

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS DE *RANA PEREZI* (AMPHIBIA: SALIENTIA)*

F. J. Martínez**, P. Mendiola** y J. de Costa**

Recibido: septiembre 1984

SUMMARY

Hematological parameters of *Rana perezi* (Amphibia: Salientia)

As part of a wider research on respiratory properties of *Rana perezi* blood, the hematological parameters of this species have been measured. The study of blood O₂-transporting proteins (hemoglobin, Hb) and plasmatic proteins has also been initiated. Using fifteen females weighting 23.5 g (15.3-31.8), the following results have been obtained: hematocrit (Hct): 25.7±3.2 (n=15); Red blood cell count (RBC): 482±154x10⁹/mm³ (n=14); Hb concentration: 5.19±0.99 g/100 ml (n=9); mean corpuscular volume (MCV): 533.29 μ³; mean corpuscular Hb concentration (MCHC): 20.15% and mean corpuscular Hb (MCH): 107.5 pg. The electrophoresis of the Hb in 5% polyacrylamide gels showed two bands. Their quantification gave 72.38±±20.19% (n=11) for the anodic band and 27.62±20.19 (n=11) for the catodic one. Electrophoresis of plasma was performed in different kinds of polyacrylamide gels, the best obtained being in 7.5 and 8.5% gel. Electrophoretic behaviour of plasma proteins seems to be similar to that described in terrestrial vertebrates. These results are discussed and compared with data from other species belonging to *Bufo*, *Hyla* and *Rana* genera.

RESUMEN

Como parte de una investigación más amplia sobre propiedades respiratorias de la sangre de *Rana perezi*, se han medido los parámetros hematológicos de la sangre de esta especie. Asimismo, se ha iniciado el estudio de sus proteínas transportadoras de O₂ (hemoglobina, Hb) y proteínas plasmáticas. Utilizando 15 hembras de peso medio 23,5 g (15,3-31,8), se han obtenido los siguientes resultados: hematocrito (Hcto): 25,7±3,2 (n=15); número de glóbulos rojos (RGR): 482±154 x 10⁹/mm³ (n=14); concentración de Hb (Hb): 5,19±0,99 g/100 ml (n=9); volumen corpuscular medio (VCM): 533,29μ³; concentración corpuscular media de Hb (CCMH): 20,15% y Hb media corpuscular (HCM): 107,5 pg. La electroforesis de la Hb en geles de 5% de acrilamida dio lugar a dos bandas, cuya cuantificación fue de 72,38±20,19% (n=11) para la más anódica y 27,62±20,19% (n=11) para la más catódica. La electroforesis de plasma se realizó con distintos tipos de gel, observándose una mejor separación en los de 7,5 y 8,5% de acrilamida. Su comportamiento electroforético parece ajustarse a un patrón típico de vertebrados terrestres. Se discuten los resultados comparándolos con otros de los géneros *Bufo*, *Hyla* y *Rana*.

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de O₂ limita las posibilidades metabólicas y, por tanto, de comportamiento de los animales en un ambiente con-

creto. Frente a esto, la adaptación a un medio depende del desarrollo de mecanismos adecuados para superar estas limitaciones, aún con un costo energético adicional.

Así, no es extraño encontrar que, en Anfi-

* Trabajo presentado como comunicación al XX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, Murcia, 1984.

** Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia.

bios, dichas adaptaciones afectan a las propiedades respiratorias de su sangre y, por tanto, a aquellos parámetros que más inciden en éstas. No obstante, otra serie de factores tienen también influencia sobre estos parámetros. Así, el recuento de glóbulos rojos (RGR) puede variar según el sexo (ARVEY, 1947; KAPLAN, 1952; NOBLE, 1954), el estado nutricional (HARRIS, 1953; NOBLE, 1954), el estado hídrico (SCHERMER, 1967) y los ciclos estacionales (HEESEN, 1924; NOBLE, 1954; HARRIS, 1972). La concentración de hemoglobina (Hb) puede cambiar en función de la actividad (GAUMER & GOODNIGHT, 1957), la altitud (STUART, 1951; HOWARD & WALLACE, 1980; BISWAS *et al.*, 1981), la temperatura ambiente (FOXON, 1964) y los ciclos estacionales (HARRIS, 1972).

Por otro lado, se ha observado en poiquilotermos cierta correlación entre los parámetros hematológicos y el hábitat y la actividad (GAUMER & GOODNIGHT, 1957; SCHOLANDER & VAN DAN, 1957). Así, los anfibios anuros terrestres y arborícolas se caracterizan por tener un alto RGR (HUTCHISON & SZARSKI, 1965; HALL, 1966). Las ranas semiterrestres tienen valores intermedios de glóbulos rojos (FOXON, 1964; LEFTWICH & BURKE, 1964) y los ránidos acuáticos valores relativamente bajos (LEFTWICH & BURKE, 1964). Los bufónidos terrestres presentan mayor concentración de Hb que algunos hílidos arborícolas (GOIN & JACKSON, 1965), los cuales muestran concentraciones superiores a las de los ránidos semiacuáticos o acuáticos (LEFTWICH & BURKE, 1964). Un alto nivel de Hb junto a un alto hematocrito (Hcto) son propios de animales con una elevada capacidad aerobia puesto que tales características favorecen un aporte adecuado de O₂ a los tejidos. Por el contrario, los anuros con gran capacidad anaerobia presentan concentraciones de Hb y Hcto más bajas (HAZARD & HUTCHISON, 1982).

Es común, dentro de la misma especie de vertebrados, la existencia de varias Hbs (HATTING, 1976; MIED & POWERS, 1977; POWERS, 1980; BREEPOEL *et al.*, 1981; CHIEFFI *et al.*, 1960; BERTINI & RATHE, 1962; BAGLIONI & SPARKS, 1963; GILLIESPIE & CREUSHAW, 1966; BEMBASSAT, 1970; JOKUMSEN & WEBER, 1980). En peces parece que las diferencias en número y porcentajes de la composición de fracciones de Hb ocurren, en gran parte, como respuesta a variaciones estacionales y adaptaciones termoaclimatadoras (SMIT & HATTING, 1981). Algo similar puede observarse en los anfibios. Así, *Xenopus laevis* presenta dos componentes: la forma electroforéticamente más catódica tiene más afinidad por el O₂ y carece de sensibilidad al pH y cooperatividad, mien-

tras que la más anódica muestra sensibilidad al pH, cooperatividad y menor afinidad por el O₂ (JOKUMSEN & WEBER, 1980).

El estudio que aquí se presenta se encuentra dentro de uno más amplio cuyo fin es caracterizar las propiedades respiratorias de la sangre de anfibios anuros y los aspectos que puedan modificar éstas. *Rana perezi* (Seoane, 1885) es una especie común en la Región murciana y muy utilizada en el laboratorio. Dada la escasa información bibliográfica sobre los parámetros hematológicos de esta especie, resulta necesaria su caracterización en este aspecto.

Así pues, en el presente trabajo se han estudiado los siguientes parámetros hematológicos de *R. perezi*: hematocrito (Hcto), concentración de Hb (Hb), recuento de glóbulos rojos (RGR), volumen corpuscular medio (VCM), concentración de Hb corpuscular media (CCMH) y Hb media corpuscular (HCM). Se ha realizado la separación de fracciones de Hb y se ha iniciado el estudio de las proteínas plasmáticas en sangre de esta especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se sacrificaron 15 hembras de *R. perezi* con un peso promedio de 23,5 g (15,3-31,8), adquiridas, en octubre de 1983, al suministrador habitual, que las captura en la ribera del río Segura, en Orihuela (Alicante). Se extrajo la sangre por punción intracardiaca con una jeringuilla heparinizada. Una parte de la muestra de sangre de cada especie se utilizó para la determinación del Hcto (microhematocrito), concentración de Hb (método de la cianometahemoglobina: $\epsilon^{540} = 11$) y para el recuento de glóbulos rojos (suspensión en líquido de Hayem; cámara de Thoma). Con estos parámetros se calcularon el VCM, CCMH y HCM mediante las siguientes expresiones:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hcto}}{\text{RGR}}; \quad \text{HCM} = \frac{\text{HB}}{\text{RGR}}; \quad \text{CCMH} = \frac{\text{HB}}{\text{Hcto}}$$

Otra parte de cada muestra se utilizó para obtener plasma sanguíneo y un hemolizado libre de éste. Primero se centrifugó a 700 g durante 10 min a 0-4° C para la separación del plasma. Posteriormente se lavaron tres veces los glóbulos rojos en solución de Ringer a pH 6,8, centrifugando a 700 g durante 10 min. La hemólisis se produjo por la adición de tampón Tris 1 mM en cantidad suficiente, pero sin superar la proporción de 1:10 respecto al volumen de eritrocitos. Al sobrenadante obtenido de la centrifugación a 8.000 g se le añadió glicerol, ditioeritritol (DTE) y solución de Drabkin en proporción 1:1:1:1.

Se realizó, en el mismo día, la electroforesis de 25 µl de esta solución de Hb en geles de poliacrilamida del 5%, con tampón Tris-Glicina-CNK, pH 9,1 y un voltaje de 100 V durante 30 min, y 250 V durante 1,5-2 horas. La refrigeración del sistema hizo que la temperatura no superase, en ningún caso, los 20° C. Tras la extracción de los geles, se procedió a su lectura a 540 nm, en un

espectrofotómetro UVIKON 810 (KONTRON) y cuantificación mediante la integración del área de los picos según el procedimiento de STORCH DE GRACIA (1975).

El plasma obtenido por centrifugación se sometió a electroforesis en condiciones semejantes, utilizando, como tampón, Tris-Glicina a pH 9,1 y distintos tipos de gel: 5%, 6,5%, 7,5% y 8,5%. La tinción se realizó con azul brillante Coomassie en solución en acético-metanol durante una hora y destinción con acético (7,5%) y metanol (5%). Los geles se leyeron, espectrofotométricamente, a 565 nm. En todas las electroforesis se utilizó un patrón de albúmina de suero bovino.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla I pueden observarse los resultados obtenidos en el presente trabajo, así como los

valores de los parámetros hematológicos de otras especies de anfibios aportados por otros autores.

Respecto al Hcto los valores de *Bufo* y *Rana* son similares. Pueden apreciarse diferencias en los datos de una misma especie, siendo el ejemplo más llamativo el de *B. marinus*. Estas diferencias podrían deberse a variaciones estacionales o al empleo de distintas metodologías. Por otro lado, los valores más bajos son los de las especies de *Hyla*. Los resultados obtenidos en *R. perezi* ($25,7 \pm 3,2$) están dentro del rango señalado para las especies de *Bufo* y *Rana*. También en el caso de *R. perezi* se producen variaciones que es muy probable que estén inducidas por los cambios estacionales. Así, este trabajo se ha realizado en otoño-invierno, mientras que trabajos anteriores, realizados en primavera-verano, mostraron valo-

TABLA I. Parámetros hematológicos de *R. perezi*. Comparación con datos pertenecientes a otras especies de anfibios anuros.

Hematological parameters of *R. perezi*. Comparison with data from several other anuran species.

ESPECIE	PESO, g	HCTO	RGR x x 10 ³ /mm ³	Hb/100 ml	VCM, μm ³	CCMH, %	HCMpg	REF.
BUFO								
<i>B. americanus</i>	180-496	37.3±8.4	817±180	11.1±2.6	257±21	29.7*	135±21	1
<i>B. americanus</i>	21.9	23.07		6.93		30*		2
<i>B. americanus</i>			658±150					3
<i>B. cognatus</i>	45.58	25.14		9.98		39.6*		2
<i>B. marinus</i>	474.8	11.76		4.61		39.2*		2
<i>B. marinus</i>		36.8±9.3	675±128	10.6±3.2	538±23	28.6±1.6	154±18	4
<i>B. w. woodhousei</i>	61.8	39.71		11.95		37.6*		2
<i>B. melanostictus</i>	53.5±9.3	32.2±0.6	680±24	11.1±0.6	480±14	34.6±0.5		5
HYLA								
<i>Hyla gratiosa</i>	14	18.18		4.49		24.6*		2
<i>H. versicolor</i>	3.84	13.65		4.63		33.9*		2
<i>H. versicolor</i>			615±165					3
RANA								
<i>R. perezi</i>	23.5	25.7±3.2 (n=15)	482±154 (n=14)	5.19±0.99 (n=14)	533.29	20.15	107.5	0
<i>R. berlandieri fo-</i> <i>rer</i>	38.5	22.06		5.19		23.5*		2
<i>R.b. berlandieri</i>	54.1	26.35		7.56		28.6*		2
<i>R. blairi</i>	40.5	21.47		7.43		34.6*		2
<i>R. catesbeiana</i>	518.2	37.3		8.99		24.1*		2
<i>R. catesbeiana</i>	537±88.1	23.8		6.6±0.4		27.7*		6
<i>R. catesbeiana</i>		27.1±1.8	312±26	6.5	874±18	23.9±1.6	202±13	4
<i>R. catesbeiana</i>			252±170					3
<i>R. pipiens</i>		22±2.7	341±37	6.6±0.9	653±40	29.4±40	192±12	4
<i>R. clamitans</i>			276±102					3

* Valores calculados en este trabajo a partir de los datos originales.

Referencias: 0: Resultados obtenidos en este trabajo. 1: HALL (1966). 2: HAZARD & HUTCHISON (1982). 3: HUTCHISON & SZARSKI (1965). 4: KALOUSTIAN & DULAC (1982). 5: BISWAS *et al.* (1981). 6: HAZARD & HUTCHISON (1978).

res sensiblemente inferiores (sin publicar). Esto pone en evidencia la necesidad de un estudio de las variaciones estacionales de los parámetros hematológicos en esta especie.

El valor de la concentración de Hb para *R. perezii* ($5.19 \pm 0.99\%$) es igual al presentado por *R. berlandieri foreri* (tabla I). Estos valores son los más bajos entre las especies de *Rana*, inferiores a los de *Bufo* y algo superiores a los de *Hyla*. Esto último contrasta con el hecho observado por LEFTWICH & BURKE (1964) de que algunos hílidos arborícolas presentan mayores concentraciones que los ránidos semiacuáticos o acuáticos. La baja concentración de Hb en *R. perezii* supone una limitada capacidad de transporte de O_2 en su sangre, así como de reserva de este gas durante el buceo. En este parámetro también pueden existir variaciones estacionales (HARRIS, 1972). Por otro lado, la infección denominada «pie rojo», en *Rana*, produce alteraciones en los parámetros hematológicos (HARRIS, 1972). Esta infección se dio, aunque poco avanzada, en alguno de los ejemplares utilizados en este trabajo.

El número de glóbulos rojos de *R. perezii* ($482 \pm 154 \times 10^3/\text{mm}^3$) es superior al presentado por otras especies de *Rana* y menor que el de las del género *Bufo* y, en general, que el de los anuros más terrestres y arborícolas (tabla I), poseyendo un número intermedio entre los ránidos más acuáticos y los terrestres (FOXON, 1964; LEFTWICH & BURKE, 1964).

En cuanto a volumen globular, aunque los datos de otras especies son muy escasos, parece existir una tendencia a que sea mayor en las especies de *Rana* que en las de *Bufo*, siendo el obtenido para *R. perezii* ($533.29\mu^3$) inferior al de otras especies de *Rana* (tabla I), así como lo son la CCMH (20,15%) y la HCM (107.5 pg). En el presente trabajo también se ha comprobado que no existe correlación entre todos estos parámetros y el peso de las distintas especies.

Por todo ello, en base a los parámetros hematológicos estudiados, se puede considerar a *R. perezii* como un anfibio semiacuático, aunque haya sido descrita como típicamente acuática por otros autores (ANDRADA, 1980).

Teniendo en cuenta la actividad que caracteriza a esta especie: súbita, de gran rapidez y corta duración, y la reducida capacidad de transporte de O_2 que posee su sangre, junto a la alta afinidad de su Hb por el O_2 (datos sin publicar), se puede deducir que *R. perezii* en actividad recurrirá al metabolismo anaerobio, y ello en mayor proporción que otras especies del mismo género.

La electroforesis de Hb dio como resultado la separación de dos fracciones cuyos porcentajes son: 72.38 ± 20.19 ($n=11$) para la más anódica y 27.62 ± 20.19 ($n=11$) para la más catódica. Aun-

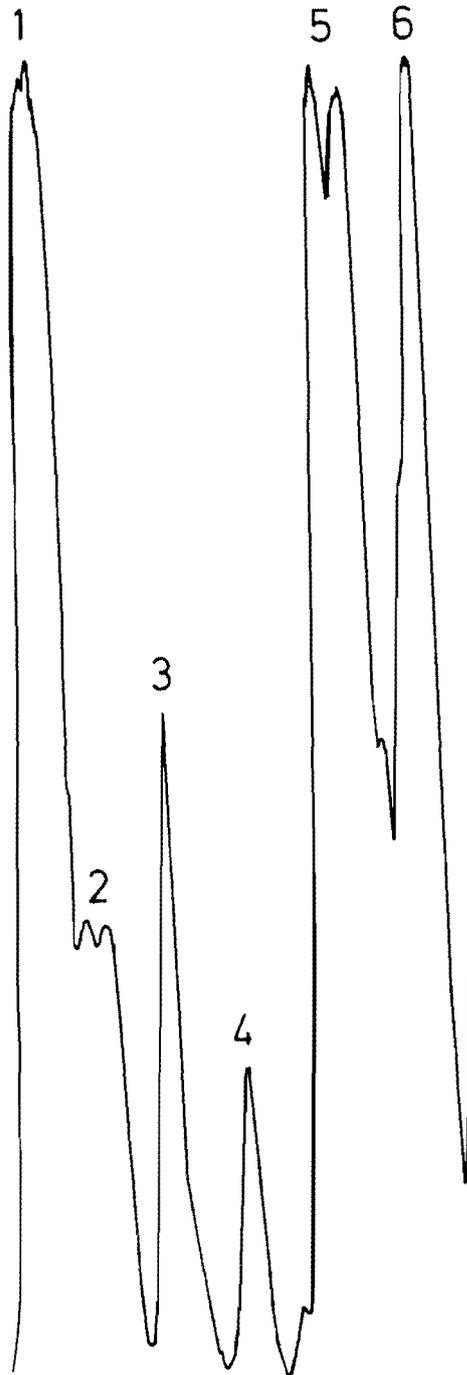


FIGURA 1. Registro de la separación electroforética de proteínas plasmáticas de *R. perezii* en gel de 8.5% de acrilamida. 1) albúmina; 2) a 6) globulinas; 5) fibrinógeno.

Electrophoretic pattern of plasmatic proteins from *R. perezii* in 8.5% acrylamide gel. 1) albumin; 2) to 6) globulins; 5) fibrinogen.

que la variabilidad es alta, la fracción más anódica es la predominante generalmente.

En *R. esculenta*, mediante cromatografía (BRUNORI *et al.*, 1968) y en *Xenopus laevis*, mediante electroenfoque (JOKUMSEN & WEBER, 1980) se han obtenido también dos isohe-moglobinas. Estas dos fracciones presentan distinta afinidad por el O₂ a pH fisiológico y diferente sensibilidad al pH, lo que proporciona a cada fracción unas características funcionales que pueden tener un significado adaptativo distinto. Aunque esto aún no ha sido estudiado, es probable que en *R. perezi* se dé una situación similar.

La mejor separación electroforética de las proteínas plasmáticas fue la realizada en geles de 7.5 y 8.5%, aunque su lectura no fue cuantificada. En la figura 1 se muestra un ejemplo de electrofo-regrama obtenido.

Las figuras 2 y 3 reproducen registros electroforéticos de suero humano (WHITE *et al.*, 1978) y de suero de *Rana ridibunda* (ARIKAN, 1983), respectivamente. Las fracciones obtenidas aquí para *R. perezi* se ajustan, en general, al modelo de mamíferos. Aunque en la figura 2 no aparece el fibrinógeno por tratarse de suero, aquél migra entre las globulinas γ y β en plasma completo (WHITE *et al.*, 1978). Por comparación de las figuras 1 y 2, se deduce que la fracción 1 corresponde muy posiblemente a la albúmina. Las fracciones 2 a 6 podrían corresponder a las globulinas, si bien la fracción 5 debe estar constituida, total o parcialmente, por fibrinógeno. Por simi-

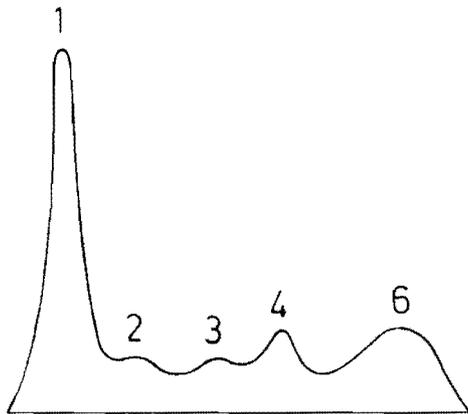


FIGURA 2. Registro electroforético de proteínas de suero humano. 1) albúmina; 2) α_1 globulina; 3) α_2 globulina; 4) β globulina; 6) γ globulina. (De WHITE *et al.*, 1978).

Electrophoretic pattern of human serum proteins. 1) albumin; 2) α_1 globulin; 3) α_2 globulin; 4) β globulin; 6) γ globulin. (From WHITE *et al.*, 1978).

tud con el modelo humano, es probable que la fracción 2 incluya las globulinas α_1 , la 3 a las α_2 , la 4 las β y la 6 las γ .

ARIKAN (1983) obtiene, mediante un método electroforético similar al empleado en el presente trabajo, diez fracciones en el suero de *R. ridibunda*: albúmina, más nueve fracciones globulínicas, denominadas G1 a G9. De la comparación de este electroforegrama (fig. 3) con el de *R. perezi* (fig. 1), se puede decir que las fracciones 2, 3 y 4 de *R. ridibunda* pueden corresponderse con las denominadas 2, 3 y 4 de *R. perezi*. A partir de la fracción 5 la correspondencia no es clara, ya que el número de fracciones es distinto y, además, parte de la fracción 5, como se ha dicho, incluye el fibrinógeno. Así pues, son necesarios estudios posteriores que puedan confirmar que las fracciones obtenidas para *R. perezi* en este trabajo están constituidas por los tipos de proteínas señalados.

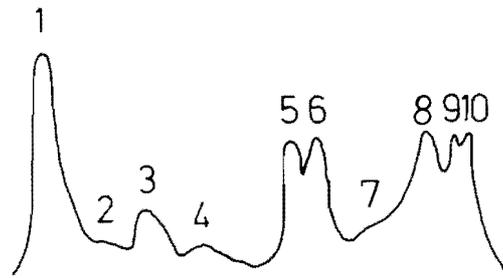


FIGURA 3. Registro electroforético de proteínas séricas de *Rana ridibunda*. 1) albúmina; 2) a 9) globulinas (De ARIKAN, 1983).

Electrophoretic pattern of serum proteins from *Rana ridibunda*. 1) albumin; 2) to 9) globulins (From ARIKAN, 1983).

BIBLIOGRAFÍA

- ANDRADA, J. 1980. *Guía de campo de los anfibios y reptiles de la península ibérica*. Omega. Barcelona.
- ARIKAN, H. 1983. Ege bölgesinde yaşayan *Rana ridibunda* (Anura-Ranidae) populasyonlarının serolojik yonden incelenmesi. *Doga Bil İro Dergisi: Temel Bilm.* 7; 37-45.
- ARVEY, L. 1947. Le dimorphisme sexuel sanguin chez *Rana temporaria* L. et *Bufo vulgaris* Laur. *C.r. Soc. Biol.*, 141: 457-459. (Cit. en HARRIS, 1972.)
- BAGLIONI, C. & SPARKS, C. E. 1963. A study of hemoglobin differentiation in *Rana catesbeiana*. *Dev. Biol.*, 8: 272-285. (Cit. en DUNLAP, 1979.)
- BENBASSAT, J. 1970. Erythroid cell development during natural amphibian metamorphosis. *Dev. Biol.*, 21: 557-583.
- BERTINI, F. & RATHE, G. 1962. Electrophoretic analy-

- sis of the hemoglobin of various species of anurans. *Copeia*, 1962: 181-185.
- BISWAS, H. M., PATRA, P. B. & BORAL, M. C. 1981. Body fluid and hematologic changes in the toad exposed to 48 h. of simulated high altitude. *J. Appl. Physiol.*, 51 (4): 794-797.
- BREFOEEL, P. M., KREUZER, F. & HAZEVOET, M. 1981. Studies of the hemoglobins of the eel (*Anguilla anguilla* L.). II.- Proton binding of a component with a negative Bohr effect. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69A: 225-230.
- BRUNORI, M., ANTONINI, E., WYMAN, J., TENTORI, L., VIVALDI, G. & CARTA, S. 1968. The hemoglobin of amphibia. -VII. Equilibria and kinetics of the reaction of frog hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24: 519-526.
- CHIEFFI, G., SINIZCALO, M. & ADINOLFI, M. 1960. Modificazioni del comportamento elettroforetica dell'emoglobina durante la metamorfosi di *Rana esculenta*. *Atti. Accad. Naz. Lincei R.*, 28: 233-235. (Cit. en DUNLAP, 1979.)
- DUNLAP, D. G. 1979. Hemoglobin phenotypes in the frog *Rana blairi*, their hybrids and a backcross. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B: 167-174.
- FOXON, G. E. H. 1964. Blood and respiration. In: *Physiology of Amphibia* (Moore, J. A. ed.): 151-209. Academic Press, New York.
- GATTEN JR., R. E. & BROOKS, G. R. 1969. Blood physiology of a tropical frog, *Leptodactylus fallax*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 30: 1.019-1.028.
- GAUMER, A. E. & GOODNIGHT, C. J. 1957. Some aspects of the hematology of turtles as related to their activity. *Am. Midl. Nat.*, 58: 332-340. (Cit. en GATTEN & BROOKS, 1969.)
- GILLESPIE, J. H. & CREUSHAW, J. W. 1966. Hemoglobin variation in *Rana pipiens* (Amphibia: Anura). *Copeia*, 1966: 889-893. (Cit. en DUNLAP, 1979.)
- GOIN, C. J. & JACKSON, C. G. 1965. Hemoglobin values of some amphibians and reptiles from Florida. *Herpetologica*, 21: 145-146. (Cit. en GATTEN & BROOKS, 1969.)
- HALL, F. G. 1966. Hemoglobin function in blood of *Bufo marinus*. *J. Cell. Physiol.*, 68: 69-74.
- HARRIS, J. P. 1953. Note on the blood of *Necturus*. *Field and Lab.*, 21: 147-148. (Cit. en HARRIS, 1972.)
- HARRIS, S. A. 1972. Seasonal variation in some hematological characteristics of *Rana pipiens*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 43: 975-989.
- HATTING, J. 1976. Haemoglobin in *Labeo umbratus*; the influence of temperature and oxygen. *S. Afr. J. Med. Sci.*, 38: 37-41. (Cit. en VAN VUREN & HATTING, 1978.)
- HAZARD, E. S. & HUTCHISON, V. H. 1978. Ontogenic changes in erythrocytic organic phosphates in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J. Exp. Zool.*, 206: 109-118.
- 1982. Distribution of acid-soluble phosphates in the erythrocytes of selected species of amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73A: 111-124.
- HEESEN, W. 1924. Über die Zahlenverhältnis der roten and weissen Blutkörper der heinischen Amphibien im Weschel der Jahreszeiten. *Z. vergl. Physiol.*, 1: 500-516. (Cit. en HARRIS, 1972.)
- HOWARD, J. H. & WALLACE, R. L. 1980. Effects of altitude on selected blood parameters in populations of the salamander *Ambystoma macrodactylum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65A: 243-245.
- HUTCHISON, V. H. & SZARSKI, H. 1965. Number of erythrocytes in some amphibians and reptiles. *Copeia*, 1965: 373-375.
- JOKUMSEN, A. & WEBER, R. E. 1980. Hemoglobin oxygen binding properties in the blood of *Xenopus laevis*, with special reference to the influence of aestivation and of temperature and salinity acclimation. *J. Exp. Biol.*, 86: 19-37.
- KALOUSTIAN, K. V. & DULAC, R. W. 1982. Relationships between red blood cell indices and the effects of thyroxine in three species of amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73A: 427-430.
- KAPLAN, H. M. 1952. Variations in white blood cells between normal and red-leg frogs. *Trans. Ill. State Acad. Sci.*, 45: 170-176. (Cit. en HARRIS, 1972.)
- LEFTWICH, F. B. & BURKE, J. D. 1964. Blood oxygen capacity in ranid frogs. *Am. Midl. Nat.*, 72: 241-248. (Cit. en GATTEN & BROOKS, 1969.)
- MIED, R. W. & POWERS, D. A. 1977. Hemoglobins of the killifish *Fundulus heteroclitus*: Separation, characterization and a model for the subunit composition. *J. Biol. Chem.*, 253: 3.521-3.528.
- NOBLE, G. K. 1954. *The biology of the Amphibia*. Dover, New York. (Cit. en HARRIS, 1972.)
- POWERS, D. A. 1980. Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: strategies for adapting to changing environments. *Amer. Zool.*, 20: 139-162.
- SCHERMER, S. 1967. *The blood morphology of laboratory animal*. 3.^a Ed.: 171-187. F. A. Davis, Philadelphia. (Cit. en HARRIS, 1972.)
- SCHOLANDER, P. F. & VAN DAM, L. 1957. The concentration of hemoglobin in some cold water arctic fishes. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 49: 1-4. (Cit. en GATTEN & BROOKS, 1969.)
- SMIT, G. L. & HATTING, G. 1981. The effect of hypoxia on haemoglobins and ATP levels in three freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68A: 519-522.
- STORCH DE GRACIA, J. M. 1975. *Fundamentos de la cromatografía de gases*. 2.^a ed. Alhambra, Madrid.
- STUART, L. C. 1951. The distributional implications of temperature tolerance and hemoglobin values in the toads *Bufo marinus* (Linnaeus) and *Bufo buourti* Brocchi. *Copeia*, 1951: 220-229. (Cit. en GATTEN & BROOKS, 1969.)
- VAN VUREN, J. H. J. & HATTING, J. 1978. Seasonal changes in the hemoglobins of freshwater fish in their natural environment. *Comp. Biochem. Physiol.*, 60: 265-268.
- WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E. L., HILL, R. L. & LEHMAN, J. R. 1978. *Principles of Biochemistry*. 6.^a Ed. McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo.