

## CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DEL *Caiman crocodilus crocodilus* EN VIDA SILVESTRE

### *Ultrastructural Characteristics of Blood Cells of Caiman crocodilus crocodilus in Wildlife*

Mario Rossini V.<sup>\*,1</sup>, Goyismery Cáceres<sup>\*\*</sup>, Eva Velasquez<sup>\*\*,\*\*\*</sup> y Gisela García,<sup>\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Laboratorio de Patología Clínica, Cátedra de Patología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Apartado 4563/2110 A, Maracay, estado Aragua, Venezuela. <sup>\*\*</sup>Estudiante graduado del Postgrado de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV. <sup>\*\*\*</sup>Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua, Departamento Clínico Integral, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela, <sup>\*\*\*\*</sup>Cátedra de Histología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV.

**Correo-E:mario.rossini@ucv.ve**

Recibido: 30/04/18 - Aprobado: 03/10/18

#### RESUMEN

Es conocido el interés económico del *Caiman crocodilus crocodilus*, pero el estudio de la sangre de estos reptiles cobra gran importancia, porque pudiera aportar información diagnóstica, al contener algunos elementos activos con potencial terapéutico. En este estudio se determinaron las características ultraestructurales de las células sanguíneas de la especie *Caiman crocodilus crocodilus*. Se usaron 20 ejemplares en vida silvestre clínicamente sanos, de ambos sexos, provenientes de las localidades de Guayabal y Altagracia de Orituco del estado Guárico. A cada animal se le extrajeron 5 mL de sangre periférica de la vena coccígea caudal y se colocaron en tubos con EDTA. Se realizó un análisis ultraestructural de las diferentes líneas celulares, mediante microscopía electrónica de transmisión. Los resultados evidenciaron eritrocitos elipsoidales y alargados, con un citoplasma electrón-denso y homogéneo; con espacio perinuclear que bordeaba al núcleo, y mitocondrias cerca de esa banda perinuclear. El núcleo era polimórfico, con heterocromatina densa. Los heterófilos tenían forma esférica, con presencia de pseudópodos o prolongaciones citoplasmáticas, con gránulos polimórficos de diferentes tamaños y electrón-densidades y núcleo excéntrico o periférico.

#### ABSTRACT

The economic interest of the spectacle caiman (*Caiman crocodilus crocodilus*) is known, but the study of the blood cells (BC) of these reptiles is very important, because it could provide diagnostic information, since the BC contain some active elements with therapeutic potential. In this investigation, twenty clinically healthy wild life spectacle caimans (SC) of both sexes, from the localities of Guayabal and Altagracia de Orituco, in the State of Guárico, Venezuela, were subjected to an ultrastructural analysis of their BC. To each animal, 5 ml of peripheral blood was withdrawn from the coccygeal vein and placed in tubes with EDTA. The analysis was carried out using transmission electron microscopy. The results showed the presence of ellipsoidal and elongated erythrocytes, with an electron-dense and homogenous cytoplasm, with perinuclear space that bordered the nucleus and mitochondria near that perinuclear band. The nucleus was polymorphic, with dense heterochromatin. The heterophiles were spherical, with pseudopods or cytoplasmic processes and polymorphic granules of different sizes and electron densities, and eccentric or peripheral nucleus. The eosinophils

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

Los eosinófilos eran esféricos, con prolongaciones citoplasmáticas poco desarrolladas y núcleo lenticular excéntrico; su citoplasma contenía gránulos esféricos u ovals voluminosos con diferente electrón-densidad. Los linfocitos eran pequeños, polimorfos, con citoplasma escaso y abundantes mitocondrias, presentaban núcleo prominente con escasa heterocromatina, abundante eucromatina y poros nucleares. Los trombocitos eran elípticos con citoplasma abundante hacia sus polos, presentando vesículas electrón-lúcida del sistema canalicular y microtúbulos; su núcleo exhibía una muesca o hendidura acentuada y no se observaron poros nucleares. No se observaron basófilos. Se concluye que existen diferencias morfológicas y ultraestructurales entre las células sanguíneas de la especie *Caiman crocodilus crocodilus* y las otras especies ya estudiadas, mostrando indicios de posibles rutas metabólicas que utilizan estas células, permitiéndoles ser más longevas que en otros animales.

**(Palabras clave:** *Caiman crocodilus*, ultraestructura, células sanguíneas, animales silvestres)

were spherical, with poorly developed cytoplasmic processes and an eccentric lenticular nucleus; their cytoplasm contained spherical or oval bulky granules with different electron-density. The lymphocytes were small, polymorphic, with scarce cytoplasm and rich in mitochondria, had a prominent nucleus with sparse heterochromatin, plentiful euchromatin, and nuclear pores. The Thrombocytes were elliptical with abundant cytoplasm towards their poles, presenting electron-lucid vesicles of the canalicular system and microtubules; their nucleus exhibited a sharp indentation or groove and no nuclear pores or basophiles were observed. It is concluded that there are morphological and ultrastructural differences among BC of the *Caiman crocodilus crocodilus*, and the other species already studied, showing signs of possible metabolic pathways that these cells use, allowing them to be longer lived than in other animals.

**(Key words:** *Caiman crocodilus*, ultrastructure, blood cells, wild animals)

## INTRODUCCIÓN

El *Caiman crocodilus*, es una especie restringida al Geotrópico, cuya distribución se extiende desde el sur de México hasta el norte de Bolivia, centro de Brasil y noroeste de Argentina. Adicionalmente está presente en Cuba, Puerto Rico y Estados Unidos (Florida) donde fue introducido y se ha convertido en una amenaza para la fauna nativa [1]. En Venezuela, la baba *Caiman crocodilus crocodilus*, se encuentra en la cuenca del río Orinoco y lago de Valencia, y extendiéndose hasta el pie de monte andino, los llanos orientales, centrales y occidentales, extremo sur del país y delta del Orinoco [2]. El crecimiento del valor económico de esta especie, así como estudios filogenéticos, despertaron interés en investigaciones por estos animales [3]. Se han reportado estudios realizados por diferentes autores [4-6], en los cuales describieron los valores hematológicos, química sanguínea y la morfología celular del *Caiman crocodilus crocodilus*. A partir de esos datos, ha sido posible identificar las variaciones cuantitativas y cualitativas de cada tipo de célula sanguínea, la

capacidad de respuesta medular ante la demanda de eritrocitos y de leucocitos; las causas posibles de las anemias y de las alteraciones leucocitarias [6]. La evaluación morfológica celular aporta mucha información diagnóstica y es importante determinar los tipos y la morfología eritrocitaria, leucocitaria y trombocítica.

En relación con el estudio ultraestructural sobre los elementos figurados de la sangre de reptiles, se destacan los trabajos realizados en leucocitos de reptiles, aves y anfibios, en los cuales se observaron algunas características ultraestructurales de los gránulos de los heterófilos (neutrófilos) y eosinófilos en los vertebrados referidos, comparando con los gránulos encontrados en esos mismos tipos celulares en mamíferos, incluyendo el hombre [7].

Estudios realizados sobre los aspectos morfológicos, citoquímicos y funcionales en células de sangre periférica de cocodrilos Americanos jóvenes y saludables, específicamente el *Alligator mississippiensis*, obtuvieron como resultados que la descripción morfológica de las células sanguínea, teñidas con Wright - Giemsa generalmente correspondieron

a las de sus contrapartes con otros reptiles; aves y mamíferos [8].

Otras investigaciones han contribuido de manera importante en el estudio sobre los aspectos ultraestructurales de trombocitos, eosinófilos y heterófilos del *Caiman crocodilus yacare*, obteniendo como resultado que los trombocitos son de forma elíptica, poseen citoplasma abundante solo en los polos y su núcleo presenta surcos profundos o hendiduras acentuadas, mostrando algunos poros en su envoltura. Su citoplasma contiene abundantes túbulos y vesículas electrón-lúcidas del sistema canalicular, observándose vacuolas con cuerpos densos y microtúbulos. Los heterófilos poseen forma aproximadamente esférica y núcleo excéntrico o periférico. Su citoplasma esta repleto de gránulos polimórficos en forma de huso, oval o esférica, con superficie irregular [9], también se realizaron estudios de las características citoquímicas morfológicas y ultraestructurales de eosinófilos en *Caiman crocodilus yacare*, que revelaron mediante la tinción con solución de Rosenfeld para el análisis morfológico y microscopía electrónica, la presencia de núcleo excéntrico redondeado, oval o lobulado con nucléolo prominente. El citoplasma de los eosinófilos es ocupado por gránulos eosinófilos evidentes [10].

La crianza en cautiverio de la baba *Caiman crocodilus crocodilus* ha acumulado gran cantidad de experiencia empírica acerca de las costumbres y las necesidades nutricionales y sanitarias de esta especie; pero en el momento de enfrentar un brote de enfermedad y adaptación a los cambios climáticos no se cuenta con los conocimientos necesarios acerca de la morfología y la fisiología de esta. Adicional al creciente interés económico del *Caiman crocodilus crocodilus* existe un especial interés científico sobre la sangre de estos reptiles, al contener algunos elementos activos con potencial terapéutico en biomedicina [11]. El conocimiento sobre la morfología ultraestructural de los elementos formes de la sangre del *Caiman crocodilus crocodilus* es de fundamental importancia como contribución a los clínicos veterinarios que se dedican a la asistencia de esos animales en vida silvestre, en criaderos comerciales y/o en otras condiciones de cautiverio; formando parte de los primeros estudios a realizar, para el conocimiento básico de la células sanguíneas, que posteriormente podrían ser utilizados en trabajos futuros. Es por ello, que el objetivo de esta investigación fue el de

determinar las características ultraestructurales de las células sanguíneas de la baba *Caiman crocodilus crocodilus*, en su ambiente natural.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Población**

Para la toma de muestras sanguíneas se utilizaron 20 animales (12 machos y 8 hembras) en vida silvestre. Cada animal fue evaluado clínicamente, verificando que no hubiese pérdida de peso por traumatismos o enfermedad; el sexaje se realizó por el método de palpación [12]. Se tomaron animales con una longitud que osciló entre 1,00 y 1,60 metros. y con una edad aproximada entre 2 y 5 años para asegurar la captura de animales adultos. Los animales en estudio fueron sacados de lagunas pertenecientes a fundos ubicados en los llanos centrales del estado Guárico (07° 38' 36", 10° 01' 47" de latitud norte y 64° 46' 07", 68° 00' 53" de longitud Oeste), Venezuela.

### **Muestras de sangre**

Estos animales fueron inmovilizados, restringidos manualmente para realizar la toma de muestras de sangre de la vena coccígea caudal en la línea media a través del 4<sup>to</sup> espacio interescamoso, inmediatamente por detrás del área genital [13, 14]. Se utilizó una jeringa de 5 mL y agujas de calibre 18 de 1½ pulgadas de longitud, (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA), y rápidamente transvasados a un tubo con EDTA (*Becton, Dickinson and Company*); los tubos fueron refrigerados (5-8°C) y transportados al laboratorio de Patología Clínica y luego al Centro de Microscopía Electrónica Dr. Humberto Fernández Morán, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV, donde se realizó su procedimiento y posterior estudio.

### **Microscopía Electrónica**

Para el desarrollo de esta técnica las muestras de sangre fueron llevadas a una centrífuga (Marca Adams Dynac CT 1300, EUA) y sometidas a 2.000 rpm por 10 min, para obtener la parte celular [15], la cual fue inmediatamente fijada con glutaraldehído al 2% a una osmolaridad de 320 mOsm, lavado con buffer fosfato a 4°C, y tetróxido de osmio al 1%. Lavado con agua destilada, tres pasos de 15 min cada uno a 4°C, precontrastado con acetato de uranilo en

agua a 4 °C, durante 15 min; con deshidratación en alcoholes crecientes (50, 70, 95 y 100 %) con pases de 15 min cada uno a 4 °C. Infiltración y embebimiento con óxido de propileno, dos cambios de 15 min. Luego, se utilizó una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica con una proporción de 1:1, dejándolo por 24 h a temperatura ambiente. Inclusión con resina epóxica durante 48 h en una estufa a 60°C, usando moldes para la polimerización de la resina y confección de los bloques.

Luego, se procedió al tallado del bloque para obtener una superficie en forma de pirámide y poder realizar el corte del tejido en el ultramicrotomo (Marca *Porter Blum* MT 2, EUA), a un grosor de 1-1,5  $\mu\text{m}$ , montado en láminas portaobjeto y coloreado con azul de toluidina al 2%, en bórax al 2% luego se observó al microscopio de luz (*Carl Zeiss*, Alemania).

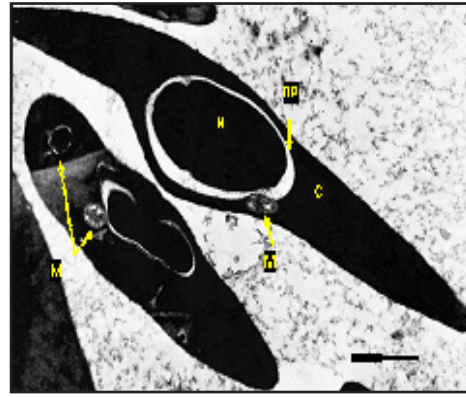
Se realizaron cortes ultrafinos (60-90 nm de espesor) y se colocaron en rejillas de cobre de 400 mesh, se contrastó colocando en un vidrio de reloj unas gotas de acetato de uranilo, durante 30 min. La misma técnica fue realizada con un segundo contrastante (citrato de plomo). Posteriormente, se lavó con agua destilada. [16].

Las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión marca Hitachi, modelo H-500, con un voltaje de aceleración de 104 Kv, efectuando la toma fotográfica del campo a objeto de llevar a cabo la posterior interpretación de las micrografías.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los eritrocitos, son células elipsoidales y alargadas, ultraestructuralmente, exhiben un citoplasma electrón-denso y homogéneo; también se evidenció la presencia de una envoltura nuclear que bordea al núcleo en su totalidad que puede medir entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  de ancho, observándose la presencia de mitocondrias cerca de la envoltura nuclear; el núcleo presenta un polimorfismo que va desde una forma ovalada, redonda o irregular con una heterocromatina densa (Figura 1).

Cabe destacar, que ultraestructuralmente las mitocondrias observadas con forma redondeada cerca de la envoltura nuclear, posiblemente se deba a que estas células utilizan ácidos grasos para llevar a cabo la función de oxidación de metabolitos (beta-



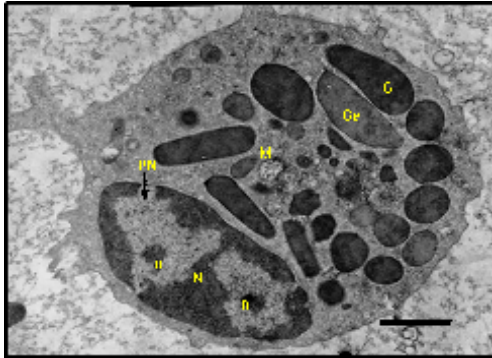
**Figura 1.** Micrografía Electrónica de Eritrocito de *Caiman crocodilus crocodilus*. Nótese la presencia de citoplasma (C), mitocondria (M), banda perinuclear (BP) y núcleo (N). Aumento 20.000 X. Barra 3  $\mu\text{m}$

oxidación de ácidos grasos) y la obtención de ATP. También se observó que estas células presentan un citoplasma muy electrondenso que posiblemente se deba a la gran cantidad de hemoglobina presente.

Es importante enfatizar que la presencia de células inmaduras eritrocíticas en sangre periférica se encontró en cantidades bajas (menos de 10 células por campo), lo cual es considerado normal en esta especie al igual que en otros reptiles como la Iguana Iguana reportado por [17], *Alligator mississippiensis* reportado por [8], en baba *Caiman crocodilus crocodilus* [4], y en la *Chelonia mydas* [18]. Este hallazgo podría ser un indicio de la ausencia de una barrera hematopoyética entre la médula ósea y la sangre periférica; indicando que esta especie, así como otros reptiles, presentan una médula ósea menos activa en comparación con los mamíferos en condiciones normales debido a que los diferentes estadios de maduración de los hematíes se completan en sangre periférica, lo que podría justificar que los eritrocitos de los poiquiloterms tienen una vida media mucho más larga que la de los homeoterms y que están relacionados probablemente con la longevidad de los ejemplares [19].

Los Heterófilos, son células que ultraestructuralmente que muestran una membrana celular delgada e irregular con prolongaciones citoplasmáticas que asemejan a pseudópodos con citoplasma abundante y escaso retículo endoplasmático granular; se evidenciaron abundantes gránulos de diferente electrondensidades, rodeados por una delgada membrana; con forma redondeada y fusiforme, y de diferentes tamaños, pequeños y grandes; observándose también la presencia de mitocondrias. El núcleo con forma lenticular se

encuentra excéntricamente ubicado con la presencia de poros en su membrana, con heterocromatina ubicada muy próxima a la membrana interna de la envoltura nuclear y eucromatina central con presencia de nucléolos (Figura 2).

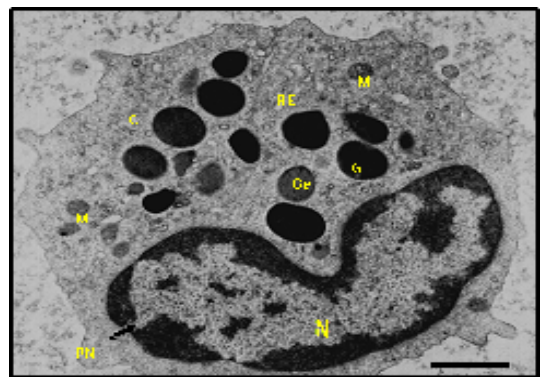


**Figura 2.** Micrografía Electrónica de Heterófilo de *Caiman crocodilus crocodilus*. Nótese la presencia de citoplasma (C); gránulos citoplasmáticos electrodensos (G); gránulos electrolúcidos (Ge); mitocondria (M); núcleo (N); nucléolos (n) y poros nucleares (PN). Aumento 20.000 X. Barra 3 µm

Ultraestructuralmente en los heterófilos se observó la presencia de una membrana celular delgada y polimorfismo granular presente en su citoplasma. Estos gránulos citoplasmáticos se encuentran envueltos en una membrana, mostrando una variación de electrondensidades, hallazgo similar fue reportado en el *Caiman crocodilus yacare* [9]. En la micrografía electrónica se evidenció la presencia de vacuolas en el citoplasma por lo que se estima que estarían relacionados con el almacenaje, transporte y la digestión de productos y residuos celulares. La presencia complejos de poro en su envoltura nuclear demuestra que estas estructuras permiten el transporte de moléculas solubles en agua a través de la envoltura nuclear, de ARNm desde el núcleo al citoplasma.

En los eosinófilos, se observó una membrana celular que exhibe prolongaciones citoplasmáticas, pseudópodos poco desarrollados, cortos y delgados. En el citoplasma se presentan gránulos esféricos de distribución irregular, con electrondensidades diversas y tamaños homogéneos; a diferencia de lo observado en los heterófilos; sin embargo, algunos presentan una estructura interna constituida por material finamente granular, a diferencia de los mamíferos los cuales presentan en su interior una porción central cristaloides rodeado por una matriz de proteínas que contienen a las enzimas fosfatasa ácida, glucuronidasa y catepsinas. Tal descripción es semejante a las

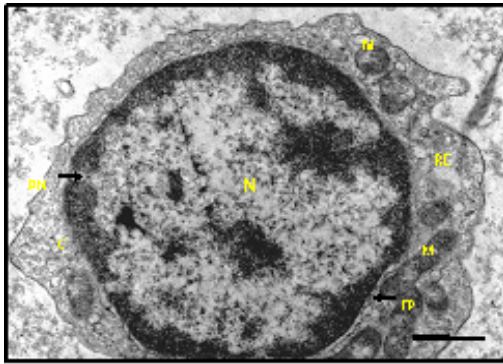
características encontradas en el *Alligator mississippiensis* por Mateo *et al.* [8]; *Caiman crocodilus yacare* por [10], y *Gallotia simonyi* [20]. También estos hallazgos en *Caiman crocodilus crocodilus* coinciden con los resultados descritos [21], para los eosinófilos de aves domésticas, cuyas diferencias consisten solamente en el patrón de distribución irregular de los gránulos y la presencia de material flocular en algunos de ellos. También, se observó retículo endoplasmático y ribosomas libres además de mitocondrias en el citoplasma; un núcleo prominente que va desde una forma amorfa a lenticular con una heterocromatina que limita con la membrana nuclear interna y una eucromatina que se encuentra en el centro del núcleo, no se evidenció la presencia de nucléolos. Al igual que en los heterófilos ya descrito, la presencia de complejo de poro en la envoltura nuclear está relacionado con el paso de sustancias entre el núcleo y el citoplasma (Figura 3).



**Figura 3.** Micrografía Electrónica de Eosinófilo de *Caiman crocodilus crocodilus*. Nótese la presencia de citoplasma (C); gránulos citoplasmático electrodensos (G) gránulos electrolúcidos (Ge); mitocondrias (M); núcleo (N) y poros nucleares (PN). Aumento 20.000 X. Barra 3 µm

En los linfocitos, se pudo observar una membrana plasmática, amorfa y al igual que en las células anteriores, exhiben proyecciones citoplasmáticas, con escaso citoplasma, con pequeñas cantidades de retículo endoplasmático granular; también presenta numerosas mitocondrias de diferentes formas y tamaños. En el núcleo, se visualizó la presencia de complejos de poros, y una delgada heterocromatina desde su membrana nuclear interna, transformándose en eucromatina hacia el centro del núcleo (Figura 4).

Estas células constituyen un 20% en esta especie en sangre periférica, según estudios reportado por Rossini [4]. Los linfocitos son las células más pequeñas en esta



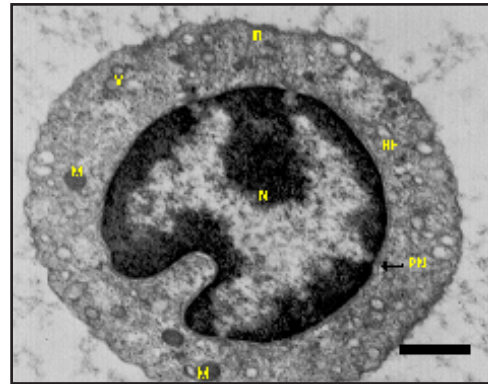
**Figura 4.** Micrografía Electrónica de Linfocito de *Caiman crocodilus crocodilus*. Nótese el citoplasma con mitocondrias (M), retículos endoplasmático granular (RE); espacio perinuclear (EP); núcleo (N) con presencia de poros nucleares (PN). Aumento 20.000 X. Barra 3 µm

especie, se caracterizan por presentar polimorfismo, sin embargo, no existen variaciones de tamaño a diferencia de algunas especies de reptiles como el *Gallotia simonyi* [20]. Al igual que en el *Caiman crocodilus yacare* [22], en *Alligator mississippiensis* [8], y en *Chelonia mydas* [18], presentan unos pequeños gránulos azurófilos muy finos en su citoplasma. Estas células tienen similitud con los trombocitos en cuanto a su tamaño, pero con un núcleo que exhibe una cromatina ligeramente condensada característica que también difiere de los mamíferos, ya que estas presentan un núcleo fuertemente condensado.

Es importante destacar que los basófilos no fueron observados en los cortes analizados, debido a la escasa cantidad circulante de este tipo de células en el *Caiman crocodilus crocodilus* en vida silvestre.

Los trombocitos predominantemente presentan una forma redonda o elíptica; sin embargo, al igual que el *Caiman crocodilus yacare* [22] y el *Gallotia simonyi* [20], el citoplasma es poco voluminoso, siendo generalmente más abundante en los polos, donde se observó un área poco electrón-densa y de aspecto homogéneo. Principalmente alrededor del núcleo, se observaron pocas vesículas electrónlúcidas del sistema canalicular. Se evidencian microtúbulos cerca de la membrana celular, que parecen contribuir al mantenimiento de la forma celular, mitocondrias y retículo endoplasmático granular. La presencia de mitocondrias, al igual que en los linfocitos, estarían relacionadas con la demanda energética que estas células presentan para llevar a cabo sus funciones fagocíticas y hemostáticas. El núcleo irregular con membrana nuclear, presenta surcos profundos con una heterocromatina gruesa, homogénea y una pequeña porción de eucromatina en el centro del

mismo. La heterocromatina, es condensada con mayor electrón-densidad condensada en la superficie interna de la envoltura nuclear, circundando áreas de eucromatina localizadas centralmente (Figura 5).



**Figura 5.** Micrografía Electrónica de Trombocito de *Caiman crocodilus crocodilus*. Nótese el citoplasma con vesículas del sistema canalicular (v), microtúbulos (m); mitocondrias (M); retículo endoplasmático (RE); mitocondrias (M); núcleo (N); poro nuclear (PN). Aumento 20.000 X. Barra 3 µm

## CONCLUSIONES

En nuestro país, se han venido realizando estudios cuantitativos y morfológicos de las células sanguíneas de la baba *Caiman crocodilus crocodilus*. La presente investigación nos permitió conocer las características ultraestructurales de cada célula, lo que servirá de referencia a los fines diagnóstico, pronóstico y de evaluación de tratamientos en el caso de zoonosis, zoológicos y animales que eventualmente pudiesen mostrar alteraciones provenientes del hábitat natural. Estos resultados también permitirán realizar inferencia sobre sus posibles funciones y darán paso a nuevos trabajos sobre la descripciones funcionales de las células de la especie *Caiman crocodilus crocodilus*.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado parcialmente por los proyectos N° 11-10-3453-98, PG-11-8159-2011-1 y ayuda menor N° 11.233.2001 otorgados por el CDCH-UCV; agradeciendo también a los dueños y a todo el personal de los fundos visitados, igualmente a todo el personal técnico y obrero de la Cátedra de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la UCV. Y especialmente al Centro de Microscopía Electrónica Dr. Humberto Fernández Morán, por todo el apoyo.

## CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores mencionan no tener conflictos de intereses.

## APORTE DE LOS AUTORES AL TRABAJO

MR, GC, EV y GG: Fase de campo; MR, GC y EV: Procesamiento en el Laboratorio y diagnóstico microscópico; MR y GG: Análisis de los resultados y MR, GC, EV y GG: redacción del manuscrito.

## REFERENCIAS

- [1] Thorbjarnarson J. Crocodiles, an action plan for their Conservation. IUCN/SSC Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland. 1992; 136 p.
- [2] Medem F. Los Crocodylia de Sur América. Vol. II. Instituto de Ciencias Naturales, Museo de Historia Natural y Colciencias. Bogotá, Colombia. 1983; 270 p.
- [3] Hickman C, Roberts L, Keen S, L'Anson H, Larson, A. Principios integrales en Zoología. Decimocuarta edición. Mcgraw-Hill Interamericana, Madrid, España; 2009; 34 p.
- [4] Rossini M. Determinación de los parámetros hematológicos de la baba (*Caiman crocodilus*) en hábitat silvestre. En: Anales del XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Argentina; 2004. 78 p.
- [5] Rossini M, García, G. Descripción Morfológica de las Células Sanguíneas de la Baba (*Caiman crocodilus crocodilus*) en Vida Silvestre. Rev Fac Cs Vets UCV. 2010; 51(2):63-70.
- [6] Rossini M, García G, Rojas J, Zerpa H. Hematology and Serum Biochemistry Reference Range Values of Wild Spectacled Caiman, (*Caiman crocodilus crocodilus*), From the Venezuelan Plain. Vet Clin Pathol. 2011; 40(3):374-79.
- [7] Kelényi G, Nemeth A. Comparative histochemistry and electron microscopy of the eosinophil leucocytes of vertebrates. I. A study of avian, reptile, amphibian and fish leucocytes. Acta Biol Acad Sci Hung. 1969; 20(4): 405-22.
- [8] Mateo M, Roberts E, Enright F. Morphologic, cytochemical, and functional studies of peripheral blood cells of young healthy American alligators (*Alligator mississippiensis*). Am J Vet Res. 1984; 45(5):1046-53.
- [9] Moura W, Oliveira L, Matushima E, Egami M. Ultrastructural Observations of thrombocytes, heterophils and eosinophils in *Caiman crocodilus yacare*. In: I Encontro Nacional de PósGraduação em Áreas da Biologia Estrutural, Campinas/Brasil, 1997. Braz J morphol Sci. 14(1): Brasilia, 1997;117 p.
- [10] Oliveira L, Moura W, Matushima E, Egami M. Características citoquímicas morfológicas y ultraestructurales de eosinofilos de *Caiman crocodilus yacare*. Rev Chil Anat. 1998; 16(2): 245-254.
- [11] Groombridge B. The IUCN Amphibia- Reptilia Red Data Book. IUCN. Gland, Suiza; 1982; 426 p.
- [12] Girling S. Basic reptile and amphibian anatomy and physiology. In: Girling S. Veterinary Nursing of Exotic Pets. Blackwell Publishing Company, 2121 State Avenue, Ames, Iowa, USA; 2003; pp.103-126.
- [13] Martínez O. Diseño y operación de zocriaderos abiertos de babas (*Caiman crocodilus crocodilus*) en Venezuela. Zocriaderos. 1996; 1(2):11-20.
- [14] Raskin R. Reptilian Complete Blood Count. In: Laboratory medicine Avian and exotic Pets. W. B. Saunders. Philadelphia, USA. 2000; pp. 193-204.
- [15] Anderson D. A method of preparing peripheral leucocytes for electron microscopy. J Ultrastruc Res. 1965; 13:263-268.
- [16] Finol H. Contribución al estudio Ultraestructural del Musculo Esquelético Enfermo (trabajo de ascenso para optar a la categoría de profesor titular). Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela. 1986.
- [17] Acuña M. Hematología normal de *Iguana iguana* (Linne, 1758) Aspectos citomorfológicos y comparaciones intraespecíficas. Caribbean J of Science. 1975; 15: 1-2.
- [18] Montilla A, Hernández J, Alvarado M. Valores hematológicos de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) presente en la alta guajira. Rev Cient FCV-LUZ. 2006; 16(3):219-26.
- [19] Velásquez E, Rossini M, Barrios E. Caracterización histológica e histoquímica de la médula ósea de la baba (*Caiman crocodilus crocodilus*) en hábitat silvestre. Revista saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 2017; 29:139-151.
- [20] Martínez S, Rodríguez M, Mateo J, Pastor J, Marco I, Lavín S, Cuenca,. Comparative haematology of blood chemistry of endangered lizards (*Gallotias species*) in de Canary Islands. Vet Rec. 2004; 135: 266-69.
- [21] Maxwell M, Trejo F. The Ultrastructure of white blood cells and thrombo-cytes of the domestic fowl. Brit Vet J. 1970; 126:583-82.
- [22] Moura W, Matushima E, Oliveira L, Egami M. Aspectos morfológicos y citoquímicos dos glóbulos sangüíneos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodylia). Braz J Vet Res Anim Sci. 1999; 36(1):45-50.