

Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

**Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica
sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga
roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio.**

Modalidad: Proyecto de graduación

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Alexandra Corrales Quirós
Valeria Valenciano González

Campus Benjamín Núñez, Heredia

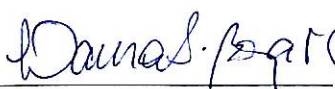
2019

TRIBUNAL EXAMINADOR

Rafael Vindas Bolaños, Lic.
Decano Facultad de Ciencias de la Salud



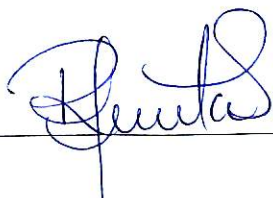
Laura Bouza Mora, M.Sc.
Subdirectora Escuela de Medicina Veterinaria



Randall Arguedas Porras, M.Sc.
Tutor



Rose Mary Huertas Segura, Lic.
Co-tutor



José Solano Rodríguez, Lic.
Lector



Fecha: 28/05/2019

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser nuestro pilar, acompañarnos durante este proceso y permitirnos llegar a este momento.

A nuestras familias, que han puesto todo su empeño para que nos superemos día con día, que siempre velan por nuestro bienestar y nos han dado su apoyo, compañía y paciencia durante tantos años de estudio.

Al Laboratorio de Análisis Clínicos por el apoyo brindado, especialmente a la Dra. Rose Marie Huertas y Andrés Villalobos por tenernos paciencia, guiarnos en cada proceso e impulsarnos para trabajar de manera eficiente. A la Dra. Laura Bouza por abrirnos las puertas del laboratorio y apoyar el proyecto.

Al Dr. Randall Arguedas por creer en nuestra idea, guiarnos y transmitirnos todo su conocimiento en esta especie tan interesante. Al Dr. José Solano por sus aportes a nuestra investigación.

A los centros de rescate que nos abrieron sus puertas para llevar a cabo esta investigación y por su amabilidad. A los funcionarios del SINAC por ayudarnos con todos los permisos necesarios para que este trabajo se llevara a cabo. Y a quienes les interesa la conservación y el bienestar de las especies silvestres.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	ii
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación.....	5
1.3. Objetivos:.....	7
1.3.1. Objetivo General.....	7
1.3.2. Objetivos Específicos	7
2. METODOLOGÍA: MÉTODOS Y MATERIALES	8
2.1. Área de estudio	8
2.2. Tipo de estudio	9
2.3. Población a estudiar.....	9
2.4. Recolección de muestras y almacenamiento	10
2.5. Procesamiento de muestras.....	12
2.5.1. Hematocrito	12

2.5.2. Concentración de hemoglobina	12
2.5.3. Conteo de leucocitos.....	13
2.5.4. Diferencial leucocitario	13
2.5.5. Morfología de las células sanguíneas	14
2.5.6. Análisis bioquímico.....	14
3. RESULTADOS	15
3.1. Análisis hematológico	15
3.2. Morfología celular	16
3.3. Análisis bioquímico.....	19
4. DISCUSIÓN.....	20
4.1 Análisis hematológico	20
4.2 Análisis bioquímico.....	24
4.3 Análisis morfológico de las células sanguíneas.....	29
5. CONCLUSIONES.....	32
6. RECOMENDACIONES	33
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
8. ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de <i>R. pulcherrima</i>	3
Cuadro 2. Valores hematológicos obtenidos de la especie <i>R. pulcherrima</i> (n=31).....	15
Cuadro 3. Mediciones obtenidas para cada tipo celular de todos los individuos de <i>R. pulcherrima</i> evaluados.	16
Cuadro 4. Valores bioquímicos obtenidos de la especie <i>R. pulcherrima</i> (n=31).	19
Cuadro 5. Valores hematológicos en diferentes especies de tortugas.	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización de los puntos de muestreo en centros de cautiverio	8
Figura 2. Ejemplos de la morfología celular de la tortuga roja (<i>R. pulcherrima</i>).	18

LISTA DE ABREVIATURAS

ALB: Albúmina
AST: Aspartato aminotransferasa
BUN: Nitrógeno ureico
Ca: Calcio
CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media
Cl⁻: Cloruro
CK: Creatinin fosfokinasa
DE: Desviación estándar
EDTA: Sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético
F: Fósforo
Glu: Glucosa
g/dl: Gramo por decilitro
Hb: Hemoglobina
Hto: Hematocrito
IU/L: Unidades internacionales por litro
K: Potasio
Máx: Máximo
mg/dl: Miligramo por decilitro
Min: Mínimo
MINAE: Ministerio Nacional del Ambiente y Energía
ml: Mililitros
mmol/L: Minimoles por litro
n: Número de muestras
Na: Sodio
PT: Proteínas totales
rpm: Revoluciones por minuto
SINAC: Sistema Nacional de Áreas de Conservación
UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
μl: Microlitros
μm: Micrómetro
μm²: Micrómetros cuadrados
%: Porcentaje
X̄: Promedio

RESUMEN

Los análisis clínicos son parte de la patología clínica que incluye la aplicación de los análisis laboratoriales a la medicina por lo que constituyen una herramienta competitiva que, junto con el examen clínico y la anamnesis, conforman la trilogía para la solución de problemas clínicos.

La importancia de realizar investigaciones en las tortugas continentales radica en promover una mejora de su salud y conservación debido a los pocos datos que se encuentran actualmente.

El tipo de estudio que se realizó fue un estudio transversal de tipo descriptivo, se trabajó con una población de 32 tortugas de la especie *Rhinoclemmys pulcherrima* de dos centros de cautiverio (centro de rescate y herpetológico). Técnicas de laboratorio estándar fueron utilizadas para conteo de leucocitos, determinación de hematocrito y hemoglobina; en el frotis sanguíneo se realizó el conteo diferencial de leucocitos y la descripción de la morfología de las células encontradas. Para las pruebas bioquímicas (proteínas totales, albúmina, globulina, glucosa, colesterol, ácido úrico, nitrógeno ureico, calcio, fósforo, AST, CK, cloruro, sodio y potasio) se empleó un equipo marca Spinreact modelo Spin 200E.

Los valores obtenidos de esta investigación son aplicables en la medicina clínica y de la conservación de las tortugas, siendo los primeros datos de hematología, bioquímica sérica y morfología celular de la tortuga roja en condiciones de cautiverio que constituyen una guía referencial preliminar; sin embargo, los factores extrínsecos e intrínsecos se deben tomar en consideración al evaluar el estado de salud de las tortugas.

Palabras clave: tortuga, hematología, bioquímica, morfología

ABSTRACT

Clinical analyzes are part of the clinical pathology that includes the application of laboratory analyzes to medicine, they constitute a competitive tool that together with the clinical examination and the anamnesis, make up the trilogy for the solution of clinical problems.

The importance of conducting research on these species lies in promoting an improvement in their health and conservation due to the limited data that is currently available.

The type of study that was carried out was a descriptive cross-sectional study, there was a population of 32 turtles of the species *Rhinoclemmys pulcherrima* from two captivity centers (rescue and herpetological center). Standard laboratory techniques were used for leukocyte count, hematocrit and hemoglobin determination; in the blood smear, the differential leukocyte count and the description of the morphology of the cells found were performed. For the biochemical tests (total proteins, albumin, globulin, glucose, cholesterol, uric acid, urea nitrogen, calcium, phosphorus, AST, CK, chloride, sodium and potassium) a Spinreact equipment model Spin 200E was used.

The ranges obtained are applicable in clinical medicine and the conservation of turtles, being the first data of hematology, serum biochemistry and cellular morphology of the painted wood turtle in captivity conditions that constitute a preliminary reference guide; however, extrinsic and intrinsic factors must be taken into consideration when assessing the health status of turtles.

Key words: turtle, hematology, biochemistry, morphology

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La herpetofauna es definida como los reptiles y anfibios de una región, hábitat o periodo geológico particular, representando para Costa Rica un grupo de gran importancia biológica, con un aproximado de 225 especies de reptiles (Castillo-Centeno y Laurent 2015).

Se han descrito 275 especies de quelonios (tortugas) a nivel mundial, variando ampliamente en cuanto a su anatomía, fisiología, comportamiento y requerimientos ambientales. Debido a lo anterior, se dificulta el abordaje clínico de dos especies bajo los mismos parámetros dada la ausencia de información fisiológica y ecológica de cada especie. Por ejemplo, los valores hematológicos y de bioquímica sanguínea han sido publicados para menos del 5 % de las especies y el hecho de que muchas especies están amenazadas o en peligro de extinción solo complica la recolección de estos datos (McArthur et al. 2004).

En Costa Rica se describen un total de 13 especies de tortugas, cinco de ellas marinas y el resto dulceacuícolas o terrestres, también conocidas como tortugas continentales (Savage 2002; Merchan-Fornelino 2003). Las especies marinas son la tortuga boba o cabezona (*Caretta caretta*), la tortuga verde (*Chelonia mydas*), la tortuga laúd o baula (*Dermochelys coriacea*), la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*) y la tortuga olivácea o lora (*Lepidochelys olivacea*) (Merchan-Fornelino 2003).

Por su parte, las continentales son la tortuga resbaladora (*Trachemys scripta*), la tortuga mordedora o lagarto (*Chelydra acutirostris*), las tortugas candado (*Kinosternon scorpioides*, *K. leucostomum* y *K. angustipons*) y las especies del género *Rhinoclemmys* spp.: la tortuga café o anulada (*R. annulata*), la tortuga negra (*R. funerea*) y la tortuga roja, dragón o del bosque (*R. pulcherrima*) (Merchan-Fornelino 2003).

La gran variedad de quelonios presentes en el país ha generado que muchas personas trasladen a sus hogares algunos especímenes de los ecosistemas cuando realizan visitas al campo (Castillo-Centeno y Laurent 2015). Esto se puede observar en la gran cantidad de tortugas continentales existentes en muchos de los hogares, a pesar de no ser permitida la tenencia de quelonios silvestres (Reglamento de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre (N 32633-MINAE)), ya que se les varían sus condiciones naturales y se les convierte en animales vulnerables a enfermedades con una alta carga de estrés (MINAE 2005; Castillo-Centeno y Laurent 2015).

Las tortugas son animales poiquiloterms, requieren de baños de sol para su termorregulación, logrando incrementar su temperatura corporal para obtener una mayor eficiencia de algunos procesos metabólicos (McArthur et al. 2004). Por lo anterior se deduce que son altamente dependientes de las condiciones ambientales y de manejo, esto permite comprender la relación de estos seres vivos con su ambiente. Los hallazgos comportamentales, físicos y clínico-patológicos pueden ser completamente variables a diferentes temperaturas o cuando hay cambios de dieta (Castillo-Centeno 2014).

Los quelonios tienen un papel relevante en diversos contextos ecológicos, esto debido a sus hábitos y sus relaciones con la agricultura, salud humana y ecoturismo. Su comportamiento los caracteriza como seres importantes en los ecosistemas, ya que hacen ingesta de semillas y actúan como organismos dispersores de las mismas (Castillo-Centeno 2014). También controlan las poblaciones de muchas especies vegetales y de invertebrados no deseados en áreas urbanas, ya que se alimentan de insectos del género *Blattaria* (cucarachas) y otros organismos patógenos para el ser humano (Acuña-Mesén 1998; Castillo-Centeno 2014).

Especies como la tortuga roja contribuye a eliminar algunos vectores de enfermedades, por ejemplo, los mosquitos del género *Anopheles*, cucarachas, hormigas y chinches, que pueden constituir una amenaza para la salud de los humanos, por lo tanto, los quelonios son animales valiosos para la salud pública (Acuña-Mesén 1998; Castillo-Centeno 2014).

Las tortugas del género *Rhinoclemmys* se consideran centroamericanas, a pesar de que se distribuyen desde el sur de México hasta el oeste de Brasil, debido a que la comunidad presente en el norte de la vertiente pacífica de Colombia, Ecuador y Perú presenta muchas más características en común con la fauna de América Central que con la del resto de América del Sur (Merchan-Fornelino 2003).

Según Acuña-Mesén (1998) y Uetz y colaboradores (2016), la clasificación taxonómica de las tortugas *R. pulcherrima* se describe en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Taxonomía de *R. pulcherrima*

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Clase:	Reptilia
Subclase:	Lepidosauria
Orden:	Testudines
Suborden:	Cryptodira
Familia:	Geomydidae
Género:	<i>Rhinoclemmys</i>

La tortuga roja presenta una concha (caparazón y plastrón) con forma de cúpula, el caparazón se caracteriza por presentar líneas de color rojo y negro, curvas y concéntricas, sobre fondo amarillo. La cabeza es café claro y presenta varias líneas rojas continuas y curvadas (Acuña-Mesén 1998).

La especie *R. pulcherrima* es una tortuga terrestre, aunque depende de los hábitats acuáticos, se encuentra a una altura máxima de 1400 metros sobre el nivel del mar. Se encuentra en el agua con facilidad, especialmente en la época seca, principalmente en recursos acuáticos de pequeño tamaño, aguas tranquilas y abundante vegetación ribereña (Acuña-Mesén 1998; Savage 2002; Merchan-Fornelino 2003). Esta especie es diurna, pero su actividad se puede restringir a horas tempranas de la mañana o la noche durante días calientes o en la estación seca (Acuña-Mesén 1998; Savage 2002).

Las tortugas *R. pulcherrima* se alimentan de numerosas especies vegetales, pero también hacen ingesta de proteína animal (Savage 2002). Su alimento lo ingieren casi siempre fuera del agua, aunque pueden alimentarse dentro de ella. Se nutren de diversas clases de alimentos por lo que se consideran animales omnívoros al consumir más de 20 especies de babosas (*Limax maximus*), larvas de diferentes insectos, abejones, lombrices de tierra, algunos vertebrados, flores, tallos, frutos, hojas y semillas (Acuña-Mesén 1998; Castillo-Centeno 2014).

Las enfermedades en general tienen un papel importante en el estado de salud de las tortugas, debido a que repercuten en su estado físico, capacidad de diseminación y riesgos de mortalidades masivas. Es poco lo que se conoce sobre la capacidad inmunitaria y el desarrollo de glóbulos blancos en estas especies. El sistema inmune de las tortugas está sujeto a variaciones dependientes de la temperatura, el estrés, la humedad ambiental y la alimentación. Estos factores afectan de modo más directo a los reptiles que a los mamíferos (Fournier-Gutiérrez 2015).

Las características de la sangre de los quelonios reflejan no solo condiciones fisiológicas, sino también ecológicas distintivas y particulares para cada especie, esto permite visualizar cualquier alteración de las actividades metabólicas del organismo. Su análisis es una herramienta esencial que combinada con la anamnesis y la exploración física proveen un diagnóstico del estado de salud del animal (McArthur et al. 2004). Para lograr este diagnóstico es imprescindible contar con parámetros sanguíneos previamente establecidos y estandarizados. Es importante tener en cuenta que la respuesta biológica y los parámetros sanguíneos varían entre regiones geográficas. Por lo tanto, también debería hacerse énfasis en la patología clínica y la imagenología diagnóstica en estos pacientes (Santillana 2012).

1.2. Justificación

La protección de especies animales, en especial aquellas que podrían estar en peligro de extinción, requiere de investigaciones que permitan conocer adecuadamente su fisiología normal, así como enfermedades y comportamiento (Roskov et al. 2017). Según lo describen las listas rojas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2017; Roskov et al. 2017) algunas de las especies de tortugas del género *Rhinoclemmys* se encuentran cercanas a ser amenazadas, por lo tanto, es relevante realizar estudios en estas especies para promover una mejora de su salud y conservación. Además, la información obtenida, favorecerá la reducción de las consecuencias inherentes al cautiverio de las tortugas continentales (Castillo-Centeno y Laurent 2015).

Los análisis clínicos constituyen una herramienta competitiva que, junto con el examen clínico y la anamnesis, conforman la trilogía para la solución de problemas clínicos. La finalidad de su aplicación radica en proveer una herramienta de diagnóstico, descartar una enfermedad,

identificar una disfunción de un órgano específico, monitorear la respuesta a un tratamiento, establecer medidas profilácticas, controlar la transferencia y diseminación de enfermedades, realizar estudios comparativos de especies y detectar especies vulnerables. El valor de la aplicabilidad de los análisis es incuestionable y llegan a ser una herramienta indispensable en la labor diaria del médico veterinario (Meneses-Guevara y Bouza-Mora 2014).

Contrario a lo que ocurre con las especies domésticas, los parámetros hematológicos de tortugas continentales se encuentran poco documentados (McArthur et al. 2004). Se han realizado investigaciones que arrojan parámetros sanguíneos de referencia para las especies marinas de Costa Rica (Redondo 2008; Howell-Ramírez 2017), pero la información es escasa en lo que respecta a las tortugas continentales del país, siendo nula para la especie nativa *R. pulcherrima*, ya que lo que se conoce de esta especie se relaciona con su ecología y manejo únicamente, evidenciándose así la necesidad de conocer estos parámetros hematológicos, bioquímicos y morfológicos previamente establecidos, que sirvan como fuente de consulta para personas relacionadas con la fauna silvestre (médicos veterinarios, biólogos, docentes y estudiantes).

El presente proyecto es relevante por ser pionero a nivel nacional, fungiendo como referente clínico para la evaluación del estado de salud de esta especie mediante la hematología y bioquímica sanguínea, favoreciendo así su conservación.

1.3. Objetivos:

1.3.1. Objetivo General

Determinar los parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de tortugas *R. pulcherrima* adultas y clínicamente sanas en condiciones de cautiverio en dos centros de rescate.

1.3.2. Objetivos Específicos

1.3.2.1. Generar los valores hematológicos y bioquímicos para la especie *R. pulcherrima* en cautiverio.

1.3.2.2. Establecer la morfología celular sanguínea normal de *R. pulcherrima* y representarla en un atlas de imágenes.

1.3.2.3. Elaborar una referencia rápida de fácil interpretación acerca de parámetros sanguíneos y morfología celular para centros de rescate o de cautiverio de la tortuga roja.

2. METODOLOGÍA: MÉTODOS Y MATERIALES

2.1. Área de estudio

Se incluyeron individuos de dos centros de cautiverio del Área de Conservación Central, el Refugio Herpetológico de Costa Rica (Santa Ana, San José) y Tortufauna (La Garita de Alajuela) (Figura 1).

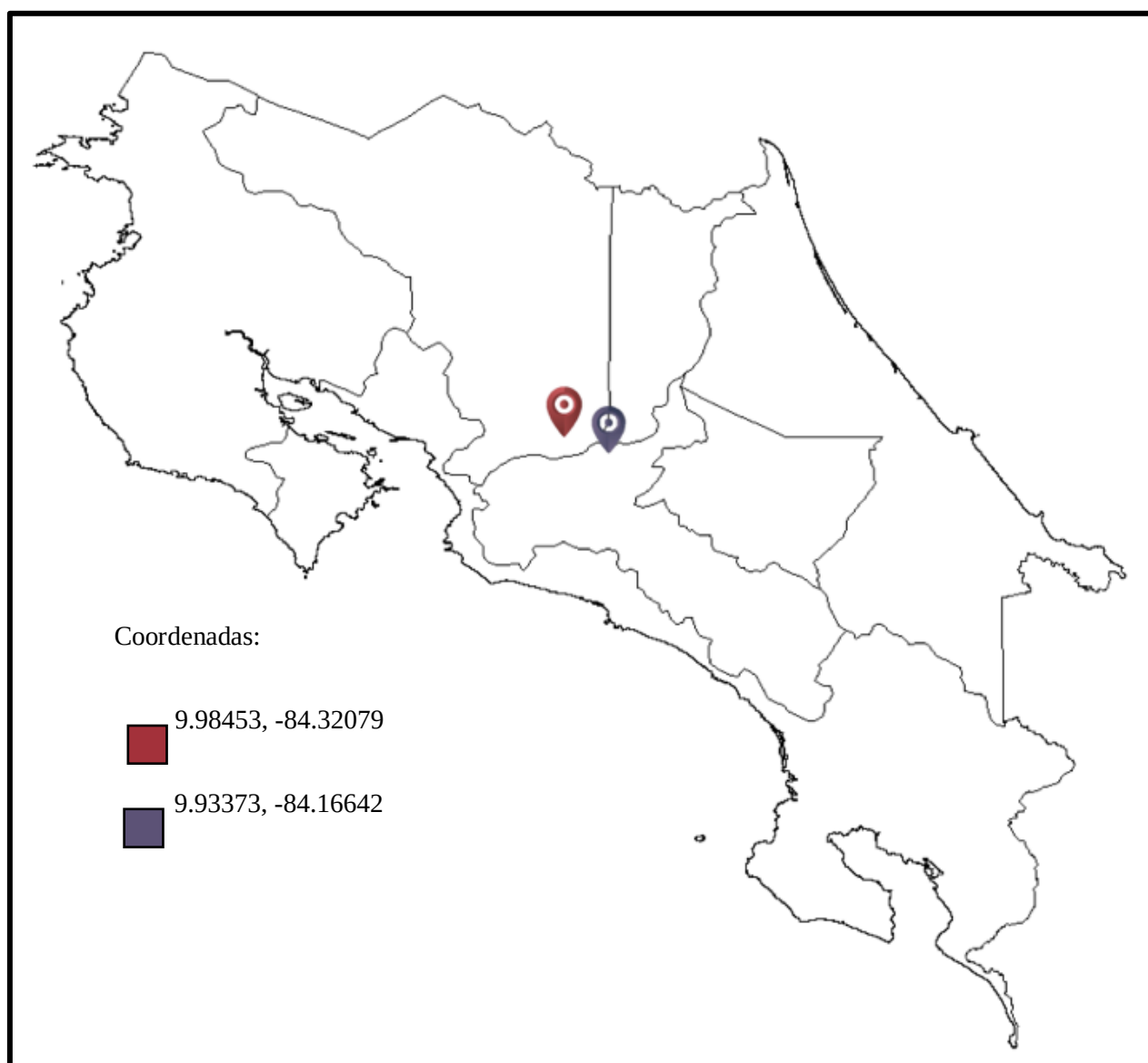


Figura 1. Localización de los puntos de muestreo en centros de cautiverio

Previo a iniciar el muestreo de sangre de los animales en cada centro de cautiverio se procedió a firmar un consentimiento informado por parte de los propietarios del centro y se aclaró cualquier duda al respecto (Anexo 1). Dicho consentimiento informado fue aprobado por la Comisión de Bienestar Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria (UNA-EMV-CBBA-ACUE-001-2018/Anexo 5).

2.2. Tipo de estudio

El tipo de estudio que se realizó fue un estudio transversal de tipo descriptivo cuyo propósito fue determinar los valores hematológicos, valores de bioquímica sérica y morfología celular de la especie de tortuga continental *R. pulcherrima* en condiciones de cautiverio.

2.3. Población a estudiar

Se trabajó con una población de 32 tortugas de la especie *R. pulcherrima* de los lugares de cautiverio detallados en el apartado 2.1. Cabe destacar que en Costa Rica no se conoce la población total de esta especie en cautiverio, ya que nunca se ha realizado un censo de la misma en los diversos centros de rescate y de exhibición legales. Además, también es incierta la población de estos individuos que viven y son reproducidos ilegalmente en cautiverio, como en casas de habitación.

Se seleccionaron especímenes adultos tanto hembras como machos, determinados mediante el tamaño del caparazón y la cola (Anexo 2). Los machos son más pequeños que las hembras con un largo de caparazón de aproximadamente 18 cm, presentan una cola más larga y gruesa por lo que su cloaca se ubica más allá del margen carapacial (Acuña-Mesén 1998; Savage 2002; Jolman y Harding 2003).

Además de lo anterior, para seleccionar los individuos que se contemplaron en el estudio se siguieron los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Individuos de la especie *R. pulcherrima* independientemente de su subespecie.
- Individuos que se encuentren en cautiverio en un centro legal de rescate o de conservación de fauna silvestre.
- Individuos clínicamente sanos según el examen físico general.

Criterios de exclusión

- Individuos de vida libre.
- Individuos en cautiverio en casas de habitación.
- Individuos con patologías físicamente evidentes.
- Individuos clasificados como juveniles según su tamaño
- Individuos con algún tipo de tratamiento médico al momento de la visita, aunque se encuentren aparentemente sanos.
- Animales que se encuentren en cuarentena al momento de la visita.

Se completó una ficha de información (Anexo 3) con la que se registró la historia del animal, examinación física, condiciones ambientales y dieta suministrada. Esta información permitió excluir aquellos animales aparentemente enfermos.

2.4. Recolección de muestras y almacenamiento

Para el manejo, inspección y toma de muestras se utilizaron guantes al manipular los animales, además se realizó un adecuado lavado de manos, uñas y antebrazo. Para la obtención de la muestra de sangre se utilizó en la mayoría de los casos el seno del caparazón, con algunas

excepciones donde fue necesario utilizar la vena yugular, ya que no se logró obtener una adecuada cantidad de muestra en el otro sitio de punción.

La sangre fue recolectada en tubos de litio heparina de 1 ml MiniCollet® de la marca Greiner bio-one para el posterior montaje de la hematología y química clínica. Además, se realizó el frotis sanguíneo inmediatamente después de la colecta de sangre, para evitar así la interferencia de los anticoagulantes durante el análisis (Fallis 2013).

Para el sangrado de las tortugas se utilizaron jeringas de 3 ml con aguja 23G X 1 ½" nuevas para cada animal. El procedimiento de toma de muestra se realizó por dos personas, una realizó la sujeción adecuada y la otra extrajo la muestra de sangre en el mínimo tiempo posible para evitar causar estrés al animal. Aquellos animales capturados en los que no se logró extraer un volumen suficiente de sangre no se incluyeron en el estudio.

Las muestras recolectadas en los tubos heparinizados se mezclaron gentilmente y se colocaron en posición vertical en un contenedor a 4°C, teniendo en cuenta que el hielo no estuviera en contacto directamente con el tubo (Meneses-Guevara y Bouza-Mora 2014).

Cada muestra y frotis fueron debidamente identificados con una etiqueta (lugar, hora, identificación del animal, sexo, número de muestra). Además, cada número de muestra tenía una correlación con un número de ficha de información. Esta ficha contemplaba preguntas sencillas y rápidas que permitieron obtener información acerca del hábitat, condiciones ambientales, nutrición y bienestar animal de cada quelonio muestreado.

Para esta investigación se solicitaron los permisos necesarios por parte del Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) para realizar la manipulación y toma de muestras de sangre de los animales en los diferentes centros de cautiverio (Anexo 4), así como la aprobación de la

Comisión de Bienestar Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA-EMV-CBBA-ACUE-001-2018/Anexo 5).

2.5. Procesamiento de muestras

Se realizó la determinación de hematocrito (Hto), hemoglobina (Hb), conteo y diferencial de leucocitos, observación morfológica, proteínas totales (PT), albúmina (ALB), globulinas, glucosa (Glu), colesterol, ácido úrico, nitrógeno ureico (BUN), calcio (Ca), fósforo (P), aspartato aminotransferasa (AST), creatin quinasa (CK), sodio (Na), cloruro (Cl) y potasio (K). Todos los análisis se realizaron en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

2.5.1. Hematocrito

Para la determinación del hematocrito se utilizaron tubos capilares marca Assitent, los cuales fueron llenados hasta $\frac{3}{4}$ de su totalidad con las muestras almacenadas en los tubos heparinizados. Luego se colocaron en la centrífuga de la marca Thermo Scientific modelo Sorvall Legend Micro 17 y se centrifugaron a 13000 r.p.m durante cinco minutos, finalmente se leyeron manualmente en el lector de microcapilares marca Damon/IEC división según el protocolo del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria.

2.5.2. Concentración de hemoglobina

Para la determinación de la hemoglobina se utilizaron 5 ml del reactivo de Drabkin, los cuales fueron colocados en un tubo de ensayo. Posteriormente se agregaron 20 μ l de muestra homogenizada al tubo de ensayo y se mezcló todo gentilmente. Se dejó reposar a temperatura

ambiente durante 10 minutos y se leyó en el analizador clínico marca Wiener Lab. modelo Metrolab 1600 DR.

2.5.3. Conteo de leucocitos

Para el cómputo de leucocitos se utilizó el kit comercial de Avian Leukopet™ de Vetlab® que utiliza floxacina. Se depositaron 25 µl de sangre en 1.5 ml de reactivo, se mezclaron gentilmente y se dejaron incubar durante cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron 20 µl de la solución en la cámara de Neubauer Bright-line y se realizó el conteo mediante observación microscópica a 10X en los nueve cuadros de la cámara.

Una vez realizado el conteo de leucocitos y en conjunto con el diferencial de leucocitos se calculó el recuento de glóbulos blancos por microlitro, utilizando la siguiente fórmula brindada por el fabricante:

$$\text{Total leucocitos/ul} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de leucocitos} \times 1.1 \times 16 \times 100}{\% \text{ heterófilos} + \% \text{ eosinófilos}}$$

2.5.4. Diferencial leucocitario

Para la realización de los frotis en fresco se utilizaron láminas portaobjetos de la marca Marienfeld Superior, estos se realizaron utilizando la técnica de deslizamiento estándar inmediatamente después de la toma de muestra y se dejaron secar al aire antes de colocarlos en la caja transportadora (Campbell y Ellis 2007). Una vez en el laboratorio, se realizó la tinción May Grünwald-Giemsa unas horas después de haber realizado el frotis siguiendo el protocolo estándar del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria.

Posteriormente se realizó el conteo utilizando un microscopio de luz de la marca Olympus modelo CX31 con el objetivo 100X. Se contaron 100 células que fueron clasificadas en: heterófilos, linfocitos, basófilos, eosinófilos y monocitos, obteniendo el porcentaje de cada tipo celular basado en la descripción de Campbell (2015).

2.5.5. Morfología de las células sanguíneas

Se realizó la observación, descripción y toma de fotografías de los diferentes tipos celulares para cada muestra, utilizando el frotis sanguíneo del diferencial leucocitario realizado. Lo anterior se llevó a cabo tomando en cuenta coloración del citoplasma, núcleo y presencia de granulaciones, así como tamaño (largo, ancho y área). Para este proceso se utilizó el programa S-eye calibrado para el objetivo 100X de un microscopio marca Olympus modelo CX33.

2.5.6. Análisis bioquímico

Para las determinaciones de química sanguínea se empleó un equipo marca Spinreact modelo Spin 200E (España) cuyo principio es el de fotometría de absorción y turbidimetría. Los reactivos se utilizaron según el protocolo del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria y de acuerdo a la casa matriz para la medición de proteínas totales, albúmina, globulinas, glucosa, colesterol, ácido úrico, nitrógeno ureico, calcio, fósforo, AST, CK, sodio, cloruro y potasio (Spinreact 2017).

3. RESULTADOS

3.1. Análisis hematológico

Se realizaron un total de 31 hemogramas completos. Los valores obtenidos de las diferentes variables hematológicas se presentan en el Cuadro 2. El establecimiento de los rangos referenciales se obtuvo a partir de los valores máximos y mínimos de cada parámetro medido.

Cuadro 2. Valores hematológicos obtenidos de la especie *R. pulcherrima* (n=31).

Variable	$\bar{X}$	DE	Rango (Mín - Máx)
Hematocrito (%)	17.47	5.35	10 - 29
Hemoglobina (g/dL)	4.91	1.28	2.7 - 7.4
CHCM (g/dl)	28.69	4.20	23.08 - 41.91
C. Leucocitario (μl)	2932	1784.14	645 - 8096
Heterófilos (%)	47	12.22	22 - 69
Heterófilos (μl)	1285	781.16	261 - 3643
Linfocitos (%)	30	12.12	8 - 60
Linfocitos (μl)	936	788.32	101 - 2992
Monocitos (%)	10	5.74	1 - 25
Monocitos (μl)	298	327.44	13 - 1619
Basófilos (%)	4	2.95	0 - 11
Basófilos (μl)	123	117.12	0 - 360
Eosinófilos (%)	9	7.48	0 - 32
Eosinófilos (μl)	290	255.37	0 - 812

3.2. Morfología celular

En el análisis morfológico de las células sanguíneas se encontraron siete tipos de células: eritrocitos, heterófilos, linfocitos, monocitos, basófilos, eosinófilos y trombocitos. Cada célula presentó características específicas de tamaño y color. Además, en uno de los animales fue posible observar la presencia de hemoparásitos en los eritrocitos. En el Cuadro 3 se detallan todas las mediciones obtenidas para cada tipo celular.

Cuadro 3. Mediciones obtenidas para cada tipo celular de todos los individuos de *R. pulcherrima* evaluados.

Células	n	Largo (μm)			Ancho (μm)			Área (μm ²)		
		$\bar{X}$	DE	Rango	$\bar{X}$	DE	Rango	$\bar{X}$	DE	Rango
Eritrocitos	300	19.26	1.73	12.52-24.22	12.00	1.22	8.39-15.54	181.84	27.50	98.03-281.88
Heterófilos	300	16.22	2.03	10.49-22.59	14.55	1.89	7.26-19.34	189.69	40.02	57.50-332.91
Linfocitos	300	9.67	1.66	6.00-15.85	8.46	1.35	4.71-12.87	69.90	20.95	31.74-139.10
Monocitos	296	13.96	2.36	7.41-21.28	12.48	2.13	6.60-18.38	144.26	45.16	40.63-301.32
Basófilo	250	11.02	1.87	6.56-17.04	10.36	1.70	5.46-16.51	94.27	29.76	11.33-202.07
Eosinófilos	300	15.76	2.55	9.00-22.86	13.86	2.27	8.55-20.72	176.77	51.80	69.66-352.02
Trombocitos	290	8.99	2.58	5.02-19.43	6.75	1.19	2.52-10.8	50.69	18.17	22.36-132.15

Eritrocitos: corresponde a la célula sanguínea más abundante. Presenta un tamaño promedio de (19.261 x 11.999) μm. El área promedio de un eritrocito es de 181.836 μm². Su forma es ovalada con núcleo central redondeado u ovalado de color morado dado por la cromatina. Presenta abundante citoplasma el cual es de color ligeramente basofílico.

Heterófilos: se caracterizan por ser la célula más común con respecto a los leucocitos. Su tamaño promedio es de (16.219 x 14.555) μm. El área promedio de un heterófilo es de

189.691 μm^2 . Son células que tienden a ser redondeadas cuyo núcleo es excéntrico, morado claro y de forma redonda u ovalada. El citoplasma es abundante pero poco observable ya que está cubierto con gránulos eosinofílicos que a la vista aparentan ser un material amorfo.

Linfocitos: estas células se encuentran en diferentes tamaños, pueden tener un área entre 31.740 μm^2 y 139.103 μm^2 , en promedio miden (9.671 x 8.455) μm . Son redondos con un núcleo grande de color morado que abarca la mayor cantidad de espacio y deja solo un halo basófilo de citoplasma alrededor que puede presentar granulaciones azurófilas.

Monocitos: presentan un área promedio de 144.262 μm^2 . En promedio miden (13.963 x 12.484) μm . Su forma es de redondeada a irregular. El núcleo es polimórfico pudiendo observarse redondeado, ovalado o en herradura; su cromatina es laxa. El citoplasma es abundante, granulado, de color basofílico o grisáceo y puede presentar vacuolas.

Basófilos: son células pequeñas y redondas que se encuentran en menor cantidad que las demás. El núcleo contiene cromatina densa. Su citoplasma es basofílico con gránulos morado oscuro que cubren incluso el núcleo. El área promedio de un basófilo es de 94.273 μm^2 y mide en promedio (11.015 x 10.365) μm .

Eosinófilos: presentan forma redonda con un tamaño promedio de (15.762 x 13.864) μm , con un área promedio de 176.774 μm^2 . El citoplasma es abundante, aparenta ser espumoso, levemente basófilo y con múltiples gránulos anaranjados distribuidos por todo el citoplasma. El núcleo se encuentra en la periferia y es de color morado.

Trombocitos: los trombocitos son las células sanguíneas más pequeñas, tienen forma redonda u ovalada. Miden en promedio (8.990 x 6.752) μm . Su área promedio es de 50.693 μm^2 . Difícilmente se logra observar su citoplasma. Su núcleo es grande, morado oscuro con cromatina densa. Son fácilmente observables en grupos.

En la Figura 2 se observa la morfología celular a 100X para esta especie.

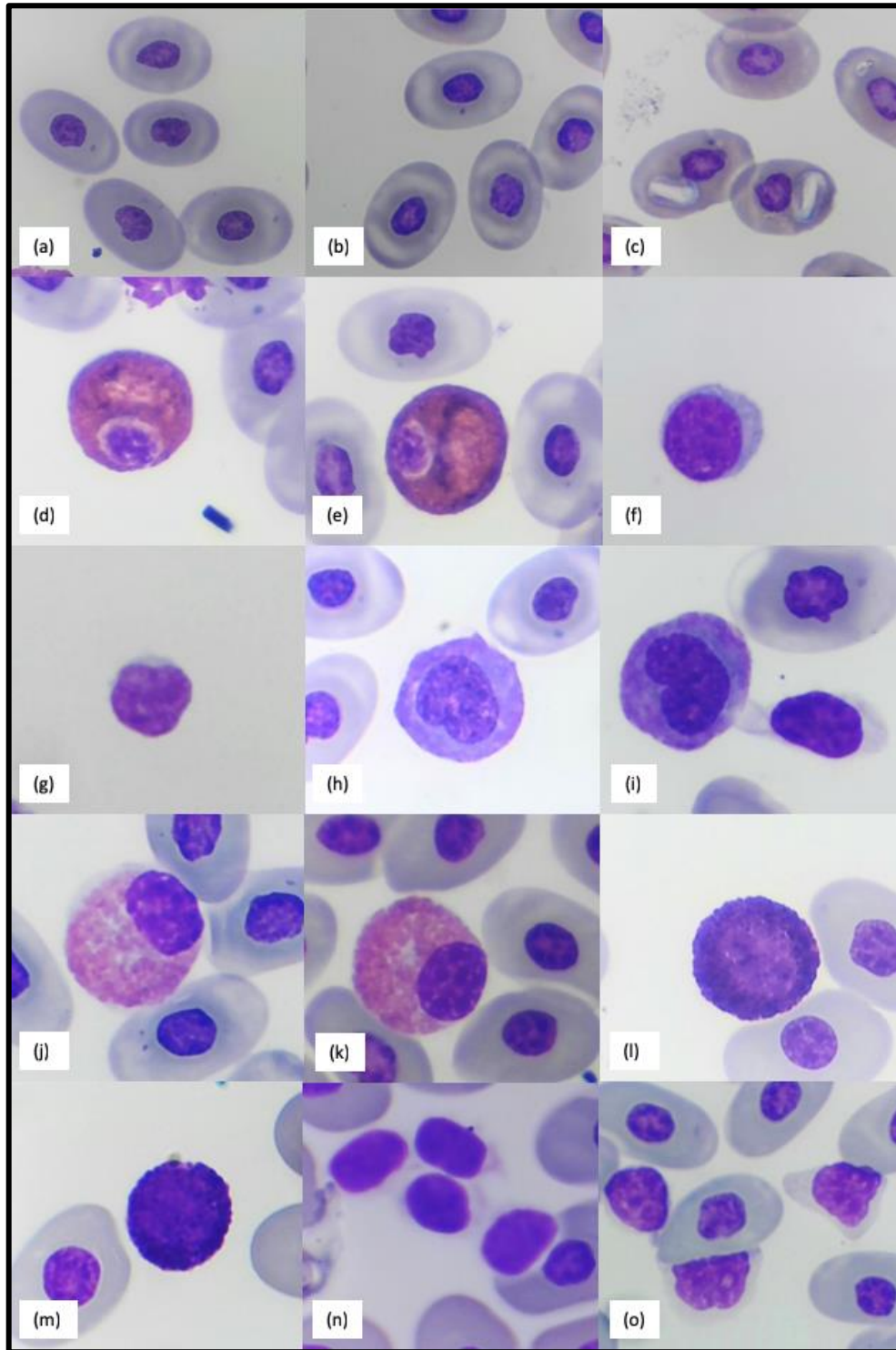


Figura 2. Ejemplos de la morfología celular de la tortuga roja (*R. pulcherrima*).

Tinción May Grünwald-Giemsa, Olympus CX33, 100X, muestreo Ago/Nov:
 (a,b) Eritrocito, (c) Eritrocito con presencia de *Haemoagregarina* sp., (d,e) Heterófilo, (f,g) Linfocito, (h,i) Monocito, (j,k) Eosinófilo, (l,m) Basófilo y (n,o) Trombocitos. Fuente: fotografías tomadas por Alexandra Corrales Quirós y Valeria Valenciano González.

3.3. Análisis bioquímico

Se realizó un análisis bioquímico completo para cada uno de los 31 individuos. Los valores obtenidos de la bioquímica sanguínea se detallan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Valores bioquímicos obtenidos de la especie *R. pulcherrima* (n=31).

Variable	$\bar{X}$	DE	Rango (Mín - Máx)
Glucosa (mg/dl)	37.44	47.68	2 - 272
Colesterol (mg/dl)	240.00	81.38	77 - 424
BUN (mg/dl)	9.01	6.40	1.3 - 35.1
Calcio (mg/dl)	19.79	8.66	9.1 - 41.6
Fósforo (mg/dl)	8.34	7.14	2.1 - 31.1
Relación Ca/P	3.30	1.63	0.99 - 8.85
Proteínas Totales (g/dl)	6.28	3.57	2.1 - 20.4
Albúmina (g/dl)	2.16	1.00	0.3 - 4.5
Globulinas (g/dl)	4.23	3.35	1.6 - 20.1
Relación Alb/Glo	0.65	0.21	0.01 - 1.31
Ácido Úrico (mg/dl)	0.95	0.79	0.06 - 4.47
AST (IU/L)	139.71	66.03	14 - 356
CK (IU/L)	715.00	406.28	117 - 1745
Sodio (mmol/L)	110.18	33.07	2 - 144
Potasio (mmol/L)	4.80	2.15	0.2 - 7.1
Cloro (mmol/L)	122.83	108.2	32 - 420

4. DISCUSIÓN

En Costa Rica se han realizado pocos estudios de hematología en tortugas marinas (*Chelonia mydas*) y continentales (*Trachemys scripta emolli*) (Redondo 2008; Fournier-Gutiérrez 2015; Howell-Ramírez 2017). La caracterización de las células sanguíneas, los valores hematológicos y la química sanguínea del presente estudio constituyen los primeros valores reportados de diferentes especímenes de la tortuga roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio.

Los resultados obtenidos son valiosos al constituir una guía para el manejo clínico y diagnóstico de estos animales que por alguna razón sean mantenidos en cautiverio, además sirve de base para futuras investigaciones biológicas y de conservación al permitir evaluar su salud.

4.1 Análisis hematológico

Los índices hematológicos determinados en este trabajo son los primeros datos calculados para la especie debido a que no se encontraron datos bibliográficos de los mismos.

Los valores hematológicos registrados incluyendo hematocrito, hemoglobina y CHCM para esta especie se encuentran dentro de los valores reportados para diferentes especies de tortugas semiacuáticas (agua dulce) y terrestres (Arcila et al. 2000; Kramer 2006; Mader y Diver 2006; Cabrera et al. 2011; Chansue et al. 2011; Andreani et al. 2014; Carrascal-Velásquez et al. 2014; Grioni et al. 2014; Yang et al. 2014; Fournier-Gutiérrez 2015; Eshar et al. 2016; Carpenter 2018). Sin embargo, no es posible realizar comparaciones con especies del mismo género ya que no se han realizado estudios incluyendo a estas tortugas.

Factores propios del animal como la edad, sexo, nivel de estrés (manipulación), nivel nutricional, niveles hormonales e hidratación corporal, así como factores medioambientales como temperatura, estación y presión de oxígeno afectan los valores hematológicos (Arcila et al. 2005; Mader 2006; Cabrera et. al 2011). Por lo tanto, se deben tener presentes todos estos factores a la hora de analizar los resultados obtenidos para determinar si el individuo se encuentra sano.

Los valores reportados en la literatura en cuanto a conteo de glóbulos blancos son variados entre cada especie de tortuga, pero se observa que los rangos tienden a ser amplios. En este caso se encuentran por debajo de todos los estudios revisados que contemplan quelonios (Kramer 2006; Mader y Diver 2006; Cabrera et al. 2011; Chansue et al. 2011; Carrascal-Velásquez et al. 2014; Yang et al. 2014; Carpenter 2018). Se debe tomar en cuenta que los leucocitos varían ampliamente en número y concentración relativa en sangre periférica dependiendo de género y especie (Stacy et al. 2011).

La respuesta leucocitaria de los quelonios es menos predecible que en mamíferos o aves, ya que es difícil establecer valores normales que sirvan de referencia debido a las variaciones que se presentan entre especies, estado nutricional, estado fisiológico, estación del año, edad, sexo, manipulación, sitio de venopunción y anticoagulante utilizado. Otros factores que también pueden afectar el leucograma de los reptiles son enfermedades y exposición a toxinas ambientales o químicas (Campbell y Ellis 2007; Campbell 2015; Miller y Fowler 2015).

La presencia de recuentos bajos puede ser debido al método empleado para el conteo celular ya que los estudios revisados utilizaron un método diferente para realizar el conteo de glóbulos blancos al del presente estudio. El conteo total de glóbulos blancos puede ser determinado por un método directo (Natt-Herricks) o indirecto (solución de floxacina B o estimación desde la lámina). Los resultados más confiables se obtienen mediante un

procesamiento y análisis consistente. Todos los métodos requieren algún nivel técnico para lograr exactitud, y es posible que los métodos no sean comparables directamente uno con el otro o entre laboratorios (Miller y Fowler 2015).

Además, el sitio y método de colecta de sangre son factores que también pueden afectar el hemograma. Los vasos linfáticos usualmente acompañan a los vasos sanguíneos en reptiles, resultando comúnmente en una mezcla de sangre y linfa a la hora de la punción (Mans 2008). La subsecuente linfodilución de la muestra sanguínea va a afectar el hemograma disminuyendo el hematocrito, hemoglobina y conteo tanto de glóbulos rojos como de glóbulos blancos (McArthur et al. 2004; Campbell y Ellis 2007; Cabrera et al. 2011).

La colecta de sangre para hematología en tubos con EDTA puede causar hemólisis en especial en las muestras de quelonios por lo que no se recomienda (Mader y Diver 2006; Campbell y Ellis 2007). Por esta razón se prefiere utilizar la heparina, debido a una menor distorsión de la morfología de los leucocitos; sin embargo, puede causar acúmulos de estas células y de los trombocitos, lo que puede dificultar el conteo celular (Campbell y Ellis 2007; Chitty y Raftery 2013).

A pesar de que el recuento leucocitario se encuentra por debajo de los rangos reportados, el porcentaje de los diferentes tipos celulares presentes (diferencial leucocitario) se comportó de la manera esperada para este orden (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valores hematológicos en diferentes especies de tortugas.

	<i>Rhinoclemmys pulcherrima</i>	<i>Trachemys scripta callirostris</i>	<i>Geochelone denticulata</i>	<i>Trachemys scripta</i> spp.	<i>Trachemys callirostris</i>	<i>Hieremys annandalii</i>	<i>Cuora flavomarginata</i>
Hematocrito (%)	10-29	8-26	11-29	8-44	20-39	11-18	23-44
Hemoglobina (g/dL)	2,7-7,4	0,71-9,97	3,1-12,2	10-12,2	2,6-6,3	4,96-7,2	4,9-10,5
C. Leucocitario ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,6-8,1		2,64-18,26	1,0-19,4	5,5-23,5	5,07-18,25	1,0-10,1
Heterófilos (%)	22-69	22-54	9-87		10-33	23-36	
Heterófilos (μl)	261-3643			180-5860		1130-5730	579-7171
Linfocitos (%)	8-60	0-10	4-74		21-52	9-21	
Linfocitos (μl)	101-2992			30-6900		570-2690	260-3116
Monocitos (%)	1-25	0-13	0-4		9-25		
Monocitos (μl)	13-1619			40-650			0-328
Basófilos (%)	0-11	4-22	0-11		1-7	19-23	
Basófilos (μl)	0-360			10-3560		960-4060	0-1344
Eosinófilos (%)	0-32	32-59	3-38		6-47	18-29	
Eosinófilos (μl)	0-812			10-3060		950-4730	0-176

Fuente: Arcila et al. 2000; Cabrera et al. 2011; Carpenter 2018; Carrascal-Velásquez et al. 2014; Chansue et al. 2011; Yang et al. 2014

De manera general se reporta que en la mayoría de las especies de reptiles los heterófilos componen de 30 % a 45 % de los glóbulos blancos en la sangre periférica; en especies de quelonios y cocodrilos estos componen más del 50 % de las células. Los eosinófilos componen entre 7 % a 20 % de los leucocitos en reptiles saludables, algunas especies de tortugas tienden a estar en el rango superior. El porcentaje de basófilos varía ampliamente entre especies de reptiles con un rango entre 0 % a 40 %, se ha observado que tortugas saludables pueden tener porcentajes de hasta 65 % aunque la razón de esto es desconocida. Los monocitos se encuentran entre 0 % a 10 %, algunas especies de reptiles llegan hasta una presencia de 20 %. La concentración de linfocitos es variable y puede representar un 80% del diferencial leucocitario normal en algunas especies (Campbell y Ellis 2007; Stacy et al. 2011).

Las tortugas muestreadas para este estudio provienen de centros de cautiverio donde la dieta que consumen no necesariamente concuerda con su dieta normal en vida silvestre, por lo que se pueden presentar algunas deficiencias que ocasionen cambios en la hematología de algunos de los individuos. Además, el muestreo se realizó a través de todo el año y se reporta que la época reproductiva para esta especie se presenta en los meses de mayo a diciembre, razón por lo que las hembras podrían presentar cambios dependiendo de su ciclo reproductivo (Acuña-Mesén 1998; Savage 2002).

4.2 Análisis bioquímico

Los parámetros bioquímicos son afectados de manera similar por los factores que afectan los valores hematológicos (McArthur et al. 2004; Mader y Diver 2006; Miller y Fowler 2015). Actualmente la interpretación de la bioquímica sanguínea de reptiles se considera igual a la de los mamíferos domésticos con la consideración de los factores externos, como las condiciones ambientales, los cuales tienen una gran influencia en la fisiología normal y salud de los vertebrados ectotérmicos en comparación con endotermos (Mader y Diver 2006; Miller y Fowler 2015).

La especie, edad, sexo, estado nutricional, época de año y estado fisiológico influyen la bioquímica sanguínea de los reptiles, esto genera que la interpretación de los resultados de esta en reptiles sea desafiante (Mader y Diver 2006; Miller y Fowler 2015). Las pruebas bioquímicas que aparentemente son más útiles para diagnóstico en reptiles incluyen proteínas totales, albúmina, glucosa, ácido úrico, AST, CK, calcio y fósforo (Mader y Diver 2006).

El rango de proteínas totales fue bastante amplio siendo su límite máximo un valor por encima de los reportados en la mayoría de estudios (Kramer 2006; Mader y Diver 2006;

Chansue et al. 2011; Andreani et al. 2014; Grioni et al. 2014; Yang et al. 2014; Fournier-Gutiérrez 2015; Eshar et al. 2016; Carpenter 2018). Las proteínas totales en plasma están compuestas por albúmina, globulinas y fracciones de fibrinógeno, cualquier variación en estos componentes se refleja en el valor total de estas (Eatwell et al. 2104). Tomando esto en cuenta, dos individuos del estudio presentaron valores muy elevados de globulinas (20.1 g/dL y 7.8 g/dL) lo que generó un aumento de las proteínas totales, elevando así el límite máximo del rango. Aparte de estos individuos, los datos de albúmina y globulinas obtenidos presentan valores similares a los reportados (Kramer 2006; Mader y Diver 2006; Chansue et al. 2011; Andreani et al. 2014; Grioni et al. 2014; Yang et al. 2014; Fournier Gutiérrez 2015; Eshar et al. 2016; Carpenter 2018). Los niveles aumentados de globulinas generalmente se asocian a inflamación, siendo las α - y β -globulinas las que responden más rápidamente, mientras que las γ -globulinas usualmente se encuentran elevadas en inflamación crónica (Eatwell et al. 2104).

En cuanto a los valores de glucosa estos se encuentran generalmente por debajo de los rangos reportados para diferentes géneros de tortugas (Kramer 2006; Mader y Diver 2006; Chansue et al. 2011; Andreani et al. 2014; Grioni et al. 2014; Yang et al. 2014; Fournier Gutiérrez 2015; Eshar et al. 2016; Carpenter 2018); sin embargo, un individuo presentó el valor de glucosa por encima del límite superior, esto puede ser debido al estrés generado a la hora de la manipulación (Eatwell et al. 2104). Tomando en cuenta los otros valores obtenidos el rango de glucosa sería de 2 mg/dL a 53 mg/dL, donde la mayoría de valores se encuentra por debajo de lo establecido en la literatura, estos niveles pueden indicar periodos de anorexia, malnutrición, enfermedad hepática severa o septicemia (Mader y Diver 2006; Eatwell et al. 2104; Miller y Fowler 2015); en este caso se sospecharía más de un factor relacionado con la nutrición de los animales ya que están siendo alimentados en cautiverio.

Los rangos de colesterol encontrados para esta especie concuerdan con los obtenidos por Mader y Diver (2006), Grioni y colaboradores (2014), Yang (2014) y Carpenter (2018). Los valores de ácido úrico se encuentran dentro del rango reportado por Andreani y colaboradores (2014) y concuerdan con diversos estudios (Kramer 2006; Chansue et al. 2011; Grioni et al. 2014; Yang et al. 2014; Eshar et al. 2016; Carpenter 2018).

El rango obtenido de AST y de CK se asemeja a los valores reportados (Kramer 2006; Mader y Diver 2006; Chansue et al. 2011; Andreani et al. 2014; Grioni et al. 2014; Yang et al. 2014; Fournier Gutiérrez 2015; Eshar et al. 2016; Carpenter 2018). La actividad del AST es alta en el hígado de los quelonios, pero no es específica de este órgano ya que también se encuentra en el riñón y en el músculo. Elevaciones de esta enzima pueden indicar daño hepático, enfermedad renal o daño muscular (usualmente en combinación con aumento de CK después de una venopunción traumática). La CK es una enzima músculo específica, su aumento se puede dar en trauma, aplicación de inyecciones o infecciones sistémicas (Mader y Diver 2006; Eatwell et al. 2104; Miller y Fowler 2015).

Los valores normales de BUN en la mayoría de reptiles es bajo (<10 mg/dL), con la excepción de quelonios, especialmente en las especies desérticas que usualmente tienen concentraciones de BUN que pueden variar normalmente entre 30 mg/dL a 100 mg/dL (Mader y Diver 2006). Según Carpenter (2018), el rango de los valores referenciales de este parámetro para *Trachemys scripta* spp. va de 2 mg/dL a 64 mg/dL el cual se asemeja a los resultados obtenidos para la especie estudiada.

En cuanto a los valores de Ca y P algunos valores se encuentran dentro de los rangos reportados (Kramer 2006; Mader y Diver 2006; Chansue et al. 2011; Andreani et al. 2014; Grioni et al. 2014; Yang et al. 2014; Fournier Gutiérrez 2015; Eshar et al. 2016; Carpenter 2018); sin embargo, la mayoría se encuentra por encima de los valores máximos reportados.

La concentración normal de calcio en el plasma para la mayoría de reptiles tiene un rango entre 8 mg/dL y 11 mg/dL, aunque varía entre especies y estatus fisiológico. Debido a estos factores que afectan las mediciones de calcio total en el plasma de los reptiles, se recomienda realizar mediciones de calcio ionizado (Mader y Diver 2006).

Según Mader y Diver (2006) se considera hipocalcemia cuando la concentración plasmática de calcio es menor a 8 mg/dL, en este estudio ningún individuo presentó valores menores a éste. Se considera hipercalcemia cuando se presentan valores mayores a 20 mg/dL, aunque algunos estudios reportan rangos normales de hasta aproximadamente 30 mg/dL (Grioni et al. 2014; Yang et al. 2014; Carpenter 2018). En el presente estudio se observó que muchas tortugas se encuentran dentro de estos valores.

Generalmente la hipercalcemia ocurre por una excesiva cantidad de calcio o vitamina D3 suministrada en la dieta o de manera parenteral (generalmente de manera iatrogénica) (Mader y Diver 2006). Es importante tomar en consideración que, los niveles de calcio pueden aumentar de dos a cuatro veces más de lo normal debido a desarrollo folicular (Miller y Fowler 2015).

Los niveles normales de fósforo en plasma para la mayoría de reptiles se encuentra entre 1 mg/dL y 5 mg/dL (Mader y Diver 2006; Miller y Fowler 2015). Los niveles de fósforo generalmente se relacionan con los niveles de calcio debido a los efectos de la hormona paratiroidea, calcitonina y el calcitriol (Eatwell et al. 2104). Varios de los individuos del estudio presentaron valores superiores a 5 mg/dL, esto se puede presentar debido a una suplementación excesiva en la dieta, hipervitaminosis D3, enfermedad renal o trauma severo a los tejidos (Mader y Diver 2006; Miller y Fowler 2015). La proporción de calcio:fósforo es uno de los indicadores más útiles de enfermedad renal temprana; en un reptil sano esta proporción es típicamente mayor a uno, en casos de enfermedad renal puede ser menor a uno

debido a niveles de fósforo aumentados en comparación con los niveles de calcio (Eatwell et al. 2104).

Los valores de sodio, potasio y cloro en tortugas son 120 - 150 mEq/L, 2 - 6 mEq/L y 100 - 110 mEq/L respectivamente (Mader y Diver 2006; Miller y Fowler 2015). La mayoría de los animales en este estudio se encuentran dentro de los rangos mencionados anteriormente, así como los rangos encontrados en otros estudios (Kramer 2006; Mader y Diver 2006; Andreani et al. 2014; Grioni et al. 2014; Fournier-Gutiérrez 2015; Eshar et al. 2016; Carpenter 2018).

El cloruro es el principal anión en la sangre, y junto con el sodio, representan el componente osmóticamente activo del plasma de la mayoría de reptiles (Mader y Diver 2006). Sin embargo, la concentración de cloruro en sangre nos brinda la información menos útil clínicamente de todos los electrolitos (Mader y Diver 2006). Un aumento en este electrolito (hipercloremia) se asocia con deshidratación y posiblemente enfermedad renal tubular (Mader y Diver 2006).

Debido al método utilizado para la determinación de potasio varios individuos obtuvieron valores de 7.1 mmol/L que es valor máximo reportado por el equipo utilizado para la medición de bioquímicas, por lo que se podría esperar que los valores reales para esos individuos sobrepasan ese dato. Una hiperkalemia se puede dar por una ingesta excesiva de potasio en la dieta, acidosis severa, presencia de hemólisis y secreción renal disminuida (Mader y Diver 2006; Miller y Fowler 2015).

4.3 Análisis morfológico de las células sanguíneas

Las características de las células sanguíneas de diferentes especies de tortugas han sido documentadas en libros de texto y diversas publicaciones (Arcila 2005; Campbell y Ellis 2007; Redondo 2008; Stacy et al. 2011; Jenkins 2012; Andreani et al. 2014; Carrascal et al. 2014; Velásquez 2014; Campbell 2015; Howell-Ramírez 2017). Las diferentes tinciones utilizadas, variaciones en los criterios y métodos de microscopía pueden generar inconsistencia en la descripción de las células entre los estudios (Redondo 2008).

La identificación de las siete células sanguíneas del presente estudio es concordante con lo descrito en otros autores como Velásquez y colaboradores (2014) y Campbell (2015). La célula más abundante de los leucocitos son los heterófilos, igual a lo reportado por Arcila y colaboradores (2005), mientras que la que se encuentra en menor cantidad son los basófilos.

En el estudio realizado por Arcila y colaboradores (2005), tanto los eritrocitos como la línea blanca concuerdan en medidas y aspecto con los del presente estudio. Los glóbulos blancos se dividen en granulocitos y agranulocitos. Los granulocitos corresponden a los eosinófilos, heterófilos y basófilos, mientras que los agranulocitos son los linfocitos y los monocitos (Arcila et al. 2005). Estas células descritas son los mismos leucocitos encontrados en esta investigación.

Un estudio realizado en Colombia por Velásquez y colaboradores (2014), con la especie *Trachemys callirostris* obtuvo los siguientes valores de área total para células sanguíneas: eritrocitos (278 ± 8.5) μm^2 , trombocitos (77 ± 3.0) μm^2 , linfocitos (75 ± 2.0) μm^2 , heterófilos (224 ± 1.2) μm^2 , eosinófilos (198 ± 5.0) μm^2 , monocitos (170 ± 2.2) μm^2 y basófilos (86 ± 3.6) μm^2 , estos valores son muy similares a los promedios de área obtenidos para cada célula en la presente investigación.

Respecto a los linfocitos, se pudo observar que estos varían en tamaño, encontrándose entre 5 - 15 μm , lo que concuerda con lo detallado por Carrascal y colaboradores (2014), quien explica que los linfocitos más pequeños pueden incluso confundirse con otro tipo de células como los trombocitos, además de Campbell y Ellis (2007) que describen a los linfocitos grandes con mayor volumen citoplasmático que los pequeños.

En la observación morfológica no fue posible encontrar azurófilos, que son descritos como células de tamaño más pequeño que el de los monocitos, con un núcleo que puede ser redondo, ovalado o bilobulado y cuyo citoplasma tiene un color azul más oscuro que el de los monocitos con la posibilidad de tener gránulos azurófilos en él. A pesar de lo anterior, lo azurófilos podrían representar una forma inmadura de los monocitos y hay poca ventaja clínica al separarlos como una célula blanca diferente a las mencionadas inicialmente (Campbell y Ellis 2007).

Dentro de la observación y análisis morfológico de las células se lograron observar heterófilos degranulados. Lo anterior puede deberse a la técnica de realización del frotis o en el caso de algunas sustancias tóxicas que afecten al animal (Campbell y Ellis 2007). También podrían presentarse a causa de una fijación inadecuada, o bien ser parte del proceso de envejecimiento normal de estas células (Martínez et al. 2011).

En algunos de los eritrocitos del presente estudio se observaron unas estructuras en el citoplasma y cerca del núcleo sin afectar la posición de este, presentado forma alargada, delgada y curvada (forma de banano) que pueden corresponder a un hemoparásito. Diversos estudios señalan a los quelonios como hospedadores de diferentes parásitos, incluyendo los hemoparásitos. Estos últimos se caracterizan por tener forma elongada, ligeramente curvados, extremos redondeados, núcleo denso y bordes bien definidos (Batalla et al. 2015).

Las estructuras encontradas en los eritrocitos de esta investigación coinciden con las descritas por Batalla y colaboradores (2015) quienes además detallan que cuando se encuentran hemoparásitos en tortugas terrestres y no hay estudios previos en la zona acerca de estos parásitos, se adopta el género *Haemoagregarina* hasta que nuevos datos sean descritos para su clasificación.

Las hemogregarinas son los hemoparásitos más comunes en reptiles, más ampliamente distribuidos y con mayor número de especies; infectan a cada uno de los órdenes de reptiles vivientes. La mayor parte de especies de hemogregarinas fueron descritas como *Haemogregarina* antes de ser descubiertas, excepto por muy pocos estudios de hemogregarinas que indican que el patrón esporogónico es esencial para la identificación de género y familia (Campbell y Ellis 2007; Medrano y Margarita, 2015). Por lo anterior, se puede afirmar que el parásito encontrado en este estudio se asemeja a los del género *Haemoagregarina*.

Estos hemoparásitos en las tortugas están bien adaptados a su hospedero causando ninguna o poca enfermedad (disminución en el crecimiento, disminución en rendimiento reproductivo, afectación de inmunidad), pero en infecciones con alta parasitemia se podría observar un cuadro de anemia hemolítica y de lesiones inflamatorias severas en varios órganos (Campbell y Ellis 2007; Batalla et al. 2015).

5. CONCLUSIONES

1. Se determinaron los primeros datos de hematología, bioquímica sérica y morfología celular de la tortuga roja en condiciones de cautiverio, que constituyen una guía referencial preliminar con valores confiables comparados con otras especies y que resultan de utilidad para el campo biológico y veterinario.
2. Se generó un atlas de imágenes que permitió la descripción de la morfología celular. Este material será de utilidad para veterinarios y centros de cautiverio al proveer material gráfico para la identificación de estructuras y características celulares, lo cual aportará información al momento de la evaluación del frotis sanguíneo, ya sea realizado a campo y/o en clínicas.
3. Se elaboro una guía de referencia rápida (Anexo 6) que permite el análisis integral de resultados de hematología, bioquímica y morfología celular, facilitando a los encargados de los centros de cautiverio evaluar la salud del individuo mediante análisis clínicos, así como las condiciones brindadas a los animales.

6. RECOMENDACIONES

Las muestras que contienen linfa deben ser descartadas y tomadas nuevamente para así evitar alteraciones en la hematología y bioquímica.

Para interpretar la hematología y la bioquímica de cada individuo hay que tomar en cuenta los factores extrínsecos e intrínsecos del mismo, ya que animales aparentemente sanos al examen físico podrían presentar alteraciones en las pruebas de laboratorio.

Se recomienda realizar estudios en poblaciones de vida libre permitirá ampliar la información de esta especie y comparar las diferencias con las que se encuentran en cautiverio.

La confirmación del hemoparásito similar a los del género *Haemogregarina* se debe realizar mediante técnicas más específicas y confiables como una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o la verificación del desarrollo y ciclo de vida del hospedador invertebrado para su correcta identificación.

Estudios adicionales deben investigar la variación en la hematología y bioquímica de *R. pulcherrima* según el sexo y edad.

Es necesario realizar nuevos estudios en hematología de tortugas continentales para la obtención de una base de datos más amplia.

La realización de análisis clínicos periódicamente en los centros de cautiverio, les permitirá tener una base de datos para identificar alteraciones en la salud de cualquier individuo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña-Mesén RA. 1998. Las tortugas continentales de Costa Rica. 2 ed. San José (CR): Editorial de la Universidad de Costa Rica. p. 15-17; 65-73
- 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.). Vet Clin Path [Internet]. [citado 5 de febrero de 2019]; 43(4): 573–583. Disponible en: 10.1111/vcp.12203
- Arcila VH, Navarro R, Real W, Rincón M, Villamizar M. 2005. Hematología y química sérica en hembras quelonios (*Trachemys scripta callirostris*) en la ribera del río Lebrija , Puerto Wilches (Santander) Parte I. Spei Domus [Internet]. [citado 30 de enero de 2019]; 1:34–43. Disponible en: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/568>
- Arias-Ortega J, Bonilla-Murillo F, Sasa M. 2016. Desarrollo de la herpetocultura en Costa Rica: Situación actual de herpetarios y manejo ex situ de reptiles y anfibios. Trop J Environ Sci [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2017]; 50(1): 1-23. Disponible en: <http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/ambientales/article/view/8647> o <http://dx.doi.org/10.15359/rca.50-1.1>

- Batalla L, Casas E, Julca R, Sánchez N, Angelats R, Rojas G, Cárdenas J. Presencia de Hemoparásitos en Tortugas Motelo (*Chelonoides denticulata*) (Linnaeus, 1766) Comercializadas en el Mercado de Belén, Iquitos, Perú. Rev Inv Vet Perú [Internet]. [citado 30 de enero de 2019]; 26(3), 489-496. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11168>
- Cabrera M, Li O, Gálvez H, Sánchez N, Rojas G. 2011. Valores hematológicos de la tortuga motelo (*Geochelone denticulata*) mantenida en cautiverio. Rev Inv Vet Perú [Internet]. [citado 30 de enero de 2019]; 22 (2): 144-150. Disponible en: [10.15381/rivep.v22i2.287](http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v22i2.287)
- Campbell T, Ellis C. 2007. Avian and exotic animal hematology and cytology. 3ed. Iowa (US): Blackwell. p. 51-81.
- Campbell T. 2015. Exotic animal hematology and cytology. 4ed. Iowa (US): Wiley Blackwell. p. 71-75
- Castillo-Centeno VE. 2014. Alimentación natural de las tortugas continentales de Costa Rica y centroamérica. San José (CR): Pixels y Letras.
- Castillo-Centeno VE, Laurent M. 2015. Tortugas continentales de Costa Rica y consecuencias de su cautiverio. San José (CR): Tortufauna.
- Chansue N, Sailasuta A, Tangtrongpiros J, Wangnaitham S, Assawawongkasem N. 2011. Hematology and clinical chemistry of adult yellow-headed temple turtles (*Hieremys annandalii*) in Thailand. Vet Clin Path [Internet]. [citado 30 de enero de 2019]; 40(2): 174-184. Disponible en: [10.1111/j.1939-165X.2011.00306.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00306.x)
- Chitty J, Raftery A. 2013. Essentials of tortoise medicine and surgery. Indiana (US): Wiley Blackwell. p. 64-75, 80-86.

- Eatwell K, Hedley J, Barron R. 2014. Reptile haematology and biochemistry. In Practice [Internet]. [citado 30 de enero de 2019]; 36(1): 34–42. Disponible desde:10.1136/inp.f7488
- Eshar D, Gancz AY, Avni-Magen N, Wagshal E, Pohlman LM, Mitchell MA. 2016. Selected plasma biochemistry analytes of healthy captive sulcata (african spurred) tortoises (*Centrochelys sulcata*). J Zoo Wildlife Med [Internet]. [citado 30 de enero de 2019]; 47(4): 993–999. Disponible en:10.1638/2016-0051.1
- Fallis A. 2013. Veterinary hematology and clinical chemistry. 2ed. West Sussex (UK): Wiley Blackwell. p. 832-839.
- Fournier-Gutiérrez L. 2015. Intervalos básicos de parámetros sanguíneos relacionados con la salud y presencia de parásitos de una población de tortugas resbaladoras (*Trachemys scripta emolli*) en época seca del 2013 en el refugio de vida silvestre Caño Negro, Costa Rica. Heredia, C.R.: Tesis (Maestría) Universidad Nacional.
- Grioni A, Ho KKY, Karraker NE, Leung KMY. 2014. Blood clinical biochemistry and packed cell volume of the chinese three-striped box turtle, *Cuora traifasciata* (Reptilia: Geomydidae). J Zoo Wildlife Med [Internet]. [citado 30 de enero de 2019]; 45(2): 228–238. Disponible en:10.1638/2012-0099.1
- Howell-Ramírez P. 2017. Perfiles hematológicos, bioquímicos y hormonales de la tortuga verde del Pacífico Este (*Chelonia mydas agassizü*) en el Golfo Dulce de Costa Rica. Heredia, C.R.: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional.

- [IUCN] International Union for Conservation of Nature [Internet]. 2016. Red List of Threatened Species. Iucnredlist.org; [citado 9 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T19503A8943143.en>
- Jenkins J. 2012. Hematologic Evaluation of Reptiles: A Diagnostic Mainstay. Vet. Tech. E1-E8.
- Jolman M, Harding J [Internet]. 2003. Rhinoclemmys pulcherrima, animal diversity web. Michigan (US): animaldiversity.org; [citado 17 enero 2019]. Disponible en: https://animaldiversity.org/accounts/Rhinoclemmys_pulcherrima/
- Kramer M. 2006. Unusual Pet Care. Vol II. Florida, Estados Unidos: Zoological Education Network.
- Mader DR, Diver SJ. 2006. Reptile Medicine and Surgery. 2ed. Missouri (US): Saunders Elsevier. p. 453-465,808
- Mans C. 2008. Venipuncture techniques in chelonian species. Lab Animal [Internet]. [citado 5 de febrero de 2019]; 37(7): 303-304. Disponible en: 10.1038/labon0708-303
- Martínez-Silvestre A, Lavin S, Cuenca R. 2011. Hematology and Blood Cytology in Reptiles. Clin Vet Peq Anim Clin. Vet. Peq. Anim [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2017]; 31(3): 131-141. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/296835848_Hematology_and_blood_cytology_in_reptiles
- McArthur S, Wilkinson R, Meyer J. 2004. Medicine and surgery of tortoises and turtles. Oxford (UK): Blackwell. p. 1-3, 87-107.

- Medrano E, Margarita E. 2015. Determinación de presencia de Hemoparásitos en Serpientes en Vida Silvestre ubicadas en las reservas Cota 70, Cotacachi Cayapas y Sumaco Napo Galeras. Ecuador: Tesis (Licenciatura) Universidad Central del Ecuador. p 4-6
- Mendenhall W, Beaver R, Beaver B. 2010. Introducción a la probabilidad estadística. 13ed. Santa Fe (MX): CENGAGE.
- Meneses-Guevara A, Bouza-Mora LS. 2014. Manual de hematología y química clínica en medicina veterinaria. Heredia (CR): EUNA. p. 27-29.
- Merchan-Fornelino M. 2003. Contribución al conocimiento de la biología de la tortuga negra (*Rhinoclemmys funerea*) y la tortuga roja (*R. pulcherrima manii*) en Costa Rica. Madrid, España: Tesis (Doctorado) Universidad Complutense de Madrid. Disponible en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26404.pdf>
- Miller RE, Fowler ME. 2015 Fowler's zoo and wild animal medicine. 8ed. Missouri (US): Elsevier. p. 30-32.
- [MINAE] Ministerio de Ambiente y Energía [Internet]. 2005. Reglamento a Ley de Conservación de la Vida Silvestre. San José (CR): Minae.go.cr; [citado 9 de octubre del 2017]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd38/CostaRica/R32633.pdf>
- Redondo A. 2008. Evaluación del perfil sanguíneo de una población de hembras adultas de tortugas marinas (*Chelonia mydas*). Heredia, C.R.: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional.

- Roskov Y, Abucay L, Orrell T, Nicolson D, Bailly N, Kirk PM, Bourgoïn T, DeWalt RE, Decock W, De Wever A, et al. [Internet]. 2017. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life. Leiden (NL): Catalogueoflife.org/col; [actualizado el 29 de septiembre de 2017; citado el 9 de octubre de 2017]. Disponible en:
<http://www.catalogueoflife.org/col/search/all/key/Rhinoclemmys/fossil/0/match/1>
- Santillana-Segovia PR. 2012. Valores hematológicos y bioquímicos sanguíneos de la Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de la población anidante de la Playa San Diego, Departamento de La Libertad, El Salvador. Salvador: Tesis (Licenciatura) Universidad de El Salvador. pdf: <http://ri.ues.edu.sv/8957/1/19200941.pdf>
- Savage JM. 2002. The amphibians and reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas. Chicago (US): University of Chicago Press. p. 767-769
- Silvestre A. 2011. Hematología y bioquímica sanguínea en tres especies de lagartos gigantes de las islas canarias (género *Gallotia*). España: Tesis (Doctorado) Universidad Autónoma de Barcelona.
- Spinreact [Internet]. 2017. Girona (España): Spinreact. [citado el 26 de noviembre de 2017]. Disponible en:
http://www.spinreact.com/es/productos/bioquimica_clinica.html
- Stacy NI, Alleman AR, Sayler KA. 2011. Diagnostic hematology of reptiles. Clin Lab Med [Internet]. [citado 18 de febrero de 2019]; 31(1): 87-108. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.10.006>

- Uetz P, Freed P, Hošek J. 2016. The Reptile Database. Reptile-database.org; [actualizado el 15 de octubre de 2017; citado 23 de octubre de 2017]. Disponible en: http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Rhinoclemmys&species=pulcherrima&search_param=%28%28search%3D%27rhinoclemmys+pulcherrima%27%29%29
- Velásquez JC, Cartagena HN, Bolaño CR, Otero GÁ, Pacheco JC, Arias JL. 2014. Caracterización hematológica de hicoteas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. Rev Med Vet [Internet]. [citado 30 de enero de 2019]; 28:43–55. Disponible en: 10.19052/mv.3180
- Yang PY, Yu PH, Wu SH, Chie CH. 2014. Seasonal hematology and plasma biochemistry reference range values of the yellow-marginated box turtle (*Cuora flavomarginata*). J Zoo Wildlife Med [Internet]. [citado 30 de enero de 2019]; 45(2): 278–286. Disponible en: 10.1638/2013-0125r1.1

8. ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento Informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Título del Estudio	:	Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga roja (<i>Rhinoclemmys pulcherrima</i>) en condiciones de cautiverio.
Investigadores Responsables	:	Valeria Valenciano González Alexandra Corrales Quirós
Doctor Responsable	:	Dr. Randall Arguedas Porras
Unidad Académica	:	Universidad Nacional de Costa Rica
Nº de teléfonos asociados al estudio	:	8888-8662 8490-6228
Correo electrónico Investigador Responsable	:	valevg.932@gmail.com alexacorrales1@hotmail.com

El propósito de este documento es ayudarlo a tomar una decisión informada para decidir participar o no en el estudio denominado "Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio" con financiamiento de la Universidad Nacional de Costa Rica, por lo que usted no debe pagar o colaborar con dinero en esta investigación.

I.- INTRODUCCIÓN

Se está realizando una investigación en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional sobre hematología en tortugas, específicamente *Rhinoclemmys pulcherrima*, conocida popularmente como tortuga roja o Coralito que es una especie muy común en este país. Le vamos a dar información e invitar a su centro a participar de esta investigación. No tiene que decidir hoy.

Una vez que haya comprendido la investigación y si usted desea participar, entonces se le solicitará que firme esta forma de consentimiento, del cual recibirá una copia firmada y fechada.

II.- PROPÓSITO Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La protección de especies animales, en especial aquellas que podrían estar en peligro de extinción, debe basarse en investigaciones que permitan conocer adecuadamente como funciona su organismo normalmente, enfermedades y comportamiento. La importancia de realizar investigaciones en estas especies radica en promover una mejora de su salud y conservación, de forma que se evite que en un futuro puedan estar en categoría de riesgo de extinción. Además, la información que se generará, favorecerá la reducción de las consecuencias debidas al cautiverio de las tortugas continentales.

Los análisis que se realizan a partir de muestras de sangre son de importancia ya que junto con el examen clínico y la historia clínica brindan la información necesaria para la solución de muchas enfermedades.

El presente proyecto de investigación es de relevancia porque constituirá el primer estudio a nivel nacional que servirá de referencia clínica para evaluar el estado de salud de esta especie, colaborando así con su conservación. Ya que para lograr un diagnóstico adecuado es indispensable contar con valores previamente establecidos acerca de los componentes de la sangre y la forma de las células que posee, para así conocer cuando éstas se encuentren alteradas. El establecimiento de estos valores servirá como fuente de consulta para personas relacionadas con la fauna silvestre (médicos veterinarios, biólogos, docentes y estudiantes).

IV. OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo: determinar los valores normales de los diferentes componentes de la sangre de la tortuga roja, así como la forma normal de las células que la componen. Lo anterior permitirá tener valores normales de estos componentes que permitirán una mejor valoración y diagnóstico en tortugas con enfermedades en cautiverio.

V.- PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO:

Para la obtención de la muestra de sangre se podría utilizar la vena dorsal de la cola o la vena yugular dependiendo de: tamaño del animal, facilidad de manipulación y cantidad de muestra que se logre extraer. La cantidad de sangre a extraer será de máximo 1% del peso de cada tortuga, por lo tanto cada animal será pesado antes de la toma de sangre. Los machos pesan entre 441.7-546.8g, mientras que las hembras oscilan entre 888.1-1001.1g, por lo tanto si el animal a muestrear pesa 500g se podrían extraer 5ml de sangre que son equivalentes una cucharadita. Posteriormente estas muestras serán analizadas en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Universidad Nacional.

VI. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Este estudio tiene el beneficio de producir conocimiento científico para la especie estudiada ya que no hay estudios en esta área con relación a este género de tortugas. Este estudio se realiza como tesis para optar por el título de Licenciatura en Medicina Veterinaria.

VII. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio consta una extracción de sangre que puede generar estrés por manipulación en los animales. A juicio de los investigadores el estudio no implica ningún tipo de riesgo físico o psicológico para los animales.

En caso de presentarse alguna emergencia el Dr. Randall Arguedas, el cual tiene amplia experiencia con reptiles, estará siempre presente en la toma de muestras. Además, si se presentara alguna complicación podrá contactarlo por vía telefónica al 8873-7088.

IX.- TIEMPO:

Esta investigación se llevará a cabo por un lapso de un año, pudiendo realizar más de una visita a cada centro de cautiverio.

X.- VOLUNTARIEDAD

La participación de centro de cautiverio es en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede decidir participar o no en este proyecto y puede retirarse de la investigación en cualquier momento.

Usted podrá solicitar información relacionada con el proyecto de investigación en el momento que desee a las investigadoras responsables (datos presentes en la primera página).

XI.- PREGUNTAS/INFORMACIÓN:

Usted tiene derecho a clarificar todas las dudas que se le presenten, podrá solicitar información más detallada sobre la investigación o algún tema relacionado con el estudio, en el momento que desee, debe comunicarse con a las investigadoras responsables (datos presentes en la primera página).

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

Cuando ocurran cambios en las condiciones o en los procedimientos de un estudio y también en estudios de largo plazo, el investigador responsable deberá Renovar el Consentimiento.

XII. COMITÉ DE BIENESTAR ANIMAL Y SINAC:

El Comité de Bienestar Animal de la Universidad Nacional, revisó y avaló la realización de este estudio. El Comité es un grupo de personas independientes del estudio, que evalúa el cumplimiento de la normativa ética nacional e internacional y asegura la protección, la seguridad y bienestar de los animales involucrados en una investigación. Además, se cuentan con los permisos de colecta de muestras por parte del SINAC.

XIII. DERECHOS DE LOS PARTICIPANTES

He leído, comprendido y discutido la información anterior con el investigador responsable del estudio y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.

La participación de este centro en este estudio es voluntaria, podré renunciar a participar en cualquier momento, sin causa y sin responsabilidad alguna.

He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos y/o educativos.

Si durante el transcurso de la investigación me surgen dudas respecto a la investigación o sobre mi participación en el estudio, puedo contactarme con las investigadoras responsables, Srta. Valeria Valenciano González, teléfono 8888-8662, correo electrónico valevg.932@gmail.com o Srta. Alexandra Corrales Quirós, teléfono 8490-6228, correo electrónico alexacorrales1@hotmail.com.

Acepto participar en este estudio de investigación titulado "Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células

sanguíneas de la tortuga roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio" Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del responsable del centro

Fecha

Nombre del Centro de Cautiverio

Testigo 1

Fecha

Testigo 2

Fecha

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica la participación de su centro. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha

ANEXO 2. Sexo, peso y observaciones de cada individuo de la especie *R. pulcherrima*

muestreado

ID	Sexo	Peso (kg)	Observaciones	Sitio de colecta
1	H	0,834		Seno del caparazón
2	M	0,532		Seno del caparazón
3	H	1,211		Seno del caparazón
4	M	0,516		Seno del caparazón
5	H	0,952		Seno del caparazón
6	H	0,516		Seno del caparazón
7	H	1,139		Seno del caparazón
8	M	0,661		Seno del caparazón
9	M	0,594		Seno del caparazón
10	H	1,110		Seno del caparazón
11	M	0,510		Seno del caparazón
12	H	1,085		Seno del caparazón
13	H	1,146	Faltan escamas del caparazón	Seno del caparazón
14	H	0,884	Caparazón fue reparado	Seno del caparazón
15	H	1,412		Seno del caparazón
16	H	0,842	Deformación del caparazón	Seno del caparazón
17	H	1,468		Seno del caparazón
18	H	1,241	Hueco en el caparazón	Seno del caparazón
19	H	1,187		Seno del caparazón
20	H	0,757	Fractura del caparazón	Seno del caparazón
21	H	0,750		Seno del caparazón
22	H	1,336	Obesa, algunos cortes en el caparazón	Seno del caparazón
23	M	1,025		Seno del caparazón
24	H	0,885		Seno del caparazón
25	H	0,963	Lesión caparazón lado izquierdo	Seno del caparazón
26	H	1,141		Seno del caparazón
27	H	1,030		Seno del caparazón
28	H	0,752		Yugular
29	M	0,553	Miembro anterior derecho amputado	Seno del caparazón
30	H	0,920		Seno del caparazón
31	H	0,883		Seno del caparazón
32	H	0,797		Seno del caparazón

ANEXO 3. Ficha de información

Adaptado de Miller and Fowler (2015) y Chitty and Raftery 2013.

Ficha de Información**Generalidades**

Identificación: _____

Sexo: () Macho () Hembra () Desconocido

Longitud del caparazón: _____

Lugar donde se obtuvo el animal: _____

Tratamiento actual: () Si _____ () No

Observación externa:

() Presencia de lesiones Localización: _____

() Presencia de ectoparásitos _____

() Presencia de masas _____

() Presencia de descargas _____

Color membranas mucosas () Normal (rosa a rosa pálido) () Anormal

Ambiente

Tipo de recinto: () Acuático () Terrestre () Mixto

Tamaño del recinto: _____

Sustrato: _____

Temperatura: _____ °C

Humedad: _____

Luz UV o Luz Solar: () Sí () No

Alimentación

Dieta: _____

Acceso al agua: () Sí () No

ANEXO 4. Cartas de autorización del SINAC Área de Conservación Central y Área de Conservación Arenal Huetar Norte



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN CENTRAL
Reserva de Biosfera Cordillera Volcánica Central
DIRECCIÓN REGIONAL
Programa de Investigación



RESOLUCIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA N° ACC-PI-008-2018

EL MINISTERIO DEL AMBIENTE y ENERGÍA, Sistema Nacional de Áreas de Conservación, a través del ÁREA DE CONSERVACIÓN CENTRAL, a las ocho horas del día diecisiete del mes de enero del dos mil DIECIOCHO.

Resultando:

PRIMERO: Que el día veinte de diciembre del dos mil diecisiete, la señora **Valeria Valenciano González, cédula número uno, mil quinientos cincuenta y dos, quinientos seis (1015520506)**, respaldada oficialmente por la Universidad Nacional de Costa Rica, solicita permiso para realizar la investigación titulada: **"Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio"**, y a su vez solicita la emisión de la licencia de colecta científica.

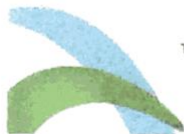
Considerando:

PRIMERO: Que la Ley Orgánica del Ambiente (Ley N°7554), Capítulo VII, en su Artículo 35, define como uno de los objetivos de las Áreas Silvestres Protegidas la promoción de la investigación científica, el estudio de los ecosistemas y su equilibrio, así como el conocimiento y las tecnologías que permitan el uso sostenible de los recursos naturales del país y su conservación.

SEGUNDO: Que la Ley de Biodiversidad (Ley N° 7788) en su Artículo 89: Fomento de programas de investigación, divulgación e información; establece que el Ministerio del Ambiente y Energía y las demás instituciones públicas y privadas fomentarán el desarrollo de programas de investigación sobre la diversidad biológica.

TERCERO: Que con fundamento en los artículos uno y tres, de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre, Ley número siete mil trescientos diecisiete del siete de diciembre de mil novecientos noventa y dos, declara que la Vida Silvestre está conformada por la Fauna Continental e Insular que vive en condiciones naturales, temporales o permanentemente en el territorio nacional y la flora que vive en condiciones naturales en el país; y que únicamente pueden ser objeto de apropiación particular y de comercio mediante las disposiciones contenidas en los tratados y convenios internacionales, en la Ley N° 7317 y su reglamento, artículos 3 y 36 al 50 y otras normativas vinculantes.

CUARTO: Que la Ley de Conservación de la Vida Silvestre (Ley N°7317), en su Artículo 2, define como **Estudio Científico:** Toda investigación que aplica el método científico; **Recolectar:** acción de recoger, cortar, capturar o separar de su medio especies orgánicas, sus productos o subproductos; **Recolecta Científica:** la captura o extracción de animales o plantas, sus productos o subproductos,



Dirección: San Miguel, Santo Domingo de Heredia
Tel. (506)2268-8091 / 2268-8087 • Fax: (506)2268-8096 • Apdo.: 11384-1000 San José, Costa Rica
www.sinac.go.cr





con fines de estudio científico; **Recolecta Cultural:** la captura o extracción de animales o plantas, sus productos o subproductos, con fines educativos **Vida Silvestre:** conjunto de la fauna continental e insular que vive en condiciones naturales, temporales o permanentes y de la flora que vive en condiciones naturales en el territorio nacional.

QUINTO: Que la **Ley de Conservación de la Vida Silvestre (Ley N°7317)**, en su Artículo 7, expresa que el Ministerio del Ambiente y Energía, tiene como competencia, entre otros, el *promover y ejecutar investigaciones en el campo de la Vida Silvestre.*

SEXTO: Que la **Ley de Conservación de la Vida Silvestre (Ley No 7317)**, en sus Artículos 3, 4, 5 y los Artículos del 36 al 51, faculta al Ministerio del Ambiente y Energía para otorgar *permisos de investigación científica, otorgar licencias por recolecta científica, a establecer los requisitos por trámites y procedimientos para otorgar dichos permisos, a inscribir y registrar las investigaciones y a otorgar permisos de importación y exportación de flora y fauna, entre otros.*

SÉTIMO: Que según la Ley N° 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre, en el artículo 6 establece que la Dirección General de Vida Silvestre es el órgano competente en materia de planificación, desarrollo y control de la flora y la fauna silvestre.

OCTAVO: Que el **Reglamento de Investigaciones de los Parques Nacionales (Decreto Ejecutivo 12329-A)**, actualmente bajo administración del Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC), en sus considerandos establece: *a) que la investigación es uno de los fines fundamentales para preservar y proteger áreas naturales y juega un papel muy importante en la elaboración de los planes de manejo de los parques nacionales y áreas afines, así como para los avances de la ciencia en el área de los recursos naturales. b) que la investigación en los Parques puede resultar favorecida por la coordinación de sus funcionarios con organismos o personales especializadas. c) que tienen prioridad las investigaciones que ayuden a comprender y conocer mejor los recursos de los Parques con el fin de manejarlos en forma correcta.*

NOVENO: Que la **Estrategia Nacional de Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad**, establece dentro de sus políticas: el impulso a las investigaciones dirigidas a conocer el estado de las especies y ecosistemas de interés particular para la conservación.

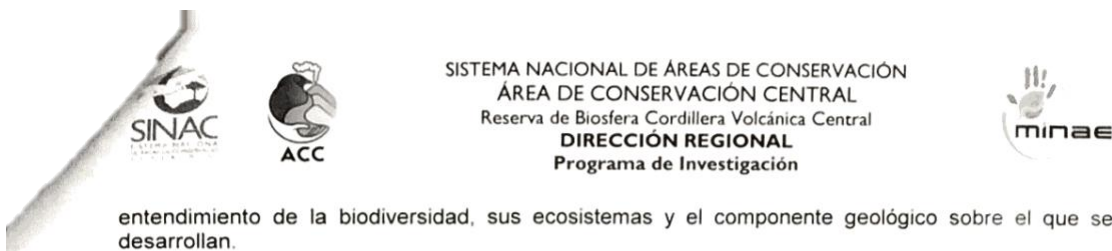
DÉCIMO: Que las **Políticas para las Áreas Silvestres Protegidas** establecen que se debe: *• fomentar el desarrollo de la investigación básica y aplicada dentro de las áreas silvestres protegidas, de acuerdo con las necesidades identificadas por la institución; • autorizar aquellas investigaciones que se realicen en las áreas silvestres protegidas de conformidad con lo que establece la legislación vigente, la reglamentación interna del Área de Conservación y las prioridades de investigación identificadas por las áreas silvestres protegidas.*

DÉCIMO PRIMERO: Que el **Área de Conservación Central (ACC)**, tiene como uno de sus principios básicos la *coordinación, promoción, participación y facilitación del desarrollo de investigaciones básicas y aplicadas e inventarios de biodiversidad* que contribuyan a incrementar el conocimiento y



Dirección: San Miguel, Santo Domingo de Heredia
Tel. (506)2268-8091 / 2268-8087 • Fax: (506)2268-8096 • Apdo.: 11384-1000 San José, Costa Rica
www.sinac.go.cr





entendimiento de la biodiversidad, sus ecosistemas y el componente geológico sobre el que se desarrollan.

DÉCIMO SEGUNDO: Que el **Area de Conservación Central** ha establecido un **Programa de Investigación** que tiene como objetivo hacer del ACC, un sitio de estudios científicos de primer orden, muy amigable a los usuarios y en donde los procesos científicos y la información obtenida, sirvan de eje central para su biodesarrollo y conservación a perpetuidad de la biodiversidad que se restaura y conserva en las 150.000 hectáreas terrestres de área silvestre protegida.

DÉCIMO TERCERO: Que el proyecto **"Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio"** es considerado de interés por cumplir con los objetivos de las estrategias de biodiversidad e investigación y con los fines que persigue el ACC de ampliar el conocimiento de sus especies, ecosistemas, recursos geológicos y culturales.

DÉCIMO CUARTO: Que en el Manual de Procedimientos para realizar Investigación en Biodiversidad y Recursos Culturales en las Áreas de Conservación, establecido por el *Comité Técnico de Investigación del SINAC* (decreto ejecutivo N°28993-MINAE) y oficializado por el SINAC (oficios SINAC-DG-147 y DG-149, del 2002 y por el decreto ejecutivo N°32553-MINAE) se establece como función de los encargados de los Programas de Investigación, entre otras, las siguientes: a) *Tramitar, evaluar y resolver los proyectos de investigación que se presenten ante su oficina regional, para realizar estudios científicos en su área de conservación.* b) *Elaborar las resoluciones respectivas y otorgar el pasaporte científico (licencia de recolecta científica).* c) *Recibir y analizar toda solicitud de permiso de investigación que se presente ante su oficina regional, para realizar estudios científicos en su área de conservación.* d) *Establecer acuerdos de Transferencia de Material cuando sea considerado necesario por la naturaleza de la investigación.*

DÉCIMO QUINTO: Que el día veinte de diciembre del dos mil diecisiete, la señora **Valeria Valenciano González, cédula número uno, mil quinientos cincuenta y dos, quinientos seis (1015520506)**, en calidad de investigador principal, cumplió con los requisitos de inscripción de investigaciones y recolecta científica establecidos en la Ley de Conservación de la Vida Silvestre (Ley N° 7317) y su reglamento; con lo estipulado en el Manual de Procedimientos del SINAC y con lo solicitado por el Programa de Investigación del ACC, para desarrollar su investigación titulada: **"Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio"**, por lo que lo procedente es aprobar este permiso.



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
 ÁREA DE CONSERVACIÓN CENTRAL
 Reserva de Biosfera Cordillera Volcánica Central
DIRECCIÓN REGIONAL
 Programa de Investigación



Por tanto
 El Licenciado Renato Sánchez González, Director a.i.
 Área de Conservación Central
RESUELVE:

PRIMERO: APROBAR EL PERMISO DE INVESTIGACIÓN a la señora Valeria Valenciano González, cédula número uno, mil quinientos cincuenta y dos, quinientos seis (1015520506), quien solicitó permiso para realizar la investigación titulada "Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio".

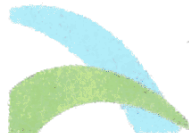
SEGUNDO: APROBAR LA LICENCIA DE COLECTA CIENTÍFICA a la señora Valeria Valenciano González, cédula número uno, mil quinientos cincuenta y dos, quinientos seis (1015520506), en calidad de investigador principal, y a Alexandra Corrales Quirós, cédula número uno, mil cuatrocientos doce, doscientos cincuenta y ocho (1014120258), en calidad de co-investigador, para la colecta permanente de:

Un máximo de 60 muestras de sangre de *Rhinoclemmys pulcherrima* (Tortuga Roja).
 Las muestras serán trasladadas al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

TERCERO: Este permiso es otorgado con los siguientes objetivos: (1) Determinar los parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de tortugas *R. pulcherrima* adultas y clínicamente sanas en condiciones de cautiverio en centros de rescate de Costa Rica.

CUARTO: Este permiso es válido únicamente para el Área de Conservación Central, específicamente en el Centro de Rescate de Vida Silvestre Tropical ZooAve, Refugio Herpetológico de Costa Rica, Tortufauna y Parque Zoológico y Jardín Botánico Nacional Simón Bolívar y no faculta para hacer la investigación o recolectar en otras áreas de protección estatal o fincas particulares sin el respectivo permiso de quien está legalmente autorizado para otorgarlo.

QUINTO: El Sistema Nacional de Áreas de Conservación y el Área de Conservación Central autoriza los métodos de recolecta científica enumerados en el reglamento de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre (Ley 7317) y los métodos autorizados en el Manual de Procedimientos del SINAC, así como aquellos que de previo hayan sido avalados por el Programa de Investigación.



Dirección: San Miguel, Santo Domingo de Heredia
 Tel. (506)2268-8091 / 2268-8087 • Fax: (506)2268-8096 • Apdo.: 11384-1000 San José, Costa Rica
www.sinac.go.cr





SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
 ÁREA DE CONSERVACIÓN CENTRAL
 Reserva de Biosfera Cordillera Volcánica Central
DIRECCIÓN REGIONAL
 Programa de Investigación



SEXTO: El Área de Conservación Central se reserva el derecho de cancelar este permiso sin responsabilidad alguna para el Estado, cuando se compruebe que se ha incumplido el mismo o se han variado las actividades sin haber informado y obtenido autorización previa del Programa de Investigación.

SÉTIMO: El Investigador no puede ceder ni en modo alguno traspasar el permiso, pues el mismo es intransferible.

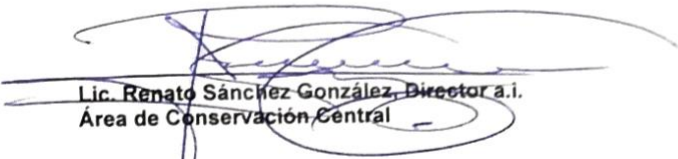
OCTAVO: El Investigador deberá permitir a los funcionarios del Área de Conservación Central la verificación de las actividades cuando sea requerido y a acatar sus disposiciones cuando le sea indicado.

NOVENO: El investigador se compromete a mantener informados al Programa de Investigación y al ACC sobre el desarrollo de su investigación y se compromete a presentar un informe de colecta científica el primero de marzo del dos mil diecinueve (01/03/2019) y un informe de resultados finales el primero de mayo del dos mil diecinueve (01/05/2019). Los informes deben seguir como mínimo lo indicado en la "Guía para la elaboración de informes finales y de colecta del SINAC".

DÉCIMO: El Área de Conservación Central y el Programa de Investigación salvan la responsabilidad sobre cualquier accidente o situación que afecte y/o ponga en peligro la integridad de las personas (investigador, asistentes, acompañantes) que participan en el desarrollo de las actividades de la investigación tanto en laboratorio como en el campo.

DÉCIMO PRIMERO: Este permiso rige a partir del día **primero de febrero del dos mil dieciocho (01/02/2018)** hasta el día **primero de febrero del dos mil diecinueve (01/02/2019)**.

DÉCIMO SEGUNDO: Notifíquese.


Lic. Renato Sánchez González, Director a.i.
Área de Conservación Central

C: Jorge Hernández B, Programa de Investigaciones ACC
 Lourdes Vargas F, Gestor de Investigaciones Secretaría Ejecutiva SINAC

Dirección: San Miguel, Santo Domingo de Heredia
 Tel. (506)2268-8091 / 2268-8087 • Fax: (506)2268-8096 • Apdo.: 11384-1000 San José, Costa Rica
www.sinac.go.cr





SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN ARENAL HUETAR NORTE
DIRECCIÓN REGIONAL



RESOLUCIÓN SINAC-ACAHN-PI-R-004-2018

El Sistema Nacional de Áreas de Conservación y el Área de Conservación Arenal Huetar Norte a través de las facultades y competencias del Director Regional a.i., al ser las catorce horas del día siete de febrero del dos mil dieciocho.

RESULTANDO:

PRIMERO: Que el día treinta de noviembre del año dos mil diecisiete, la oficina de la Secretaría Ejecutiva del Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) recibe la solicitud de permiso de investigación y colecta científica, la investigadora principal **VALERIA VALENCIANO GONZALEZ**, nacionalidad costarricense, estudiante de medicina veterinaria de la Universidad Nacional, cédula de identidad número 115520506; la cual solicita permiso para desarrollar la investigación con fines académicos titulada *"Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga roja (Rhinoclemmys pulcherrima)"*.

SEGUNDO: Que la investigadora principal presentó documento del proyecto, formulario de solicitud, copia de curriculum, cédula de identidad, fotografías, carta respaldo de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA). Además solicita se incluya a Alexandra Corrales Quirós cédula 114120258 en calidad de co-investigadora.

TERCERO: Que el día siete de febrero del dos mil dieciocho, la funcionaria Sandra Díaz Alvarado, encargada del Programa de Investigación del Área de Conservación Arenal Huetar Norte, presentó oficio SINAC-ACAHN-PI-05-2018; donde se informa del análisis previo y recomienda se autorice.

CUARTO: Que de conformidad con el criterio del ente técnico competente sea la Secretaría Técnica Nacional Ambiental (SETENA), según acuerdo ACP-70-2015 adoptado en la Sesión Ordinaria N° 088-2015-SETENA de la Comisión Plenaria de la Secretaría Técnica Nacional Ambiental del 23 de junio de 2015, la evaluación de impacto ambiental no resulta de aplicación para los permisos de funcionamiento para centros de rescate, mariposarios, acuarios, herbarios, museos naturales, bancos de germoplasma y exhibiciones que impliquen construcciones menores a 300 metros cuadrados o que no impliquen nuevas construcciones, así como los viveros artesanales comerciales, los permisos de investigación, las licencias de caza de subsistencia y las licencias de colecta científica o académica, los permisos de importación y de exportación presuponiendo que los establecimientos respectivos de procedencia o de destino de los especímenes si cuentan con una EIA, los permisos para desarrollar actividades relacionadas con costumbres comunitarias y por ende los mismos quedaron exentos del trámite





SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN ARENAL HUETAR NORTE
DIRECCIÓN REGIONAL



referente a la evaluación de impacto ambiental establecido en el numeral 26 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre N° 7317.

CONSIDERANDO:

PRIMERO: Que la Ley de Conservación de la Vida Silvestre N° 7317, del treinta de octubre de mil novecientos noventa y dos y sus reformas, en los artículos 1 y 3, establece que: *"La vida silvestre está conformada por el conjunto de organismos que viven en condiciones naturales, temporales o permanentes en el territorio nacional..."* que *"Se declara de dominio público la fauna silvestre que constituye un recurso natural renovable.... De interés público la flora silvestre..."* y que únicamente pueden ser objeto de apropiación particular y de comercio mediante las disposiciones contenidas en los tratados públicos, en los convenios internacionales y en la Ley N° 7317 y su reglamento, artículos 3 y del 36 al 50 y otras normativas vinculantes.

SEGUNDO: Que según la Ley N° 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en el artículo 6, establece que el Sistema Nacional de Áreas de Conservación del Ministerio de Ambiente y Energía es el órgano competente en materia de planificación, desarrollo y control de la vida silvestre, en igual sentido dicha competencia se encuentra establecida en el artículo 22 de la Ley de Biodiversidad N° 7788.

TERCERO: Que según la Ley N° 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en el artículo 7, inciso e) establece que el Sistema Nacional de Áreas de Conservación del Ministerio de Ambiente y Energía tiene entre sus competencias el promover y ejecutar investigaciones en el campo de la vida silvestre.

CUARTO: Que según la Ley N° 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en los artículos 40 al 49, faculta al SINAC para dar permisos de investigación así como rechazar cualquier solicitud contraria al interés público y fiscalizar la ejecución de estas actividades.

QUINTO: Que la Ley N° 4594, Depósito de duplicados de Material Zoológico, Botánico o Mineral en la UCR y el Museo Nacional, del primero de julio del año mil novecientos setenta, en su artículo 1 indica que *"todo científico o institución que personalmente o en representación, recoja material botánico, zoológico o mineral con fines taxonómicos, en cualquier zona o lugar del territorio nacional, tiene la obligación de dejar duplicados de sus colecciones a la Universidad de Costa Rica y al Museo Nacional. La Universidad de Costa Rica y el Museo Nacional, conjuntamente, pueden exonerar al científico o institución de que se trata, de la obligación a que se refiere el párrafo anterior, tomando en consideración motivos calificados que le impidan dejar esos duplicados."*





SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN ARENAL HUETAR NORTE
DIRECCIÓN REGIONAL



SEXTO: Que el Decreto Ejecutivo N° 12329-A, Reglamento de Investigaciones del Servicio de Parques Nacionales, del 6 de marzo de 1981, establece lo referente a las investigaciones en los parques nacionales y áreas afines administradas por el Servicio de Parques Nacionales.

SETIMO: Que de conformidad con el criterio del ente técnico competente sea la Secretaría Técnica Nacional Ambiental (SETENA), según acuerdo ACP-70-2015 adoptado en la Sesión Ordinaria N° 088-2015-SETENA de la Comisión Plenaria de la Secretaría Técnica Nacional Ambiental del 23 de junio de 2015, la evaluación de impacto ambiental no resulta de aplicación para los permisos de funcionamiento para centros de rescate, mariposarios, acuarios, herbarios, museos naturales, bancos de germoplasma y exhibiciones que impliquen construcciones menores a 300 metros cuadrados o que no impliquen nuevas construcciones, así como los viveros artesanales comerciales, los permisos de investigación, las licencias de caza de subsistencia y las licencias de colecta científica o académica, los permisos de importación y de exportación presuponiendo que los establecimientos respectivos de procedencia o de destino de los especímenes si cuentan con una EIA, los permisos para desarrollar actividades relacionadas con costumbres comunitarias y por ende los mismos quedaron exentos del trámite referente a la evaluación de impacto ambiental establecido en el numeral 26 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre N° 7317, según el acuerdo previamente citado.

OCTAVO: Que el solicitante **VALERIA VALENCIANO GONZALEZ** cumplió con los requisitos de inscripción de investigaciones y colecta científica establecidos en la Ley N° 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre, sus reformas y su reglamento.

POR TANTO

EL DIRECTOR REGIONAL A.I. DEL AREA DE CONSERVACIÓN ARENAL HUETAR NORTE

RESUELVE:

PRIMERO: Aprobar la solicitud de la investigadora principal **VALERIA VALENCIANO GONZALEZ** e inscribir la investigación científica con fines académicos titulada "**Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio**".

SEGUNDO: Anotar en el Pasaporte Científico N°02961 a nombre de Valeria Valenciano González, investigadora principal; y en el Pasaporte Científico N°02962 a nombre de Alexandra Corrales Quirós en calidad de co-investigadora; quienes están autorizadas según el permiso de investigación y colecta científica del proyecto titulado "**Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio**".



Dirección: Alajuela, San Carlos, Quesada 150 metros Norte y 250 metros Este del Hospital San Carlos.
Teléfono: (506)2460.06.20 • Fax: (506)2460.06.44 • Apdo.: 71384-1000 San José, Costa Rica
www.sinac.go.cr



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN ARENAL HUETAR NORTE
DIRECCIÓN REGIONAL



TERCERO: Se autoriza la captura y liberación de sesenta tortugas *Rhinoclemmys pulcherrima* en cautiverio, que se ubica en el Área de Conservación Arenal Huetar Norte (ACAHN), según se detalla:

Nombre de la especie	<i>Rhinoclemmys pulcherrima</i>
Lugar	Centro de Vida Silvestre Snake Garden en La Virgen de Sarapiquí, Heredia.
Cantidad a coleccionar por especie	60 tortugas se autoriza para sacar muestras de sangre

Este permiso no faculta para coleccionar en fincas privadas ni en territorios indígenas, sin el respectivo permiso del propietario registral o de quien está legalmente autorizado para otorgarlo.

CUARTO: Los objetivos de la investigación son: Determinar los parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de tortugas *Rhinoclemmys Pulcherrima* adultas y clínicamente sanas en condiciones de cautiverio en centros de rescate de Costa Rica.

Los objetivos específicos señalan: a) Establecer los valores hematológicos y bioquímicos de referencia para la población nacional de *Rhinoclemmys pulcherrima* en cautiverio. b) Establecer la morfología celular sanguínea normal de *R. pulcherrima* y representarla a manera de atlas de imágenes. c) Elaborar una referencia rápida de fácil interpretación acerca de parámetros sanguíneos y morfología celular para centros de rescate o de cautiverio de la tortuga roja.

QUINTO: Métodos: Se incluirán individuos de al menos cuatro centros de cautiverio (zoológico, herpetológico, centro de rescate y centro de exhibición). Los puntos de muestreo se ubican en la región Central y en la región Huetar Norte. El tipo de estudio a realizar, consiste en un estudio transversal de tipo descriptivo cuyo propósito es determinar los valores hematológicos, valores de bioquímica sérica normal y morfología celular sanguínea de la especie de tortuga continental *R. pulcherrima* en condiciones de cautiverio. a) Población a estudiar: Una población de al menos 60 tortugas de la especie *R. pulcherrima*. Se seleccionarán tanto hembras como machos, ambos adultos determinados mediante la longitud recta espalдар tomada desde el borde anterior del escudo nuchal hasta el borde posterior del escudo supracaudal, a nivel de la línea media longitudinal del espalдар; teniendo esta medición un rango entre 13.4-14.4cm en machos y 16.3-17.0cm en hembras (Merchan-Fornelino 2003).

b) Recolección de muestras y almacenamiento: Para el manejo, inspección y toma de muestra se recomienda el uso de guantes al manipular los animales, así como lavarse muy bien las manos.

4/7

Dirección: Alajuela, San Carlos, Quesada 150 metros Norte y 255 metros Este del Hospital San Carlos.
Teléfono: (506)2460.06.29 • Fax: (506)2460.06.44 • Apdo.: 11384-1008 San José, Costa Rica
www.sinac.go.cr





SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN ARENAL HUETAR NORTE
DIRECCIÓN REGIONAL



las uñas y el antebrazo posteriormente. Para la obtención de la muestra de sangre se podría utilizar la vena coccígea dorsal o la vena yugular dependiendo de: tamaño del animal, facilidad de manipulación y cantidad de muestra que se logre extraer. Es posible obtener un volumen máximo del 1% de su peso corporal (Campbell and Ellis 2007; Chitty and Raftery 2013). Para el montaje de la hematología y química clínica se trabajará con sangre colectada en tubos de heparina. Además, se realizará el frotis con sangre sin anticoagular inmediatamente después de la colecta de sangre, para evitar así la interferencia de los anticoagulantes durante el análisis (Fallis 2013). Para el sangrado de las tortugas se utilizará el equipo básico de jeringa y aguja calibre 22G o 23G nuevos para cada animal. El procedimiento de toma de muestra se deberá realizar por dos personas, una que realice la sujeción adecuada y otra que extraiga la muestra de sangre en el mínimo tiempo posible para evitar causar estrés al animal. Aquellos animales a los que no se les logre extraer un volumen suficiente de sangre, se muestrearán en una segunda visita. Las muestras recolectadas se almacenarán en tubos heparinizados. Una vez que se pasa la muestra al tubo esta se mezclará gentilmente y se colocarán en posición vertical en un contenedor a 4°C, teniendo en cuenta que el hielo no debe tocar directamente el tubo. Cada muestra y frotis serán debidamente identificados con una etiqueta (lugar, hora, identificación del animal, sexo, número de muestra). Cada número de muestra se deberá correlacionar con un número de ficha de información. Esta ficha consistirá en preguntas sencillas y rápidas que permitan obtener información acerca del hábitat, condiciones ambientales, nutrición y bienestar animal de cada quelonio muestreado.

c) Procesamiento de muestras: Se determinará hematocrito, hemoglobina, conteo de leucocitos, proteínas totales (fraccionadas), glucosa, colesterol, ácido úrico, nitrógeno ureico, calcio, fósforo, AST, cloruro, sodio y potasio. Para la determinación del hematocrito, hemoglobina y conteo de leucocitos se utilizará la técnica de Natt y Herrick (Martínez-Silvestre et al. 2011). El cómputo y diferencial de leucocitos se realizará según el protocolo establecido en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, mismo que funge como laboratorio de referencia a nivel nacional (Meneses-Guevara and Bouza-Mora 2014). Para la observación morfológica se utilizará la tinción MayGrünwald-Giemsa en un microscopio de luz (Meneses-Guevara and Bouza-Mora 2014). Para la química sanguínea se empleará un equipo marca Spinreact modelo Spin 200E (España) cuyo principio es el de fotometría de absorción y turbidimetría. Los reactivos se utilizarán de acuerdo a la casa matriz y según el protocolo del Laboratorio de Análisis Clínicos (Spinreact 2017).

d) Destino de las muestras: Laboratorio de Análisis Clínico, Universidad Nacional de Costa Rica.

SEXTO: El Sistema Nacional de Áreas de Conservación únicamente autorizará los métodos de colecta científica enumerados en el reglamento de la Ley 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre.

SETIMO: Cuando los especímenes obtenidos mediante recolecta científica o cultural se destinen a instituciones extranjeras, el Sistema Nacional de Áreas de Conservación, exigirá

517

Dirección: Alajuela, San Carlos, Quesada 150 metros Norte y 250 metros Este del Hospital San Carlos.
Teléfono: (506)2460.00.26 • Fax: (506)2460.66.44 • Apdo.: 11384-1000 San José, Costa Rica
www.sinac.go.cr





SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN ARENAL HUETAR NORTE
DIRECCIÓN REGIONAL



antes de otorgar el permiso de exportación con fines científicos o culturales, la entrega de ejemplares idénticos para el Museo Nacional y a la Universidad de Costa Rica, para los jardines botánicos y los zoológicos estatales, única y exclusivamente (Artículo 46 Ley N°7317). Así, también se exigirá la devolución de los especímenes colectados (vivos o muertos) al Museo de Zoología de la UCR).

OCTAVO: Este permiso de investigación no autoriza al permisionario a utilizar los recursos biológicos descritos en la clausula TERCERO para fines de acceso a la información genética o bioquímica de dichos recursos. Si así fuere, este permiso no tendría validez y en tal caso el interesado deberá tramitar su solicitud de permiso de acceso por vía separada, en cumplimiento de la legislación nacional respectiva.

NOVENO: El presente permiso no autoriza la comercialización de plantas o animales ni subproductos de estos.

DECIMO: El Sistema Nacional de Áreas de Conservación se reserva el derecho de cancelar este permiso sin responsabilidad alguna para el Estado, cuando se compruebe que se ha incumplido con los términos y condiciones en él estipulados.

DECIMO PRIMERO: El permisionario no puede ceder ni en modo alguno enajenar el permiso, pues el mismo es intransferible. Del mismo modo, cuando el investigador principal desee incluir co-investigadores o asistentes de investigación para este permiso, deberá solicitarlo por escrito al Área de Conservación Arenal Huetar Norte del Sistema Nacional de Áreas de Conservación, con al menos 8 días de antelación.

DECIMO SEGUNDO: El permisionario deberá permitir a los funcionarios (as) del Sistema Nacional de Áreas de Conservación, el ingreso al lugar donde se realizará el acceso o al lugar donde se realiza la investigación. El permisionario deberá rendir un informe final en la fecha siete de marzo del dos mil diecinueve (07-03-2019), como lo establece la Ley de Conservación de la Vida Silvestre N° 7317 y su Reglamento, decreto Ejecutivo 32633-MINAE y el Manual para realizar investigaciones en biodiversidad y en recursos culturales. El incumplimiento de este requisito será sancionado con la imposibilidad, para los científicos en forma personal o para la institución que representa, de obtener nuevas autorizaciones, de estudios o investigaciones, hasta por un periodo de dos años.

Con el fin de asegurar la adecuada transferencia de los conocimientos derivados de este proyecto de investigación hacia las comunidades locales, el permisionario deberá desarrollar alguna iniciativa para la divulgación de los resultados hacia las comunidades localizadas.

DECIMO TERCERO: El permisionario deberá enviar una copia del informe final y de todas las





SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN ARENAL HUETAR NORTE
DIRECCIÓN REGIONAL



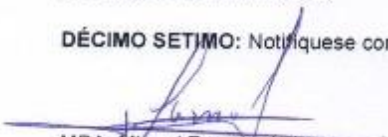
publicaciones que se generen a raíz del presente permiso de investigación a la Biblioteca Nacional y otra copia al Área de Conservación Arenal Huetar Norte.

DECIMO CUARTO: Este permiso rige a partir del día siete de febrero del año dos mil dieciocho (07-02-2018), hasta el día siete de febrero del año dos mil diecinueve (07-02-2019), pudiendo solicitarse un nuevo permiso para el mismo proyecto, desde treinta días antes de su vencimiento.

DECIMO QUINTO: De comprobarse el incumplimiento parcial o total de alguno de los términos y condiciones establecidos en la presente resolución o a la Ley de Conservación de la Vida Silvestre N° 7317 y su reglamento, se procederá a cancelar el permiso, con las consecuencias administrativas, civiles y penales que consecuentemente se deriven y se interpondrá sin mayor demora la denuncia penal o administrativa ante la autoridad correspondiente.

DECIMO SEXTO: Contra la presente resolución proceden los recursos ordinarios de revocatoria y / o apelación, de conformidad con los artículos 343 y siguientes de la Ley General de la Administración Pública, los cuales serán resueltos, el de revocatoria por el mismo órgano que lo dictó y el de apelación por el Consejo Nacional de Áreas de Conservación. Los recursos deberán interponerse ante el órgano que dicta ésta resolución dentro de los tres días tratándose de acto final y de veinticuatro horas en los demás casos, contados, en ambos casos, posteriores a su notificación.

DÉCIMO SETIMO: Notifíquese contra la presente al fax 2460-06-44.


MBA. Miguel Zamora Araya
Director Regional a.i.
Área de Conservación Arenal Huetar Norte
Sistema Nacional de Áreas de Conservación
ACAHN-SINAC



ANEXO 5. Aprobación por parte de la Comisión de Bioética y Bienestar Animal de la Escuela



UNA
UNIVERSIDAD NACIONAL
COSTA RICA

Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria
Comité de Bioética y Bienestar Animal
Tel. 2562-4565/2562-4569

8 de febrero de 2018
UNA- EMV- CBBA-ACUE-001-2018

DIRECCION EMV-UNA
12 FEB 18 AM 10:44

RECIBE: *[Signature]*

RECIBE: *[Signature]*

Dra. Nancy Astorga Miranda
Directora
Escuela de Medicina Veterinaria

45 Estimada señora:

Para su información y efectos consiguientes, me permito transcribir el acuerdo tomado por la Comisión de Bioética y Bienestar Animal, en la Sesión Ordinaria N°001-2018, celebrada el 2 de febrero de 2018, que dice:

Considerando

1. Que una vez revisado y analizado el proyecto titulado: **"Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio"**.
2. Que el mismo estará a cargo de las estudiantes Alexandra Corrales Quirós y Valeria Valenciano González.
3. Que el proyecto arriba enumerado todos los participantes se comprometen a guardar el bienestar animal de todos los animales objeto del estudio.
4. Asimismo, el proyecto cumple los requisitos que se emanan de la Ley 7451 "Bienestar de los Animales".
5. Que este proyecto cuenta con cuatro votos a favor.

POR LO TANTO, SE ACUERDA:

1. **AVALAR EL PROYECTO TITULADO: "DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICA SANGUÍNEA Y MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE LA TORTUGA ROJA (*RHINOCEMMYS PULCHERRIMA*) EN CONDICIONES DE CAUTIVERIO", PRESENTADO POR LAS ESTUDIANTES ALEXANDRA CORRALES QUIRÓS Y VALERIA VALENCIANO GONZÁLEZ.**

ACUERDO FIRME

Atentamente,



Dra. Sandra Estrada König
Coordinadora
Comité de Bioética y Bienestar Animal
Escuela de Medicina Veterinaria



C: Est. Alexandra Corrales Quirós
Est. Valeria Valenciano González.
Dr. Mario Baldí Salas
Dr. Julio César Rojas Ocampo
Dr. Mauricio Jiménez Soto

Tel. (506) 2277-3000
Apartado 88-3000
Heredia
Costa Rica
www.una.ac.cr

INSTITUCIÓN BENEMÉRITA DE LA EDUCACIÓN, LA TECNOLOGÍA, LA CIENCIA Y LA CULTURA COSTARRICENSE • LEY 9187

ANEXO 6. Guía de referencia rápida de parámetros sanguíneos de la tortuga roja



Hematología y bioquímica sanguínea

Rhinoclemmys pulcherrima

Valores sanguíneos Tortuga Roja (*Rhinoclemmys pulcherrima*)

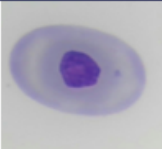
Hematología	Rango
Hematocito (%)	10 – 29
Hemoglobina (g/dL)	2.7 – 7.4
CHCM (g/dL)	23 – 42
C. Leucocitos (µL)	645 – 8096
Heterófilos (µL)	261 – 3643
Linfocitos (µL)	101 – 2992
Monocitos (µL)	13 – 1619
Basófilos (µL)	0 – 360
Eosinófilos (µL)	0 – 812
Bioquímica	Rango
Glucosa (mg/dL)	2 – 53
Colesterol (mg/dL)	77 – 353
BUN (mg/dL)	1 – 35
Calcio (mg/dL)	9 – 42
Fósforo (mg/dL)	2 – 32
Proteínas Totales (g/dL)	2.1 – 8.6
Albúmina (g/dL)	0.8 – 4.3
Globulinas (g/dL)	1.6 – 5.3
Ácido úrico (mg/dL)	0.06 – 1.8
AST (UI/L)	14 – 356
CK (UI/L)	117 – 1745
Sodio (mmol/L)	35 – 144
Potasio (mmol/L)	0.2 – 7.1
Cloruro (mmol/L)	32 – 404

Tinción May Grünwald-Giemsa, microscopio Olympus CX33, objetivo 100X, muestreo Agosto/Noviembre.

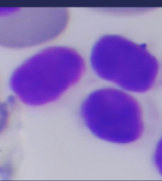


Descripción Morfológica Celular

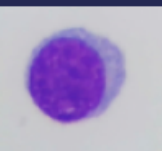
Eritrocito
Tamaño: 19.261 µm x 11.999 µm
Forma: oval
 Abundante citoplasma con núcleo central redondeado u ovalado.



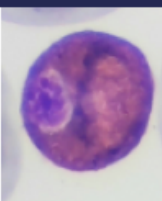
Trombocito
Tamaño: 8.990 µm x 6.752 µm
Forma: oval o redondo
 Difícilmente se logra observar su citoplasma, su núcleo es grande y se pueden observar en grupos.



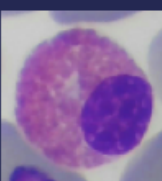
Linfocito
Tamaño: 9.671 µm x 8.455 µm
Forma: redondo
 Núcleo grande con un halo basófilo de citoplasma alrededor.



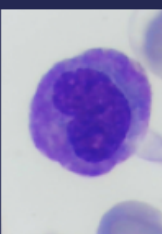
Heterófilo
Tamaño: 16.219 µm x 14.555 µm
Forma: redondo
 Núcleo es excéntrico, con citoplasma abundante cubierto con gránulos eosinofílicos (material amorfo).



Eosinófilo
Tamaño: 15.762 µm x 13.864 µm
Forma: redondo
 Citoplasma abundante con múltiples gránulos anaranjados, y núcleo en la periferia.



Monocito
Tamaño: 13.963 µm x 12.484 µm
Forma: redondo a irregular
 Núcleo polimórfico con un citoplasma abundante, granulado, de color basofílico o grisáceo que puede presentar vacuolas.



Basófilo
Tamaño: 11.015 µm x 10.365 µm
Forma: redondo
 Citoplasma es basofílico con gránulos morado oscuro que cubren incluso el núcleo.

