

UCH-FC
MAG-B
R 934
C 2

"ADAPTACIONES HEMATOLOGICAS DE ANUROS A LAS ALTURAS ANDINAS"

GRICELDA RUIZ VALENZUELA

Profesor Patrocinante: Mario Rosenmann A.

SANTIAGO, Enero

1986

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N
T E S I S D E M A G I S T E R

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la can
didata:

GRICELDA RUIZ VALENZUELA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Cien
cias Biológicas.

Patrocinante de Tesis:

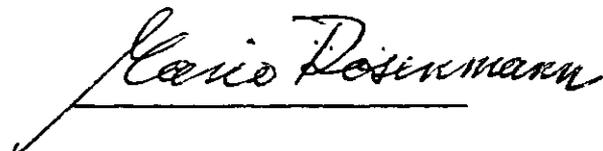
Dr. Mario Rosenmann A.

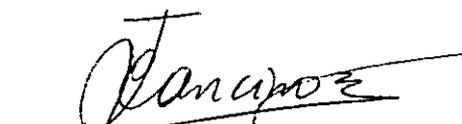
Comisión Informante de Tesis:

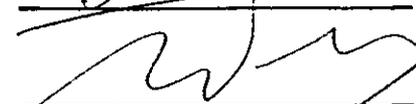
Dr. Juan Cancino C.

Dr. Alberto Veloso M.

Prof. Fernando Zambrano B.









A Juan y Lucía

AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de esta tesis, muchas personas me han brindado su generosa ayuda, vayan para todas ellas mis más sinceros reconocimientos. En especial a mi tutor Dr. Mario Rosenmann quien ha guiado este trabajo; a los Dres. Alberto Veloso, Nelson Díaz, Irma Northland y Ramón Formas quienes han contribuido con material de estudio; a Francisco Bozinovič por su colaboración en el estudio de *C. caudiverbera*; a los Dres. Sergio Iturri y Fernando Zambrano por su apoyo en aspectos metodológicos; al Dr. José Valencia por identificar algunas especies; al Dr. Lafayette Eaton por su ayuda en el tratamiento estadístico y finalmente, a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido al desarrollo de este trabajo.

INDICE DE MATERIAS

| | Pág. |
|--------------------------|------|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| INDICE DE MATERIAS | iii |
| LISTA DE TABLAS | iv |
| LISTA DE FIGURAS | vi |
| RESUMEN | x |
| ABSTRACT | xiv |
| | |
| INTRODUCCION | 1 |
| MATERIAL Y METODOS | 13 |
| RESULTADOS | 24 |
| DISCUSION | 58 |
| CONCLUSIONES | 102 |
| REFERENCIAS | 105 |

LISTA DE TABLAS

| | | pág. |
|-------------|--|------|
| TABLA N° 1. | Números correlativos de las especies y altitud del lugar de <u>colec</u> ta | 14 |
| TABLA N° 2 | Distribución altitudinal máxima de cada especie | 15 |
| TABLA N° 3 | Diámetro mayor del eritrocito de cada especie | 27 |
| TABLA N° 4 | Diámetro menor del eritrocito de cada especie | 29 |
| TABLA N° 5 | Superficie del eritrocito de ca- da especie | 32 |
| TABLA N° 6 | Volumen corpuscular medio del eritrocito de cada especie | 36 |

| | pág. |
|-------------|--|
| TABLA N° 7 | Número de eritrocitos por mm ³ de sangre de cada especie 40 |
| TABLA N° 8 | Hematocrito de cada especie 43 |
| TABLA N° 9 | Concentración de hemoglobina en la sangre (g%) en cada especie 47 |
| TABLA N° 10 | Hemoglobina corpuscular media en cada especie 49 |
| TABLA N° 11 | Concentración de hemoglobina cor puscular media en cada especie 51 |
| TABLA N° 12 | Valores hematológicos en <i>Bufo</i> <i>spinulosus</i> de diversas altitudes 56 |

LISTA DE FIGURAS

| | pág. |
|--|------|
| FIGURA 1. Diámetro mayor del eritrocito versus tamaño corporal en <u><i>Gu</i></u> <i>diverbera caudiverbera</i> | 26 |
| FIGURA 2. Relación interespecífica entre la superficie de los eritrocitos y su volumen corpuscular medio | 34 |
| FIGURA 3. Correlación logarítmica entre el volumen corpuscular medio para cada especie y su <u>distribución</u> altitudinal máxima | 38 |
| FIGURA 4. Correlación entre el número de eritrocitos por mm ³ de sangre y la distribución altitudinal máxima de cada especie | 41 |

| | pág. |
|--|------|
| FIGURA 5. Correlación entre el hematocrito y la distribución altitudinal má- xima de cada especie | 45 |
| FIGURA 6. Frecuencias acumuladas de los diá- metros mayores de los eritrocitos de <i>Bufo spinulosus</i> provenientes de 200, 2700, 3200 y 4300 metros..... | 54 |
| FIGURA 7. Relación interespecífica entre la forma del eritrocito (excentricidad) y su volumen corpuscular medio | 70 |
| FIGURA 8. Relación interespecífica entre la concentración de hemoglobina g % y el hematocrito | 73 |
| FIGURA 9. Relación interespecífica entre el número de eritrocitos por mm ³ de san- gre y el volumen corpuscular medio ... | 81 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 10. Correlación entre la concentración de hemoglobina en la sangre (g%) y la distribución altitudinal máxima de cada especie. | 83 |
| FIGURA 11. Relación interespecífica entre el número de eritrocitos y la concentración de hemoglobinas (g%) en la sangre | 86 |
| FIGURA 12. Relación interespecífica entre la concentración de hemoglobina en la sangre y la hemoglobina corpuscular media | 88 |
| FIGURA 13. Correlación entre la hemoglobina corpuscular media y la distribución altitudinal máxima de cada especie | 90 |
| FIGURA 14. Relación interespecífica entre el volumen corpuscular medio y la hemoglobina corpuscular media. | 92 |

FIGURA 15. Relaciones interespecíficas entre
la concentración de hemoglobina
corpuscular media y el volumen corp
puscular medio 97

FIGURA 16. Correlación entre la concentración
de hemoglobina corpuscular media y
la distribución altitudinal máxima
de cada especie 99

RESUMEN

La adaptación de los animales a las altas altitudes puede involucrar uno o más pasos en la cadena de transporte de oxígeno desde el ambiente hasta su utilización final en los tejidos, por ejemplo: superficies respiratorias, tamaño del corazón, concentración de hemoglobina, número de eritrocitos, densidad capilar, etc. Sin embargo, en este mismo marco, estudios realizados en mamíferos parecen indicar que roedores nativos de altas altitudes no se caracterizan por poseer hematocritos o concentraciones de hemoglobina mayores que las especies nativas de bajas altitudes. En reptiles la correlación entre altitud y parámetros hematológicos parece cumplirse en ciertas especies, pero no en otras. El objetivo central de esta Tesis es la búsqueda de características hematológicas que pudiesen ser consideradas como adaptaciones a la alta altitud en anuros.

Con este propósito, hemos trabajado en 21 especies que representan los 2/3 de los anuros de Chile y que se distribuyen en un gradiente altitudinal que va desde el

nivel del mar hasta casi 5000 metros de altura.

Entre las características hematológicas de las especies estudiadas que se correlacionan con la distribución altitudinal resalta en primer lugar el pequeño tamaño de los eritrocitos. Esta característica se evidencia tanto en las dimensiones lineales como en el volumen del glóbulo rojo. El diámetro mayor promedio del eritrocito de nuestras especies de alta altitud (16.2 μm) difiere significativamente del de las especies de altitudes menores a 3000 metros (20.1 μm), $p < 0.001$.

Paralelamente, el volumen promedio de los eritrocitos de las especies de alta altitud (392 μm^3) es significativamente menor ($p < 0.05$) que el de los de baja altitud (527 μm^3), y resultan ser los más pequeños entre los anfibios hasta ahora conocidos. La ventaja de poseer eritrocitos de pequeño tamaño está probablemente asociada a una mayor superficie relativa, lo que debiese facilitar el intercambio de gases.

Además de las características morfológicas, el número de eritrocitos circulantes (N) 713.000 vs 415.000 por

mm³ de sangre y la concentración de hemoglobina en la sangre (Hb) 9.0 vs 5.5%, son significativamente más altos ($p < 0.01$) en las especies de alta altitud. La concentración de hemoglobina en la sangre de los anuros de alta altitud está entre los valores más altos descritos en anfi-bios.

A pesar de las diferencias en N y Hb, los hematocritos promedio de las especies de alta y de baja altitud (28 vs 21%) no son significativamente diferentes ($p > 0.05$), aunque las especies de alta altitud muestran cierta tendencia a los valores altos.

La baja correlación entre el hematocrito y altitud se debe probablemente a que en las especies de alta altitud se compensa el mayor número de eritrocitos, con una disminución en el tamaño celular; por otra parte, el escaso número de eritrocitos de los anuros de zonas bajas es también compensado con un mayor volumen.

La cantidad de hemoglobina de los eritrocitos (MCH) no está correlacionada con la presencia altitudinal de los anuros estudiados. Dada la marcada diferencia

en los tamaños celulares, la baja correlación entre MCH y la distribución altitudinal, puede ser atribuida en gran medida a una concentración de hemoglobina corpuscular (MCHC) distinta en ambos grupos. Efectivamente, el valor de MCHC en las especies de altura (31%) es significativamente mayor ($p < 0.01$) que en los de baja altitud (27.4%). Este hecho adquiere consecuencias importantes al calcular la capacidad de saturación de oxígeno de un volumen dado de eritrocitos en ambos grupos. En promedio, las especies andinas superan la capacidad de transporte de oxígeno de los anuros de baja altitud en un 14% y en los extremos del rango de distribución esta diferencia alcanza a un 57%.

Finalmente, excluyendo la variable altitudinal, los resultados obtenidos permiten obtener una serie de relaciones cuantitativas entre diversos parámetros hematológicos (Hct, Hb, N, MCV, etc.), cuyo valor predictivo puede ser de gran utilidad en el campo de la fisiología comparada de vertebrados.

ABSTRACT

Adaptation to high altitude involves one or more steps in the transport chain of oxygen from the surrounding atmosphere to its final utilization in the tissues v.g., respiratory surface, relative heart size, hemoglobin concentration, number of red cells, degree of vascularization, etc. In this frame, studies conducted in mammals have failed to show higher hemoglobin concentration or higher hematocrits in high altitude rodents compared with low altitude species. In reptiles, the correlation between blood values and altitude appears to hold in some species but not in others. The aim of this thesis is to search for hematological characteristics that could be considered as adaptations to high altitude. With this purpose we have examined 21 species, covering almost 2/3 of the known Chilean frogs and toads and distributed from sea level up to near 5000 meters.

We have found in a first place a small red cell size. This feature is evidenced by the linear dimensions as well as by the volume of the erythrocytes. Our high altitudes species

have a mean red blood cell mayor axis of 16.2 μm vs 20.1 μm in the low altitude species, ($p < 0.001$). At the same time, the average cell volume of the Andean species was 392 μm^3 vs 527 μm^3 in the low altitude group ($p < 0.05$). Other distinctive features of our high altitude amphibians are their high red cell number (713.000 mm^{-3}) and a high blood hemoglobin concentration (9.0%). In comparison, the mean red cell number in the species found at altitudes lower than 3000 meters was 415.000 mm^{-3} , while the mean hemoglobin concentration was 5.5% ($p < 0.01$).

In spite of the large number of red cells, the hematocrit of the Andean species was not too different from the average observed in the low altitude group (28 vs 21%). ($p > 0.05$). The low correlation found between altitudinal distribution and hematocrit is probably due to a compensation of the large number of red blood cells (high altitudes species) by having a small cell volume, whereas the fewer number of cells (low altitudes species) is also compensated with larger erythrocytes.

Mean cell hemoglobin concentration (but not mean cell hemoglobin) was significantly higher ($p < 0.001$) in the Andean species (31 vs 27.4%). This feature may have important consequences when the oxygen capacity of a given volume of red blood cells is calculated for both groups. In average the high altitude species exceed the oxygen saturation capacity of the low altitude ones by 14%, but at the two ends of the altitudinal distribution this difference may be as high as 57%.

Finally, a series of quantitative relations were obtained between different hematological parameters. The predictive value of these relations can be useful in the field of comparative physiology of vertebrates.

INTRODUCCION

La presión parcial de oxígeno (pO_2) en nuestra atmósfera disminuye exponencialmente a medida que aumenta la altura de la corteza terrestre ($\log pO_2(\text{torr}) = 2.2 - 0.054 \times \text{Km}$), de modo que en alturas relativamente moderadas (aproximadamente 3000 m) encontramos solamente 2/3 del oxígeno disponible a nivel del mar. Un ascenso de 2400 m sobre esta altura aumentará la diferencia a un equivalente de 1/2 atmósfera ($pO_2 = 80 \text{ torr}$). Se comprende entonces que los ambientes fríos e hipóxicos de las grandes alturas impongan no tan sólo severas restricciones a la distribución de un sinnúmero de especies, sino que además sean elementos de fuerte selección de mecanismos adaptativos que permiten la vida en las grandes alturas.

Uno de los cambios más conocidos que presentan el hombre y otras especies como respuesta de

aclimatización (#) a la altura o de aclimatación (#) a la hipobaría e hipoxia experimental es el aumento del número de eritrocitos y de los niveles de hemoglobina. Desde las observaciones de Viault en 1891, llevadas a cabo en los Andes del Perú, se ha demostrado repetidamente que la prolongada o permanente exposición a las altas altitudes "produce" policitemia.

Los nativos residentes de estos lugares tienen valores más altos en el número de células rojas en la cantidad de hemoglobina y en el hematocrito. El volumen de sangre total está también aumentado, sin embargo, esta elevación está exclusivamente basada en un alto contenido de células, dado que el volumen de plasma es normal o aún levemente inferior al que presentan los residentes de bajas altitudes.

(#) La terminología para describir los cambios adaptativos no genéticos ha sido poco consistente en la literatura. En esta tesis usaremos el término "aclimatación" referido a los procesos inducidos artificialmente en el laboratorio y a los cambios resultantes de exposiciones controladas; mientras que utilizaremos el término "aclimatización" a los cambios inducidos por todo el clima en la naturaleza (Hart, 1957).

Estas características indican que la condición de hipoxia constituye un estímulo específico eritropoyético y que la policitemia de la alta altitud es consecuencia de una hiperactividad en la formación de eritrocitos y de hemoglobina.

La policitemia de las altas altitudes puede ser vista como un mecanismo adaptativo de aclimatización. Este resulta en un aumento del contenido de oxígeno en un volumen dado de sangre, en compensación a la reducción de la gradiente de pO_2 entre la sangre arterial y la sangre venosa, en tanto que los grandes volúmenes celulares contribuyen a la capacidad buffer de la sangre para el CO_2 (Hurtado, 1964).

También la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno parece cambiar como respuesta de aclimatización a la altura; así fue observado por Aste-Salazar & Hurtado (1944) y más actualmente por Lenfant & Sullivan (1971).

El desplazamiento de la curva de disociación hacia una disminución de la afinidad por oxígeno, favorecería el pasaje de este gas desde la sangre a los tejidos.

Pero la adaptación a la altura (adaptación genética) puede involucrar además, uno o más pasos en la cadena de transporte del oxígeno desde el ambiente hasta su utilización final en los tejidos, como por ejemplo: modificaciones de superficies respiratorias, tamaño del corazón, concentración de hemoglobina, etc. (Morrison, 1964). La existencia de pequeños eritrocitos (RBC) podría entonces facilitar el flujo de oxígeno desde el medio ambiente a la célula y a este respecto los camélidos Sud-Americanos y otros mamíferos andinos pueden ser tomados como ejemplos de especies con eritrocitos notablemente pequeños (Morrison *et al.*, 1963).

Las respuestas hematológicas que siguen a la exposición a altas altitudes, han sido cuidadosamente estudiadas en mamíferos (Hurtado, 1964; Lenfant, 1971) y en aves (Burton, 1972; Jaeger, 1974; Mc Grath, 1971). Los cambios hematológicos más importantes encontrados son: aumento de la cantidad de eritrocitos, hematocrito, concentración de hemoglobina y un aumento del volumen sanguíneo. Sin embargo, algunos trabajos sugieren una disminución en el volumen de plasma en mamíferos (Anthony, 1961; Frayers, 1952) y un aumento del volumen del plasma en aves

(Mc Grath, 1971).

De los datos hematológicos en algunos roedores chilenos y peruanos nativos de alta y de baja altitud, se pueden concluir que la concentración de eritrocitos y de hemoglobina, no son factores significativos en la adaptación de estos pequeños mamíferos a las altas altitudes. En contraste, un sólo ejemplo de *Mus musculus* de 4500 metros aclimatizados en bajas altitudes y transportados nuevamente a altas altitudes, muestran un aumento del hematocrito. Esta respuesta es similar a las que se ha visto en el hombre aclimatizado a altas altitudes (Morrison *et al.*, 1963 B).

Ciertamente una gran concentración de hemoglobina en las células podría ser una adaptación ideal, ya que supuestamente un aumento en concentración de un componente ya existente podría ser más fácilmente realizado que otras adaptaciones morfológicas o fisiológicas que permitan incrementar el volumen de oxígeno movilizado. Sin embargo, este aparente "cambio adaptativo simple" no parece haber sido seguido por los roedores de altas altitudes (Morrison *et al.*, 1963 B).

Por otra parte si el tamaño pequeño del eritrocito fuese verdaderamente adaptativo a la hipoxia no tan solo por sí mismo, sino además por permitir una densa distribución de pequeños capilares y un más fácil intercambio hacia y desde la célula, entonces podría esperarse encontrar eritrocitos pequeños en especies que habitan medios pobres en oxígeno, independiente de la altitud de su medio natural. Las observaciones realizadas en peces del género *Fundulus* tienden a confirmar esta hipótesis, ya que el volumen de los eritrocitos de siete especies que habitan normalmente en aguas pobres en oxígeno, resultó ser 20% menor que el volumen de los eritrocitos de doce especies de aguas normóxicas (Srivastava *et al.*, 1974). La interpretación de los autores, es que las características del ambiente que habitan las especies de *Fundulus* es reflejada en el tamaño del eritrocito; células pequeñas actúan como un mecanismo compensatorio para la deficiencia de oxígeno. Las células pequeñas tienen grandes valores de relación superficie-volumen, esto las hace más eficientes en el intercambio de gas (Hartman & Lesler, 1964). Tal eficiencia podría ser una ventaja en un medio ambiente con baja cantidad de oxígeno disuelto. Esta interpretación nos parece razonable, sin embargo la comparación de estas mismas

especies muestran claramente que existe además una correlación entre la salinidad de su habitat típico y el tamaño del eritrocito: los peces de ambientes más salinos y casualmente más hipóxicos tienen eritrocitos más pequeños. Este hecho nos muestra que es difícil interpretar estos datos apoyándose en la importancia relativa de las diferentes influencias ambientales que de alguna manera parecen modular el tamaño (genético) del eritrocito de *Fundulus*. Más aún Szarski (1976), describe una correlación positiva entre los tamaños celulares y corporales de distintas especies, aunque excluye comparaciones intraespecíficas.

La correlación entre altitud y parámetros hematológicos en reptiles es discutible, parece cumplirse en ciertas especies pero no en otras: Dawson & Poulson, 1962; Burns, 1969; Dessauer, 1970; Duguay, 1970, indican que no existen tal correlación en poblaciones de *Sceloporus jarrovi*. Sin embargo, reptiles de alta montaña (*Liolaemus*, *Sceloporus* y *Urosaurus*) presentan altos valores hematológicos en relación a las especies de baja altitud (Engbretson & Hutchison, 1976; Newlin & Ballinger, 1976).

Otros trabajos muestran que los valores de concentración de hemoglobina de *Sceloporus jarrovi* (Vinegar & Hillyard, 1972; Ballinger & Newlin, 1975) y los valores

de capacidad de oxigenación de *Sceloporus occidentalis* (Vinegar & Hillyard, 1972) difieren significativamente con la altitud de captura. Estos autores sugieren que dentro de un género particular, la sangre de las formas de altas altitudes tienen más hemoglobina que las formas de baja altitud.

Relaciones similares se han descrito para anfibios de altura, *Bufo bocourti* de América Central (3200 m) tiene uno de los más altos valores de contenido de hemoglobina en los anuros (Stuart, 1951).

La rana acuática *Telmatobius culeus* del lago Titicaca (3800 metros) presenta una combinación de adaptaciones conductuales, morfológicas y fisiológicas, que le permiten una vida acuática en altas altitudes; posee además, eritrocitos cuyo tamaño es el más pequeño descrito para los anfibios ($394 \mu\text{m}^3$) (Hutchison, 1976; Hock, 1964).

No hemos encontrado datos sobre el tamaño del eritrocito de otros anfibios de altura; aunque se sabe que ciertas especies son capaces de vivir aproximadamente

a 5000 metros en los Himalaya, que es probablemente el límite superior altitudinal de distribución geográfica para los anfibios (Noble, 1931).

Hasta aquí, la síntesis presentada nos deja la impresión de que la existencia de reptiles y anfibios a altas altitudes es poco conocida y menos aún estudiada en lo que a adaptaciones específicas se refiere.

En altas montañas los factores que afectan la distribución de estos animales no son totalmente los mismos que afectan a los vertebrados homeotermos.

Las bajas temperaturas del ambiente obviamente debiese también afectarlos, dada la corta estación en la cual la actividad es posible para los poiquilotermos. Sin embargo, el calentamiento por radiación solar puede mejorar dicha condición.

Hipoxia no parece ser el factor limitante exclusivo en la vida de anfibios y reptiles a altas altitudes, ya que tanto el alimento como el agua disponible son serios factores limitantes (Hock, 1964).

De todos los antecedentes analizados no nos queda totalmente claro si las especies de anuros de altura muestran efectivamente adaptaciones hematológicas. Esto se debe en parte a que los autores citados más arriba han estudiado muy pocas características en más de una especie o bien han estudiado un número adecuado de características, pero en una sola especie.

Sin embargo, cabe aceptar que en principio eritrocitos de pequeño tamaño, conjuntamente con altos valores hematológicos, baja actividad metabólica y una aparente habilidad para soportar un alto grado de hipoxia le permitirían a las especies la vida exitosa en la altura. Cabría entonces esperar que diferentes especies de anfibios que habitan desde el nivel del mar hasta los 5000 metros de altura, mostrasen una correlación positiva entre el número de eritrocitos, hematocrito y concentración de hemoglobina versus altura y una correlación negativa entre altura y el volumen o tamaño del eritrocito. Esta es la hipótesis central de esta tesis.

Para verificarla hemos seleccionado un amplio número de especies nativas de una serie de alturas diferentes que van desde el nivel del mar hasta los 5000 metros

de altura, donde la presión atmosférica es aproximadamente la mitad de la que existe a nivel del mar.

Entre las especies estudiadas destaca con especial interés *Bufo spinulosus* cuya distribución abarca el rango total de alturas (nivel del mar hasta 5000 metros). Este es un caso muy particular ya que con la posible excepción de ciertas aves, difícilmente podría encontrarse un ejemplo similar en otros grupos de vertebrados.

Hemos separado al resto de las especies estudiadas en dos grupos, especies de alta y de baja altitud. Sin embargo esta separación pudiese parecer arbitraria debido a que a pesar de lo vastamente utilizado, el término "alta altitud" es en cierto modo ambiguo. Esto se debe a que el límite inferior del rango no está claramente establecido. Más aún, la diferente sensibilidad a los efectos de la "altura" (y a los factores asociados a ella) que presentan diversos grupos de animales, hacen que esta característica del ambiente tenga un carácter más bien relativo que absoluto.

En el presente trabajo hemos tomado 3000 metros de altura como límite inferior del rango "alta altitud".

Esta cifra corresponde aproximadamente al promedio de las alturas mínimas señaladas por R.J. Hock (1964) para la distribución de anfibios y reptiles de altura, oscilando entre 2800 y 3400 metros en los Alpes, las Montañas Rocosas y Sierra Nevada.

MATERIAL Y METODOS

La búsqueda de las características hematológicas de los anfibios de alta altitud, se realizó en especies de los géneros: *Bufo*, *Telmatobius* y *Pleurodema*, estas características se compararon con las de 16 especies que habitan desde alturas moderadas hasta el nivel del mar, representativas de los géneros: *Bufo*, *Caudiverbera*, *Rhinoderma*, *Alsodes*, *Insuetophrynus*, *Pleurodema*, *Batrachyla* y *Eupsophus*.

El rango de distribución geográfica latitudinal cubierto por todas las especies estudiadas se extiende desde pocos kilómetros al norte de Arica (18° 20' S) hasta Chiloé (42° 20' S). La altitud y el lugar específico en que fueron colectados los animales de cada una de las especies, se detallan en la Tabla N° 1. La distribución altitudinal máxima de cada especie se muestra en la Tabla N° 2, que fue confeccionada a partir de los datos de Duellman (1979) y de Formas (1979).

TABLA N° 1

NUMEROS CORRELATIVOS DE LAS ESPECIES Y ALTITUD DEL LUGAR DE COLECTA

| | <u>ALTITUD</u> (m) | <u>LOCALIDAD</u> (#) |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| 1. <i>Bufo spinulosus</i> | 200 - 2700 | Azapa, Baños Morales |
| 2. <i>Bufo spinulosus</i> | 3200 - 4300 | Putre, Parinacotá |
| 3. <i>Bufo chilensis</i> | 10 - 500 | Los Vilos, Santiago |
| 4. <i>Bufo rubropunctatus</i> | 200 | Lago Lanalhue |
| 5. <i>Bufo atacamensis</i> | 600 | Antofagasta (Paposo) |
| 6. <i>Gaudiververa caudiverbera</i> | 200 - 500 | Melipilla |
| 7. <i>Eupsophus roseus</i> | 10 - 200 | Valdivia (Saval) |
| 8. <i>Eupsophus vertebralis</i> | 10 - 200 | Valdivia (Mehuín) |
| 9. <i>Eupsophus migueli</i> | 10 - 200 | Valdivia (Mehuín) |
| 10. <i>Eupsophus calcaratus</i> | 12 | Chiloé |
| 11. <i>Batrachyla leptopus</i> | 12 | Chiloé |
| 12. <i>Batrachyla taeniata</i> | 10 - 200 | Valdivia (Mehuín) |
| 13. <i>Alsodes nodosus</i> | 10 - 200 | Los Vilos, San Gabriel |
| 14. <i>Alsodes tumultuosus</i> | 2700 | La Parva |
| 15. <i>Telmatobius peruvianus</i> | 3360 | Putre |
| 16. <i>Telmatobius marmoratus</i> | 4300 | Lago Chungará |
| 17. <i>Telmatobius halli</i> | 3600 | Antofagasta (Zapahuira) |
| 18. <i>Telmatobius pefauri</i> | 3360 | Putre |
| 19. <i>Insuetophrynus acarpicus</i> | 10 - 200 | Valdivia (Mehuín) |
| 20. <i>Pleurodema thaul</i> | 200 - 1800 | Mehuín, Baños Morales |
| 21. <i>Pleurodema marmorata</i> | 3360 | Putre |
| 22. <i>Rhinoderma darwini</i> | 10 - 200 | Valdivia (Saval) |

Las localidades indicadas, son los sitios más relevantes de captura, sin embargo, varias especies fueron también capturadas en otras localidades, pero en menor número. En estos casos la altura de captura cae dentro del rango indicado.

TABLA N° 2

DISTRIBUCION ALTITUDINAL MAXIMA (*)

| <u>ESPECIE</u> | <u>ALTITUD</u> (m) |
|------------------------------------|--------------------|
| 1 <i>Bufo spinulosus</i> | 3000 |
| 2 <i>Bufo spinulosus</i> | 5000 |
| 3 <i>Bufo chilensis</i> | 2000 |
| 4 <i>Bufo rubropunctatus</i> | 600 |
| 5 <i>Bufo atacamensis</i> | 600 |
| 6 <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | 500 |
| 7 <i>Eupsophus roseus</i> | 1000 |
| 8 <i>Eupsophus vertebralis</i> | 1000 |
| 9 <i>Eupsophus migueli</i> | 200 |
| 10 <i>Eupsophys calcaratus</i> | 200 |
| 11 <i>Batrachyla leptopus</i> | 1000 |
| 12 <i>Batrachyla taeniata</i> | 800 |
| 13 <i>Alsodes nodosus</i> | 1700 |
| 14 <i>Alsodes tumultuosus</i> | 2600 |
| 15 <i>Telmatobius peruvianus</i> | 3500 |
| 16 <i>Telmatobius marmoratus</i> | 5000 |
| 17 <i>Telmatobius halli</i> | 3000 |
| 18 <i>Telmatobius pefauri</i> | 3200 |
| 19 <i>Insuetophrynus acarpicus</i> | 500 |
| 20 <i>Pleurodema thaul</i> | 2000 |
| 21 <i>Pleurodema marmorata</i> | 5000 |
| 22 <i>Rhinoderma darwini</i> | 800 |

(*) De acuerdo a los datos de W.E. Duellman (1979) y de J.R. Formas (1979).

Los batracios de altas altitudes fueron colectados en varias localidades de los Andes del Norte chileno (Tarapacá y Antofagasta) entre las latitudes ($18^{\circ} 26' S$ y $23^{\circ} 40' S$) y en diferentes épocas del año (abril, mayo, agosto y diciembre).

Las mediciones de concentración de oxígeno y de temperatura en el medio ambiente natural de las especies Andinas (que son en su mayoría acuáticas) indican que éstas, viven por lo menos durante el verano en una temperatura promedio de $10^{\circ}C$ y una presión parcial de oxígeno de 90 torr.

Adultos de ambos sexos fueron colectados y trasladados al laboratorio en Santiago (500 m de altura) donde fueron mantenidos en acuarios a temperaturas controladas, similares a las registradas en su ambiente de origen. La mayor parte de las observaciones se realizaron en muestras de sangre que fueron tomadas por punción cardíaca con jeringas heparinizadas y sin anestesia. En animales de pequeño peso corporal (0.5 a 3 gramos) la sangre fue obtenida introduciendo por una leve succión el corazón del animal 2 a 3 mm en el extremo anterior de una jeringa

heparinizada de 1 ml cuidando de no seccionar los vasos sanguíneos, manteniendo una leve presión negativa se procedió a atravesar el corazón desde aurícula a ventrículo con una aguja hipodérmica. De esta manera se logró en primer lugar, obtener un máximo de sangre y en segundo lugar, realizar la operación en un tiempo más breve que si solo se utilizaran agujas hipodérmicas.

Los valores de hematocrito se obtuvieron de muestras de sangre en duplicado (salvo excepciones) en tubos de microhematocrito heparinizados que se sellaron a la llama y se centrifugaron a 10.000 revoluciones por minuto en una centrífuga de microhematocrito Hawksly hasta alcanzar un volumen constante, normalmente el tiempo requerido fue menor de 10 minutos, la lectura de la longitud de las columnas de eritrocitos y de sangre total se hicieron utilizando un patrón metálico con divisiones de 0.5 mm y un lente de aumento de 3 X o una lupa binocular. Se descartaron los tubos que presentaron hemólisis. Inmediatamente terminada esta lectura se partió el tubo por sobre el menisco de los glóbulos blancos y se utilizó el plasma para las lecturas del índice de refracción en un refractómetro Goldberg (American Optics) con el objeto de identificar (y descartar) estados de hidratación anómalos (fuera del rango 3.9-6.5% en sólidos totales).

La concentración de hemoglobina en sangre total se midió espectrofotométricamente a 540 μm por el método de cianmetahemoglobina. Se utilizó para esto 20 microlitros de sangre diluidos en solución de Drabkin (Mercko-test Merck) cuya composición fue: cianuro de potasio 1.0 mM, amortiguador fosfato 2.5 mM a pH 7.2, hexacianoferrato (III) de potasio 0.6 mM, cloruro de sodio 1.5 mM, detergente 0.05% (Drabkin, 1949).

Esta solución se mantuvo refrigerada en un frasco ámbar; en estas condiciones la solución duró más de seis meses.

Después de agregar la sangre a 5 ml de solución de Drabkin, se agitó enérgicamente y se realizaron las lecturas al espectrofotómetro después de 3 minutos de reposo. Excepcionalmente algunos tubos que presentaron turbidez, fueron centrifugados por corto tiempo y a velocidades bajas.

Las mediciones se realizaron usando un espectrofotómetro Beckman/Spinco modelo 151 o en un Mini-Spectronic 20 Bausch and Lomb, la diferencia de los valores de

densidad óptica entre ambos instrumentos no fue mayor de un 4%.

Para el cálculo de la concentración de hemoglobina en la sangre se multiplicó la densidad óptica de la solución por 36.8. Esta constante deriva de la razón entre el peso molecular de la hemoglobina (64.458) y el coeficiente de extinción molar (44.000), este resultado se multiplicó por el factor de dilución (251) y por el factor 0.1 (conversión de gramos por litro a gramos%).

El recuento globular se efectuó en hemocitómetros Neubauer utilizándose pipetas estandar para dilución de sangre (1:100) en solución de cloruro de sodio (0.7%). Las pipetas se agitaron enérgicamente en un agitador Clay Adams INC., por lo menos dos veces durante 45 segundos cada vez, esta operación es necesaria dada la mayor velocidad con que decantan los eritrocitos de anfibios comparados con los eritrocitos de mamíferos.

Los diámetros de los eritrocitos se midieron en frotis secos y sin teñir, con un micrómetro ocular CARL-ZEISS y con un aumento de 1000 X sin inmersión.

Se utilizaron frotis de sangre sin fijar ni teñir en consideración al marcado efecto de fijadores y colorantes sobre el tamaño y forma del eritrocito. Por ejemplo nuestras mediciones realizadas en una especie seleccionada con este fin (*Caudiverbera caudiverbera*) y efectuadas en frotis fijados (metanol absoluto) y teñidos (hematoxilina-eosina) mostraron una reducción promedio de 23.7% en el diámetro mayor y de 37.9% en el diámetro menor en relación a los frotis a fresco. Además, la forma del eritrocito definida por Davison, 1959; (diámetro mayor/diámetro menor) fue también alterada. En los frotis tratados esta razón fue 2.0 versus 1.67 en los frotis a fresco.

Se midieron no menos de 300 eritrocitos por cada especie, este número de glóbulos rojos fue en promedio superior a los tomados por: Latorre, 1938 (50); Olmo & Morescalchi, 1975 (15); Desmet, 1981 (20) y Kuramoto, 1981 (40 a 500). Este alto número de mediciones es aconsejable debido a que los promedios de diversas mediciones de grupos de 20 eritrocitos de una misma preparación dieron ocasionalmente diferencias significativas.

Con estos datos, se hicieron estudios para determinar la posible relación entre el tamaño del eritrocito

y el tamaño corporal (¿edad?) de diferentes individuos de una misma especie. Para ésto se escogió a *Caudiverbera caudiverbera* por presentar el mayor rango de tamaños corporales (desde 20 gramos hasta más de medio kilo).

El estudio de la distribución de frecuencias de tamaño de los eritrocitos se realizó solamente en *Bufo spinulosus*, por ser la especie de distribución altitudinal más amplia, desde el nivel del mar hasta 4500 metros.

La estimación de la superficie de los eritrocitos fue obtenida considerándolos como una elipse doble, para el cálculo de una de las dos caras se multiplicó el producto de los radios mayor y menor por π . También se representó en un solo parámetro a ambos diámetros del eritrocito como su medio geográfico, calculando el diámetro del círculo equivalente al área de la elipse dada por la longitud y el ancho del eritrocito (Kuramoto, 1981).

A partir de las mediciones de concentración de hemoglobina en la sangre (g%), de hematocrito y de recuento globular, se calculó el volumen corpuscular medio (MCV), la cantidad de hemoglobina corpuscular media (MCH) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC).

$$\text{MCV} = \frac{\text{Hematocrito } \%}{\text{Número de eritrocitos por mm}^3} \quad (\mu\text{m}^3) \quad (1)$$

$$\text{MCH} = \frac{\text{Hemoglobina } \%}{\text{Número de eritrocitos por mm}^3} \quad (\text{pg/célula}) \quad (2)$$

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Hemoglobina g } \%}{\text{Hematocrito } \%} \quad (\%) \quad (3)$$

Tanto los parámetros medidos como los calculados se correlacionaron con las alturas máximas habitadas por cada especie, por considerarlas como indicadores de potencialidades adaptativas.

El test de Student fue utilizado para comparar promedios de valores de las especies agrupadas de alta altitud con el promedio de las especies agrupadas de baja altitud. Sin embargo, cuando las diferencias de estos valores promedio fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) se procedió al cálculo de nuevos promedios considerando cada uno de los valores individuales de ambos grupos. Esto se hizo para asegurar que las diferencias encontradas no dependían de la variación de los valores dentro de las especies, parámetro que no es considerado

cuando se toman solamente los promedios de los valores de las especies.

RESULTADOS

En esta sección analizaremos los resultados obtenidos globalmente en las especies estudiadas; sin embargo, en beneficio de una mayor claridad en el análisis de los datos, analizaremos la especie *Bufo spinulosus* separadamente al final de la sección Resultados.

I. TAMAÑO DEL ERITROCITO

Así como todos los vertebrados adultos que no son mamíferos, los anfibios tienen eritrocitos que son típicamente nucleados, de forma elíptica y ligeramente biconvexos.

El tamaño del eritrocito en especies diferentes es muy variable, y uno puede estimar este tamaño midiendo sus ejes mayores y menores, o calculando su superficie o bien, midiendo el volumen promedio de los corpúsculos rojos.

En esta tesis se estimó el tamaño del eritrocito utilizando precisamente estos tres tipos de mediciones. La Figura N° 1 muestra que el tamaño del eritrocito (por lo menos en *C. caudiverbera*) es independiente del tamaño (¿edad?) de los individuos, y por lo tanto pareciera ser un parámetro adecuado para utilizarlo en comparaciones entre especies.

I.a Dimensiones lineales

Debido a las peculiares características geométricas, es normalmente factible medir solamente dos dimensiones, el diámetro mayor y el diámetro menor.

Los promedios y la desviación estandar de los diámetros mayores de los eritrocitos de cada especie se registran en la Tabla N° 3. Estos valores oscilan entre 14 μm en los eritrocitos de *Pleuronema marmorata*, especie que vive por sobre los 3000 metros de altura y 25 μm en los de *Caudiverbera caudiverbera* especie que no se encuentra por sobre los 1000 metros.

El análisis estadístico (test de Student) inter-específico, de los promedios del diámetro mayor de las seis especies agrupadas de alta altitud (medido en varios ejemplares por cada especie) y de los valores promedios de las dieciseis especies agrupadas de baja altitud indican que

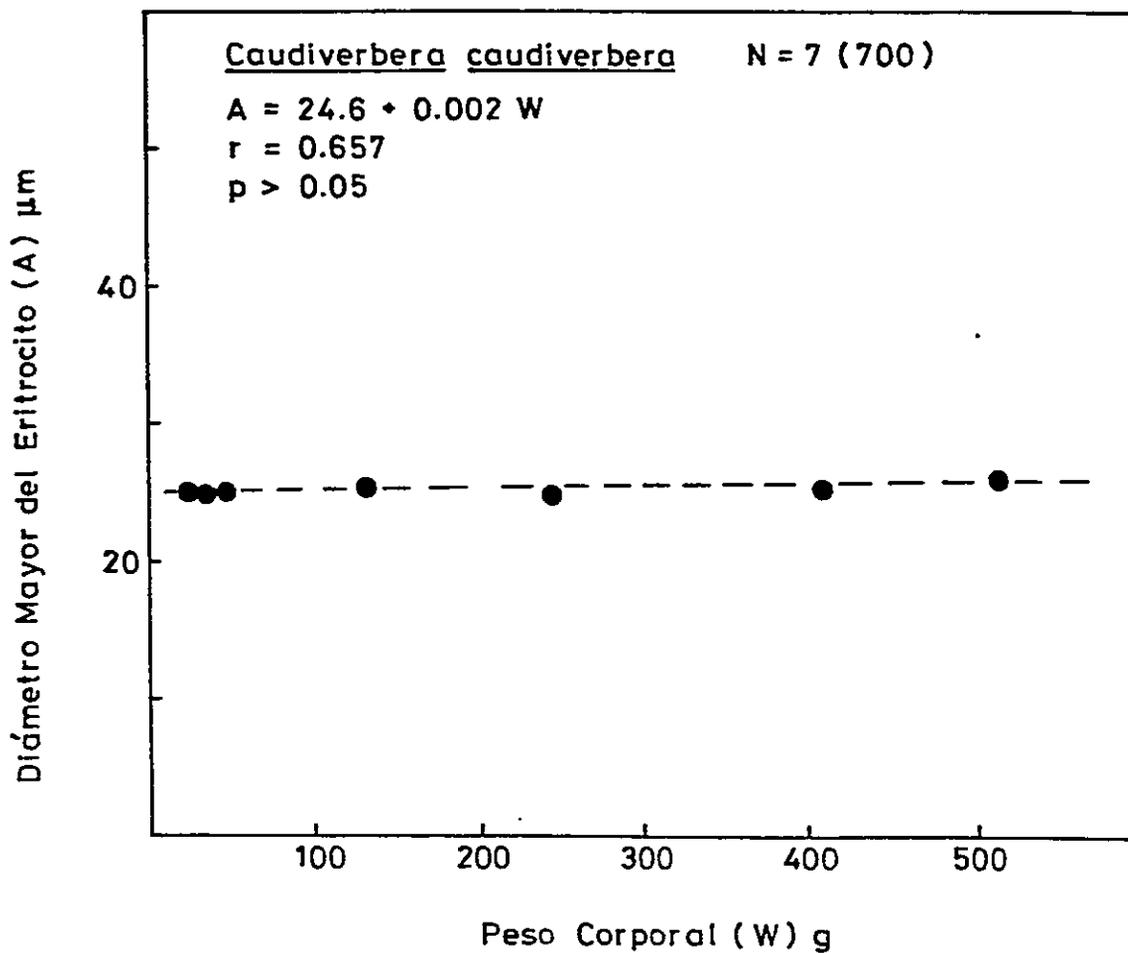


FIG. 1. Diámetro mayor del eritrocito versus tamaño corporal en *Caudiverbera caudiverbera*.

Los puntos corresponden a los promedios de las mediciones realizadas en 100 eritrocitos de cada individuo. Las desviaciones de los promedios corresponden aproximadamente al diámetro de cada punto.

TABLA N° 3

VALORES HEMATOLOGICOS EN ANUROS NATIVOS DE ALTAS Y BAJAS ALTITUDES

| | | DIAMETRO MAYOR DEL ERITROCITO (A) μm | | |
|-----------------------------|----------------------------------|---|---------|-----|
| | ESPECIE | ALTITUD | A \pm | DS |
| Bufonidae | <i>Bufo spinulosus</i> | baja | 18.5 | 1.1 |
| | <i>Bufo spinulosus</i> | alta | 16.9 | 1.0 |
| | <i>Bufo chilensis</i> | baja | 19.1 | 0.9 |
| | <i>Bufo rubropunctatus</i> | baja | 21.7 | 1.2 |
| | <i>Bufo atacamensis</i> | baja | 20.0 | 0.9 |
| Leptodactylidae | <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | baja | 25.2 | 1.8 |
| | <i>Eupsophus roseus</i> | baja | 19.7 | 1.4 |
| | <i>Eupsophus vertebralis</i> | baja | 20.9 | 1.2 |
| | <i>Eupsophus migueli</i> | baja | 22.1 | 1.6 |
| | <i>Eupsophus calcaratus</i> | baja | 20.7 | 1.6 |
| | <i>Batrachyla leptopus</i> | baja | 18.7 | 1.1 |
| | <i>Batrachyla taeniata</i> | baja | 16.2 | 0.7 |
| | <i>Alsodes nodosus</i> | baja | 19.3 | 1.0 |
| | <i>Alsodes tumultuosus</i> | baja | 21.1 | 1.3 |
| | <i>Telmatobius peruvianus</i> | alta | 17.4 | 1.0 |
| | <i>Telmatobius marmoratus</i> | alta | 17.6 | 0.9 |
| | <i>Telmatobius halli</i> | alta | 16.1 | 1.0 |
| | <i>Telmatobius pefauri</i> | alta | 15.4 | 0.8 |
| | <i>Insuetophrynus acarpicus</i> | baja | 22.7 | 1.2 |
| | <i>Pleurodema thaul</i> | baja | 16.8 | 1.4 |
| <i>Pleurodema marmorata</i> | alta | 14.0 | 0.9 | |
| <i>Rhinoderma darwini</i> | baja | 19.4 | 1.5 | |

| Altitud | Alta | Baja | t | p |
|-----------|------|------|------|---------|
| N | 6 | 16 | | |
| \bar{x} | 16.2 | 20.1 | 4.15 | < 0.001 |
| DS | 1.3 | 2.2 | | |

N = Número de especies.

\bar{x} = Promedios de las especies.

hay diferencias significativas entre ambos grupos, $t = 4.15$
 $p < 0.001$.

Los promedios de los diámetros menores para estas mismas especies se presentan en la Tabla N° 4. A pesar que el promedio del grupo de alta altitud y el promedio del grupo de especies de baja altitud difieren entre sí ($t=2.8$; $p < 0.02$) las diferencias encontradas no son tan notables como en el caso del diámetro mayor. Es interesante el hecho de que los valores extremos encontrados no corresponden a las mismas especies que presentaban los valores extremos de diámetro mayor, lo que indica que las formas geométricas difieren en excentricidad.

El valor más bajo $11.2 \mu\text{m}$ corresponde a la especie *Pleurodema thaul*, y el valor más alto a la especie *In*
suetophrynus acarpicus, ambas especies consideradas en este trabajo, como habitantes de bajas altitudes.

Por otra parte, cabe señalar que en todas las especies estudiadas el diámetro menor es bastante más constante que el diámetro mayor. La razón diámetro mayor máximo/ diámetro mayor mínimo es de 1.8 comparado con 1.3

TABLA N° 4

VALORES HEMATOLOGICOS EN ANUROS NATIVOS DE ALTAS Y BAJAS ALTITUDES

| | | DIAMETRO MENOR DEL ERITROCITO (B) μm | | |
|-----------------------------|----------------------------------|---|------|----------|
| | ESPECIE | ALTITUD | B | \pm DS |
| Bufonidae | <i>Bufo spinulosus</i> | baja | 13.2 | 0.8 |
| | <i>Bufo spinulosus</i> | alta | 12.1 | 1.0 |
| | <i>Bufo chilensis</i> | baja | 12.5 | 0.6 |
| | <i>Bufo rubropunctatus</i> | baja | 13.7 | 0.7 |
| | <i>Bufo atacamensis</i> | baja | 14.5 | 0.7 |
| Leptodactylidae | <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | baja | 14.5 | 1.4 |
| | <i>Eupsophus roseus</i> | baja | 13.2 | 0.9 |
| | <i>Eupsophus vertebralis</i> | baja | 13.8 | 1.1 |
| | <i>Eupsophus migueli</i> | baja | 14.4 | 1.1 |
| | <i>Eupsophus calcaratus</i> | baja | 14.5 | 1.2 |
| | <i>Batrachyla leptopus</i> | baja | 12.3 | 0.7 |
| | <i>Batrachyla taeniata</i> | baja | 11.6 | 0.6 |
| | <i>Alsodes nodosus</i> | baja | 13.0 | 0.8 |
| | <i>Alsodes tumultuosus</i> | baja | 14.6 | 1.0 |
| | <i>Telmatobius peruvianus</i> | alta | 12.8 | 0.7 |
| | <i>Telmatobius marmoratus</i> | alta | 13.0 | 0.7 |
| | <i>Telmatobius halli</i> | alta | 11.5 | 0.7 |
| | <i>Telmatobius pefauri</i> | alta | 11.5 | 0.6 |
| | <i>Insuetophrynus acarpicus</i> | X baja | 15.0 | 1.4 |
| | <i>Pleurodema thaul</i> | baja | 11.2 | 1.0 |
| <i>Pleurodema marmorata</i> | alta | 11.7 | 0.6 | |
| <i>Rhinoderma darwini</i> | baja | 13.3 | 1.0 | |

| Altitud | Alta | Baja | t | p |
|-----------|------|-------|------|--------|
| N | 6 | 16 | | |
| \bar{x} | 12.1 | 13.45 | 2.82 | < 0.02 |
| DS | 0.6 | 1.1 | | |

N = Número de especies.

\bar{x} = Promedios de las especies.

para la razón de los diámetros menores.

I.b Superficie del eritrocito (S) μm^2

Se ha sugerido muchas veces (Smith, 1925; Gonio-kawska, 1970, 1973; Nitecki, 1973; Szarski, 1976) que el tamaño de la célula está en general relacionado negativamente con su intensidad metabólica.

La relación entre el área y la masa, de figuras sólidas similares, es definida por la ecuación:

$$S = b V^{0.67}$$

siendo S = superficie, V el volumen y b un factor de proporcionalidad dependiente de la forma de la figura.

De acuerdo a esta relación, en una célula grande, la razón área/volumen es desplazada hacia el volumen y en una pequeña es desplazada hacia el área. La superficie de la célula puede ser entonces un factor limitante del metabolismo en células o eritrocitos de gran tamaño.

Como la superficie del eritrocito pudiese tener además un rol importante en medio hipóxicos decidimos analizar este parámetro en todas las especies estudiadas.

La Tabla N° 5 resume los promedios de los valores de la superficie de los eritrocitos de cada especie, estas cifras oscilan entre $128.6 \mu\text{m}^2$ en los eritrocitos de *Pleurodema marmorata* y $287 \mu\text{m}^2$ en los de *Cauliverbera cauliverbera*.

Existen diferencias significativas ($t = 3.368$; $p < 0.005$) entre los promedios de las superficies de los eritrocitos de las especies de alta altitud ($156.53 \pm 22.9 \mu\text{m}^2$) y el promedio de las especies de baja altitud ($214.31 \pm 39.2 \mu\text{m}^2$).

Cabe hacer notar que los datos presentados en esta tabla corresponden al producto de los radios mayores y menores por 3.15169 (Superficie de una elipse), de modo que representan las superficies de una de las dos caras de los eritrocitos. La correlación entre la superficie

TABLA N° 5

VALORES HEMATOLOGICOS EN ANUROS NATIVOS DE ALTAS Y BAJAS ALTITUDES

| | | <u>SUPERFICIE (S_e)</u> μm^2 | |
|-----------------------------|----------------------------------|---|----------------------|
| | <u>ESPECIE</u> | <u>ALTITUD</u> | <u>S_e</u> |
| Bufonidae | <i>Bufo spinulosus</i> | baja | 191.8 |
| | <i>Bufo spinulosus</i> | alta | 160.6 |
| | <i>Bufo chilensis</i> | baja | 187.5 |
| | <i>Bufo rubropunctatus</i> | baja | 233.5 |
| | <i>Bufo atacamensis</i> | baja | 227.8 |
| Leptodactylidae | <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | baja | 287.0 |
| | <i>Eupsophus roseus</i> | baja | 204.2 |
| | <i>Eupsophus vertebralis</i> | baja | 226.5 |
| | <i>Eupsophus migueli</i> | baja | 250.0 |
| | <i>Eupsophus calcaratus</i> | baja | 235.7 |
| | <i>Batrachyla leptopus</i> | baja | 180.6 |
| | <i>Batrachyla taeniata</i> | baja | 147.6 |
| | <i>Alsodes nodosus</i> | baja | 197.0 |
| | <i>Alsodes tumultuosus</i> | baja | 241.9 |
| | <i>Telmatobius peruvianus</i> | alta | 185.8 |
| | <i>Telmatobius marmoratus</i> | alta | 179.7 |
| | <i>Telmatobius halli</i> | alta | 145.4 |
| | <i>Telmatobius pefauri</i> | alta | 139.1 |
| | <i>Insuetophrynus acarpicus</i> | baja | 267.4 |
| | <i>Pleurodema thaul</i> | baja | 147.8 |
| <i>Pleurodema marmorata</i> | alta | 128.6 | |
| <i>Rhinoderma darwini</i> | baja | 202.6 | |

| <u>Altitud</u> | <u>Alta</u> | <u>Baja</u> | <u>t</u> | <u>P</u> |
|----------------|-------------|-------------|----------|----------|
| N | 6 | 16 | | |
| \bar{x} | 156.54 | 214.31 | 3.3677 | < 0.01 |
| DS | 22.88 | 39.22 | | |

N = Número de especies.

\bar{x} = Promedios de las especies.

de la elipse y el volumen del eritrocito ($r = 0.902$) fue utilizada por ser ligeramente más alta que la correlación entre el medio geométrico y el volumen ($r = 0.87$ $N = 23$). La correlación logarítmica ($r = 0.81$) entre la superficie y el volumen de los eritrocitos de las especies indicadas en la Tabla N° 1 se muestra en la Figura N° 2. En este gráfico se puede observar que el exponente del volumen (0.679) es prácticamente idéntico al esperado (0.67).

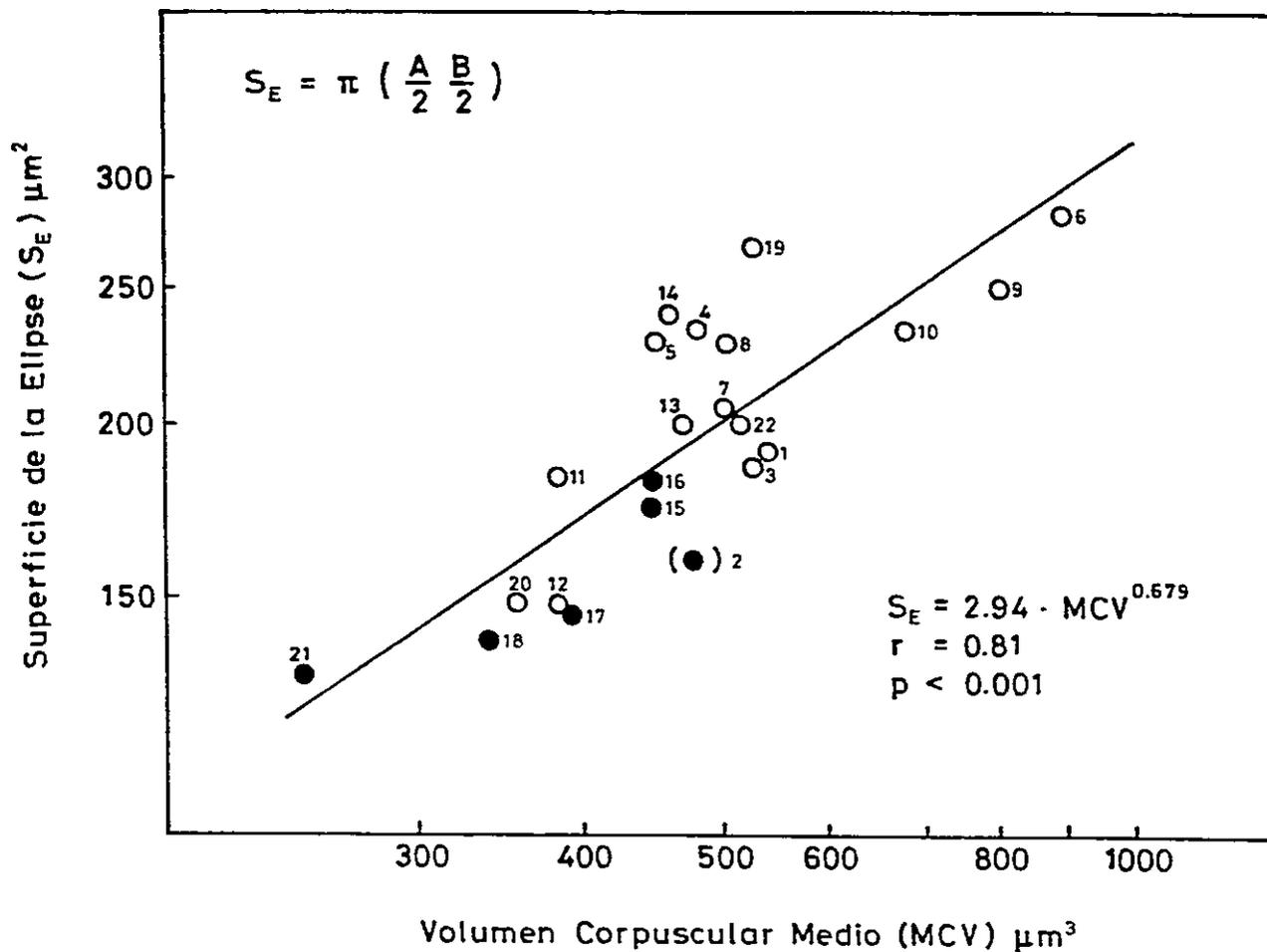


FIG. 2. Relación logarítmica entre la superficie de los eritrocitos, considerados como elipses y su volumen corpuscular medio. Los números corresponden a las especies indicadas en la Tabla N° 1. Los círculos negros identifican a las especies de alta altitud. Las desviaciones de los valores en torno a los promedios de volumen se indican en la Tabla N° 6. Los valores promedio de la población de altura de *B. spinulosus* se señala entre paréntesis.

I. c Volumen corpuscular medio (MCV) μm^3

El volumen corpuscular medio se calculó a partir de los valores de los hematocritos y de los recuentos globulares, de acuerdo a la ecuación # 1 (en Material y Métodos). Los promedios y desviación estandar para cada especie se presentan en la Tabla N° 6.

El rango de volúmenes se extiende desde 250 μm^3 en *Pleurodema marmorata* hasta casi 900 μm^3 en la especie *Caudiverbera caudiverbera*.

Cabe hacer notar que los volúmenes más pequeños descritos para anfibios son de 394 μm^3 para *Telmatobius culleus* (Hutchison *et al.*, 1976) y de 338 μm^3 en *Telmatobius pefauri* (Ruiz *et al.*, 1983).

En esta tabla también se ven diferencias significativas entre los promedios de MCV de los individuos de nivel del mar ($527 \pm 145 \mu\text{m}^3$) y el MCV de los de alta altitud ($392.2 \pm 84 \mu\text{m}^3$), esta diferencia es significativa si comparamos ambos grupos como promedio de valores individuales ($p < 0.001$; $N^{\text{e}} = 45/130$) o como promedios de las

TABLA N° 6

VALORES HEMATOLOGICOS EN ANUROS NATIVOS DE ALTAS Y BAJAS ALTITUDES

| | | VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (MCV) μm^3 | | |
|---------------------------|----------------------------------|---|-----------|------|
| | ESPECIE | ALTITUD | MCV \pm | DS |
| Bufonidae | <i>Bufo spinulosus</i> | baja | 544.1 | 24.9 |
| | <i>Bufo spinulosus</i> | alta | 476.6 | 21.7 |
| | <i>Bufo chilensis</i> | baja | 526.4 | 42.2 |
| | <i>Bufo rubropunctatus</i> | baja | 474.5 | 23.5 |
| | <i>Bufo atacamensis</i> | baja | 445.0 | 12.4 |
| Leptodactylidae | <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | baja | 872.5 | 51.4 |
| | <i>Eupsophus roseus</i> | baja | 506.0 | 52.0 |
| | <i>Eupsophus vertebralis</i> | baja | 501.0 | 32.4 |
| | <i>Eupsophus migueli</i> | baja | 808.0 | 99.5 |
| | <i>Eupsophus calcaratus</i> | baja | 679.4 | 40.0 |
| | <i>Batrachyla leptopus</i> | baja | 397.7 | 31.4 |
| | <i>Batrachyla taeniata</i> | baja | 380.0 | 13.5 |
| | <i>Alsodes nodosus</i> | baja | 463.7 | 25.4 |
| | <i>Alsodes tumultuosus</i> | baja | 456.0 | 28.0 |
| | <i>Telmatobius peruvianus</i> | alta | 446.0 | 48.0 |
| | <i>Telmatobius marmoratus</i> | alta | 447.9 | 19.5 |
| | <i>Telmatobius halli</i> | alta | 390.4 | 22.0 |
| | <i>Telmatobius pefauri</i> | alta | 338.3 | 28.0 |
| | <i>Insuetophrynus acarpicus</i> | baja | 526.5 | 69.3 |
| | <i>Pleurodema thaul</i> | baja | 352.3 | 37.8 |
| | <i>Pleurodema marmorata</i> | alta | 254.0 | 12.7 |
| <i>Rhinoderma darwini</i> | baja | 517.4 | 75.0 | |

| Altitud | Alta | Baja | t | p |
|------------|--------|----------|------|---------|
| N | 6 (45) | 16 (130) | | |
| \bar{x} | 392.2 | 527.03 | 2.13 | < 0.05 |
| DS | 83.8 | 145.00 | | |
| \bar{x}' | 395.2 | 536.26 | 5.91 | < 0.001 |
| DS | 84.2 | 152.27 | | |

N = Número de especies. Número de individuos entre paréntesis.

\bar{x} = Promedios de las especies. \bar{x}' = Promedios de valores individuales.

especies ($p < 0.05$; $N^{\&} = 6/16$).

En la Figura N° 3 se correlaciona el volumen del eritrocito con la distribución altitudinal máxima de las especies estudiadas. Se observa en este gráfico logarítmico una buena correlación negativa $r = -0.72$ ($p < 0.001$) entre ambos parámetros, lo que implica que el volumen de los eritrocitos es inversamente proporcional a la altitud. Esta relación está representada por la siguiente ecuación:

$$MCV = 2138 X^{-0.21} \quad (4)$$

en la que MCV es el volumen en μm^3 y X es la altitud en metros. $\&$: número de valores de alta altitud/número de valores de baja altitud.

II. NUMERO DE ERITROCITOS (RBC) $10^3/\text{mm}^3$

Los cambios en los números totales y relativos de células en la sangre indican alteraciones de mayor o menor importancia en el organismo como respuesta a condiciones nuevas en el medio ambiente o en el propio organismo.

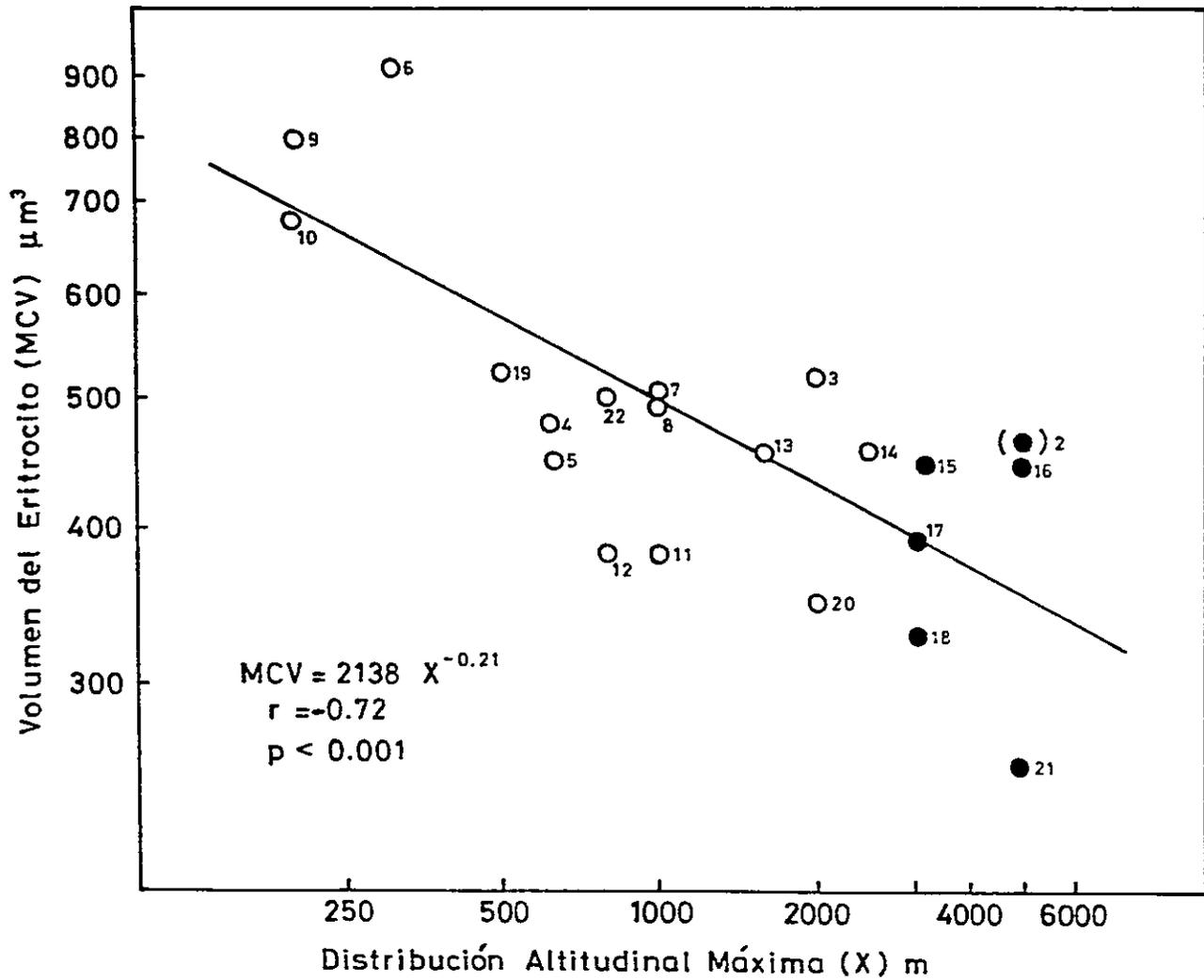


FIG. 3. Correlación logarítmica entre el volumen corpuscular medio para cada especie y su distribución altitudinal máxima. Los símbolos siguen la nomenclatura de la Figura 2.

El número de eritrocitos en los anfibios puede diferir de una especie a otra, aunque dentro de una misma especie tiende a ser más estable. Sin embargo, las cifras normales pueden ser modificadas por factores tales como estado nutricional, balance de agua, etc. (Noble, 1931).

Al eliminar algunos valores eminentemente anómalos (2 a 3% del total) hemos encontrado que el número de eritrocitos tiende a ser característico para muchas de las especies que hemos estudiado.

Los recuentos de células rojas realizados en estas 22 especies se presentan en la Tabla N° 7, en la cual se puede apreciar una clara diferencia entre el promedio del número de eritrocitos del grupo de especies de baja altitud (415.000/mm³ de sangre) y el promedio de las especies de alta altitud (713.000/mm³ de sangre) ($t = 9.28; p < 0.001$).

Este hecho se ve reafirmado en la Figura N° 4 en la que se observa una alta correlación positiva ($r = 0.806; p < 0.001$) entre el número de eritrocitos y la distribución altitudinal máxima de cada especie.

$$\text{RBC} = 280.4 + 0.11 X \quad (5)$$

en la que RBC es el número de eritrocitos en miles por mm³ de sangre y X es la altitud máxima en metros.

TABLA N° 7

VALORES HEMATOLOGICOS EN ANUROS NATIVOS DE ALTAS Y BAJAS ALTITUDES

| | | NUMERO DE ERITROCITOS (RBC) $10^3/\text{mm}^3$ | | |
|-----------------------------|----------------------------------|--|-------|----------|
| | ESPECIE | ALTITUD | RBC | \pm DS |
| Bufonidae | <i>Bufo spinulosus</i> | baja | 707.0 | 85 |
| | <i>Bufo spinulosus</i> | alta | 708.4 | 111 |
| | <i>Bufo chilensis</i> | baja | 552.0 | 190 |
| | <i>Bufo rubropunctatus</i> | baja | 463.0 | 178 |
| | <i>Bufo atacamensis</i> | baja | 506.7 | 142 |
| Leptodactylidae | <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | baja | 280.0 | 98 |
| | <i>Eupsophus roseus</i> | baja | 276.6 | 157 |
| | <i>Eupsophus vertebralis</i> | baja | 199.3 | 85 |
| | <i>Eupsophus migueli</i> | baja | 197.5 | 65 |
| | <i>Eupsophus calcaratus</i> | baja | 301.6 | 24 |
| | <i>Batrachyla leptopus</i> | baja | 340.3 | 160 |
| | <i>Batrachyla taeniata</i> | baja | 466.0 | 150 |
| | <i>Alsodes nodosus</i> | baja | 517.0 | 136 |
| | <i>Alsodes tumultuosus</i> | baja | 688.8 | 256 |
| | <i>Telmatobius peruvianus</i> | alta | 601.5 | 51 |
| | <i>Telmatobius marmoratus</i> | alta | 794.6 | 181 |
| | <i>Telmatobius halli</i> | alta | 892.1 | 229 |
| | <i>Telmatobius pefauri</i> | alta | 560.8 | 188 |
| | <i>Insuetophrynus acarpicus</i> | baja | 358.0 | 126 |
| | <i>Pleurodema thaul</i> | baja | 602.0 | 224 |
| <i>Pleurodema marmorata</i> | alta | 718.3 | 145 | |
| <i>Rhinoderma darwini</i> | baja | 187.0 | 58 | |

| Altitud | Alta | Baja | t | p |
|------------|--------|----------|------|---------|
| N | 6 (45) | 16 (128) | | |
| \bar{x} | 712.61 | 415.1 | 9.28 | < 0.001 |
| DS | 111.3 | 166.2 | | |
| \bar{x}' | 749.5 | 448.8 | 8.30 | < 0.001 |
| DS | 187.1 | 216.4 | | |

N = Número de especies. Número de individuos entre paréntesis.

\bar{x} = Promedios de las especies. \bar{x}' = Promedios de valores individuales.

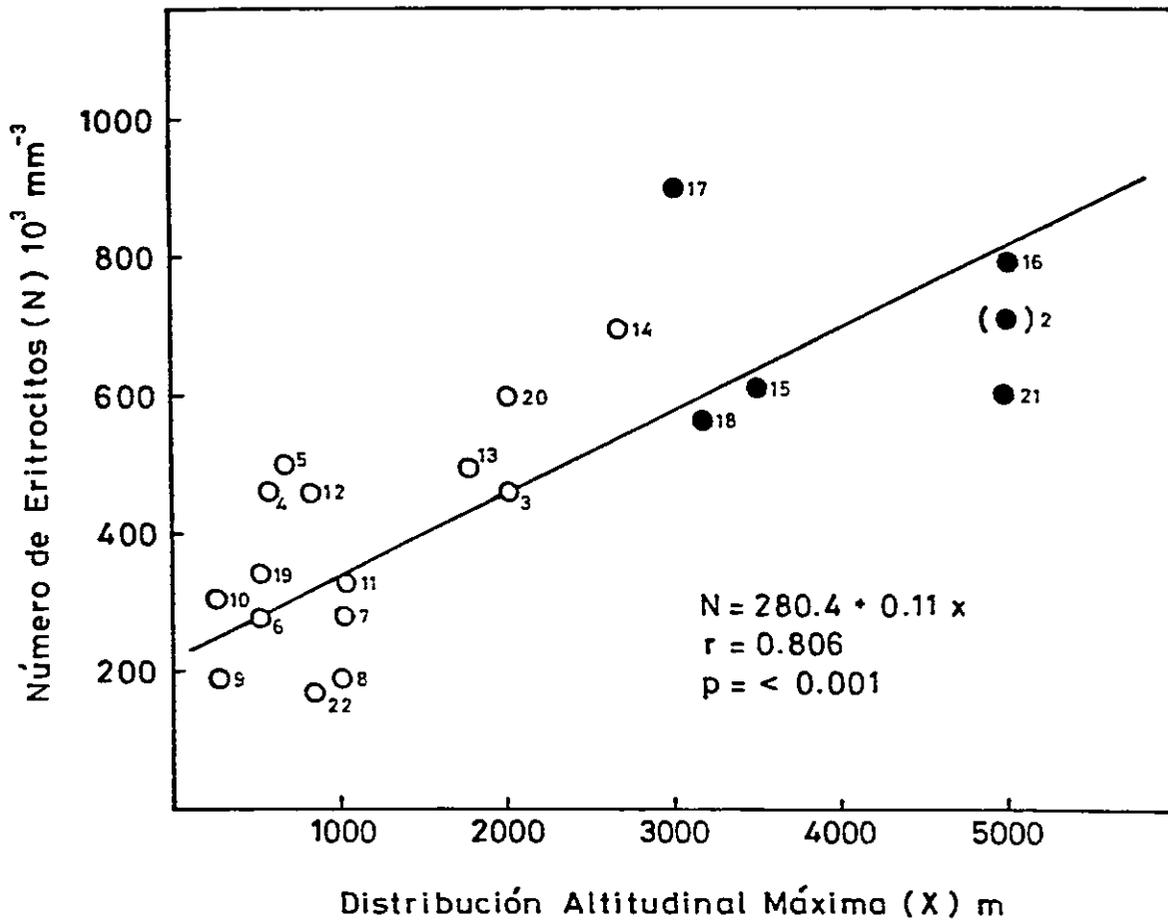


FIG. 4. Correlación entre el número de eritrocitos circulantes y la distribución altitudinal máxima de cada especie. Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Figura 2.

Las especies de alta altitud (círculos negros) se ven claramente separadas del grupo de baja altitud, teniendo estas últimas una menor cantidad de eritrocitos por mm^3 de sangre. En esta misma relación la pendiente de la recta implica un incremento de 11.000 eritrocitos por mm^3 por cada 100 metros de incremento en altitud.

III. HEMATOCRITO (Hct) %

Los promedios de los valores de hematocritos de los anuros estudiados se presentan en la Tabla N° 8.

Previo a un breve análisis de estos datos conviene recordar que las variaciones del volumen relativo de los glóbulos rojos de la sangre dependen tanto del número como del tamaño de los eritrocitos circulantes.

De allí que la pequeña diferencia entre el promedio de los hematocritos de las especies de alta altitud (28%) y el promedio de las de baja altitud (21%) no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Este hecho puede explicarse como una suerte de compensación entre

TABLA N° 8

VALORES HEMATOLOGICOS EN ANUROS NATIVOS DE ALTAS Y BAJAS ALTITUDES

HEMATOCRITOS (HCT) %

| | <u>ESPECIE</u> | <u>ALTITUD</u> | <u>HCT</u> | <u>±</u> | <u>DS</u> |
|-----------------|----------------------------------|----------------|------------|----------|-----------|
| Bufonidae | <i>Bufo spinulosus</i> | baja | 38.5 | | 5.0 |
| | <i>Bufo spinulosus</i> | alta | 34.4 | | 4.7 |
| | <i>Bufo chilensis</i> | baja | 29.2 | | 8.9 |
| | <i>Bufo rubropunctatus</i> | baja | 22.1 | | 9.5 |
| | <i>Bufo atacamensis</i> | baja | 25.0 | | 7.4 |
| Leptodactylidae | <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | baja | 25.0 | | 8.6 |
| | <i>Eupsophus roseus</i> | baja | 11.6 | | 6.9 |
| | <i>Eupsophus vertebralis</i> | baja | 10.1 | | 4.5 |
| | <i>Eupsophus migueli</i> | baja | 14.3 | | 3.9 |
| | <i>Eupsophus calcaratus</i> | baja | 21.8 | | 7.7 |
| | <i>Batrachyla leptopus</i> | baja | 10.3 | | 6.0 |
| | <i>Batrachyla taeniata</i> | baja | 17.8 | | 5.8 |
| | <i>Alsodes nodosus</i> | baja | 23.9 | | 6.2 |
| | <i>Alsodes tumultuosus</i> | baja | 33.2 | | 6.1 |
| | <i>Telmatobius peruvianus</i> | alta | 27.0 | | 5.0 |
| | <i>Telmatobius marmoratus</i> | alta | 35.5 | | 6.4 |
| | <i>Telmatobius halli</i> | alta | 34.3 | | 7.9 |
| | <i>Telmatobius pefauri</i> | alta | 19.3 | | 7.7 |
| | <i>Insuetophrynus acarpicus</i> | baja | 18.4 | | 4.7 |
| | <i>Pleurodema thaul</i> | baja | 20.1 | | 6.4 |
| | <i>Pleurodema marmorata</i> | alta | 17.6 | | 4.5 |
| | <i>Rhinoderma darwini</i> | baja | 9.0 | | 2.5 |

| <u>Altitud</u> | <u>Alta</u> | <u>Baja</u> | <u>t</u> | <u>p</u> |
|----------------|-------------|-------------|----------|----------|
| N | 6 (49) | 16 (137) | | |
| \bar{x} | 28.0 | 20.6 | 1.91 | 0.06 |
| DS | 7.32 | 8.3 | | |

N = Número de especies.

\bar{x} = Promedios de las especies.

número y volumen, ya que aparentemente cuando las células son muy pequeñas, son a su vez muy numerosas, como por ejemplo: *Pleurodema marmorata* que tiene el volumen más pequeño ($254 \mu\text{m}^3$) tiene también uno de los valores más altos de recuento globular (718.300 eritrocitos por mm^3). Al revés, en los animales en los cuales estas células son notoriamente grandes, su número es muy bajo, como por ejemplo *Caudiverbera caudiverbera* que presenta un gran volumen celular de $870 \mu\text{m}^3$ y paralelamente un bajo recuento (280.000 eritrocitos por mm^3 de sangre). No obstante, ambas especies tienen hematocritos que caen dentro de un rango $21.3 \pm 4\%$.

Un caso semejante será analizado más adelante al referirnos específicamente a *Bufo spinulosus*.

De lo que hasta aquí hemos expuesto, pareciera ser que el hematocrito no es un carácter muy adecuado para diferenciar especies nativas de alta y de baja altitud.

La Figura N° 5, que relaciona los valores de Hct de las especies estudiadas con su distribución altitudinal máxima tiende a corroborar esta idea. En este gráfico, el

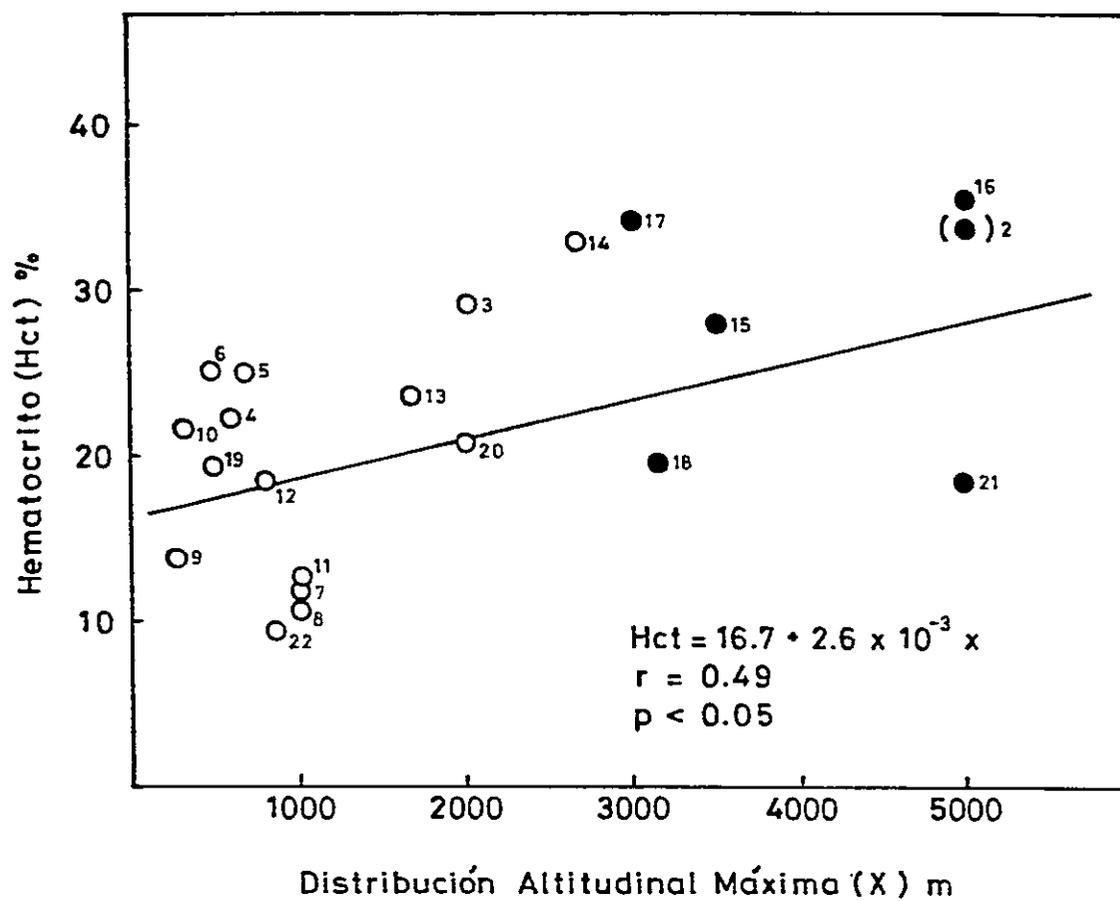


FIG. 5 Correlación entre el hematocrito y la distribución altitudinal máxima de cada especie.
 Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Figura 2.

coeficiente de correlación (r) tiene un valor de 0.49 con una probabilidad ligeramente inferior a 0.05, lo que consideramos como cifra frontera de significancia.

IV. HEMOGLOBINA

IV. a Hemoglobina circulante (Hb) g/100 ml de sangre

Los niveles de hemoglobina en la sangre (g %) se resumen en la Tabla N° 9. Al igual que el hematocrito los valores tienen una amplia variación en las diversas especies estudiadas. Los más bajos se encontraron en el género Eupsophus (2.3% en *E. vertebralis*) y los más altos representan casi 5 veces este valor (11.2% en *Telmatobius marmoratus*).

Un análisis de estas cifras permite distinguir dos grupos de especies: los valores promedios de las especies colectadas en altas altitudes (9.02 g %) son significativamente mayores ($t = 3.55$; $p < 0.01$) que las de baja altitud (5.54 g %).

TABLA N° 9

VALORES HEMATOLOGICOS EN ANUROS NATIVOS DE ALTAS Y BAJAS ALTITUDES

| | | HEMOGLOBINA (Hb) g/100 ml | | |
|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------|------|-----|
| | ESPECIE | ALTITUD | Hb ± | DS |
| Bufonidae | <i>Bufo spinulosus</i> | baja | 10.4 | 1.3 |
| | <i>Bufo spinulosus</i> | alta | 9.3 | 1.7 |
| | <i>Bufo chilensis</i> | baja | 8.6 | 2.7 |
| | <i>Bufo rubropunctatus</i> | baja | 6.1 | 2.6 |
| | <i>Bufo atacamensis</i> | baja | 7.3 | 1.9 |
| Leptodactylidae | <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | baja | 5.7 | 2.1 |
| | <i>Eupsophus roseus</i> | baja | 3.8 | 1.9 |
| | <i>Eupsophus vertebralis</i> | baja | 2.3 | 0.7 |
| | <i>Eupsophus migueli</i> | baja | 3.9 | 0.5 |
| | <i>Eupsophus calcaratus</i> | baja | 5.4 | 2.9 |
| | <i>Batrachyla leptopus</i> | baja | 3.4 | 1.4 |
| | <i>Batrachyla taeniata</i> | baja | 4.6 | 1.5 |
| | <i>Alsodes nodosus</i> | baja | 6.0 | 1.9 |
| | <i>Alsodes tumultuosus</i> | baja | 8.2 | 3.2 |
| | <i>Telmatobius peruvianus</i> | alta | 9.5 | 1.8 |
| | <i>Telmatobius marmoratus</i> | alta | 11.2 | 2.4 |
| | <i>Telmatobius halli</i> | alta | 9.8 | 1.7 |
| | <i>Telmatobius pefauri</i> | alta | 8.7 | 2.0 |
| | <i>Insuetophrynus acarpicus</i> | baja | 5.0 | 1.2 |
| | <i>Pleurodema thaul</i> | baja | 5.3 | 2.5 |
| <i>Pleurodema marmorata</i> | alta | 5.6 | 1.7 | |
| <i>Rhinoderma darwini</i> | baja | 2.5 | 1.0 | |

| Altitud | Alta | Baja | t | p |
|------------|--------|----------|------|---------|
| N | 6 (42) | 16 (121) | | |
| \bar{x} | 9.02 | 5.54 | 3.55 | < 0.01 |
| DS | 2.16 | 1.70 | | |
| \bar{x}' | 8.92 | 6.33 | 4.92 | < 0.001 |
| DS | 2.57 | 3.06 | | |

N = Número de especies. Número de individuos entre paréntesis.

\bar{x} = Promedios de las especies. \bar{x}' = Promedios de valores individuales.

Esta diferencia se acentúa aún más si consideramos los promedios de los valores individuales de ambos grupos ($t = 4.92$; $p < 0.001$).

IV. b. Hemoglobina corpuscular media (MCH) pg/célula

Hemos encontrado que la variación en la hemoglobina corpuscular media, se relaciona en general con los cambios en el volumen corpuscular medio. A medida que las células aumentan su tamaño, tienden igualmente a tener un aumento en la cantidad de hemoglobina contenida y vice-versa (&).

Así, en la Tabla N° 10 presentamos el promedio de MCH encontrado en cada una de las especies estudiadas. En esta tabla los valores extremos corresponden a 76.9 ± 6.3 pg/célula en *Pleurodema marmorata* (valores mínimos) y

(&) Al referirnos a cambios en el volumen o tamaño celular queremos indicar diferencias que se observan al ordenar jerárquicamente los valores de las distintas especies. Ello no implica un cambio real en los valores individuales ni en los promedios de las especies.

TABLA N° 10

VALORES HEMATOLOGICOS EN ANUROS NATIVOS DE ALTAS Y BAJAS ALTITUDES

HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (MCH) pg/célula

| | <u>ESPECIE</u> | <u>ALTITUD</u> | <u>MCH</u> | <u>±</u> | <u>DS</u> |
|---------------------------|----------------------------------|----------------|------------|----------|-----------|
| Bufonidae | <i>Bufo spinulosus</i> | baja | 147.5 | | 10.7 |
| | <i>Bufo spinulosus</i> | alta | 129.8 | | 9.2 |
| | <i>Bufo chilensis</i> | baja | 154.4 | | 17.9 |
| | <i>Bufo rubropunctatus</i> | baja | 130.5 | | 9.0 |
| | <i>Bufo atacamensis</i> | baja | 166.5 | | 23.1 |
| Leptodactylidae | <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | baja | 198.7 | | 27.4 |
| | <i>Eupsophus roseus</i> | baja | 151.2 | | 15.4 |
| | <i>Eupsophus vertebralis</i> | baja | 123.3 | | 21.0 |
| | <i>Eupsophus migueli</i> | baja | 231.8 | | 60.9 |
| | <i>Eupsophus calcaratus</i> | baja | 187.9 | | 29.0 |
| | <i>Batrachyla leptopus</i> | baja | 109.5 | | 18.5 |
| | <i>Batrachyla taeniata</i> | baja | 97.7 | | 13.8 |
| | <i>Alsodes nodosus</i> | baja | 115.7 | | 15.4 |
| | <i>Alsodes tumultuosus</i> | baja | 125.9 | | 7.8 |
| | <i>Telmatobius peruvianus</i> | alta | 157.7 | | 17.2 |
| | <i>Telmatobius marmoratus</i> | alta | 143.1 | | 13.5 |
| | <i>Telmatobius halli</i> | alta | 113.2 | | 17.3 |
| | <i>Telmatobius pefauri</i> | alta | 114.6 | | 2.3 |
| | <i>Insuetophrynus acarpicus</i> | baja | 126.9 | | 5.3 |
| | <i>Pleurodema thaul</i> | baja | 96.2 | | 11.3 |
| | <i>Pleurodema marmorata</i> | alta | 76.9 | | 6.3 |
| <i>Rhinoderma darwini</i> | baja | 142.9 | | 28.3 | |

| <u>Altitud</u> | <u>Alta</u> | <u>Baja</u> | <u>t</u> | <u>p</u> |
|----------------|-------------|-------------|----------|----------|
| N | 6 | 16 | | |
| \bar{x} | 122.6 | 144.2 | 1.33 | > 0.1 |
| DS | 25.6 | 36.2 | | |

N = Número de especies.

 \bar{x} = Promedios de las especies.

a 198.7 ± 27.4 pg/célula en *Caudiverbera caudiverbera* (valores máximos), especies que tienen los volúmenes corpusculares más bajos y los más altos respectivamente (ver Tabla N° 6).

El análisis de datos agrupados de las especies de alta y de baja altitud señalados en la Tabla N° 10 indica que no existen diferencias significativas entre los promedios de MCH entre los dos grupos ($t = 1.33$; $p > 0.1$).

IV. c. Concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) %

Uno de los hechos más interesantes en el campo de la hematología comparada es la relativa constancia de la concentración de hemoglobina corpuscular media en los diversos grupos de vertebrados, a pesar de las grandes diferencias que puedan existir en casi todos los otros parámetros hematológicos (Wintrobe, 1934).

) Los anfibios en estudio caen en un rango de MCHC de $30 \pm 5\%$ (Tabla N° 11), salvo *Caudiverbera caudiverbera* que parece ser una excepción, con una concentración de

TABLA N° 11

VALORES HEMATOLOGICOS EN ANUROS NATIVOS DE ALTAS Y BAJAS ALTITUDES

CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (MCHC) %

| | <u>ESPECIE</u> | <u>ALTITUD</u> | <u>MCHC</u> | \pm | <u>DS</u> |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------|-------------|-------|-----------|
| Bufonidae | <i>Bufo spinulosus</i> | baja | 27.1 | | 1.28 |
| | <i>Bufo spinulosus</i> | alta | 27.3 | | 1.40 |
| | <i>Bufo chilensis</i> | baja | 29.2 | | 1.60 |
| | <i>Bufo rubropunctatus</i> | baja | 28.0 | | 0.82 |
| | <i>Bufo atacamensis</i> | baja | 29.6 | | 2.59 |
| Leptodactylidae | <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | baja | 22.8 | | 2.42 |
| | <i>Eupsophus roseus</i> | baja | 29.6 | | 1.77 |
| | <i>Eupsophus vertebralis</i> | baja | 24.7 | | 5.12 |
| | <i>Eupsophus migueli</i> | baja | 28.0 | | 0.54 |
| | <i>Eupsophus calcaratus</i> | baja | 29.2 | | 1.30 |
| | <i>Batrachyla leptopus</i> | baja | 28.8 | | 0.13 |
| | <i>Batrachyla taeniata</i> | baja | 26.2 | | 3.19 |
| | <i>Alsodes nodosus</i> | baja | 26.0 | | 2.33 |
| | <i>Alsodes tumultuosus</i> | baja | 28.2 | | 1.22 |
| | <i>Telmatobius peruvianus</i> | alta | 35.4 | | 0.50 |
| | <i>Telmatobius marmoratus</i> | alta | 31.4 | | 1.50 |
| | <i>Telmatobius halli</i> | alta | 29.4 | | 2.40 |
| | <i>Telmatobius pefauri</i> | alta | 32.3 | | 0.60 |
| | <i>Insuetophrynus acarpicus</i> | baja | 25.3 | | 2.90 |
| | <i>Pleurodema thaul</i> | baja | 28.8 | | 0.85 |
| <i>Pleurodema marmorata</i> | alta | 31.1 | | 0.30 | |
| <i>Rhinoderma darwini</i> | baja | 27.2 | | 0.96 | |

| <u>Altitud</u> | <u>Alta</u> | <u>Baja</u> | <u>t</u> | <u>p</u> |
|----------------|-------------|-------------|----------|----------|
| N | 6 (41) | 16 (122) | | |
| \bar{x} | 31.3 | 27.4 | 3.74 | <0.01 |
| DS | 2.5 | 1.9 | | |
| \bar{x}' | 30.5 | 27.4 | 5.63 | <0.001 |
| DS | 2.9 | 3.1 | | |

N = Número de especies. Número de individuos entre paréntesis.

\bar{x} = Promedios de las especies. \bar{x}' = Promedios de valores individuales.

hemoglobina tan baja (22.8%), similar a la que existe en peces y lampreas, que es normalmente inferior a la de otros vertebrados.

A pesar de la relativa constancia de MCHC los animales colectados en bajas altitudes tienen una concentración de hemoglobina corpuscular media promedio de $27.4 \pm 1.9 \%$, que contrasta con los animales de alta altitud ($30.5 \pm 2.9\%$). Si comparamos los valores promedios de ambos grupos, considerando los valores individuales para todas las especies, las diferencias son estadísticamente significativas ($t = 5.63; p < 0.001$). El valor más alto encontrado corresponde a la especie *Telmatobius marmoratus* que es de 35.4%, valor muy similar o superior al que tienen el hombre y otros mamíferos.

V. *Bufo spinulosus*

Un caso muy especial lo constituye la especie *Bufo spinulosus* debido a que es la única especie en que los animales fueron colectados prácticamente desde el nivel del mar hasta los 4300 metros de altura.

Los valores promedios de los diámetros mayores de los eritrocitos de individuos provenientes de distintas alturas se muestran en la Figura N° 6, en la que se graficaron los valores de cuatro grupos de *Bufo spinulosus* de acuerdo a las alturas de colecta: 200, 2700, 3200 y 4300 metros de altura, respectivamente.

En este gráfico se presenta la distribución de frecuencias de tamaño del eritrocito, representado por los diámetros mayores, que según lo indicado más arriba expresa mejor, que el diámetro menor las diferencias de tamaño del eritrocito.

Casi no existen diferencias en los valores promedios del diámetro mayor del grupo de individuos provenientes de 200 y el de 2700 metros, tampoco hay diferencias entre el grupo de 3200 y de los individuos provenientes de 4300 metros de altura. Sin embargo, la separación es clara si los ejemplares se consideran como integrantes de solamente dos grupos que se corresponden además con nuestra definición primaria: Especies provenientes de alta altitud, a aquellas que habitan por sobre los 3000 metros de altura y un segundo grupo de especies de baja altitud, a aquellas que viven bajo los 3000 metros.

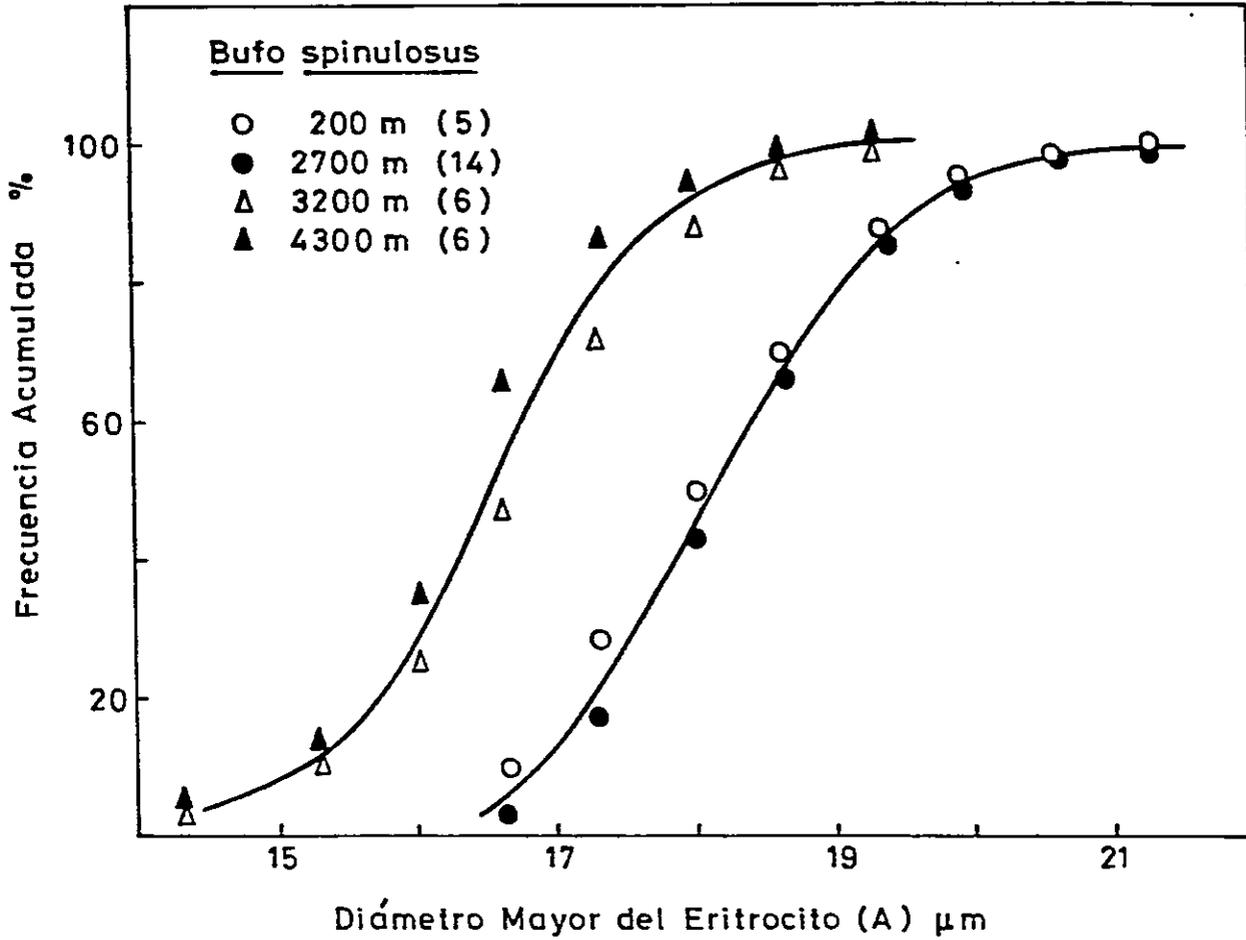


FIG. 6 Frecuencias acumuladas de los diámetros mayores de los eritrocitos de *Bufo spinulosus* proveniente de 200, 2700, 3200 y 4300 metros. El número de ejemplares se indica entre paréntesis.

Al comparar ahora los promedios de ambos grupos: $18.5 \pm 1.1 \mu\text{m}$ versus $16.9 \pm 1.0 \mu\text{m}$ en el grupo de alta altitud, se observa una diferencia significativa ($t = 25.3$; $p < 0.001$).

Estas diferencias son menos marcadas pero también significativas ($p < 0.02$) cuando se comparan los diámetros menores ($13.45 \pm 1.1 \mu\text{m}$ versus $12.1 \mu\text{m}$ en el grupo de alta altitud).

En la Tabla N° 12 se presentan los valores promedios de todos los parámetros hematológicos estudiados en esta especie. Se realizó un test de Student para comparar los valores de los individuos de alta altitud ($\geq 3000 \text{ m}$) con los de baja altitud ($< 3000 \text{ m}$).

Existen diferencias significativas entre ambos grupos en los siguientes parámetros: volumen corpuscular medio ($p < 0.001$); diámetros del eritrocito ($p < 0.001$) y hemoglobina corpuscular media ($p < 0.001$). Siendo los eritrocitos de los individuos de alta altitud más pequeños y con menor contenido de hemoglobina por célula.

TABLA N° 12

VALORES HEMATOLOGICOS EN BUFO SPINULOSUS DE DIVERSAS ALTITUDES

| Altitudes de origen (m) | (200 - 2700)* | (3200 - 4300)** | p |
|--|---------------|-----------------|---------|
| HEMATOCRITO (%) | 38.5 ± 5.0 | 34.4 ± 4.7 | < 0.05 |
| HEMOGLOBINA (g%) | 10.4 ± 1.3 | 9.3 ± 1.7 | > 0.1 |
| NUMERO DE ERITROCITOS (10 ³ /mm ³) | 707 ± 85 | 708 ± 111 | > 0.1 |
| VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (μm ³) | 544.1 ± 24.9 | 476 ± 22 | < 0.001 |
| CONCENTRACION DE Hb CORPUSCULAR (%) | 27.1 ± 1.3 | 27.2 ± 1.4 | > 0.1 |
| HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (pg/cél) | 147.5 ± 11 | 129.8 ± 9.2 | < 0.001 |
| DIAMETRO MAYOR DEL ERITROCITO (μm)*** | 18.5 ± 1.1 | 16.8 ± 1.0 | < 0.001 |
| DIAMETRO MENOR DEL ERITROCITO (μm)*** | 13.2 ± 0.8 | 12.5 ± 0.7 | < 0.001 |
| PESO CORPORAL (g) | 45.4 ± 18.3 | 22.9 ± 8.1 | < 0.001 |

* (N = 16)

** (N = 11)

*** (Promedio de 1000 RBC en cada grupo)

En esta tabla podemos ver que no existen diferen
cias estadísticamente significativas entre los promedios
de ambos grupos en: número de eritrocitos ($p > 0.9$), hemoglo
globina (g %) ($p > 0.1$) y concentración de hemoglobina corpus
cular media ($p > 0.9$).

DISCUSION

En nuestra búsqueda de características hematológicas más probables de ser consideradas como adaptaciones para la vida de los anfibios en altas altitudes, hemos encontrado que uno de los rasgos más distintivos de las especies de alta altitud, es el pequeño tamaño de sus eritrocitos. Hecho que puede observarse aún en poblaciones de una misma especie (*B. spinulosus*).

A este respecto, las diferencias entre los valores obtenidos en las especies que viven por sobre los 3000 metros y las que viven por debajo de esta altura se aprecian claramente al comparar las dimensiones lineales del eritrocito.

El diámetro mayor de los eritrocitos de las especies de alta altitud consideradas en conjunto, es de $16.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$ mientras que el diámetro mayor de las especies de baja altitud es de $20.1 \pm 2.2 \mu\text{m}$ ($t= 4.15$; $p < 0.001$).

Paralelamente, el diámetro menor para las especies de alta altitud es en promedio $12.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$, y para las especies de baja altitud es de $13.45 \pm 1.1 \mu\text{m}$ ($t=2.82$; $p < 0.02$).

En un contexto más amplio, conviene tener presente que en general el tamaño del eritrocito en los anfibios es muy variable. Por ejemplo los Urodelos tienen los eritrocitos más grandes de todos los vertebrados.

El diámetro mayor de esta célula en *Amphiuma sp* es de $70 \mu\text{m}$ (Noble, 1931); y en *Proteus* y *Necturus* es de 55 y $70 \mu\text{m}$ respectivamente (Foxon, 1964; Hartman & Lessler, 1964).

Sin embargo, los anuros tienen eritrocitos considerablemente más pequeños (y además menos elípticos), buenos ejemplos son *Rana pipiens* y *Rana palustris* en las que el diámetro mayor del eritrocito en ambas especies es de $20 \mu\text{m}$ aproximadamente (Kaloustian & Dulac, 1982).

Considerando nuestros datos de *Pleurodema marmorata*, el diámetro mayor del eritrocito de anfibios oscila entre 14 y $70 \mu\text{m}$, ciertamente el rango más amplio entre todas

las clases de vertebrados (W. Andrew, 1965).

Esta gran plasticidad en el tamaño del glóbulo rojo de los anfibios, ha permitido distinguir grupos de tamaños de eritrocitos, asociados a la presencia altitudinal de las especies estudiadas, o de las poblaciones de una misma especie (*B. spinulosus*).

Además de las diferencias en el tamaño del eritrocito (dimensiones lineales) encontradas en ambos grupos de anuros, también encontramos diferencias cuando comparamos los valores promedios del MCV y la superficie de los glóbulos rojos.

Sin hacer referencia a la distribución altitudinal de las especies estudiadas, el rango de MCV encontrado se extiende desde un mínimo de $250 \mu\text{m}^3$ hasta $900 \mu\text{m}^3$ (Tabla N°6). En este rango, las especies de altura se agrupan en torno a un valor promedio de $392 \mu\text{m}^3$ y las de baja altitud en torno a los $527 \mu\text{m}^3$. La diferencia entre ambos grupos es altamente significativa ($p < 0.001$) y se ve corroborada en la Fig. N° 3, que muestra una buena correlación negativa entre el volumen del eritrocito y la

distribución altitudinal de las especies ($r = -0.72$; $p < 0.001$). A nivel de poblaciones se observa la misma tendencia; el eritrocito de *B. spinulosus* de alta altitud es significativamente más pequeño que el de baja altitud (Tabla N° 12).

No existen muchos datos sobre el MCV de otros anuros, sin embargo en la revisión de Wood *et al.* (1975) las especies del género *Rana* como *R. catesbeiana*, *R. esculenta* y *R. pipiens* presentan valores de MCV que oscilan entre 660 y 770 μm^3 .

Bastante mayor (1235 μm^3) es el MCV de *Hyla arborea* (Szarsky, 1976).

En el género *Bufo*, Kaloustian & Dulac (1982), reportan un MCV de 538 μm^3 para *B. marinus* y Biswas *et al.* (1981), de 480 μm^3 en *B. melanostictus*. Desgraciadamente los valores de MCV dados por Olmo & Morescalchi (1978), para *B. viridis* (709 μm^3), *B. bufo* (819 μm^3) y para otras especies de anuros, no son comparables con nuestros datos (ni con los de otros autores), debido a que fueron estimados a partir de las dimensiones lineales de eritrocitos

fijados y teñidos, lo que al menos en *C. cadaverbera* subestima el volumen del eritrocito "a fresco" en aproximadamente 30%.

Aún con estas consideraciones, resulta claro que los valores de MCV citados para las especies de baja altitud de los géneros *Rana* y *Bufo*, caen también dentro del rango de valores que hemos encontrado para nuestras especies de baja altitud; *Hyla arborea* lo sobrepasa.

Por otra parte, Hutchison *et al.* (1976) y Ruiz *et al.* (1983) dan valores de MCV en cinco especies de altura del género *Telmatobius* (algunas incluidas en nuestras tablas) y que concuerdan con el rango inferior de volúmenes del eritrocito que hemos descrito para las especies de alta altitud. Notable en este respecto es el MCV de *Pleurodema marmorata* ($254 \mu\text{m}^3$) cuyo pequeño volumen es el menor descrito hasta ahora en anfibios. Un poco mayor ($352 \mu\text{m}^3$) es el eritrocito de la especie congénérica *Pleurodema thaul*, la que hasta donde sabemos, no se encuentra por sobre los 2000 a 2500 metros. Sin embargo, los ambientes hipóxicos no son exclusivamente característicos de las grandes alturas y el pequeño volumen del eritrocito de *P. thaul* bien pudiese atribuirse tanto a una característica genérica

como a la existencia de cierta potencialidad que le permita sobrevivir (por lo menos parte del año) en ciénagas o enterrado en lugares pobres en oxígeno. Esto último ocurre en condiciones naturales de sequía en *Xenopus laevis* (Moore, 1964).

Paralelamente, nuestras mediciones de MCV en seis ejemplares adultos de *Xenopus laevis* dan un valor de $301 \pm 15 \mu\text{m}^3$, ciertamente dentro del rango de valores de MCV de nuestras especies de alta altitud; o mejor dicho, de las especies que viven en medios hipóxicos, que en nuestro caso particular definimos como hipoxia de altura.

Además del volumen, la superficie del eritrocito tiene un rol importante en el intercambio de gases, contribuyendo a determinar la eficiencia con que realiza esta función (Hawkey, 1975; Andrew, 1965).

Es de esperar entonces que un eritrocito subdividido en pequeñas unidades tenga una mayor superficie total y sea más favorable para el intercambio de gases entre el exterior y el interior del eritrocito. Es de esperar, además, que esta situación se observe tanto en animales con alto

requerimiento de energía como en aquellos en que la disponibilidad de oxígeno esté restringida.

Efectivamente, hace ya más de medio siglo que Smith (1925) observó que el metabolismo de seis especies de anfibios estaba inversamente relacionado con el tamaño de sus eritrocitos, hecho que más recientemente confirman Monnickendam & Balls (1973) y en peces, Srivastava & Griffiths (1974).

En nuestro trabajo, hemos calculado la superficie del eritrocito considerándolo como una elipse doble; de modo que el área de cada cara es el resultado de la multiplicación de π por los semiejes $A/2$ y $B/2$.

Es de esperar entonces que las relaciones entre la superficie de los eritrocitos y la altura de origen de las especies tengan las mismas características que las relaciones ya descritas entre las dimensiones lineales del glóbulo rojo y la altura de origen. Efectivamente, la superficie promedio de los eritrocitos de las especies de altura es menor que el promedio de las especies de baja altitud (156.5 vs $214 \mu\text{m}^2$; $p < 0.005$).

Podemos tener una apreciación cuantitativa de la ventaja que representa este hecho para las especies de altura, si comparamos la superficie y el MCV de los eritrocitos de *Pleurodema marmorata* y de *Caudiverbera caudiverbera*: el MCV de esta última ($873 \mu\text{m}^3$) es equivalente a 3.44 eritrocitos de *P. marmorata* ($254 \mu\text{m}^3$) que suman una superficie de $442 \mu\text{m}^2$, área que es 54% mayor de la que tiene un eritrocito de *Caudiverbera caudiverbera* ($287 \mu\text{m}^2$) a igual volumen.

Esto se debe a que el eritrocito de *P. marmorata* tiene solamente 1/3 del volumen, pero casi 1/2 de la superficie del eritrocito de *Caudiverbera*.

En las especies estudiadas la correlación ($r = 0.81$) entre la superficie del eritrocito y su volumen es buena y corresponde a la ecuación de regresión:

$$S_e = 2.94 \times \text{MCV}^{0.679} \quad (6)$$

Siendo S_e , la superficie de una de las caras del eritrocito (μm^2) y MCV el volumen corpuscular medio (μm^3). El valor 2.94 es un factor de proporcionalidad que depende de la forma del eritrocito (Fig. N° 2).

La forma exponencial de esta ecuación era de esperarse, dado que en teoría la superficie de un cuerpo de biese ser proporcional a su volumen elevado a un exponente $2/3$ (Kleiber, 1961).

La similitud entre el exponente teórico (&) y el empírico es verdaderamente grata.

Por lo descrito hasta ahora, es claro que aunque en general los eritrocitos de anfibios son elípticos, su forma difiere en las distintas especies y esta diferencia podría ser dependiente de su tamaño.

Algunos autores utilizan la razón entre el diámetro mayor y el diámetro menor del eritrocito (L/W) como un índice de su forma (Davison, 1959). Otros la expresan en términos de excentricidad (e).

(&) El volumen (V) es proporcional a la dimensión lineal elevada al cubo (L^3), por lo tanto la raíz cúbica del volumen ($V^{1/3}$), elevada al cuadrado ($V^{2/3}$) debe ser proporcional a la superficie (L^2).

A partir de los diámetros mayores (A) y menores (B) se calculó la excentricidad (e) de los eritrocitos, considerándolos como elipses. Para ello se utilizó la relación:

$$e = \frac{c}{a} = \frac{\sqrt{\left(\frac{A}{2}\right)^2 - \left(\frac{B}{2}\right)^2}}{\frac{A}{2}} \quad (7)$$

En la que c es la distancia entre uno de los focos de la elipse y el centro geométrico, cuyo valor númerico corresponde a la raíz cuadrada de la diferencia entre el semieje mayor al cuadrado y el semieje menor al cuadrado, a es la longitud del semi eje mayor.

La relación (L/W) para el eritrocito de la mayoría de los Urodelos estudiados es de 1.74 a 1.92: y de 0.816 a 0.841, en excentricidad.

Por su parte los anuros presentan un rango en L/W de 1.49 a 1.93 y de 0.736 a 0.854 en excentricidad (Kuramoto, 1981).

Nosotros hemos expresado la forma del eritrocito en términos de excentricidad por considerarla geométricamente más adecuada. El rango de excentricidad encontrado en nuestras especies va desde 0.549 en *Pleurodema marmorata*, el valor más bajo de excentricidad en el MCV más pequeño encontrado en nuestras especies, hasta 0.818 en *Caudiverbera caudiverbera* el valor más alto de excentricidad y el mayor MCV encontrado.

En general, los eritrocitos de las especies nativas de alta altitud resultaron ser no tan solo de menor tamaño que los de las especies de baja altitud, sino que además presentan una menor excentricidad (0.66 ± 0.06 versus 0.74 ± 0.03 ; $p < 0.001$), es decir, tienden a ser más circulares que en las especies de baja altitud. Es probable que las diferencias en las formas de los eritrocitos de ambos grupos se asocie más con las diferencias de sus volúmenes corpusculares (Tabla N° 6), o de sus longitudes mayores (Tabla N° 3), que con una cualidad particular de facilitación de intercambio de gases, de las formas circulares comparadas con elípticas. Apoyan esta idea las correlaciones entre excentricidad y volumen corpuscular medio:

$$e = 0.603 + 0.23/1000 \text{ VCM} \quad r = 0.64 \quad (8)$$

$$p < 0.005 \quad (\text{Fig. N}^\circ 7)$$

y entre excentricidad y diámetro mayor:

$$e = 0.420 + 0.0157 A \quad r = 0.79 \quad (9)$$

$$p < 0.001$$

Similarmente, debemos recordar que la sangre de los camélidos sudamericanos se diferencia de la de mamíferos nativos de baja altitud, fundamentalmente por su alto número de eritrocitos ($10 \times 10^6/\text{mm}^3$), de bajo MCV (25 a $30 \mu\text{m}^3$) y de alta MCHC(40%), más que por la forma de éstos (Morrison *et al.*, 1963; Rosenmann & Morrison, 1963). Por otra parte, la forma elíptica de los eritrocitos de los camélidos "de altura" (*Lama vicugna*) no es diferente a la de los camélidos "de desierto" (*Camelus*) (Hawkey, 1975).

Un enfoque sobre el origen probable de la excentricidad del eritrocito sería relacionarla con la forma del núcleo celular (obviando atribuirle ventajas o desventajas de forma). Pero los datos de Kuramoto (1981),

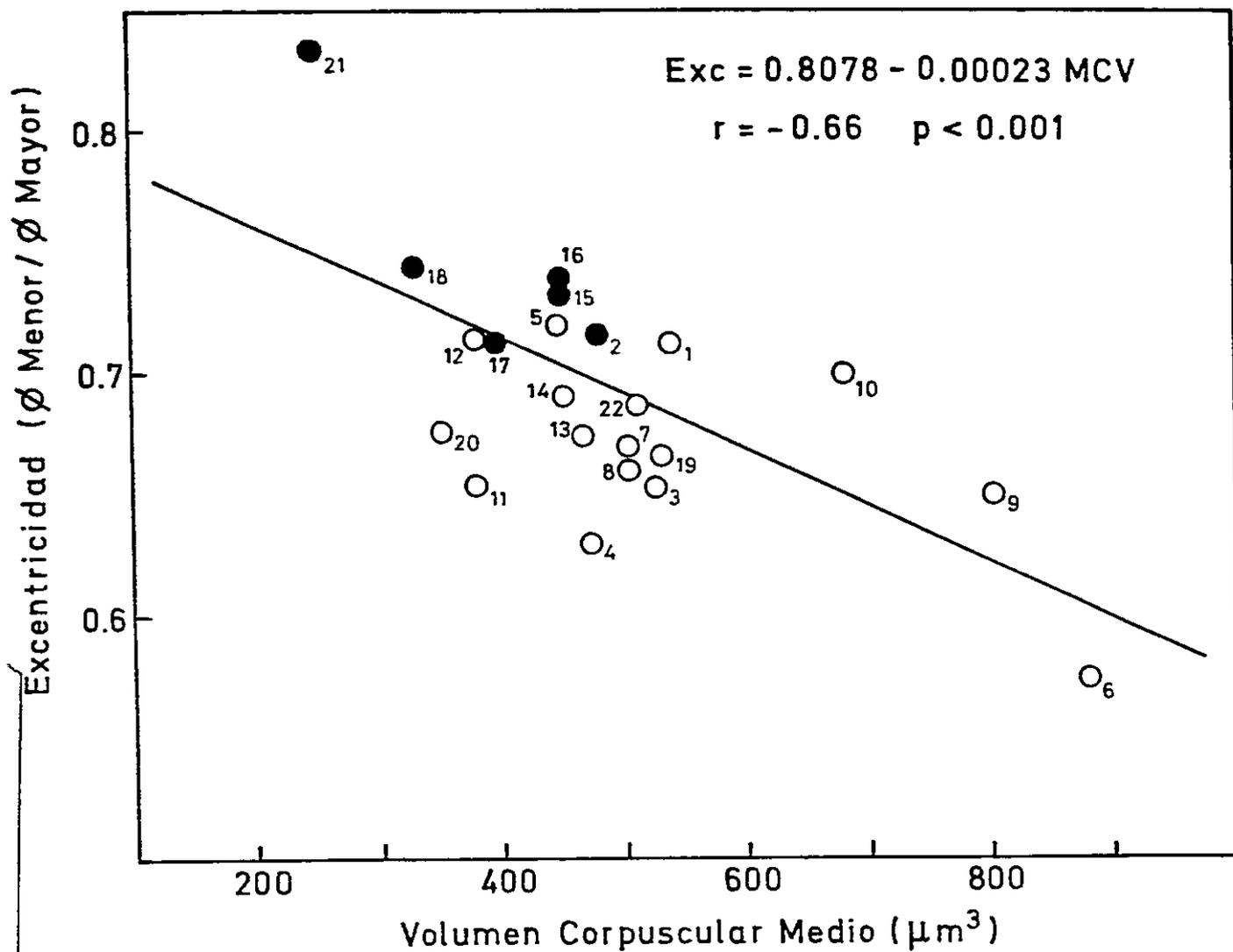


FIG. 7 Relación interespecífica entre la forma del eritrocito (excentricidad) y su volumen corpuscular medio.
Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Figura 2.

indican que la excentricidad de los núcleos de los eritrocitos de 20 especies de anfibios es prácticamente independiente de los eritrocitos que los contienen ($r = 0.3$; $p > 0.1$).

En ciertos reptiles (tortugas marinas) los eritrocitos de mayor tamaño son menos excéntricos que los más pequeños (Frair, 1977); sin embargo, nuestros datos indican que la excentricidad aumenta con el tamaño del eritrocito, hecho que ha sido también descrito en otras especies de anuros y urodelos (Davison, 1959; Günther, 1977; Kuramoto, 1981; Kaloustian & Dulac, 1982), de manera que esta relación bien pudiese ser aplicada como una regla dentro del grupo particular de los anfibios. Sin embargo, ni la necesidad ni la generalidad de este fenómeno nos parece actualmente clara.

Además de las características morfológicas de los eritrocitos de las especies estudiadas, se evidencian otros aspectos que merecen ser considerados en más detalle, antes de pronunciarnos sobre su posible rol adaptativo. Nos referiremos a tres parámetros (hematocrito, número y hemoglobina), que están de tal manera relacionados entre

sí, que normalmente un cambio en uno de ellos es de inmediato reflejado por los otros dos y con una magnitud proporcional a dicho cambio. En los anuros, estas relaciones generales también parecen cumplirse fielmente, tanto a nivel de especie como entre diferentes especies. Las relaciones encontradas entre la hemoglobina (Hb %) y el hematocrito (Hct), así como entre el hematocrito y número muestran una alta correlación, como se indica en las siguientes ecuaciones de regresión:

$$\begin{aligned} \text{Hb \%} &= 0.278 + 0.274 \text{ Hct}; & r &= 0.92 & (10) \\ & & p &< 0.001 & (\text{Fig. N}^\circ 8) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Hct \%} &= 5.737 + (0.034 \text{ N} \times 10^{-3}); & r &= 0.80 & (11) \\ & & p &< 0.001 \end{aligned}$$

En la que la Hb % es la concentración de hemoglobina circulante en gramos por 100 ml de sangre; Hct % es el volumen porcentual de glóbulos rojos por unidad de volumen de sangre y, N es el número de eritrocitos por mm^3 de sangre.

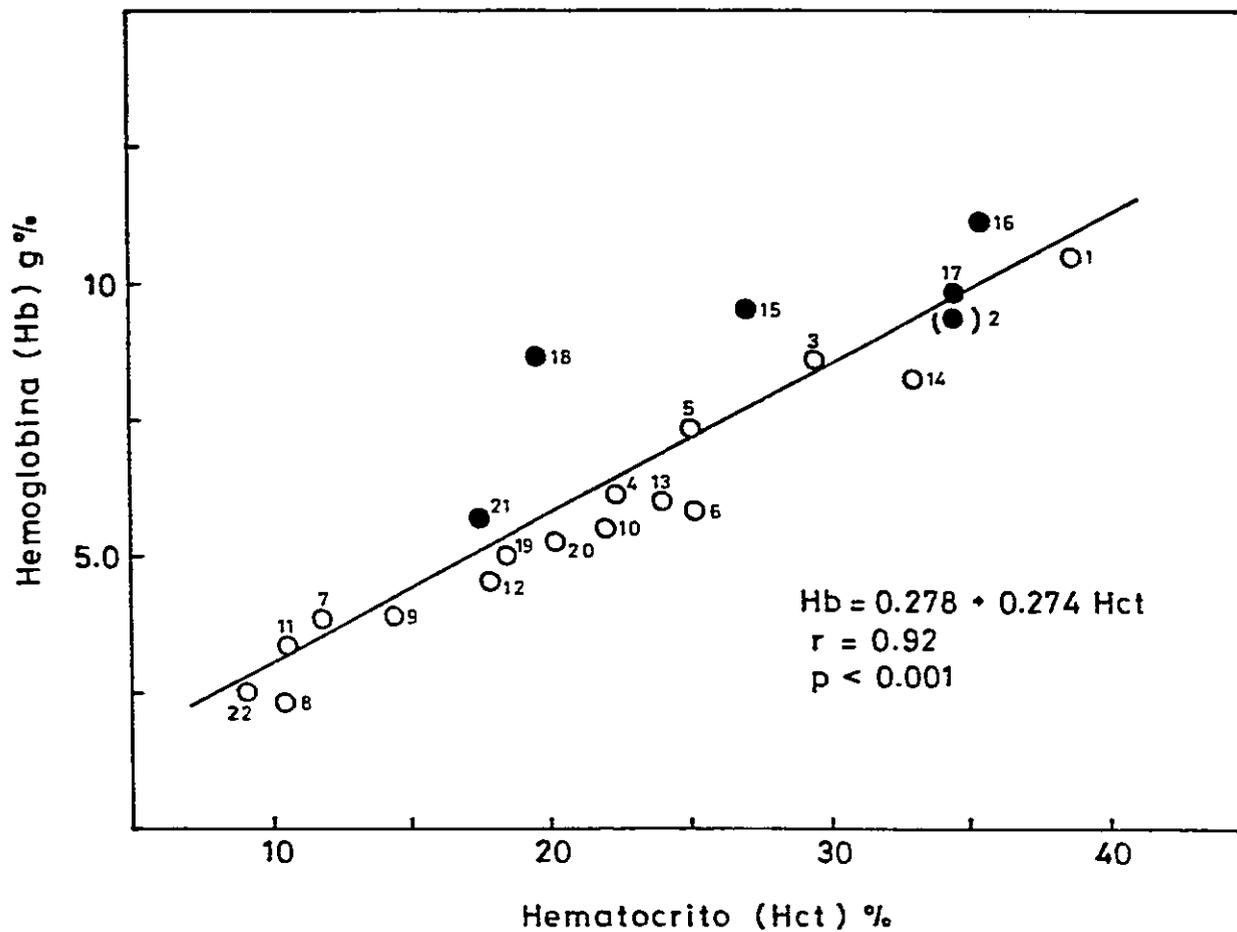


FIG. 8 Relación interespecífica entre la concentración de hemoglobina circulante y el hematocrito. Los símbolos siguen la nomenclatura de la Figura 2.

Estas correlaciones confirman la interdependencia de los parámetros discutidos, pero no indican por sí solas rasgos hematológicos adaptativos. Sin embargo, en la medida en que los valores de las especies definidas como de alta y de baja altitud, se distribuyan en forma diferente en torno a las rectas de regresión, podremos obtener una apreciación del "peso relativo" de cada uno de los tres parámetros discutidos, que como veremos más adelante puede ser marcadamente diferente. En el análisis de estos resultados, cabe tener presente que los niveles de hematocrito, de recuento y de concentración de hemoglobina en la sangre, están sujetos a grandes oscilaciones durante el ciclo vital de los anfibios; por ejemplo, durante la primavera se incrementa la eritropoiesis, por acción aditiva de la médula roja de los huesos largos, mientras que en otras estaciones es el bazo el responsable casi absoluto de dicha función (Andrew, 1965). La deshidratación puede también afectar estos valores, habiéndose observado cambios de más de un 30% en el hematocrito de varias especies de los géneros *Rana*, *Bufo*, *Xenopus* y *Scaphiopus*, sometidos a privación de agua (Hillman, 1980).

El alimento y la temperatura son también factores que modifican el número de eritrocitos circulantes (Noble, 1931) y hormonas como la tiroxina y triyodo tiroxina pueden también afectarlos (Kaloustian & Dulac, 1982). De menor importancia parece ser la variación intraespecífica del número de eritrocitos en relación con el sexo. Machos y hembras de *Bufo vulgaris* no difieren apreciablemente en los recuentos y lo mismo ocurre en machos y hembras de *Rana pipiens* (480.000 vs 510.000 mm⁻³) respectivamente (Moore, 1964).

En resumen, la multiplicidad de factores que son capaces de modificar los tres parámetros discutidos, nos llevan a mirar con cautela las diferencias encontradas entre las especies de alta y de baja altitud, evitando interpretarlas en conjunto como "adaptativas". Por esta razón, discutiremos cada uno de estos parámetros separadamente.

El hematocrito promedio de las especies de alta altitud resultó ser ligeramente más alto que el de las de baja altitud (28% versus 21%); sin embargo, la diferencia entre ambos promedios no es significativa ($p > 0.05$).

Ambos grupos caen en el rango promedio de valores de la mayoría de los anuros estudiados, e independientemente de la altitud de origen. Por ejemplo, el valor promedio del hematocrito de nuestras especies de alta altitud es similar al de *Rana esculenta* (27.3%), (Roofe, 1961); es también similar al de *Rana catesbeiana* (27.1%), e incluso menor que el de *Bufo marinus* (36.8%) (Kaloustian & Dulac, 1982), y más bajo que el de *Bufo paracnemis* (34%), (Johansen & Ditadi, 1966) y de *Bufo melanostictus* (32%), (Biswas *et al.*, 1981).

Es también más bajo que el de los individuos normalmente hidratados de *Xenopus laevis* (41.4%), *Scaphiopus couchii* (36.3%), *Bufo cognatus* (37.6%), *Bufo boreas* (36.7%) y de *Rana muscosa* (31.2%), (Hillman, 1980), pero ligeramente más alto que el de *Racophorus viridis* (24.6%) (Kuramoto, 1981).

Aún más, el valor más alto de hematocrito encontrado en todas nuestras especies corresponde al de *Bufo spinulosus* (38.5%), capturado en el Valle de Azapa, a no más de unos 200 metros sobre el nivel del mar; mientras que el hematocrito más alto de las especies de alta altitud

es el de *Telmatobius marmoratus* (35.5%), especie que no se ha encontrado por debajo de los 4300 metros. Por otra parte, el hematocrito de *B. spinulosus* de alta altitud (34.4%) es menor que el encontrado en los individuos de nivel del mar (Tabla N° 12).

Con estos antecedentes, y tal como lo adelantamos brevemente en el capítulo de Resultados, el hematocrito no parece caracterizar a las especies nativas de alta altitud. A iguales conclusiones llegaron Morrison y colaboradores (1963 A, 1963 B), al comparar los hematocritos de once especies de roedores de baja altitud con los de 16 especies de Los Andes de Chile y Perú, colectados entre 3900 y 4500 metros de altitud. Curiosamente, el hematocrito más alto que ellos encontraron en el género *Phyllotis* correspondió al de *P. darwini limatus* (47.3%), colectado a nivel del mar, mientras que el valor más alto de las cuatro especies de *Phyllotis* de alta altitud alcanzó solamente a 43% en *P. darwini rupestris*.

No nos es difícil entonces, aceptar la idea de que si bien es cierto que un hematocrito aumentado podría representar una mayor capacidad de transporte, éste

incremento impondría a su vez una sobrecarga en el sistema circulatorio debido al aumento de viscosidad de la sangre. Este efecto no deseable pudiese ser evitado o disminuido en gran medida, manteniendo un hematocrito moderado pero aumentando el número de eritrocitos, para lo cual éstos deben ser necesariamente pequeños.

Esto es lo que aparentemente sucede en nuestros anuros; las especies de altura muestran claramente tener un mayor número de eritrocitos ($713.6 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ vs $415 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$, $p < 0.001$), y de menor tamaño ($395 \mu\text{m}^3$ vs $536 \mu\text{m}^3$, $p < 0.001$) que las especies de baja altitud, aún cuando sus hematocritos no difieren significativamente. Este hecho se ve corroborado por la alta correlación positiva ($r = 0.81$; $p < 0.001$) entre el número de eritrocitos por mm^3 de sangre y la distribución altitudinal máxima de las especies estudiadas, que presentamos en la Fig. N° 4.

El gran número de eritrocitos de los anfibios estudiados de alta altitud es solamente sobrepasado por contadas especies de anuros. Por ejemplo, en los machos de *Hyla hallowelli* ($1061 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$) y de *Rana tsushimensis* ($990 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$), durante la estación reproductiva (Kuramoto,

1981). También en la estación reproductiva Varela & Sellárés (1938) han descrito para *Bufo arenarum* recuentos tan altos como $1000 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$.

Pero fuera de estas excepciones, los datos de recuentos son en general bastante más bajos. Por ejemplo en la revisión de Prosser (1952), los recuentos de once especies de anfibios no superan los $670 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$, encontrado en *Hyla arborea*; y Moore (1964) dá para cinco especies un valor máximo de $512 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ en *Rana pipiens*. Finalmente, de la revisión de Kuramoto (1981), el promedio de los valores de recuento en veinte especies de anfibios de Japón y de Korea es de $443 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$, incluyendo los valores máximos ya señalados para *Hyla hallowelli* y *Rana tsushimensis* durante la estación reproductiva. Este valor es sobrepasado ligeramente por el promedio de las 16 especies de baja altitud ($415 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$).

Resulta entonces evidente que como las especies de alta y de baja altitud no se diferencian en su hematocrito, pero difieren en el número de eritrocitos, debería existir consecuentemente una relación inversa entre el tamaño y el número de eritrocitos. En efecto, en los extremos de

nuestros valores de tamaño del glóbulo rojo están *P. marmorata* ($254 \mu\text{m}^3$) y *Caudiverbera caudiverbera* ($870 \mu\text{m}^3$), con recuentos de $718,3 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ y de $280 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$, respectivamente. La Figura N° 9 muestra la relación entre ambos parámetros en todas las especies que hemos estudiado.

Esta relación se expresa en la ecuación:

$$N = (889 - 0.800 \text{ MCV}) 10^3; \quad r = -0.57, \quad p < 0.01 \quad (12)$$

en la que N es el número de eritrocitos por mm^3 de sangre y MCV el volumen corpuscular medio en μm^3 .

Nuestros datos corroboran las antiguas observaciones de Wintrobe (1934) que en su clásico trabajo de hematología comparada dice: "Me fue evidente la extraordinaria diferencia entre números y tamaños de los glóbulos rojos. En los casos en que los corpúsculos fueron muy numerosos, los glóbulos rojos fueron muy pequeños y en los animales en los que fueron excesivamente grandes, su número total fue muy bajo". A estas mismas conclusiones llegó Hawkey (1975), y hace pocos años, Kaloustian & Dulac (1982), confirman esta relación en los eritrocitos de los géneros *Rana* y *Bufo*.

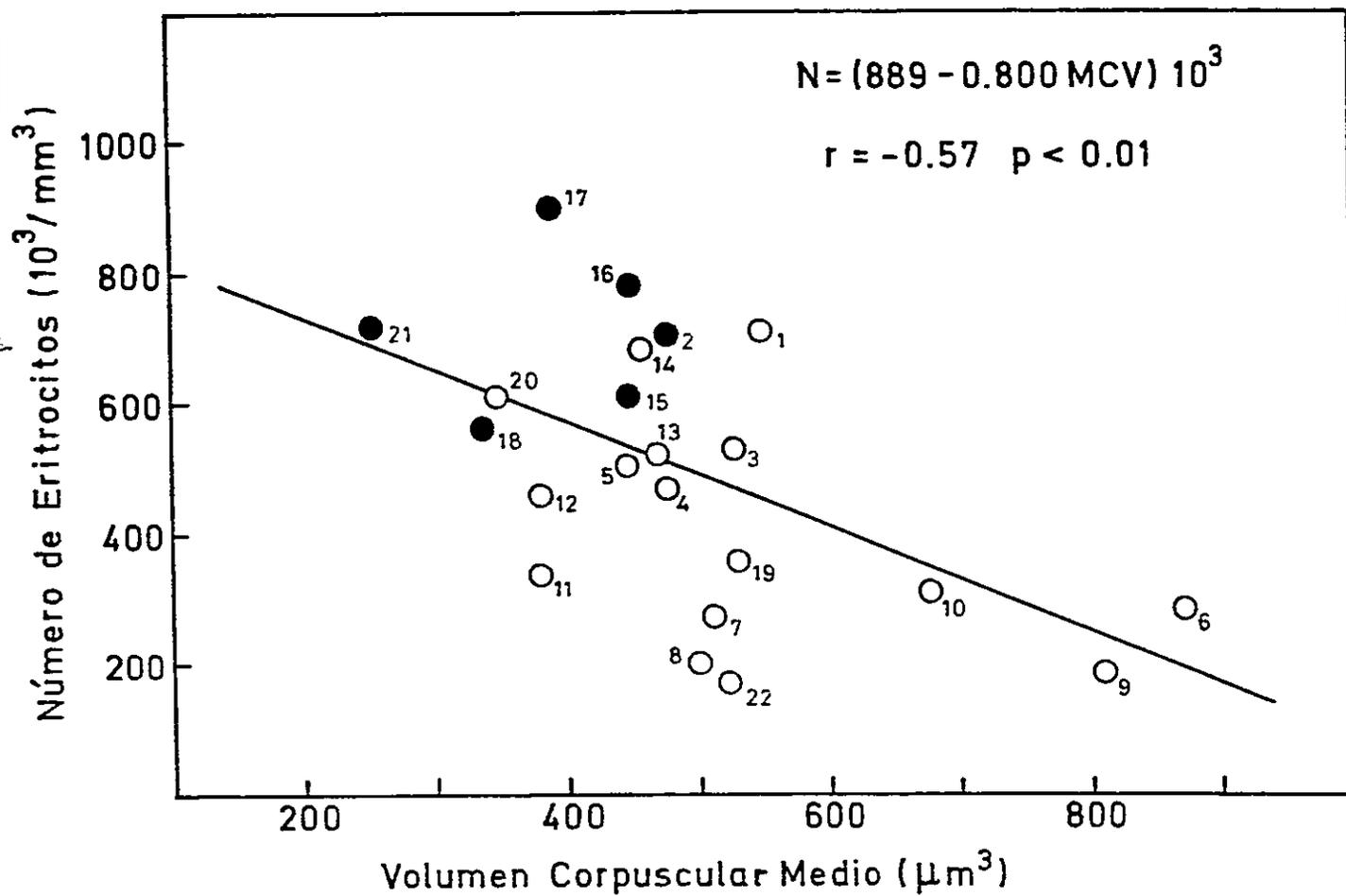


FIG. 9 Relación interespecífica entre el número de eritrocitos y el volumen corpuscular medio.
 Los símbolos siguen la nomenclatura de la Figura 2.

La concentración promedio de hemoglobina circulante (Hb %) resultó ser también significativamente más alta ($p < 0.01$) en las especies de alta altitud (9.02%) comparadas con el promedio de las de baja altitud (5.54%). La correlación entre estos dos parámetros (Hb %) y distribución altitudinal máxima se muestra en la Figura N° 10. Nuevamente debemos recordar que esto ocurre a pesar de que los hematocritos no son marcadamente diferentes. La explicación de este interesante fenómeno se dará más adelante al analizar los datos de concentración de hemoglobina por volumen de eritrocitos (MCHC).

No existen muchos datos confiables en la literatura sobre concentración de hemoglobina en anfibios. Esto se debe probablemente a que los métodos espectrofotométricos de determinación cuantitativa de hemoglobina se comenzaron a estandarizar solamente a mediados de siglo (Drabkin, 1949).

Así y todo, los valores de Hb % en nuestras especies de alta altitud están entre los valores más altos descritos para anuros. Por ejemplo, la concentración de hemoglobina en la sangre de *Telmatobius marmoratus* (11.2%), excede a la

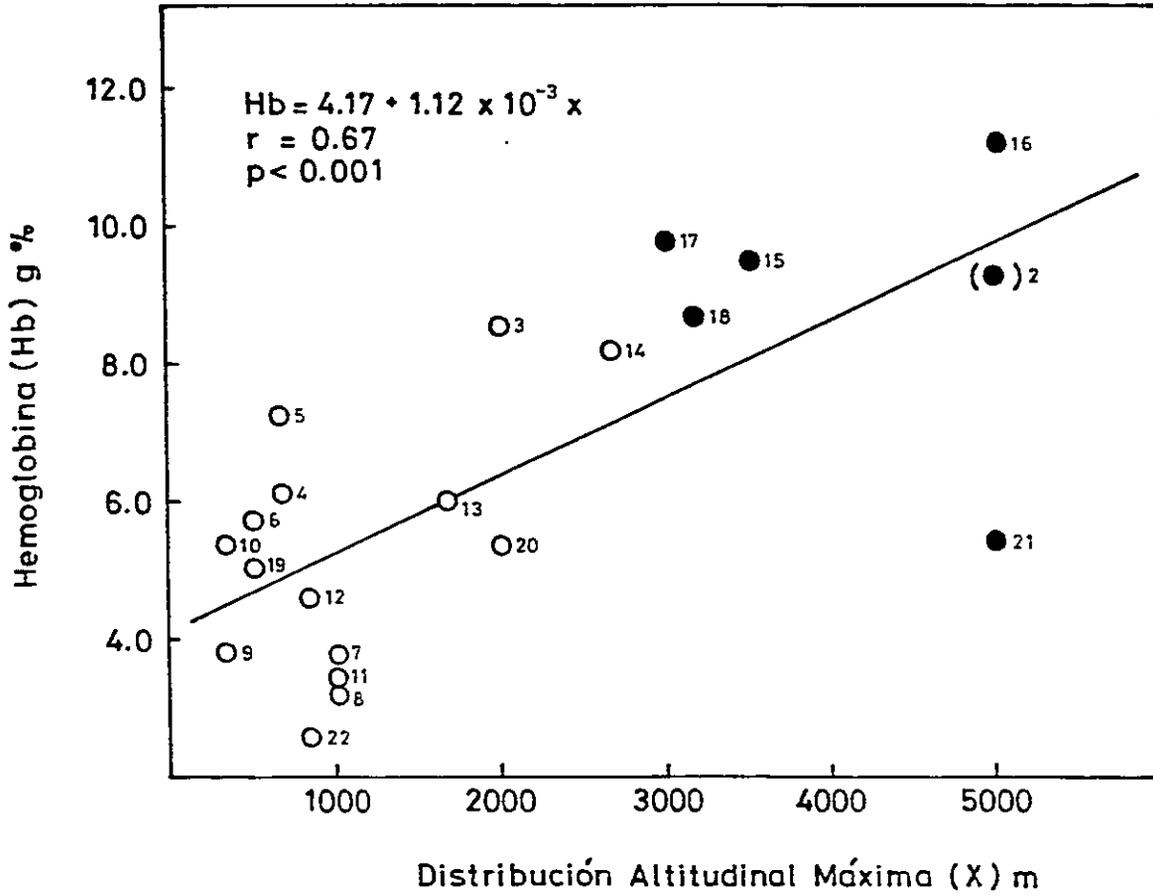


FIG. 10 Correlación entre la concentración de hemoglobina circulante y la distribución altitudinal máxima de cada especie.
 Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Fig.2.

de *Bufo marinus* (8.7%) y *Bufo bocourti* de 3200 metros de altitud (10.6%) (Stuart, 1951). Es también más alta que la de *Hyla arborea* (10.2%) y de *Bufo vulgaris* (10.2%) (Prosser, 1962); similar a la de *Bufo melanostictus* (11.2%) (Biswas *et al.*, 1981), y es solamente sobrepasada por la del sapo fosorial, "pie de espada", *Scaphiopus* (10 a 12.9%), (Seymour, 1973). En otros anfibios los valores de hemoglobina son bastante más bajos, por ejemplo 8.1% en *Telmatobius culeus* (Hutchison *et al.*, 1976); 6 a 8% en *Rana catesbiana*, *R. esculenta* y *R. pipiens* (Wood, 1975), (Kalousian & Dulac, 1982). Antiguos valores dados para *Pleurodema thaul* y para *C. caudiverbera* (6.7%), en base a determinaciones hechas con el método de Sahli (Latorre, 1938), caen dentro del promedio ± 1 SD de nuestras especies de baja altitud ($5.5 \pm 1.7\%$), asumiendo 100% Sahli = 13.8 Hb % (Wintrobe, 1967).

Entonces aparte del pequeño tamaño de los glóbulos rojos, pareciera ser que tanto el número de eritrocitos como la concentración de hemoglobina en la sangre, caracterizan a las especies de alta altitud. La correlación entre estos dos últimos factores es alta ($r = 0.85$, $p < 0.001$) y se expresa en la ecuación:

$$Hb = 1.15 + 0.0107 (N) 10^{-3} \quad (13)$$

en la que Hb es la concentración de hemoglobina en gramos por 100 ml de sangre y N es el número de eritrocitos por mm^3 de sangre (Figura N°11). Una aparente correlación positiva entre Hb % y altitud de origen se ha descrito en cuatro especies de lagartos de los géneros *Sceloporus* y *Urosaurus* (Newlin & Ballinger, 1976) y Engbretson & Hutchison (1976) encuentran en *Liolaemus multiformis* de 4800 metros de altitud, valores de hemoglobina más altos que la de muchos otros lagartos. Sin embargo, Friedman (1971) no encontró que la concentración de hemoglobina de Urodélos de altura fuese mayor que la de los de nivel del mar, y Morrison *et al.* (1963 A y 1963 B), tampoco encuentran una diferencia significativa en la concentración de hemoglobina de roedores de alta y de baja altitud. De lo anterior solo podemos hacer resaltar el hecho de que aparentemente las "respuestas adaptativas" de los diferentes grupos de vertebrados, enfrentados a un problema ambiental similar, han seguido rutas diferentes.

En la búsqueda de estos caminos, que es precisamente el objetivo central de esta Tesis, llegamos al análisis de

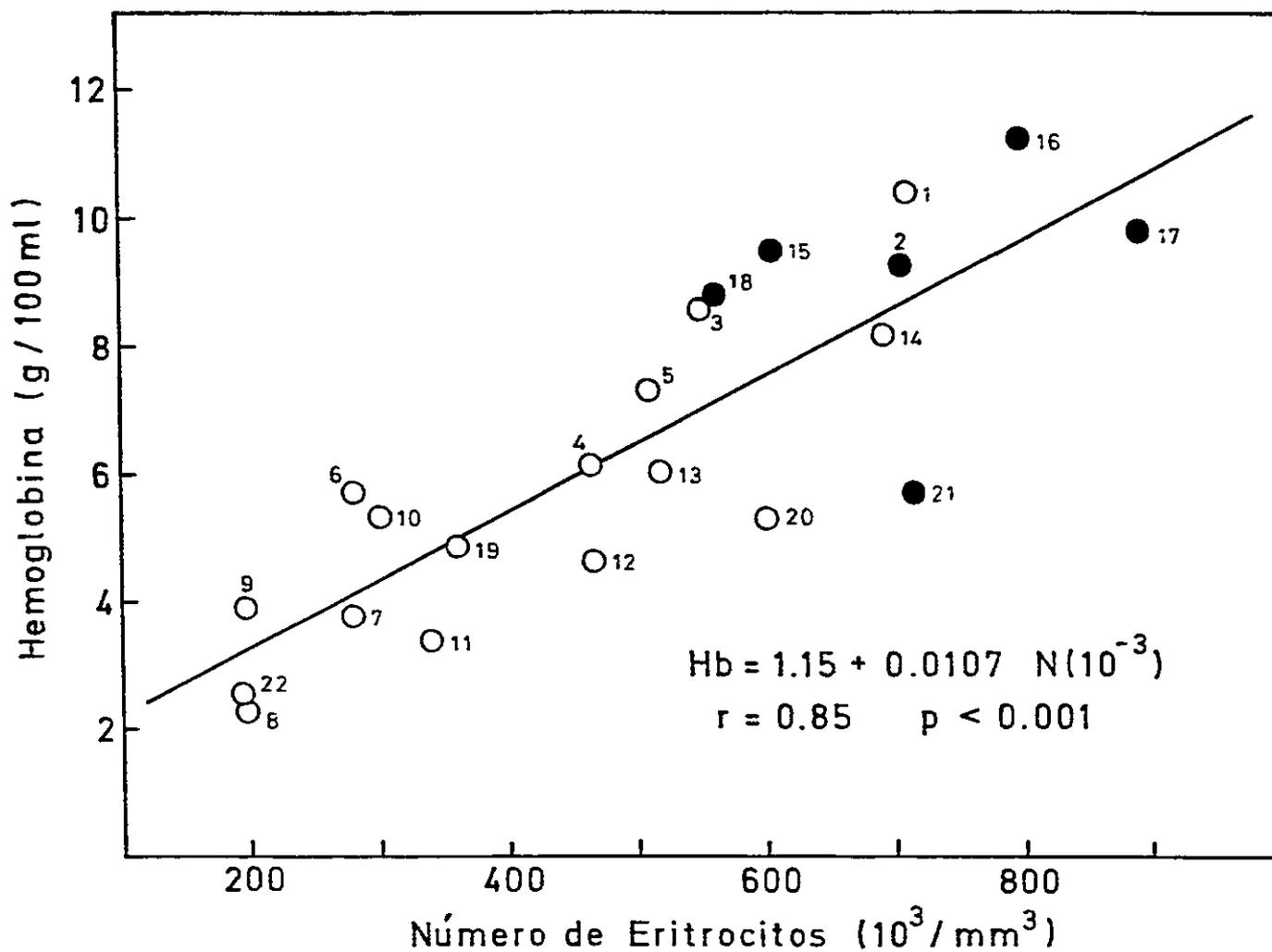


FIG. 11 Relación interespecífica entre el número de eritrocitos y la concentración de hemoglobina circulante. Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Fig. 2.

los últimos dos parámetros hematológicos estudiados: La cantidad de hemoglobina que se encuentra en un eritrocito o hemoglobina corpuscular media (MCH), estimada en picogramos de hemoglobina por célula, y la concentración de este pigmento respiratorio por unidad de volumen de eritrocitos (MCHC), estimada en gramos de hemoglobina por 100 ml de glóbulos rojos. Ambos parámetros son bastante más estables que los anteriormente discutidos (Hcto, Hb % y recuento) y del mismo modo, son mucho más independientes de factores ambientales como cambios estacionales, alimento, etc. Tanto es así, que el coeficiente de correlación entre Hb % y MCH en nuestras especies, es prácticamente cero, como se muestra en la Figura N° 12, de la que se desprende la siguiente ecuación de regresión:

$$\begin{aligned} \text{Hb} &= 6.684 - 0.0015 \text{ MCH}; & r &= -0.02, \\ & & p &= >0.1 \end{aligned} \tag{14}$$

en que Hb es la concentración de hemoglobina circulante en gramos por 100 ml de sangre, y MCH la cantidad de hemoglobina en picogramos por célula. Esto indica que grandes diferencias en la cantidad de hemoglobina circulante no son necesariamente acompañadas por variaciones en MCH. Por

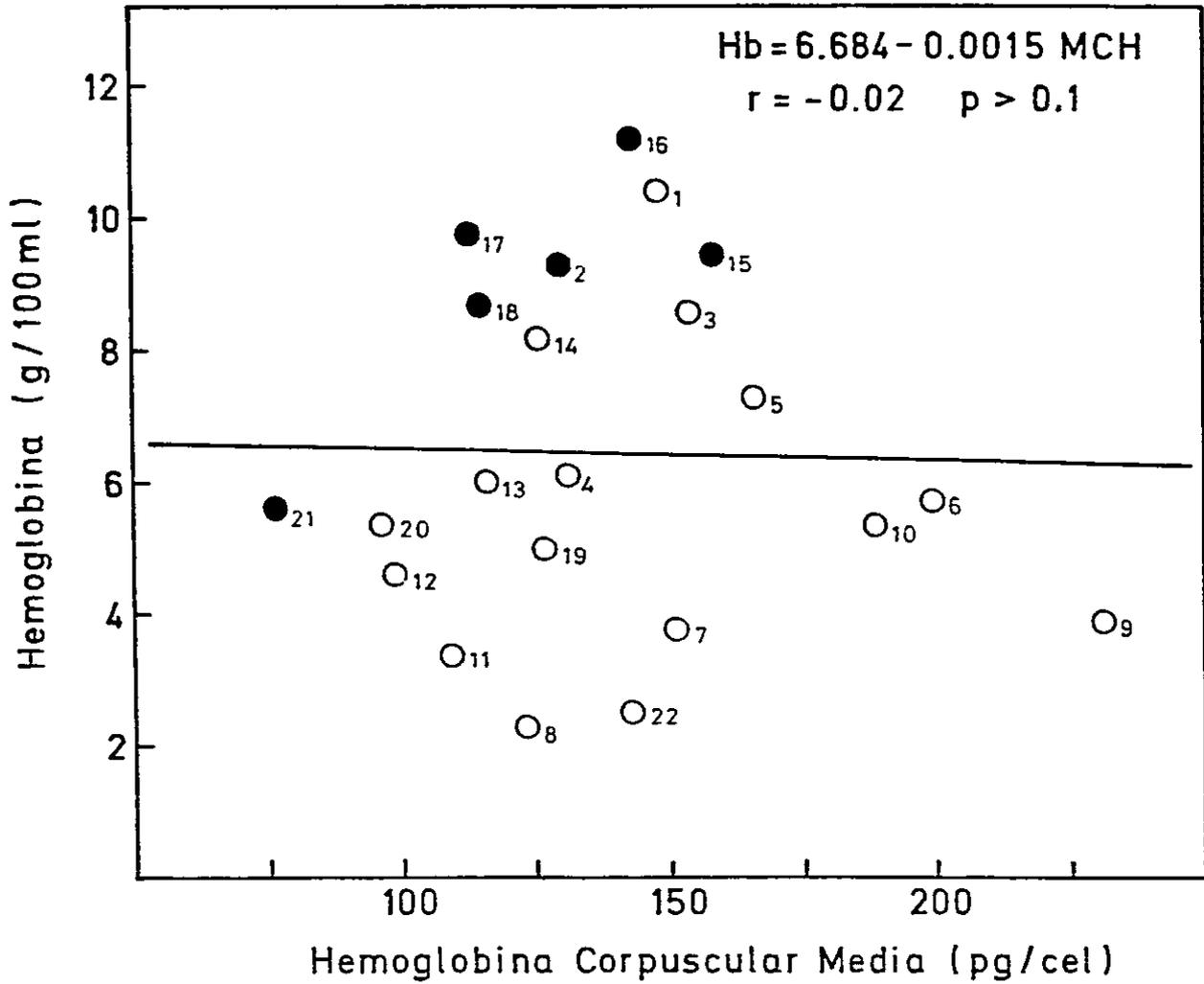


FIG. 12 Relación interespecífica entre la concentración de hemoglobina en la sangre y la hemoglobina corpuscular media. Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Fig. 2.

ejemplo, *Rhinoderma darwini* y *Telmatobius marmoratus* tienen igual MCH (143 ± 0.1 pg/cel), pero la especie andina tiene 4.5 veces más hemoglobina circulante que la especie austral (11.2 versus 2.5 g %).

Podríamos pensar "*a priori*" que células grandes pueden contener más hemoglobina que células más chicas, y por esta razón esperar que los pequeños eritrocitos que caracterizan a las especies de alta altitud estudiadas, tuviesen valores de MCH inferiores a los de las especies de baja altitud. Efectivamente, los resultados indican esta tendencia, que se ilustra en la Figura N° 13 y que correlaciona los valores de MCH con la distribución altitudinal máxima de las especies estudiadas. A pesar de ello, los promedios de MCH de las especies de alta altitud (122.6 pg/cel) y los de baja altitud (144.2 pg/cel), no son significativamente diferentes ($p > 0.1$). Este interesante hecho se debe probablemente a varias razones. Por una parte, el coeficiente de variación de ambos grupos oscila entre 20 y 25%; por otra parte, hay una razón de incrementos diferentes entre ambas variables (tamaño y MCH). Por ejemplo, *C. caudiverbera* y *Pleurodema marmorata* presentan los tamaños máximos y mínimos de eritrocitos entre todas las especies

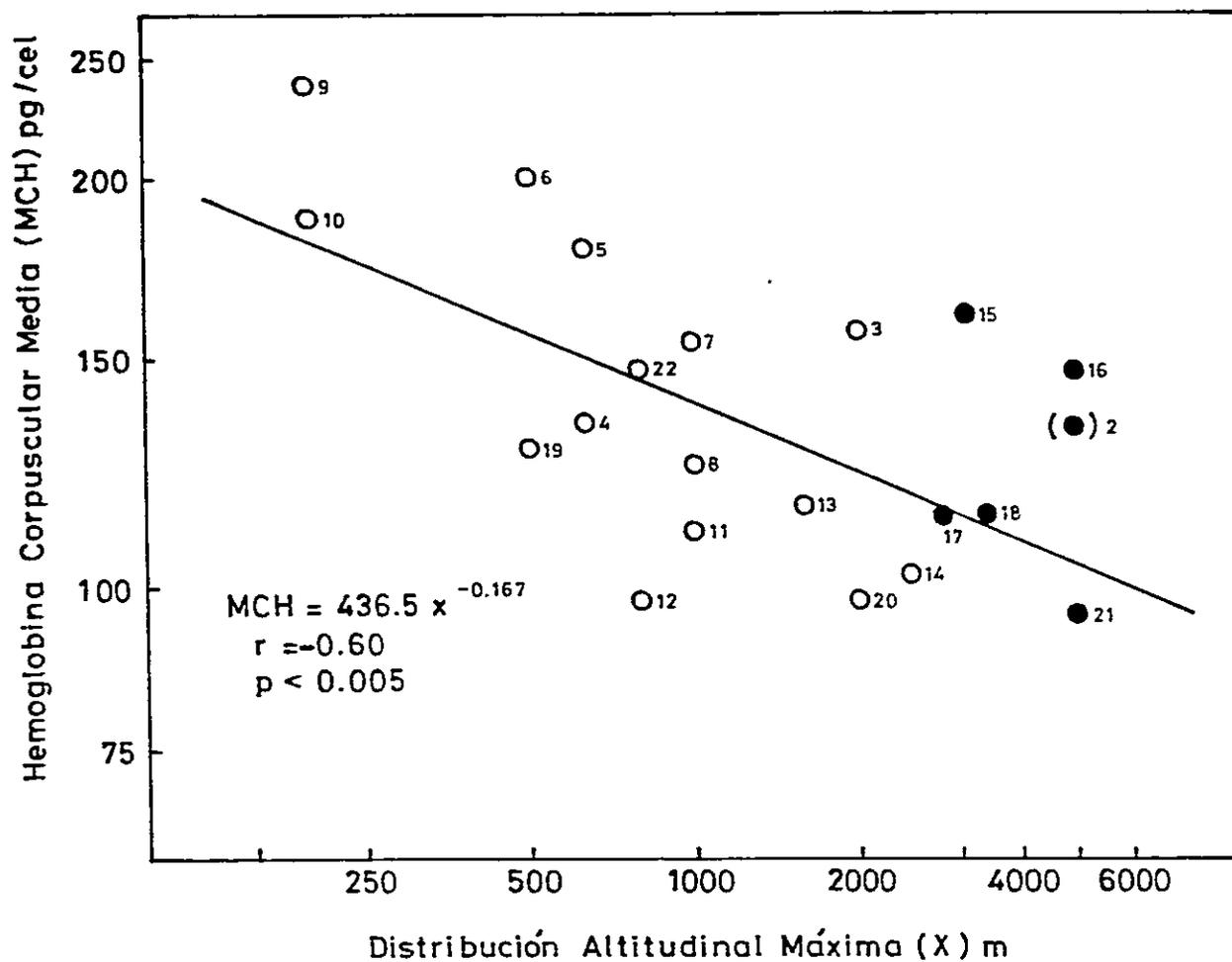


FIG. 13 Correlación entre la hemoglobina corpuscular media y la distribución altitudinal máxima de cada especie. Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Fig. 2.

analizadas: 873 y 254 μm^3 respectivamente, con una razón de 3.44 entre ambas. Sin embargo, los valores de MCH para estas mismas especies son de 199 y 77 pg/cel respectivamente, con una razón de solamente 2.58 entre ellas. Esto no significa que el tamaño celular no esté correlacionado con la cantidad de hemoglobina que contiene. Al contrario, la Figura N° 14 muestra que la correlación entre ambos parámetros es alta y se expresa en la siguiente ecuación:

$$\text{MCV} = -2.525 + 3.564 \text{ MCH}; \quad (r = 0.89) \quad (15)$$

$$(p < 0.001)$$

en la que MCV es el volumen corpuscular medio del eritrocito en μm^3 y MCH la cantidad de hemoglobina que contiene, en pg por célula. A pesar de esta buena correlación, un tercer factor influye en la falta de significación estadística de la diferencia entre los promedios de MCH de los anuros de alta y de baja altitud. Este factor es la concentración de hemoglobina corpuscular (MCHC), que no tan solo explica parcialmente este hecho sino que además explica que a pesar de la poca diferencia entre los hematocritos de alta y de baja altitud, los niveles de hemoglobina sean

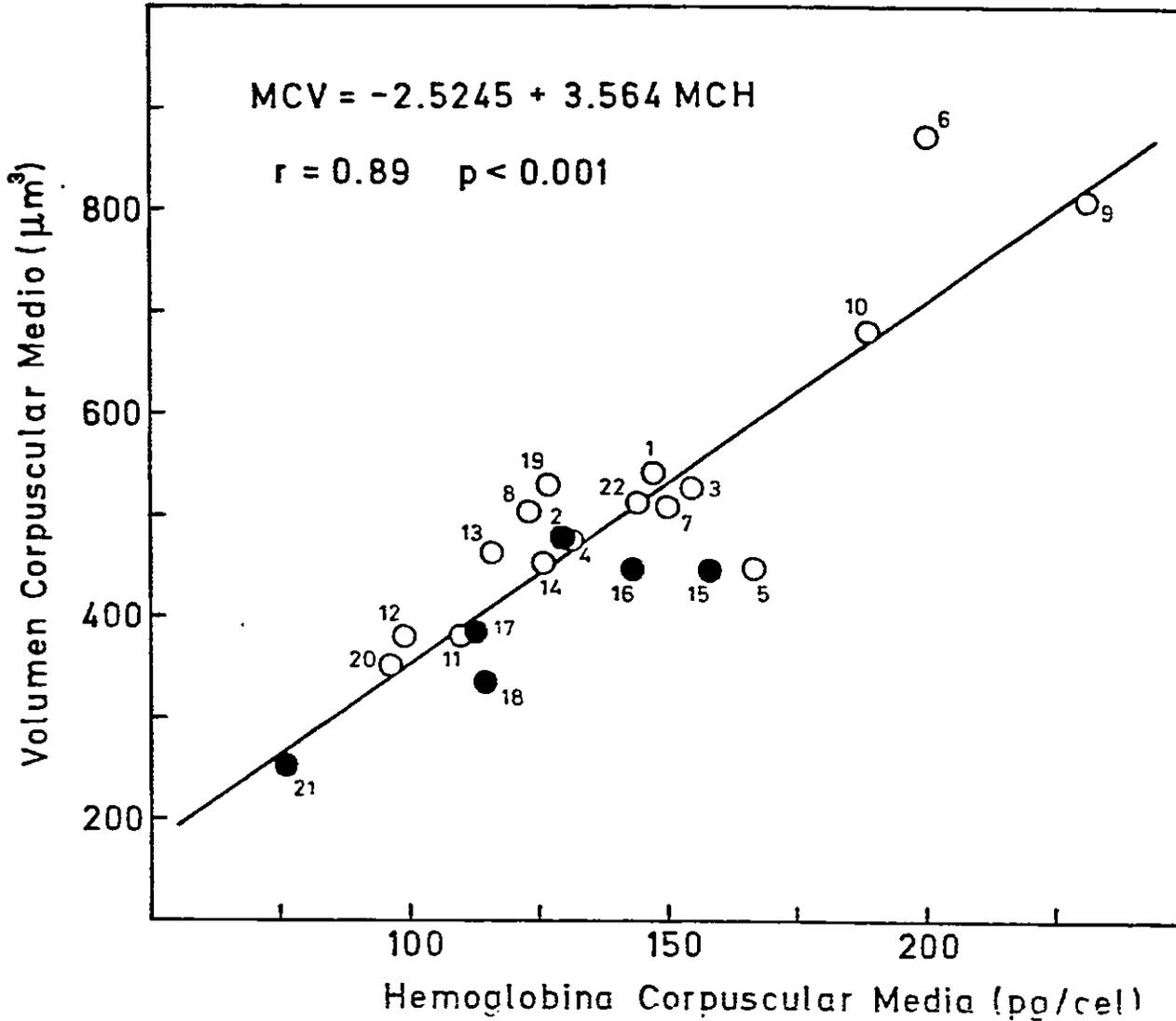


FIG. 14 Relación interespecífica entre el volumen corpuscular medio y la hemoglobina corpuscular media. Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Fig. 2.

significativamente diferentes.

Contrariamente a lo encontrado en el análisis de MCH, la concentración de hemoglobina corpuscular es significativamente diferente entre nuestros dos grupos de anfibios, tanto a nivel de especies agrupadas ($p < 0.01$), como a nivel de individuos agrupados ($p < 0.001$). Este hecho no nos sorprende mucho, debido a que la correlación entre ambos parámetros (MCHC y MCH) para todas nuestras especies, es pobrísima:

$$\begin{aligned} \text{MCHC} = 29.47 - 0.0075 \text{ MCH}; \quad (r = -0.09) \\ (p > 0.1) \end{aligned} \quad (16)$$

Confirmando nuestra hipótesis básica, los anuros de alta altitud presentan en promedio una mayor concentración de hemoglobina por volumen de eritrocitos (MCHC = 31.1 %) que los de baja altitud (MCHC = 27.4%). El coeficiente de variación de ambos promedios es relativamente bajo (7 a 11%), lo que indica cierta homogeneidad del carácter medido en torno a los promedios.

La diferencia en MCHC entre ambos grupos tiene importantes consecuencias, al considerar la capacidad de saturación de oxígeno de los eritrocitos, en base a la propiedad general de las hemoglobinas de combinarse con oxígeno en proporción de una molécula de oxígeno por grupo hem, o lo que es lo mismo, de 1.34 ml de oxígeno por gramo de hemoglobina.

Sobre esta base, resulta entonces que un volumen dado de eritrocitos de nuestras especies de alta altitud puede contener en promedio un 14% más oxígeno que un volumen igual de eritrocitos de las especies de baja altitud ($31.1/27.4 = 1.14$), independientemente del tamaño y del número de los glóbulos rojos que ocurran en ambos grupos.

Ahora bien, si seleccionamos algunas especies, esta diferencia puede ser bastante más dramática.

Por ejemplo, 1 ml de eritrocitos de *Telmatobius peruvianus* (MCHC = 35.4%), puede transportar 43% más oxígeno que 1 ml de glóbulos rojos de *Eusophus vertebralis* (MCHC = 24.7%) y 57% más oxígeno que 1 ml de eritrocitos de *Caudiverbera caudiverbera* (MCHC = 22.8%).

Podría arguirse que si bien es cierto la capacidad de transporte de oxígeno es diferente, las presiones parciales de oxígeno en sus respectivos ambientes también lo son, y que los valores de saturación de hemoglobina con oxígeno en las especies de altura pudiesen no corresponder a la capacidad de oxígeno estimada a nivel del mar. La respuesta a esta pregunta debiese nacer de la cuantificación de los valores de P_{50} (presión parcial de saturación 50%) en ambos grupos, estudio que no nos fue posible realizar, dados los escasos volúmenes de sangre de la enorme mayoría de las especies estudiadas. Sin embargo, de la revisión de Altman & Dittmer (1974), en 17 especies de anfibios se desprende que el valor promedio de P_{50} es de 23.7 torr \pm 12 torr, entre 15°C y 25°C. Por otra parte, Moore (1964) cita para algunas especies del género *Rana* valores de P_{50} de 10 a 22 torr, entre 10 y 20°C, y Hutchison *et al.* (1976) da un P_{50} de 15.6 torr para *Telmatobius culeus* a 10°C.

Con estos antecedentes, no podemos menos que inferir que a las presiones parciales de oxígeno y a las temperaturas de los lugares de colecta de mayor altitud ($pO_2 = 90$ a 94 torr y $T_A = 10^\circ C$), la hemoglobina de las especies de alta altitud debiese estar saturada en gran medida, sin

que aparentemente se vea necesario postular una afinidad mayor de sus hemoglobinas por oxígeno que la de los promedios reportados para otros anuros.

De nuestros datos surgen además relaciones entre MCHC y el tamaño de los eritrocitos. Pareciera ser que los eritrocitos pequeños tienen a su vez una mayor concentración de hemoglobina que los más grandes (Figura N° 15).

Las siguientes ecuaciones así lo indican:

$$\text{MCHC} = 32.89 - 0.009 \text{ MCV}; \quad (r = -0.48) \quad (17)$$

$$(p < 0.05)$$

$$\text{MCHC} = 81.70 \text{ MCV}^{-0.172} \quad ; \quad (r = -0.5) \quad (18)$$

$$(p < 0.02)$$

en las que MCHC es la concentración de hemoglobina en los eritrocitos, expresada en g%, y MCV el volumen corpuscular medio de éstos, en μm^3 .

Como las especies de altura presentan eritrocitos que en promedio son más pequeños que los glóbulos rojos de

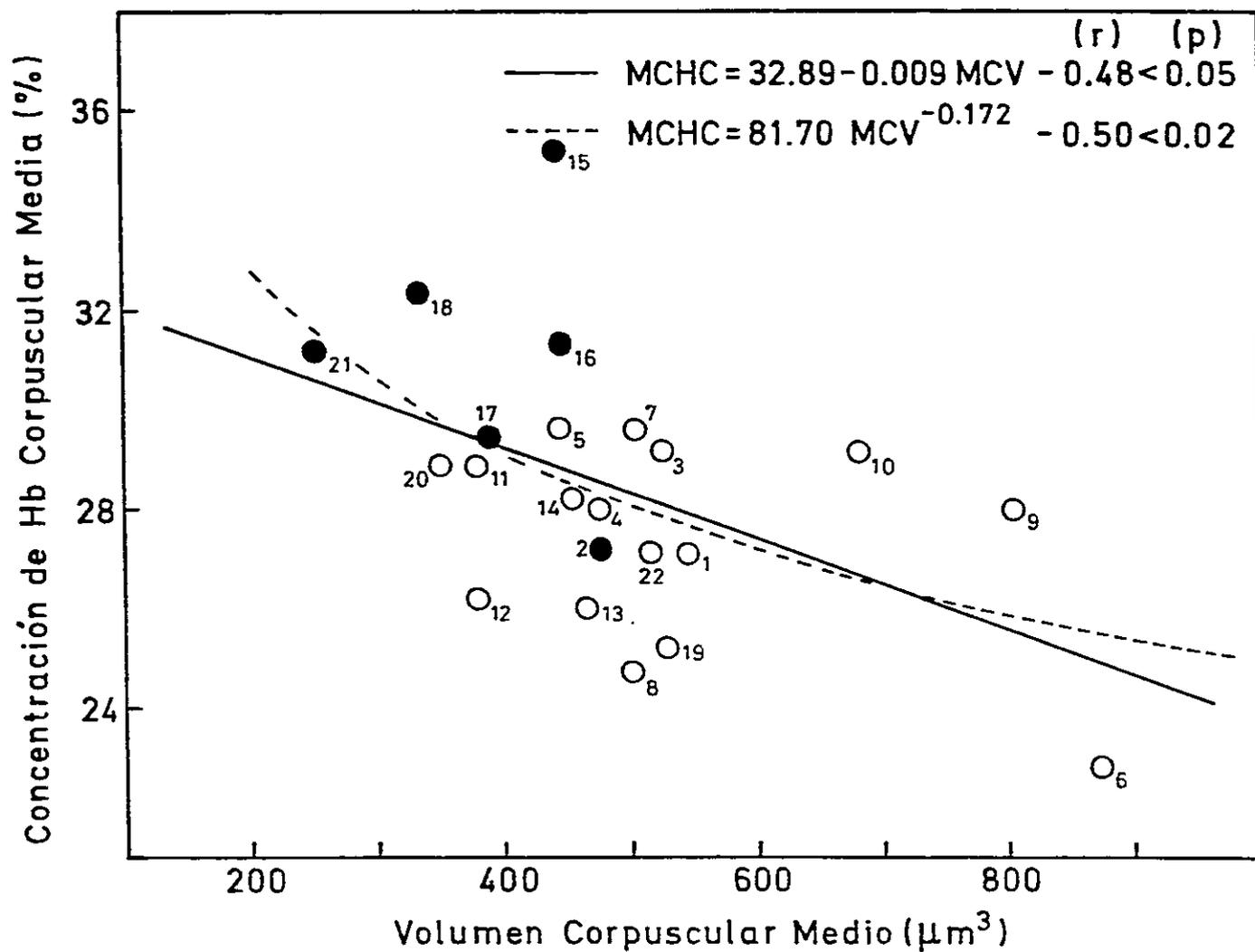


FIG. 15 Relaciones interespecíficas (exponencial en trazado discontinuo) entre la concentración de hemoglobina corpúscular media y el volumen corpúscular medio. Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Fig. 2.

las especies de baja altitud, es natural esperar que dadas las ecuaciones 17 y 18, exista también una buena correlación entre MCHC y la distribución altitudinal máxima de las especies estudiadas. Efectivamente, la Figura N° 16 muestra la relación encontrada entre estos dos parámetros, de ella se desprende la siguiente ecuación:

$$\text{MCHC} = 26.4 + 1.2 \times 10^{-3} X \quad (r = 0.65) \quad (19)$$

$$(p < 0.002)$$

en la que MCHC tiene igual significado y unidades que en las ecuaciones anteriores, y X representa la distribución altitudinal máxima, en metros sobre el nivel del mar.

No podemos finalizar nuestra Discusión sobre el rol adaptativo que se evidencia en este último parámetro sin señalar que los valores de MCHC en nuestras especies de altura son en general extraordinariamente altos. Por ejemplo, el promedio de MCHC en las cuatro especies de *Telmatobius* (32.1%) es más alto que el promedio de 31% encontrado en aproximadamente cien especies de reptiles (Pough, 1980). El MCHC de 35.4% de *Telmatobius peruvianus*, es sin duda el valor más alto conocido hasta ahora en anfibios, y de una

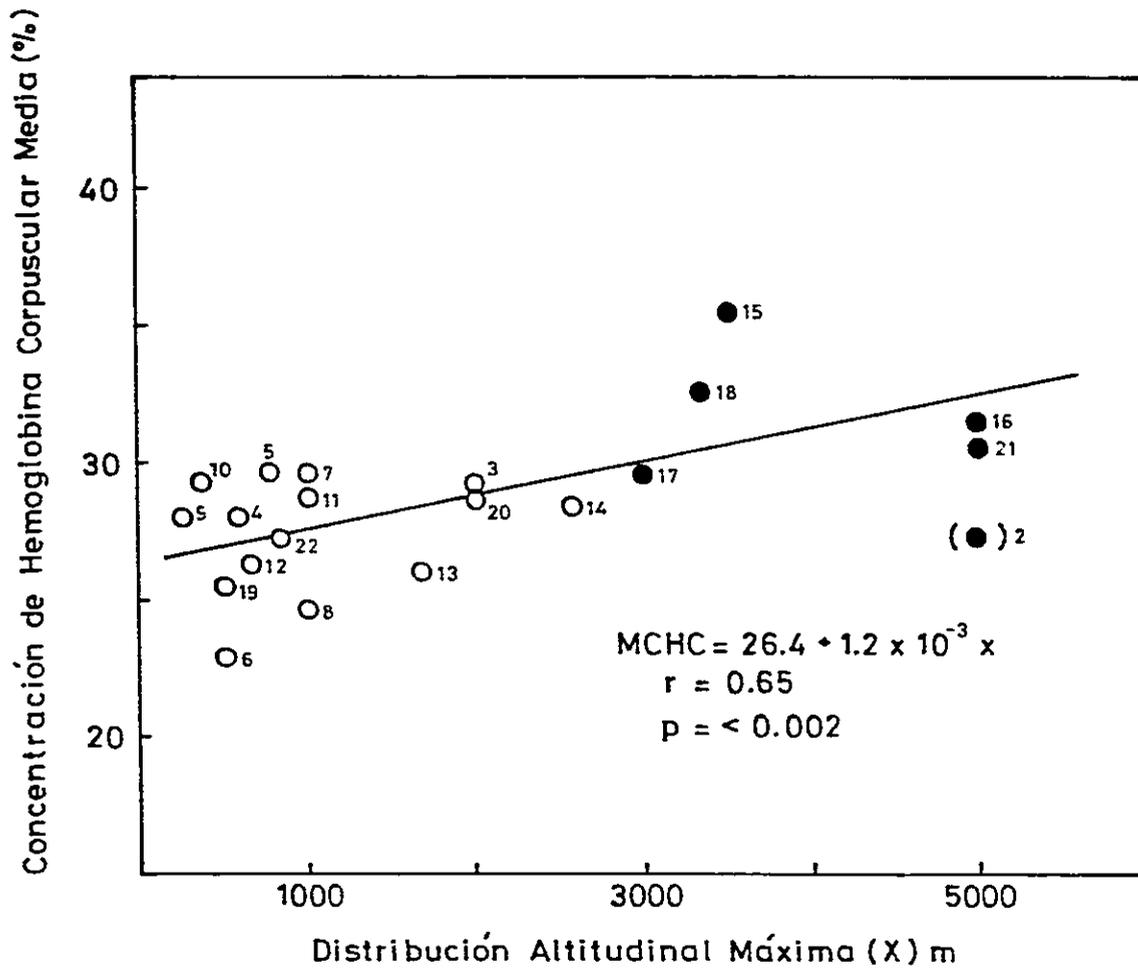


FIG. 16 Correlación entre la concentración de hemoglobina corpuscular media y la distribución altitudinal máxima de cada especie.
 Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Fig. 2.

lista de aproximadamente cincuenta especies de vertebrados es excedido solamente por un par de especies de mamíferos (Wintrobe, 1967), y por el pavo real entre diferentes especies de aves (Isaacks & Harness, 1980).

La magnitud de este carácter se ve corroborada en la visión general de MCHC en diversos grupos de vertebrados, dada por Altman & Dittmer (1974), de cuya versión obtenemos los siguientes promedios: Mamíferos (15 especies), MCHC = $32.0 \pm 2.4\%$; Aves (4 especies), MCHC = $29.8 \pm 5.2\%$; Reptiles (6 especies), MCHC = $28.2 \pm 2.7\%$; Anfibios (5 especies), MCHC $24.1 \pm 2.6\%$; Peces (10 especies) MCHC = $24.2 \pm 5.5\%$.

Tomando estas cifras solamente como una pauta de referencia, parecería ser que los valores promedios de nuestras especies de baja altitud (27.4%), se encuentran en el centro del rango de los vertebrados. Un valor promedio prácticamente idéntico ($27.3 \pm 2.4\%$) ha sido dada por Kalloustian & Dulac (1982), para tres especies de anuros de los géneros *Rana* y *Bufo*. Sin embargo, el promedio de MCHC de nuestras especies de alta altitud (31.1%), es solo comparable con los valores encontrados en los eritrocitos

anucleados de los mamíferos. Es curioso que células nucleadas puedan "empaquetar" hemoglobina en concentración similar a la de células anucleadas; sin embargo, Tooze & Davis (1963), han dado evidencias de la presencia de hemoglobina en los núcleos de eritrocitos de *Triturus cristatus* y en cantidad no despreciable (45% de la existente en el citoplasma). ¿Ocurrirá un hecho similar en nuestras especies de altura? - No lo sabemos.

CONCLUSIONES

En este estudio comparativo resaltan cuatro características hematológicas que aparentan definir rasgos adaptativos de las especies andinas que viven por sobre los 3000 m.

- 1) A diferencia de otros grandes grupos de vertebrados (mamíferos y reptiles), los anfibios estudiados muestran una correlación negativa entre su distribución altitudinal y el tamaño del eritrocito que se evidencia tanto en las dimensiones lineales como en sus volúmenes corpusculares. Esta relación se observa entre especies diferentes y entre poblaciones de una misma especie, como es el caso de *Bufo spinulosus*. El rango de volúmenes corpusculares encontrados en todas las especies estudiadas se extiende desde $250 \mu\text{m}^3$ hasta $900 \mu\text{m}^3$, el límite inferior de este rango corresponde a la especie *Pleurodema marmorata* cuyo volumen es el más pequeño descrito hasta ahora en anfibios.
- 2) Una mayor concentración de hemoglobina corpuscular (31.3 vs 27.4%). El promedio de MCHC de nuestras especies de

alta altitud es solo comparable con los valores encontrados en los eritrocitos anucleados de mamíferos.

- 3) Un mayor número de eritrocitos por unidad de volumen de sangre (713.000 vs 415.000 por mm^3), lo que indica que las especies de altura poseen numerosos eritrocitos de pequeño tamaño, en oposición a las especies de baja altitud.
- 4) Una mayor concentración de hemoglobina por mm^3 de sangre (9.0 vs 5.5 g%). Los valores de hemoglobina en la sangre de las especies de alta altitud están entre los valores más altos descritos para anuros.

Sin excluir la probable existencia de otros mecanismos adaptativos, estas cuatro cualidades permitirían en conjunto una mayor superficie de intercambio del eritrocito, la existencia de capilares de diámetro pequeño y permitirían además un alto contenido de oxígeno en la sangre, incluso a saturaciones muy inferiores de 100%; todos estos factores facilitarían sin duda la existencia de las especies en medios hipóxicos.

Por otra parte, aunque las especies de alta y de baja altitud difieren en el número y en el tamaño de los eritrocitos, no se diferencian en su hematocrito ($p = 0.06$); tampoco la

hemoglobina corpuscular demuestra caracterizar a las especies o poblaciones que viven por sobre los 3000 m ($p > 0.1$).

REFERENCIAS

- ALTMAN, P. & D. DITTMER (1974) Blood and other fluids. Biology Data Book. Second Edition. Chapter 13 Fed. of American Soc. Exper. Biol., Bethesda, Maryland.
- ANDREW, W. (1965) Comparative haematology. Grune and Stratton, New York and London. Chapter 5: 69-101
- ANTHONY, A. & J. KREIDER (1961) Blood volume changes in rodents exposed to simulated high altitude. Am. J. Physiol. 200: 523 - 526.
- ANTHONY, F.H. (1961) Survival of goldfish in carbon monoxide. J. Exp. Biol. 38: 109 - 125.
- ASTE-SALAZAR, H. & A. HURTADO (1944) The affinity of hemoglobin for oxygen at sea level and at high altitudes. Am. J. Physiol. 142: 733 - 743.
- BALLINGER, R.E. & M.E. NEWLIN (1975) Altitudinal acclimation and seasonal variation in hemoglobin of the iguanid lizard *Sceloporus jarrovi*. Physiol. Zool. 48: 93-96.
- BISWAS, H. & P. PATRA (1981) Body fluid and hematological changes in the toad exposed to 48 h of simulated high altitude. J. Appl. Physiol. 51: 794-797.

- BURNS, T.A. (1969) En: Newlin & Ballinger, 1976.
Copeia 1976: 392 - 394.
- BURTON, R. & A.H. SMITH (1972) The effect of chronic erythrocytic polycythemia and high altitud upon plasma and blood volumes. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 140: 920 - 923.
- DAVISON, J. (1959) Studies on the form of the amphibian red blood cell. Biol. Bull. 116: 397 - 405.
- DAWSON, W.R. & T.L. POULSON (1962) Oxygen capacity of lizard bloods. Amer. Midl. Nat. 68: 154 - 164.
- DESSAUER, H.C. (1970) Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. 1-72 In: Biology of the Reptilia. Vol. 3, Morphology C., Gans (ed.), Academic Press, New York.
- DRABKIN, D.L. (1949) The standarization of hemoglobin measurement. Am. J. Med. Sc. 217: 710 - 718.
- DUELLMAN, W.E. (1979) The South American Herpetofauna: its origin, evolution, and dispersal. Museum of Natural History the University of Kansas. Monograph N° 7: 341 - 364.

- DUGUY, R. (1970) En: Biology of the Reptilia. Vol. 3: 93-109. Morphology C., Gans (ed.), Academic Press New York.
- DUPRE, K. & E. FARRAR (1982) Relationship of blood energy substrates and standard metabolic rate in several amphibian species. Comp. Biochem. Physiol., 71 A 627 - 629.
- ENGBRETSON, G. & N. HUTCHISON (1976) Erythrocyte count, hematocrit and hemoglobin content in the lizard *Lio-laemus multiformis*. Copeia 1976 (1): 186.
- FRIEDMANN, G.B. (1971) Altitudinal variations in the red blood cell content and haemoglobin content of urodele blood. Can. J. Zool. 49: 565 - 568.
- FORMAS, J. (1979) Amphibians of the Chilean southern temperate forest: a proposal about its origin. Arch. Biol. Med. Exp. 12: 191 - 196.
- FOXON, G.E. (1964) In: Physiology of the Amphibia (Edited by Moore, J.A.), 151 - 209. Academic Press, New York.
- FRAIR, W. (1977) Sea turtle red blood cell parameters correlated with carapace length. Comp. Biochem. Physiol. 56 A: 467 - 472.

- FRAYERS, G.R. (1952) Effect of decreased atmospheric pressure on blood volume of rats. Amer. J. Physiol. 171: 459 - 464.
- GONIAKOWSKA, L. (1970) En: Szarsky, H. 1976. Int. Rev. Cytol. 44: 93 - 111.
- GONIAKOWSKA, K. (1973) En: Olmo, E. & A. Morescalchi, 1978. Experientia 34: 44 - 46.
- GÜNTHER, R. (1977) En: Kuramoto, M., 1981. Comp. Biochem. Physiol. 69A: 771 - 775.
- HARTMAN, F.A. & M.A. LESSLER (1963) Erythrocyte measurements in birds. Auk., 80: 467 - 473.
- HARTMAN, N.F. & M.A. LESSLER (1964) Erythrocyte measurements in fishes, amphibia and reptiles. Biol. Bull. 126: 83 - 88.
- HART, J.S. (1957) Seasonal changes in CO₂ sensitivity and blood circulation in certain freshwater fishes. Can. J. Zool. 35: 195 - 200.
- HAWKEY, C.M. (1975) Comparative mammalian Haematology William Heinemann Medical Books Ltds., London

- HILLMAN, S. (1980) Physiological correlates of differential dehydration tolerance in anuran amphibian. *Copeia* 1980: 125 - 129.
- HOCK, R. (1964) En: Handbook of Physiolo. Adaptation to the Environment. Edited by Dill D.B., American Physiological Society, Washington, D.C. Chapter 53: 841 - 842.
- HURTADO, A. (1964) En: Handbook of Physiology. Adaptation to the Environment. Edited by Dill D.B., American Physiological Society, Washington, D.C. Chapter 54: 843 - 860.
- HUTCHISON, V. & H. SZARSKI (1965) Number of erythrocytes in some amphibians and reptiles. *Copeia* 1965: 373-375.
- HUTCHISON, V., HAINES, H. & C. ENGBRETSON (1976) Aquatic life at high altitude: Respiratory Adaptations in the lake Titicaca frog, *Telmatobius culeus*. *Respir. Physiol.* 27: 115 - 129.
- ISAACKS, R. & D. HARKNESS (1980) Erythrocyte organic phosphates and hemoglobin function in birds, reptiles and fishes. *Am. Zool.* 20: 115 - 129.
- JAEGER, J.J. & J.J. MC GRATH (1974) Hematologic and biochemical effects of stimulated high altitude on the japonese quail. *J. Appl. Physiol.* 37: 357-361.

- JOHANSEN, J. & S. DITADI (1966) Double circulation in the giant toad *Bufo paracnemis*. *Physiol. Zool.* 39: 140 - 150.
- KALOUSTIAN, K. & W. DULAC (1982) Relationships between red blood cell indices and the effects of thyroxine in the three species of amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.* 73 A, : 427 - 430.
- KLEIBER, M. (1961) "The fire of life". An introduction to animal energetics. Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- KURAMOTO, M. (1981) Relationships between number, size and shape of red blood cells in amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.* 69 A: 771 - 775.
- LATORRE, A. (1938) Untersuchungen über blut und lympe einiger chilenischer anuren. *Folia Haemat.* 61: 36 - 46.
- LENFANT, C. & K. SULLIVAN (1971) Adaptation to high altitude. *New Engl. J. Med.* 284: 1298 - 1309.
- MC GRATH, J.J. (1971) Acclimation response of pigeons to simulated high altitude. *J. Appl. Physiol.* 31: 274-278.
- MOORE, J.A. (1964) *Physiology of the Amphibia*. Academic Press, Inc., New York.

- MONNCKENDAM, M.A. & J. BALLS (1973) En: Szarsky, H.,
1976. Int. Rev. Cytol. 44: 93 - 111.
- MORRISON, P., KERST, K., REYNAFARJE, C. & J. RAMOS (1963)
Hematocrit and hemoglobin levels in some peruvian
rodents from high and low altitude. Int. J.
Biometeor. 7: 51 - 58.
- MORRISON, P. (1964) Wild animals at high altitudes.
Symp. Zool. Soc. Lond. 13: 49 - 55.
- NEWLIN, M.E. & R. BALLINGER (1976) Blood hemoglobin
concentration in four species of lizards. Copeia
1976: 392 - 394.
- NITECKI, C. (1973) En: Szarski, 1976. Int. Rev.
Cytol. 44: 93 - 111.
- NOBLE, G.K. (1931) The Biology of the Amphibia. Mc
Graw-Hill, New York, Chapter 8: 179 - 186.
- OLMO, E. & A. MORESCALCHI (1975) Evolution of the genoma
and cell size in Salamanders. Experientia 31:
804 - 806.
- OLMO, E. & A. MORESCALCHI (1978) Genoma and cell sizes
in frogs: A comparison with Salamanders. Experientia
34: 44 - 46.

- POUGH, F. (1980) Blood oxygen transport and delivery in reptiles. *Am. Zool.* 20: 173 - 185.
- PROSSER, C. & C. JUDSON (1952) Pharmacology of haemal vassels of *Stichopus*. *Biol. Bull.*, 102: 249 - 251.
- ROOFE, P.G. (1961) Blood constituents of *Amblystoma tigrinum*. *Anat. Rec.* 140: 337 - 340.
- ROOT, R.W. (1931) The respiratory function of the blood of marine fishes. *Biol. Bull.* 61: 427 - 456.
- ROUF, M.A. (1969) Hematology of the leopard frog *Rana pi-piens*. *Copeia* 1969: 682 - 687.
- RUIZ, G., ROSENMANN, M. & A. VELOSO (1983) Respiratory and hematological adaptations to high altitude in *Telmatobius* frogs from the Chilean Andes. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 76 A,: 109 - 113.
- SEYMOUR, R.S. (1973) Gas exchange in Spadefoot toads beneath the ground. *Copeia* 1973: 452 - 460.
- SMITH, H. (1925) Cell size and metabolic activity in amphibia. *Biol. Bull.* 48: 347 - 378.
- SMITH, H., BELT, E., ARNOLD, R. & B. CARRIER (1924) Blood volume changes at high altitude. *Am. J. Physiol.* 71: 395 - 412.

- SRIVASTAVA, A. & R. GRIFFITH (1974) Erythrocyte morphology and ecology of species of *Fundulus*. *Copeia* 1974 (1): 136 - 140.
- STUART, L. (1951) The distributional implications of temperature tolerances and hemoglobin values in the toads *Bufo marinus* (Linnaeus) and *Bufo bocourti* (Brocchi). *Copeia* 1951: 220 - 229.
- SZARSKY, H. (1976) Cells size and nuclear DNA content in vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 44: 93 - 111.
- SZARSKI, H. & R. CYBULSKA (1967) Liver cell size in *Protopterus dolloi*. *Blngr. (Dipnoi). Bull. Acad. Pol. Sic. Cl II (B)* 15: 217 - 220.
- TOOZE, J. & H.G. DAVIES (1963) The occurrence and possible significance of hemoglobin in the chromosomal regions of mature erythrocyte nuclei of the newt *Triturus cristatus*. *J. Cell. Biol.*, 16: 501 - 511.
- VARELA, M.E. & M.E. SELLARES (1938) Variations annuelles du sang du crepaud *Bufo arenarum*. *Hensel. Compt. Rend. Soc. Biol.* 129: 1248 - 1249.
- VIAULT, E. 1891) En: Hurtado, A. *Handbook of Physiology. Adaptation to the Environment.* Chapter 54: 843-860.

- VINEGAR, A. & S.D. HILLYARD (1972) The effects of altitude on oxygen-binding parameters of the blood of the iguanid lizards, *Sceloporus jarrovi* and *Sceloporus occidentalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 43 A: 317-320.
- WEATHERS, W. & F.N. WHITE (1972) Hematological observations on populations of the lizards *Sceloporus occidentalis* from sea level and altitude. *Herpetologica* 28: 172 - 175.
- WINTROBE, M. (1934) Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haemat.*, 51: 32 - 49.
- WINTROBE, M. (1967) *Clinical Hematology*. 6 edn. Lea and Febiger, Philadelphia.
- WOOD, S., WEBER, R., MALOIJ, G. & K. JOHANSEN (1975) Oxygen uptake and blood respiratory properties of the Caecilian *Boulengerula taitanus*. *Respir. Physiol.* 24: 355 - 363.