

## Valores hematológicos y distribución altitudinal de anfibios chilenos

Blood values and altitudinal distribution of Chilean amphibians

GRICELDA RUIZ<sup>1</sup>, MARIO ROSENMANN<sup>2</sup> y ALBERTO VELOSO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Casilla 147, Santiago.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago.

Blood values were measured on a series of Chilean species of frogs and toads from low and high altitudes, ranging from near sea level up to 4,500 m. Average values of red cell number, blood hemoglobin concentration and cell hemoglobin concentration were all higher in the high altitude group (6 species), while the average cell size was larger in the low altitude group (16 species). Hematocrits and cell hemoglobin content showed poor or no correlation with the altitudinal distribution of the examined species.

La presión parcial de oxígeno en la atmósfera disminuye exponencialmente a medida que aumenta la altura de la corteza terrestre, de modo que en alturas relativamente moderadas (aproximadamente 3.000 m) encontramos solamente 2/3 del oxígeno disponible a nivel del mar. Un ascenso de 2.400 m sobre esta altura aumentará la diferencia a un equivalente de 1/2 atmósfera ( $pO_2 = 80$  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 presenta el hombre y otras especies como respuesta de aclimatación 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.

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).

De los datos hematológicos en algunos roedores chilenos y peruanos nativos de

alta y de baja altitud, se puede concluir que el número de eritrocitos y la concentración de hemoglobina no son factores significativos en la adaptación de estos pequeños mamíferos a las altas altitudes (Morrison *et al.*, 1963).

En reptiles la correlación entre altitud y parámetros hematológicos es discutible; parece cumplirse en ciertas especies (Engbretson & Hutchison, 1976; Newlin & Ballinger, 1976) pero no en otras (Dawson & Poulson, 1962; Burns, 1969).

Correlaciones similares en anfibios son menos conocidas; sin embargo, los trabajos de Stuart (1951), de Hock (1964), de Hutchison (1976) y de Ruiz *et al.* (1983) parecen indicar una respuesta opuesta a la descrita anteriormente en mamíferos.

En principio, eritrocitos de pequeño tamaño, conjuntamente con altos valores hematológicos, debiesen facilitar la vida de los anfibios en altas altitudes. Cabría entonces esperar que diferentes especies mostrasen una correlación positiva entre el número de eritrocitos, hematócrito y concentración de hemoglobina versus distribución altitudinal y una correlación negativa entre altitud y el volumen o tamaño del eritrocito. Esta es la hipótesis central del presente trabajo.

Para verificarla hemos seleccionado un amplio número de especies que se distribuyen en un gradiente altitudinal, que va desde el nivel del mar hasta casi 5.000 metros de altura.

## MATERIAL Y METODOS

Los parámetros hematológicos fueron medidos en 184 ejemplares de las especies o poblaciones designadas más adelante con los siguientes números: *Bufo spinulosus* (1, 2), *B. chilensis* (3), *B. rubropunctatus* (4), *B. atacamensis* (5), *Caudiverbera caudiverbera* (6), *Eupsophus roseus* (7), *E. vertebralis* (8), *E. migueli* (9), *E. calcaratus* (10), *Batrachyla leptopus* (11), *B. taeniata* (12), *Alsodes nodosus* (13), *A. tumultuosus* (14), *Telmatobius peruvianus* (15), *T. marmoratus* (16), *T. halli* (17), *T. pefauri* (18), *Insuetophrynus acarpicus* (19), *Pleurodema thaul* (20), *P. marmorata* (21) y *Rhinoderma darwini* (22).

La distribución latitudinal de las especies indicadas se extiende desde Arica (18°20'S) hasta Chiloé (42°20'S). Los batracios de altas altitudes\* fueron colectados en diversas localidades andinas del norte de Chile (Tarapacá y Antofagasta) y en diferentes épocas del año.

Exceptuando la especie 18 (sólo 3 ejemplares), el número de individuos examinados por especie de alta altitud fue de  $8,3 \pm 3,8$  ( $\bar{X}$ , SD) ( $\Sigma N = 50$ ) y de  $8,4 \pm 3,7$  por especie de baja altitud ( $\Sigma N = 134$ ).

Todos los animales fueron trasladados al laboratorio en Santiago (500 m de altura), donde se les mantuvo (por no más de cinco semanas) a temperaturas similares a las registradas en su ambiente de origen.

Salvo excepciones, las muestras de sangre fueron tomadas por punción cardíaca, utilizando jeringas heparinizadas y sin anestesia.

Los análisis de sangre se efectuaron con las técnicas usuales en hematología. El hematócrito (Hct) se determinó como microhematócrito centrifugando a 10.000 revoluciones por minuto hasta volumen constante. La concentración de hemoglobina en sangre total (Hb) se midió como cianmetahemoglobina (MercKotest Merck). El recuento globular (N) se efectuó en hemocitómetros Neubauer, usando una dilución de sangre (1:100) en solución de NaCl al 0,7%. Los diámetros de los eritrocitos se midieron en frotis secos y sin tinción, con un micrómetro ocular calibrado Carl Zeiss, utilizando un aumento de 1.000 X, sin inmersión.

A partir de los valores de Hct, de Hb y de N se calculó el volumen corpuscular medio (MCV), la cantidad de hemoglobina corpuscular media (MCH) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC).

Todas las ecuaciones de regresión fueron calculadas por el método de los cuadrados mínimos. En la comparación de promedios se utilizó el test de *t*.

\* En este trabajo consideramos como "altas altitudes" a aquellas que se aproximan o que superan los 3.000 metros.

## RESULTADOS

Por sus peculiares características geométricas es usual medir en los eritrocitos solamente dos dimensiones lineales, el diámetro mayor (A) y el diámetro menor (B).

El promedio de los valores de A para las seis especies de alta altitud (referidas en Material y Métodos con los números 2, 15, 16, 17, 18 y 21) fue de  $16,2 \pm 1,2$   $\mu\text{m}$ , mientras que el promedio de las 16 especies de baja altitud fue de  $20,1 \pm 4,15$   $\mu\text{m}$  ( $p < 0,001$ ). En el extremo inferior del rango de tamaños destacan los eritrocitos de la especie de altura *P. marmorata* (14  $\mu\text{m}$ ) y en el extremo superior los de *C. caudiverbera* (25  $\mu\text{m}$ ), especie que no se encuentra por sobre los 1.000 metros.

Una relación similar se observa al comparar los diámetros menores en ambos grupos. El promedio de los valores de B en las especies de alta altitud fue de  $12,1 \pm 0,6$   $\mu\text{m}$  y de  $13,45 \pm 1,1$   $\mu\text{m}$  en las de baja altitud ( $p < 0,02$ ).

El rango de volúmenes de los eritrocitos se extiende en nuestras especies desde 250  $\mu\text{m}^3$  en *P. marmorata* hasta casi 900  $\mu\text{m}^3$  en *C. caudiverbera*. En este rango el promedio de los valores agrupados de las especies de altura ( $392 \pm 84$   $\mu\text{m}^3$ ) es significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que el promedio de las especies nativas de bajas altitudes ( $527 \pm 145$   $\mu\text{m}^3$ ). Corroborando las diferencias encontradas al comparar promedios de los grupos, la Figura 1 correlaciona los valores de MCV con la distribución altitudinal máxima de cada especie (Duellman, 1979). Se observa en este gráfico logarítmico una buena correlación negativa,  $r = -0,72$  ( $p < 0,001$ ), entre ambas variables.

La ecuación de regresión  $\text{MCV} = 2138 X^{-0,21}$ , en la que X representa la altura en metros, indica que el volumen de los eritrocitos es inversamente proporcional a la altitud de origen de los anuros estudiados. Esta correlación pareciera cumplirse incluso a nivel de poblaciones. El MCV de *B. spinulosus* capturados entre 200 y 2.700 metros dio un valor promedio de  $544 \pm 25$   $\mu\text{m}^3$  (no incluido en la Figura 1), mientras que el promedio de los valo-

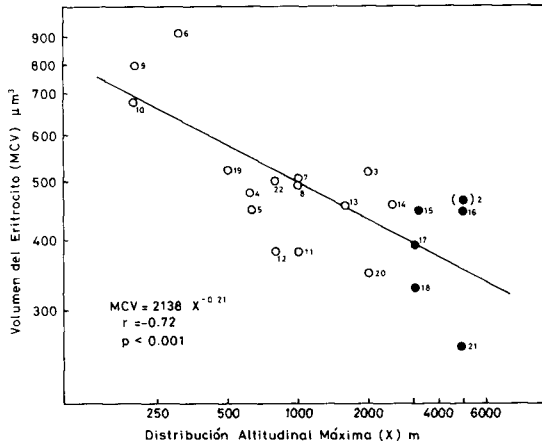


Fig. 1: Relación logarítmica entre el volumen de los eritrocitos y la distribución altitudinal máxima de los anuros estudiados. Los números corresponden a las especies indicadas en el texto. Los círculos negros identifican a las especies de alta altitud. En este gráfico y en los siguientes se incluye en paréntesis solamente a las poblaciones de altura de *B. spinulosus*.

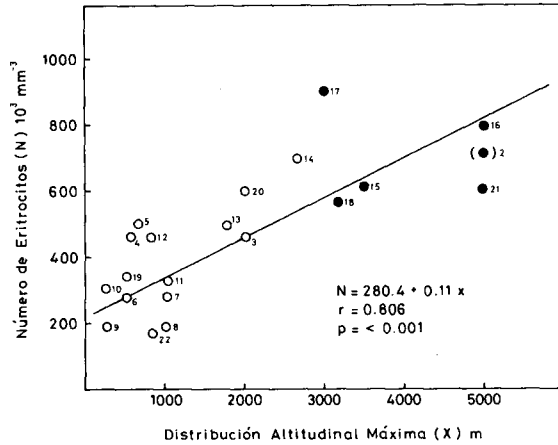


Fig. 2: Número de eritrocitos (miles por mm³ de sangre) y distribución altitudinal máxima en diversas especies de anuros. Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Figura 1.

res de individuos capturados entre 3.200 y 4.300 metros (indicado entre paréntesis en la Figura 1) dio un promedio de  $477 \pm 22 \mu\text{m}^3$ .

Los recuentos globulares permiten apreciar una clara diferencia entre el promedio del número de eritrocitos por mm³ de sangre del grupo de especies de baja altitud ( $415.000 \pm 166 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ ) y el promedio encontrado en las especies de alta altitud ( $713.000 \pm 111 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ ),  $p < 0,001$ . Este hecho se ve reafirmado en la Figura 2, en la que se correlacionan ambas variables, número de eritrocitos (N) en miles por mm³ y la distribución altitudinal máxima en metros (X).

La ecuación ( $N = 280,4 + 0,11 X$ ) indica que a partir de los valores mínimos de recuento, el número de eritrocitos se incrementa en  $11.000 \text{ mm}^{-3}$  por cada 100 metros de incremento en altitud.

A pesar de la marcada diferencia encontrada en los recuentos de eritrocitos, los promedios de los valores de Hct en ambos grupos de anuros ( $28 \pm 7,3\%$  versus  $21 \pm 8,3\%$  en los de baja altitud) no son significativamente diferentes ( $p = 0,06$ ).

Sin embargo, las especies de altura muestran cierta tendencia hacia los valores altos, como se observa en la Figura 3, en la que la correlación entre ambas variables es rela-

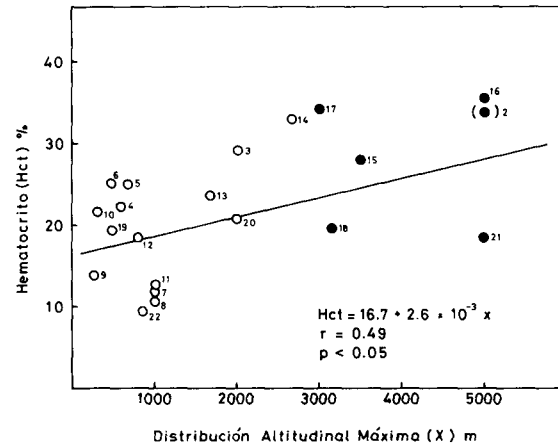


Fig. 3: Hematócritos y distribución altitudinal máxima en diversas especies de anuros. Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Figura 1.

tivamente baja ( $r = 0,49$ ), pero significativa ( $p < 0,05$ ).

La concentración de hemoglobina en la sangre (Hb%) difiere entre ambos grupos y refleja más las diferencias encontradas en los recuentos globulares que en los hematócritos.

El promedio de Hb% en los anuros de baja altitud ( $5,54 \pm 1,7\%$ ) equivale a 2/3 del promedio de las especies de alta altitud ( $9,02 \pm 2,16\%$ ),  $p < 0,01$ .

La Figura 4 correlaciona ambas variables. En este gráfico la pendiente de la regresión implica un aumento de 1,12 gramos de Hb%, por cada 1.000 metros

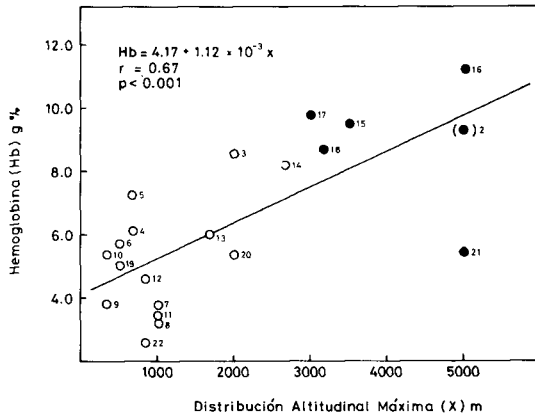


Fig. 4: Concentración de hemoglobina en la sangre y distribución altitudinal máxima en diversas especies de anuros. Los símbolos siguen la nomenclatura indicada en la Figura 1.

de incremento de altitud. Sin embargo, la cantidad de Hb almacenada en los eritrocitos (hemoglobina corpuscular media) no difiere significativamente ( $p > 0,1$ ) en ambos grupos ( $123 \pm 26$  pg/cel en los anuros de altura versus  $114 \pm 36$  pg/cel en los de baja altitud).

Si relacionamos este hecho con las diferencias de tamaño de los eritrocitos, debiésemos esperar una menor concentración de Hb en los eritrocitos de las especies de baja altitud. Efectivamente, en estas especies la concentración de Hb corpuscular media (MCHC) resultó ser de  $27,4 \pm 1,9\%$ , comparada con un promedio de  $31,1 \pm 2,5\%$  en las de alta altitud ( $p < 0,01$ ).

#### DISCUSION

En la búsqueda de características hematológicas más probables de ser consideradas como adaptaciones a las grandes alturas, resalta, en primer lugar, el pequeño tamaño de los eritrocitos. Esta característica se evidencia tanto en las dimensiones lineales como en el volumen de los glóbulos rojos. El diámetro mayor promedio de nuestras especies de baja altitud ( $20 \mu\text{m}$ ) no difiere de los valores encontrados en otros anuros (Kaloustian y Dulac, 1982); sin embargo, el promedio de las especies de altura da un valor de  $16,2 \pm 1,3 \mu\text{m}$ ,

destacándose entre ellos *P. marmorata* con un valor de A de solamente  $14 \mu\text{m}$ . Paralelamente, el volumen de los eritrocitos en las especies de alta altitud es tan pequeño, que resultan ser los más bajos entre los anfibios conocidos. Por ejemplo, el MCV en *P. marmorata* ( $254 \mu\text{m}^3$ ) alcanza a solamente  $2/3$  del volumen dado para *T. culeus* (Hutchison *et al.*, 1976); a  $1/2$  del volumen que presentan varias especies del género *Bufo* (Biswas *et al.*, 1981), (Kaloustian & Dulac, 1982); a  $1/3$  del valor encontrado en especies del género *Rana* (Wood *et al.*, 1975) y a solamente  $1/5$  del volumen de los eritrocitos de *Hyla arborea* (Szarsky, 1976).

La ventaja de poseer eritrocitos pequeños está probablemente asociada a su mayor superficie relativa. Por ejemplo, el eritrocito de *P. marmorata* tiene solamente  $1/3$  del volumen, pero casi  $1/2$  de la superficie del eritrocito de *C. caudiverbera*, calculada como la superficie de una elipse de diámetros A y B.

Además de las características morfológicas, el número de eritrocitos circulantes y la concentración de Hb en la sangre son significativamente más altos en las especies de altura. El alto número de eritrocitos en nuestros anuros andinos es solamente sobrepasado por contadas especies. Por ejemplo, en los machos de *Hyla hallowelli* y de *Rana tsushimensis* ( $990$  a  $1.060 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ ) durante la época de reproducción (Kuramoto, 1981) y de *Bufo arenarum* durante la misma época (Varela y Sellares, 1938).

Fuera de estas excepciones, los datos de recuento son en general bastante más bajos y cercanos al promedio de nuestras 16 especies de baja altitud (Prosser, 1952; Moore, 1964; Kuramoto, 1981).

Una relación similar se encuentra al comparar nuestros valores de Hb% con datos de otras especies. La concentración de Hb en la sangre de los anuros de alta altitud está entre los valores más altos descritos en anfibios. Por ejemplo, Hb% en *T. marmoratus* ( $11,2\%$ ) excede al encontrado en diversas especies de los géneros *Bufo* ( $8$  a  $10,6\%$ ), *Hyla* ( $10,2\%$ ) y *Rana* ( $6,5$  a  $7,8\%$ ) (Stuart, 1951); Prosser, 1952); (Wood, 1975); y es solamente

sobrepasada por la del sapo fosorial *Scaphiopus* (10 a 12,9%) (Seymour, 1973).

De estos datos y de la relación expresada en la Figura 4 pareciera ser claro que en los anuros la concentración de Hb es mayor en las especies de alta altitud. Una correlación positiva similar se ha propuesto en reptiles (Newlin y Ballinger, 1976). Sin embargo, resultados diferentes han sido descritos en urodelos (Friedmann, 1971) y en mamíferos (Morrison *et al.*, 1963), en los que las especies de alta altitud no demuestran tener una mayor concentración de Hb circulante.

A pesar de las diferencias en N y en Hb, los hematocritos promedios de las especies de alta y de baja altitud (28 versus 21%) no son significativamente diferentes. Ambos grupos caen en el rango de valores (10 a 40%) de la mayoría de los anuros (Hillman, 1980); (Kuramoto, 1981).

La baja correlación entre hematocrito y altitud se debe probablemente a que en las especies de altura 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 baja altitud es también compensado con un mayor MCV. De aquí resulta que el Hct aparenta ser más independiente de la distribución altitudinal que N, Hb y MCV.

Del análisis de los datos agrupados de las especies de alta y de baja altitud se desprende que la cantidad de Hb en los eritrocitos no demuestra estar relacionada con el origen altitudinal de los anuros estudiados. Los promedios de MCH de las especies de altura ( $123 \pm 26$  pg/cel) y de las de baja altitud ( $144 \pm 36$  pg/cel) no son significativamente diferentes ( $p > 0,1$ ). Dada la marcada diferencia en los tamaños celulares, la baja correlación entre MCH y distribución altitudinal puede ser atribuida en gran medida a una concentración de hemoglobina corpuscular distinta en ambos grupos.

Efectivamente, el valor promedio de MCHC en las especies de altura ( $31,1 \pm 2,5\%$ ) resultó ser significativamente mayor ( $p < 0,01$ ) que en las de baja altitud ( $27,4 \pm 1,9\%$ ). Este hecho adquiere consecuencias importantes al comparar la capacidad de saturación de oxígeno de un

volumen dado de eritrocitos en ambos grupos. Por ejemplo, un ml de eritrocitos de *T. peruvianus* (MCHC = 35,4%) podría transportar 43% más oxígeno que un ml de eritrocitos de *E. vertebralis* (MCHC = 24,7%) y 57% más oxígeno que si se tratara de eritrocitos de *C. caudiverbera* (MCHC = 22,8%), independientemente del número y tamaño de sus glóbulos rojos.

Finalmente, resulta interesante señalar que el promedio de MCHC en los anuros andinos ( $31,1 \pm 2,5\%$ ) se asemeja más a los valores encontrados en los eritrocitos anucleados de los mamíferos ( $32 \pm 2,7\%$ ) (Wintrobe, 1967), que a los de los anfibios de bajas altitudes ( $27,4 \pm 1,9\%$ ).

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto DIB N° 1753-8534 de la Universidad de Chile.

#### REFERENCIAS

- BISWAS, H. & PATRA, P. (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) Ecology and physiology of *Sceloporus jarrovi* in the Graham Mountains. Citado por Newlin, M.E. and Ballinger, R. *Copeia*, 1976: 392-394.
- DAWSON, W.R. & POULSON, T.L. (1962) Oxygen capacity of lizard bloods. *Amer. Midl. Nat.* 68: 154-164.
- DUELLMAN, W.E. (1979) The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution, and Dispersal. Museum of Natural History the University of Kansas. Monograph N° 7.
- ENGBRETSON, G. & HUTCHISON, V. (1976) Erythrocyte count, hematocrit and hemoglobin content in the lizard *Liolaemus multiformis*. *Copeia* 1976: 186.
- FRIEDMANN, G.B. (1971) Altitudinal variations in the red blood cell count and haemoglobin content of urodele blood. *Can. J. Zool.* 49: 565-568.
- HILLMAN, S. (1980) Physiological correlates of differential dehydration tolerance in anuran amphibians. *Copeia* 1980: 125-129.
- HOCK, R. (1964) Animals in high altitudes: Reptiles and Amphibians. En: *Handbook of Physiology*, Section 4, Dill, D.B. (editor), American Physiological Society, Washington, D.C.
- HUTCHISON, V.; HAINES, H. & ENGBRETSON, C. (1976) Aquatic life at high altitude: Respiratory Adaptations in the lake Titicaca frog, *Telmatobius culeus*. *Resp. Physiol.* 27: 115-129.
- KALOUSTIAN, K. & DULAC, W. (1982) Relationships between red blood cell indices and the effects of thyroxine in the three species of amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.* 73A: 427-430.
- KURAMOTO, M. (1981) Relationships between number, size and shape of red blood cells in amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.* 69A: 771-775.
- MOORE, J.A. (1964) *Physiology of the Amphibia*. Academic Press, Inc., New York.

- MORRISON, P.; KERST, K.; KEYNAFARJE, C. & RAMOS, J. (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. & BALLINGER, R. (1976) Blood hemoglobin concentration in four species of lizards. *Copeia* 1976: 392-394.
- PROSSER, C. & JUDSON, C. (1952) Pharmacology of haemal vassels of *Stichopus*. *Biol. Bull.*, 102: 249-251.
- RUIZ, G.; ROSENMANN, M. & VELOSO, A. (1983) Respiratory and hematological adaptations to high altitude in *Telmatobius* frogs from the Chilean Andes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76A: 109-113.
- SEYMOUR, R.S. (1973) Gas exchange in Spadefoot toads beneath the ground. *Copeia* 1973: 452-460.
- STUART, L.C. (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) Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 44: 93-111.
- VARELA, M.E. & SELLARES, M.E. (1938) Variations annuelles du sang du crepaud *Bufo arenarum* Hensel. *Comt. Rend. Soc. Biol.* 129: 1248-1249.
- WINTROBE, M. (1967) *Clinical Hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- WOOD, S.; WEBER, R.; MALOY, G. & JOHANSEN, K. (1975) Oxygen uptake and blood respiratory properties of the Caecilian *Boulengerula taitanus*. *Resp. Physiol.* 24: 355-363.