se basa mayormente en observaciones realizadas sobre ejemplares en cautividad y a trabajos y observaciones realizados a campo en localidades puntuales de su distribución. Pocos trabajos han sido publicados acerca de la densidad o abundancia relativa de *Chelonoidis chilensis* en Argentina y nada se sabe del Chaco Seco de Paraguay y Bolivia (6).

Los estudios fisiológicos de animales silvestres que se mantienen en cautiverio o que han sido capturados recientemente son muy importantes para obtener detalles sobre la naturaleza de la especie en cuestión, que puede utilizarse como herramienta de diagnóstico. La sangre es uno de los primeros sistemas estudiados. Tiene la capacidad de transportar gases (principalmente oxígeno) y nutrientes, y también para eliminar los residuos metabólicos (11).

Un recuento sanguíneo completo consiste en una evaluación de una variedad de parámetros que permiten obtener información sobre el estado general y la salud del animal y que ayuda en la identificación de patologías, particularmente las relacionadas con la volemia y las infecciones. Cuando se compara con otros vertebrados, hay poca información disponible en la literatura sobre la hematología de los reptiles (12).

El objetivo del trabajo fue determinar los valores hematológicos en tortugas terrestres de la especie *Chelonoidis chilensis*, en cautiverio en las ciudades de Asunción y San Lorenzo, Paraguay.

## MATERIALES Y METODOS

El tipo de estudio fue observacional, descriptivo y de corte transversal. El mismo fue

realizado entre el mes de marzo del año 2015 hasta el mes de junio del año 2016. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de los animales del Jardín Botánico y Zoológico de Asunción, de animales que acudían a consultar al consultorio de animales exóticos y silvestres en el Hospital Veterinario "Prof. Dr. José Vicente Núñez" de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Nacional de Asunción.

La población enfocada fue de 40 tortugas terrestres de la especie *Chelonoidis chilensis*, aparentemente sanas, con un peso igual o mayor a 0,5 Kg.

Antes de la obtención de la muestra, los animales fueron inspeccionados, y se realizó una anamnesis completa sobre el animal, su historial, su alimentación, su hábitat en cautiverio. Se identificó el sexo y peso de cada animal.

En los chelonios la venipunción puede ser hecha preferentemente de las venas yugulares, coccígea o subcarapacial (13). Se realizó la venopunción del seno subcarapacial en todos los animales, (Figura 1) con el fin de uniformizar los resultados.



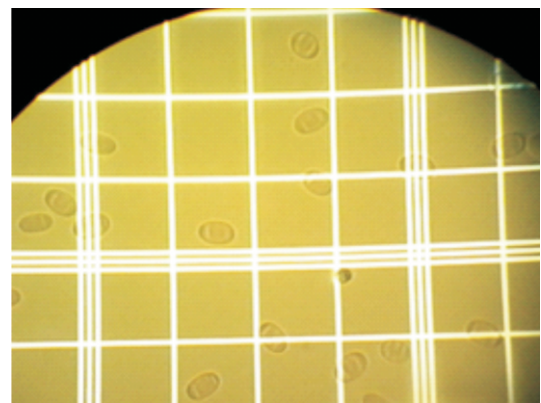
**Figura 1.** Extracción de muestra sanguínea del seno subcarapacial

El volumen de las muestras consistió en 1 mL de sangre, y como anticoagulante se utilizó heparina sódica (0,75mg) colocada previamente en la jeringa. Debido a la rápida coagulación de la sangre reptil, se realizó la homogeneización en la jeringa, posteriormente se depositó la sangre en un tubo estéril. Las muestras fueron refrigeradas a 4°C hasta

su procesamiento en el transcurso de 24 horas como máximo.

El trabajo de laboratorio fue realizado en el Laboratorio de Patología Clínica del Departamento de Patología y Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción. La determinación del hemograma se realizó por métodos manuales debido a las características propias de los reptiles que se diferencian bastante de los mamíferos, como ser la presencia de eritrocitos nucleados. La determinación de hematocrito se realizó por el método micro-hematocrito (14, 15). Para la determinación de concentración de hemoglobina, se empleó el método de ciano-meta-hemoglobina utilizando kit comercial Human (Alemania), las muestras con el reactivo de Drabkin se centrifugaron a 3000 rpm por cinco minutos previo a la lectura fotocolorimétrica (13), realizando la misma en fotómetro de filtro Biosystem BTS 350 (España). Para la determinación de la proteína total se utilizó refractómetro. (14,15).

Para el recuento de células sanguíneas se utilizó la cámara de Neubauer. Se realizó el recuento de eritrocitos y leucocitos utilizando aumento de 400x previa dilución de la sangre 1:100 (5) con suero Ringer con Lactato (Figura 2).

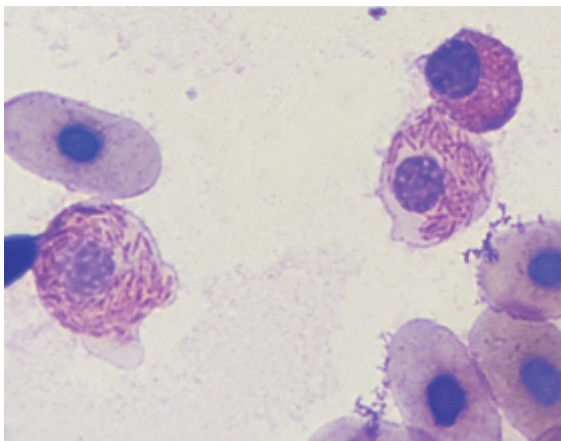


**Figura 2.** Visualización de células sanguíneas en Cámara de Neubauer

Para el recuento de glóbulos rojos se descargó la dilución sobre una cámara de Neubauer modificada en uno de los lados. Se contaron a 40 x las células en 5 cuadraditos centrales (en diagonal o 4 esquinas más el centra). Sólo se contaron los eritrocitos que no tocaron ninguna línea central o tocaron la línea central de los lados inferior e izquierdo de cada cuadradito (16). El número total de eritrocitos contados (la suma de los 5 cuadraditos) se multiplicó por 5000 (13) teniendo el

número total de glóbulos rojos por  $\mu\text{L}$ . Los índices hematimétricos se calcularon con las fórmulas de Wintrobe (8). Para el recuento de glóbulos blancos se contaron todos los 25 cuadraditos ( $1 \text{ mm}^3$ ). Se multiplicó el valor por la constante 1000 (dilución 100 por constante 10 obtenida de las medidas de la cámara) (13). Para realizar la fórmula leucocitaria se realizó frotis sanguíneo con el método de cubreobjetos (16,17). Posteriormente se utilizó la tinción de May Grünwald - Giemsa (16) para la correcta diferenciación de eritrocitos nucleados y leucocitos. Los leucocitos de reptiles fueron clasificados en granulocitos: Heterófilos, Eosinófilos, Basófilos y agranulocitos Linfocitos y Monocitos (13). La estimación del recuento de trombocitos se realizó contando su cantidad en 10 campos, multiplicando el resultado por el factor 1500 (18).

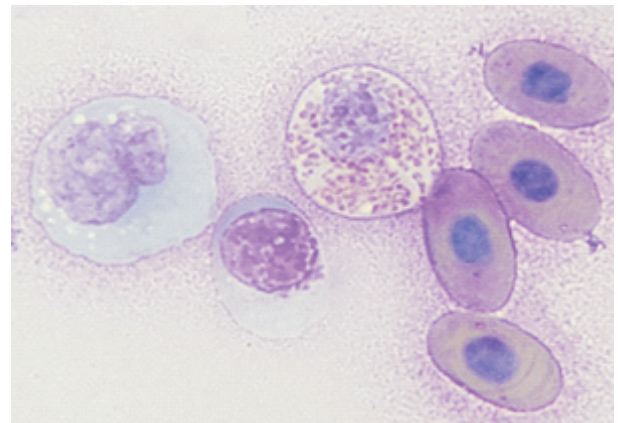
En el frotis sanguíneo los eritrocitos de tortugas tienen una forma elipsoidal con bordes romos, son nucleados, con el núcleo ovalado, posicionado en el centro (19) (Figura 3).



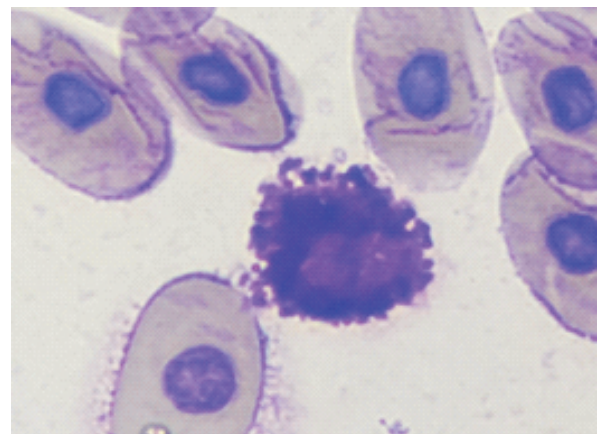
**Figura 3.** Eritrocitos y Heterófilos

Los heterófilos son células redondeadas con gránulos citoplásmicos fusiformes eosinófilos (naranja o rojo); su núcleo es redondo a ovalado, posicionado excéntricamente (19) (Figura 3). Los eosinófilos son células grandes y redondeadas con gránulos citoplásmicos eosinófilos esféricos; el núcleo suele estar en el centro de la célula con forma variable, alargado a lobulado (19) (Figura 4). Los basófilos son pequeños y redondos, contienen gránulos citoplásmicos basófilos que muchas veces oscurecen al núcleo, ligeramente excéntrico (19) (Figura 5). Los linfocitos son células redondas y pequeñas, similares al linfocito de mamíferos y aves; tienen el núcleo redondo o ligeramente endentado, en posición ligeramente excéntrica (19) (Figura 4).

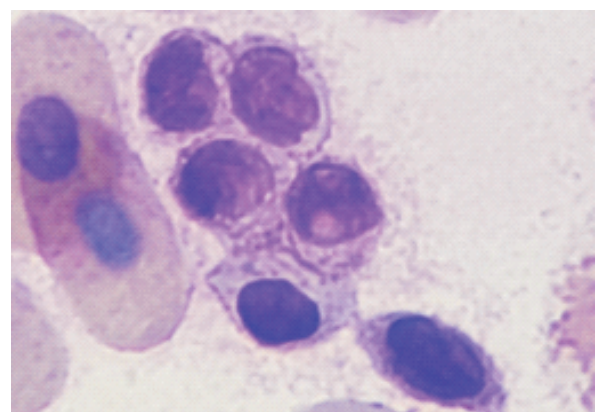
Los monocitos son los leucocitos de mayor tamaño y tienen forma redondeada a ameboidea; su núcleo varía entre redondo a ovalado, y esta lobulado (19) (Figura 4). Los trombocitos son células pequeñas de forma variable, de elíptica a fusiforme; el núcleo, teñido de púrpura, está en posición central, con citoplasma incoloro. Generalmente están agregados (Figura 6) (19).



**Figura 4.** Monocito, Eosinófilo y Linfocito



**Figura 5.** Basófilo rodeado de eritrocitos



**Figura 6.** Trombocitos

Se determinó promedio y desviación estándar (DE) de las distintas variables utilizando el paquete estadístico Infostat versión estudiantil (20).

En este trabajo de investigación fueron

contemplados los Principios Éticos Rectores Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales del CIOMS (Organización Científica Internacional y No Gubernamental, establecida por la UNESCO y la OMS en 1949). Debido a que este trabajo implicó el estudio de muestras biológicas provenientes de tortugas vivas, se justificó la necesidad del empleo de las mismas, constituyendo por lo tanto la fuente biológica de los materiales (sangre). Las muestras a ser estudiadas fueron obtenidas de forma cuidadosa, por profesionales entrenados en la técnica, sin causar daño a los animales, tratándolos como seres sensibles que son, promoviendo en todo momento el bienestar animal y el cuidado del paciente, minimizando el dolor, las molestias y el estrés (21). El sitio de punción utilizado (seno subcarapacial) redujo la manipulación del animal, ya que puede ser accedido con la cabeza del quelonio retraída o extendida. Tiene la ventaja de minimizar el forcejeo con el animal, y el consecuente estrés que esto implica (19).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinaron los valores hematológicos de la serie roja, serie blanca, plaquetas y proteínas total en tortugas terrestres de la especie *Chelonoidis chilensis*. Los resultados encontrados se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Valores hematológicos en Tortugas Terrestres (*Chelonoidis chilensis*) en cautiverio de las Ciudades Asunción y San Lorenzo, Paraguay.

VARIABLES	Media	D.E.	Mín.	Máx.
Eritrocitos (10 <sup>6</sup> /μL)	0,31	0,14	0,14	0,8
Hematocrito (%)	17	5,47	6	28
Hemoglobina (g/dL)	4,4	1,7	1,5	8,5
VCM (fL.)	581	157,21	288	975
CHCM (g/dL)	26	4,97	14	38
HCM (pg.)	147	42,52	79	274
Leucocitos totales (/μL)	5.330	4.437	1000	21000
Heterófilos (%)	66	22,47	20	98
Linfocitos (%)	26	21,01	2	80
Eosinófilos (%)	5	6,92	0	28
Monocitos (%)	2	2,68	0	12
Basófilos (%)	1	2,87	0	14
Plaquetas (/μL)	33.000	15788,26	12000	159800
Proteína total (g/dL)	3,1	1,23	0,8	6,2

Al analizar los valores de la serie roja, el recuento de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina se reportaron valores más bajos en el presente estudio que el publicado por Troiano et al (1998) (22). Se deben considerar diferencias climáticas, como un invierno más frío y prolongado en la Argentina, y un clima bastante más cálido en el Paraguay. Esto podría explicar las diferencias en la

serie roja. Los resultados de Troiano 1998 (22) indican que la época del año es el factor que causa variaciones en los componentes sanguíneos. Durante el invierno se observa un aumento de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina ( $p < 0.01$ ) (22).

Los resultados anteriores afectan directamente a los valores del Volumen Corpuscular Medio (VCM) que fue más alto en el presente estudio debido a que el recuento de eritrocitos fue más bajo al relacionarlo con el hematocrito y la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) más baja en esta investigación debido a que la hemoglobina fue considerablemente más baja (23).

También debe tenerse en consideración las diferencias en la alimentación. Esto último puede variar teniendo en cuenta que la diferencia en el clima y el hábitat traen consigo una diferencia en los alimentos disponibles. Por un lado, en vida libre el animal escoge el alimento de acuerdo a sus preferencias o necesidades. Por otro lado, en cautiverio el animal depende de lo que ofrezca el propietario o lo que está a disposición. Estas diferencias pueden tener un efecto sobre los valores fisiológicos, pero esto debe ser estudiado más profundamente.

En cuanto a la serie blanca, los valores encontrados en este estudio para leucocitos totales ( $5330 \pm 4437$ ) son menores y tienen mayor variabilidad que los hallados por Troiano et al ( $11200/\mu\text{L} \pm 2500$ ) (22). Cabe destacar que se reportó un porcentaje mucho mayor de heterófilos ( $66 \pm 22,5$ ) y menor de eosinófilos ( $5 \pm 6,9$ ) que en el mencionado estudio ( $29 \pm 2,3$  y  $32 \pm 5$  respectivamente) (22). Sin embargo en el estudio de Cabrera et al (24) que estudiaron los valores hematológicos de la tortuga terrestre *Chelonoidis denticulata*, originaria del norte de Sudamérica, reportan valores de leucocitos totales ( $7820/\mu\text{L} \pm 3660$ ) y porcentaje de heterófilos ( $55,6 \pm 20,1$ ) y eosinófilos ( $15,8 \pm 8,9$ ) (24) intermedios entre la presente investigación y el publicado por Troiano et al (22).

Las variaciones en cuanto a los recuentos de leucocitos totales pueden deberse a diferencias en los diluyentes, suero Ringer con lactato en nuestro trabajo, en vez de solución de Natt y Herrick descrita en los otros trabajos. También pueden influir en los valores hematológicos, diferentes sitios de punción

para la toma de la muestra, así como a diferencias en edad, actividad muscular, alojamiento y factores de estrés (25). Los valores del leucograma pueden variar sin tener gran significancia si no son analizados periódicamente en cada animal (19).

En cuanto al recuento de plaquetas o trombocitos, se encontró una cantidad mucho mayor en el presente trabajo debido a la utilización de diferentes métodos de determinación. El estudio de Troiano (22) utilizó el recuento en cámara de Neubauer.

Los resultados obtenidos de proteína total ( $3,1 \pm 1,2$ ) son similares a los reportados en otros estudios. Keller et al. (2012) determinó los valores de proteína total en tortugas de la especie *Emys marmorata* en vida libre ( $3,76 \text{ g/dL} \pm 0,69$ ) y en cautiverio ( $5,43 \text{ g/dL} \pm 1,14$ ), explicando que los animales en cautiverio pasaron una noche de ayuno y la deshidratación aumentó sus niveles de proteína total (26). Los resultados también son parecidos a los presentados por otros estudios en tortugas de agua dulce (27, 28).

Cabe destacar que en 5 animales fueron encontrados hemoparásitos intracelulares identificados como *Haemogregarina* o *Hepatozoon*.

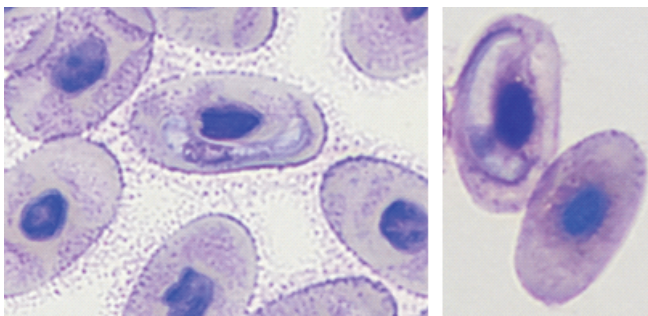


Figura 7. *Haemogregarina* dentro de eritrocitos

Los parásitos aparentemente no son patogénicos en quelonios, quienes adquieren los mencionados parásitos a través de garrapatas y mosquitos (13). Se recomienda un estudio más profundo en trabajos sucesivos.

Es muy importante entender que las respuestas celulares en la sangre del reptil son menos predecibles que los de mamíferos endotérmicos y aves, cuyos microambientes celulares son más estables. Cuando se evalúa la respuesta hematológica en reptiles, factores externos como condiciones

ambientales que pueden aumentar o inhibir la respuesta del animal a la enfermedad no deben ser ignorados. Además, varios factores de manejo de muestras, como el sitio de toma, tipo de anticoagulante, método de conteo celular, y tipo de tinción utilizada suman a la variabilidad de los valores en hemogramas de reptiles. Estos factores complican el establecer de valores de referencia en reptiles. Por eso, los valores leucocitarios deben diferir enormemente (del doble, ya sea mayor o menor) de los valores de referencia para ser considerados significativos (19).

## CONCLUSIÓN

Los valores de recuento de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina fueron menores a los reportados por la literatura debido a diferencias climáticas y posiblemente de alimentación. El VCM fue mayor y el CHCM fue menor que lo reportado en la literatura.

El recuento de leucocitos fue menor a lo reportado por la literatura debido posiblemente a diferencias en edad, alojamiento y factores de estrés. Los valores porcentuales de heterófilos fueron mayores y los de eosinófilos fueron menores a los reportados por la literatura.

Los valores promedio de trombocitos fueron mucho mayores que los reportados por la literatura debido a la utilización de diferentes técnicas. Los valores de proteína total fueron similares a la literatura.

La hematología es muy valiosa como herramienta para evaluar la respuesta del paciente a una enfermedad o terapia. Los resultados de investigación proveen las bases para un mejor entendimiento de la fisiología de los quelonios en nuestro medio, además de servir de herramienta de comparación para la evaluación clínica y del estado general de las tortugas que presenten alguna afección.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fritz U, Alcalde L, Vargas-Ramírez M, Goode E, Fabius-Turoblin D, Praschagj P. Northern genetic richness and southern purity, but just one species in the *Chelonoidis chilensis* complex. *Zoologica scripta*. Norw. Acad. of Scie. and Lett. 2012; 41 (3): 220–232.

2. Ruete A., Leynaud G. Identification of limiting climatic and geographical variables for the distribution of the tortoise *Chelonoidis chilensis* (Testudinidae): a baseline for conservation actions. PeerJ 2015; 3:e1298; DOI 10.7717/peerj.12982015.
3. Cei, J. M. Reptiles del centro, centro-oeste y sur de la Argentina. Herpetofauna de las zonas áridas y semiáridas. Torino: Museo Regionale di Scienze naturali, Monografie; 1986.
4. Cabrera M.R. 1998. Las tortugas continentales de Sudamérica austral. Córdoba: edición privada del autor; 1998.
5. Fritz, U. & Havas, P. Checklist of chelonians of the world. Vertebrate Zoology. 2007; 57: 149–368.
6. Sánchez Julieta. Variabilidad genética, distribución y estado de conservación de las poblaciones de Tortugas terrestres *Chelonoidis chilensis* (Testudines: Testudinidae) que habitan en la República Argentina. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, 2012.
7. Brun I, Kohn Patiño C E. Anfibios y Reptiles del Paraguay. Paraguay: Natura Vita; 2005.
8. TORTOISE & FRESHWATER TURTLE SPECIALIST GROUP. *Chelonoidis chilensis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Cambridge, Reino Unido; 1996 (Consultado mayo del 2016). Disponible en <[www.iucnredlist.org/details/9007/0](http://www.iucnredlist.org/details/9007/0)>.
9. Prado W. S., Waller T., Piña C. A., Albareda D. A., Cabrera M. R., Etchepare E., Giraudo A., González Carman V., Prosdocimi L. & Richard E. Categorización del estado de conservación de las tortugas de la República Argentina. Cuad. herpetol. 2012; 26 (1): 375-387.
10. Motte M., Pier Cacciali K. N., Norman Scott F. B. & Aquino A. L. Categorización del estado de conservación de los anfibios y reptiles de Paraguay. Cuad. de herpetol. 2009; 23 (1): 5-18.
11. Zago C, Ferrarezi A, Vizotto L. Oliveira C, Cabral S, Taboga S, Bonilla-Rodríguez G, Venancio L, Bonini-Domingos C. Hemoglobin polymorphism and hematological profile of Geoffroy's side-necked turtle (*Phrynops geoffroanus*, Testudines) in the northwestern region of São Paulo State, Brazil. Genetics and Molecular Research. 2010; 9 (2): 721-726.
12. Garcia-Navarro CEK and Pachaly JR. Manual de Hematología Veterinaria. São Paulo: Livraria Varela Ltda. 1994.
13. Cubas Z S, Ramos Silva J C, Catao-Diaz J L. Tratado de animais salvagens. 2a ed. Sao Paulo: Roca; 2014.
14. Wittwer M F. Manual de patología clínica veterinaria. Valdivia: América; 2012.
15. Kraft W, Durr U M. Diagnóstico de laboratorio clínico en veterinaria. Madrid: Editores médicos; 2000.
16. Juste de Santa-Ana M C, Carretón Gómez, E. Fundamentos de Análisis Clínicos en animales de compañía. Barcelona: Multimédica; 2015.
17. Benjamin M M. Manual de Patología Clínica en veterinaria. Mexico: Limusa; 1991.
18. Arauz, M S. Metodología, práctica e interpretación de análisis clínicos veterinarios. La Plata; 2008.
19. Mader D. Reptile Medicine and Surgery. Saint Louis: Elsevier; 2006
20. Software estadístico InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; 2014. (Mayo de 2016) Disponible en : [http://www.fca.proed.unc.edu.ar/file.php/68/Tutorial\\_soft.pdf](http://www.fca.proed.unc.edu.ar/file.php/68/Tutorial_soft.pdf)
21. Gimpel J. Principios rectores internacionales para investigación biomédica con animales. CIOMS – ICLAS. 2012. (Consultado mayo del 2016) Disponible en [www.cioms.ch/.../326-cioms-and-iclas-release-the-new-international](http://www.cioms.ch/.../326-cioms-and-iclas-release-the-new-international)
22. Troiano J C, Silva M C. Valores hematológicos de referencia en tortuga terrestre Argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*). Analecta Veterinaria. (Argentina). 1998; 18 (1): 47 – 51.
23. Meyer D J, Harvey J W. Medicina laboratorial veterinaria: interpretación y diagnosis. Barcelona:

Multimédica; 2007.

24. Cabrera M, Li O, Gálvez H, Sánchez N, Rojas G. Valores hematológicos de la tortuga motelo (*Geochelone denticulata*) mantenida en cautiverio. *Rev Inv Vet Perú*. 2011; 22 (2): 144-150.

25. Rebar A P, Mac W, Metzeger F. Manual de hematología de perros y gatos. Barcelona: Multimédica; 2002.

26. Keller K A, Sanchez-Migallon D, Paul-Murphy J, Byrne B A, Owens S D, Kass P H, Weber S. Haematologic and Plasma Biochemical Values of Free-Ranging Western Pond Turtles (*Emys marmorata*) with Comparison to a Captive Population. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 2012; 22 (3-4): 99-106.

27. Perpiñán D, Hernandez-Divers SM, Latimer KS, Akre T, Hagen C, Bulmann KA, Hernandez-Divers SJ. Hematology of the Pascagoula map turtle (*Graptemys gibbonsi*) and the southeast Asian box turtle (*Cuora amboinensis*). *J Zoo Wildl Med*. 2008; 39(3): 460-463.

28. Chung C, Cheng C, Ghin S, Lee A, Chi C. Morphologic and cytochemical characteristics of Asian yellow pond turtle (*Ocadia sinensis*) blood cells and their hematologic and plasma biochemical reference values. *J Zoo Wildl Med*. 2009; 40(1): 76-85.