

# Comparación de la morfometría de los eritrocitos de *Triturus marmoratus* con la de otras especies de anfibios

Luis Docampo\*

HURIEM. Centro de Investigación de Humedales, Ríos y Embalses, Ortuella, Bizkaia, Spain.

\* Correspondence: HURIEM. C/Lasagabaster, 21 derecha, 48530-Ortuella (Bizkaia), Spain. Phone: +34 944255126, E-mail: huricem1@yahoo.es

Recibido: 18 agosto 2014; devuelto para su revisión: 11 noviembre 2014; aceptado: 17 junio 2015.

Como principal objetivo de este trabajo se obtienen los valores morfométricos más importantes de los eritrocitos del tritón jaspeado (*Triturus marmoratus*): longitud de los ejes mayor (dy) y menor (dx), longitud (dn) y anchura (an) del núcleo, y superficies del hematíe (Se) y del núcleo (Sn), además de los valores del hematocrito. Se compara el tamaño de los hematíes de *T. marmoratus* con los de varias especies de anuros y urodelos, para la cual se realiza una comparación interespecífica de la relación entre el número de eritrocitos (N) y el eje mayor o la superficie de la célula, determinándose que *T. marmoratus* tiene unos eritrocitos grandes que lo sitúan dentro del grupo de especies muy ligadas al medio acuático como *Ambystoma maculatum*, *Proteus anguinus*, *Necturus maculosus* o *Cryptobranchus alleganiensis*, entre otras.

**Key words:** eritrocito; hematocrito; respiración; tritón jaspeado.

**Morphometric comparison of the erythrocytes between *Triturus marmoratus* and other amphibian species.** In this work we obtained the main morphometric values of marbled newt (*Triturus marmoratus*) erythrocytes: major axis length (dy), minor axis length (dx), nucleus length (dn), nucleus width (an), nucleus surface (Sn) and erythrocyte surface (Se), as well as hematocrit values. These morphometric values from *T. marmoratus* are compared with those of several species of anurans and urodeles. With this purpose, we conduct an inter-specific comparison of the relationship between the number of erythrocytes (N) and the major axis length or the erythrocyte surface, determining that *T. marmoratus* has large erythrocytes, which place it within the group of species very linked to the aquatic environment like *Ambystoma maculatum*, *Proteus anguinus*, *Necturus maculosus*, or *Cryptobranchus alleganiensis*, among others.

**Key words:** breathing; erythrocyte; hematocrit; marbled newt.

**Comparaison de la morphométrie des érythrocytes de *Triturus marmoratus* avec celle des autres espèces des amphibiens.** Dans cet article, les principales valeurs morphométriques des érythrocytes de triton marbré (*Triturus marmoratus*) sont obtenus: longueurs des axes majeur (dy) et mineur (dx), longueur (dn), largeur (an) et surface (Sn), et surface des érythrocytes (Se). Les valeurs d'hématocrite sont également fournies. Ces valeurs morphométriques de *T. marmoratus* sont comparés avec plusieurs espèces d'anoures et urodèles moyennant la comparaison inter-spécifique de la relation entre le nombre d'érythrocytes et la longueur du axe majeur ou la surface des cellules, déterminant que *T. marmoratus* a des très grandes érythrocytes que le placent parmi le groupe

d'espèces étroitement liées à l'environnement aquatique comme *Ambystoma maculatum*, *Proteus anguinus*, *Necturus maculosus*, ou *Cryptobranchus alleganiensis*, entre autres.

**Key words:** erythrocyte; hématocrite; respiration; triton marbré.

ARIKAN & ÇIÇEK (2014) presentaron una revisión de los principales aspectos hematológicos de anfibios y reptiles, entre ellos la recopilación morfométrica de los eritrocitos de varias especies de anfibios entre las que no se incluía el tritón jaspeado (*Triturus marmoratus*), la especie analizada en este trabajo. Nuestro objeto es tipificar la morfometría de los hematíes de *T. marmoratus* con respecto a una escala ecofisiológica definida por la relación existente entre el número de eritrocitos y el tamaño de los mismos (longitud del eje mayor y/o superficie celular) en varias especies de anfibios, escala que mostraría la influencia del tipo de hábitat utilizado por cada especie en dicha relación de parámetros hematológicos.

EVANS (1939), en un estudio con pleto-dóntidos, estableció una correlación negativa entre el tamaño de los eritrocitos y el nivel de actividad de los mismos expresado en forma de consumo de oxígeno, presentando las especies con los eritrocitos más grandes menores consumos de oxígeno. VERNBERG (1955) determinó en varias especies de urodelos una correlación positiva entre el tamaño de los hematíes y la masa corporal, señalando que dos especies del género *Ambystoma* no se ajustaban a dicha correlación. ARIKAN *et al.* (2003) determinaron entre las especies estudiadas en Turquía que los hematíes de los anuros tenían dimensiones y superficies más pequeñas que los de los urodelos. GÜL *et al.* (2011) indicaron que, en

anuros, los eritrocitos más grandes aparecían en las especies terrestres y con mayor actividad. RUIZ *et al.* (1989) señalaron que estas relaciones entre los hábitos de cada especie y el tamaño de los eritrocitos sería una consecuencia derivada de determinadas condiciones ambientales como la temperatura y la presión atmosférica, mientras que otros autores también han manifestado que se debería a la actividad de las especies asociada a la reproducción, hibernación, depredación, etc. (CAMPBELL, 2004; ALLENDER & FRY, 2008). Entre los trabajos más recientes, GRENAT *et al.* (2009) determinaron que los eritrocitos de individuos diploides de *Odontophrynus americanus* y *Odontophrynus cordobae* tenían longitudes, anchuras y superficies inferiores a los de los tetraploides. Otros trabajos previos también han correlacionado positivamente el tamaño del eritrocito con la poliploidía (KURAMOTO, 1981; GLOMSKY *et al.*, 1997; GREGORY, 2003).

El medio acuático es muy deficitario en oxígeno disuelto respecto de la atmósfera (MARGALEF, 1989; PICARD & FANG, 2002). La evolución nos ha demostrado que los organismos, para compensar dicho déficit, han desarrollado estructuras con grandes superficies de contacto como son las branquias o la piel (GRASSÉ, 1978). Cuando el gradiente o diferencia de concentraciones de cualquier gas entre dos medios es muy grande se necesita superficie (área) para que exista la difusión con el menor gasto energético posible (ley de Fick). Fisiológi-

camente los anfibios utilizan la plasticidad (i.e. respiración intermitente) y la eficiencia energética (BARJA DE QUIROGA, 1993). No es una casualidad que en los anfibios con menor número de eritrocitos, éstos sean los más grandes, es decir, tengan las mayores superficies de contacto (intercambio). Tampoco es una casualidad que las especies más ligadas en su respiración al medio acuático (i.e. predominio de la respiración cutánea y/o branquial) tengan los hematíes más grandes.

En este trabajo se plantea y argumenta, como hipótesis plausible, que la relación inversa existente entre el tamaño de los hematíes y su número radica en el tipo de respiración predominante en las distintas especies y sus poblaciones, y que *T. marmoratus*, por tratarse de una especie muy ligada al medio acuático donde predomina la utilización de la respiración cutánea durante su periodo de reproducción en dicho medio, se situaría en la citada escala entre las especies con eritrocitos grandes.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Los individuos de tritón jaspeado utilizados para la obtención de muestras fueron capturados en 12 charcas y posteriormente devueltos a las mismas, ubicadas en las cuadrículas UTM de 1 x 1 km 30T VN9494 (43°17'55,7"N, 03°04'26,3"O) y 30T VN9591 (43°16'18,5"N, 03°03'41.8"O) (altitud 200-400 m). Dichos individuos se capturaron en febrero de 2001 y se encontraban en período reproductor, puesto de manifiesto en el desarrollo ovárico observado a través de la piel de las hembras en su región ventral, en las libreas nupciales de ambos sexos y en la observación *in situ* de cortejos nupciales.

Las charcas donde se recolectaron los individuos forman parte del complejo de humedales de la zona minera de Bizkaia, integrado por 60 masas de agua, algunas de carácter somero y estacional y otras, correspondientes a antiguas minas de extracción de mineral de hierro (siderita y goethita) a cielo abierto, con superficies de hasta 2 ha y 40 m de profundidad. Estas masas de agua han sido muestreadas periódicamente desde 1985 hasta la actualidad, inventariando su flora y fauna (aves, peces, anfibios, reptiles e invertebrados del bentos y del plancton) y tomando muestras de agua para su análisis físico-químico. Las características físico-químicas y bióticas de estas charcas están descritas en detalle en DOCAMPO (1995) y GOBIERNO VASCO (2002). La vegetación periférica son saucedas con dominio de *Salix atrocinerea* y la vegetación acuática está integrada principalmente por *Cladophora* sp., *Chara fragilis*, *Lemna minor*, *Myriophyllum* sp., *Nasturtium officinale*, *Juncus effusus* y *Typha latifolia*. Las aguas son duras (172-252 mg CaCO<sub>3</sub> / l), ligeramente alcalinas (pH = 7-8,5) y oxigenadas (media ± SD = 8,00 ± 3,67 mg O<sub>2</sub> / l). En primavera y verano la concentración de oxígeno disuelto es muy variable a lo largo del día en función de la fotosíntesis. Especialmente la fotosíntesis de las masas de *Cladophora* y *Chara fragilis* vuelca el sistema carbónico-carbonatos hacia la disminución de la conductividad y el incremento del pH hasta valores de 9 con el consiguiente aumento del oxígeno hasta valores máximos registrados de 13,5-15 mg O<sub>2</sub> / l. Sin embargo, se han observado individuos de *T. marmoratus* realizando la parada nupcial en aguas con una concentración mínima de 2 mg O<sub>2</sub> / l. La

temperatura máxima del agua en verano oscila entre 20°C y 22°C con una media  $\pm$  SD en verano de  $11,6 \pm 4,0^\circ\text{C}$ , y una temperatura mínima registrada en invierno de 5°C, formándose capas de hielo en la superficie de las charcas a pesar de lo cual se han encontrado tritones realizando la parada nupcial en estas condiciones.

En esta zona, *T. marmoratus* ocupa el medio acuático a finales de noviembre, siendo los machos los primeros en colonizarlo. A finales de junio, las charcas temporales comienzan a secarse y los tritones desaparecen de las mismas. En algunos estanques con gran cobertura arbórea en su periferia se han observado tritones durante todo el verano. En verano se han encontrado también individuos aislados en el medio terrestre, bajo piedras, en túneles mineros abandonados y en simas a 10 m de profundidad (afloramientos de lenares).

En estos humedales *T. marmoratus* cohabita con *Lissotriton helveticus*, *Alytes obstetricans*, *Pelophylax perezi*, *Bufo spinosus* e *Hyla molleri*. Como depredadores limnéticos naturales se encuentran *Natrix natrix*, *Natrix maura*, *L. helveticus* y *Gasterosteus gymnurus*, y como depredadores alóctonos *Procambarus clarkii*, *Micropterus salmoides* y *Lepomis gibbosus*, ocasionando estas especies alóctonas la desaparición de las poblaciones de *T. marmoratus*, especialmente en los estanques más profundos y de mayor superficie, con lámina de agua permanente durante todo el año.

Las muestras de sangre se extrajeron de 22 individuos (12 machos y 10 hembras). Para su manipulación, se anestesió a los animales con clorhidrato de xilocaína en dosis de 0,5 ml / individuo mediante punción subcutánea en un flanco del tronco

corporal, comprobando *in situ* que el efecto se alcanzaba entre 5 y 10 minutos después de la administración de la anestesia. Los individuos eran depositados en bateas cuyo fondo estaba revestido por una capa de 2 cm de algodón saturado de agua. La anestesia permitió un tiempo mínimo de manipulación de 2 horas. Todos ellos fueron medidos y pesados con precisiones de mm y mg, respectivamente. Tras la recuperación de la anestesia, los individuos fueron depositados en las orillas de las charcas sobre la hierba. La sangre se extrajo mediante punción cardíaca, en una cantidad de 0,4 ml por cada individuo. La alícuota destinada a la medición del hematocrito fue tratada con heparina de litio para evitar su coagulación, en tanto que la utilizada para la realización de frotis se mantuvo sin anticoagulante y se secó al aire, fijándose posteriormente en metanol durante 5 minutos. La colocación de la gota de sangre en cada portaobjetos se realizó desde la punta de la aguja.

El hematocrito se midió mediante la técnica estándar del microhematocrito, con centrifugación a 6270 xg durante 5 minutos. Los frotis de sangre fueron teñidos por el método de Giemsa y se procesaron mediante microscopía óptica. Trabajando en cámara clara a 1000x y con contraste de fases (Nikon-Ophthiphot), los hematíes se fotografiaron y se dibujaron para tomar sus dimensiones. Se analizaron 22 frotis, uno por cada individuo; en 14 de ellos se midieron tres eritrocitos por frotis y en los ocho restantes solo se midieron dos eritrocitos por frotis. Así se tomaron en total las principales dimensiones de 58 eritrocitos: longitud del eje mayor (dy), longitud del eje menor (dx), an-

chura máxima del núcleo (an), longitud del eje mayor del núcleo (dn), superficie del núcleo (Sn) y superficie celular (Se). Aparte de las medidas morfométricas, se comprobó la presencia de hemoparásitos o de micronúcleos en los eritrocitos, y se estimó la madurez celular a partir de la condensación de la cromatina que se presenta en forma de retículos de color muy intenso en los hematíes inmaduros, siguiendo las indicaciones establecidas por KREMER (2012) para células sanguíneas nucleadas.

Para contrastar la aleatoriedad de la secuencia de las medidas realizadas a los eritrocitos se aplicó la prueba estadística de rachas a los principales valores que definen el tamaño de los mismos (i.e. dy, dx), teniendo en cuenta que no son series cronológicas. Las rachas se obtuvieron tipificando ambos parámetros mediante la mediana de cada serie en categorías nombradas mediante los signos “+” y “-”. Al ser el número de eritrocitos  $N = 58$ , la prueba de rachas sigue una distribución normal reducida de estadístico  $Z = (R - E) / \sigma$ , siendo R el número de rachas observadas, E el número de rachas esperable y  $\sigma$  la desviación típica de las rachas (WALPOLE & MYERS, 1987; BOX *et al.*, 1989; MENDENHALL & SINCICH, 1997; DOCAMPO, 1996). Asimismo, la validación del tamaño muestral de eritrocitos medidos se ha realizado mediante la fórmula  $N = (\sigma Z_{\alpha/2} / H)^2$  aplicada a los valores de dy, siendo Z la distribución normal reducida para  $\alpha = 0,05$ ,  $\sigma$  la desviación estándar y H el intervalo de error de la media que no debe superar el 5% (PEÑA SÁNCHEZ DE RIVERA, 1986; WALPOLE & MYERS, 1987).

Las dimensiones lineales de cada eri-

trocito se midieron con un ocular provisto de retículo micrométrico y los dibujos de cada uno de ellos fueron copiados con el programa informático AutoCAD 2000. Con este programa se midió de forma muy exacta el área de toda la célula y de su núcleo. Asimismo, se determinó la excentricidad ( $\epsilon$ ) de la elipse que representa a cada eritrocito mediante la relación existente entre la semidistancia focal (c) y el semieje mayor de la misma (a), calculándose según la ecuación  $\epsilon = [1 - (b^2 / a^2)]^{0,5}$ , siendo  $a = dy / 2$  y  $b = dx / 2$  (WEISSTEIN, 2009). Así,  $\epsilon$  adquiere valores comprendidos entre 0 (circunferencia) y 1 (línea recta).

La diferencia entre sexos, o entre células maduras e inmaduras, en las diferentes variables analizadas se analizó mediante una t de Student-Fisher para datos no apareados y varianzas no homogéneas, realizándose las regresiones mediante el método de los mínimos cuadrados ordinarios (WALPOLE & MYERS, 1987). Para la prueba de normalidad de las distribuciones se emplearon como estadísticos los coeficientes de asimetría ( $g_1$ ) y de curtosis ( $g_2$ ) estandarizados al valor 0, utilizando los valores de significación tabulados en SNEDECOR & COCHRAN (1980).

Para analizar el crecimiento alométrico de los eritrocitos (alometría ontogenética de GOULD, 1966) se utilizó la ecuación potencial  $Y = k X^m$ , donde Y corresponde a la variable dy y X a la variable dx o a la variable dn. Si  $m = 1$  el crecimiento es isométrico (la forma del hematíe sería una elipse perfecta), un valor de  $m > 1$  indica crecimiento alométrico positivo, y un valor de  $m < 1$  indica crecimiento alométrico negativo, lo que implica en este último caso

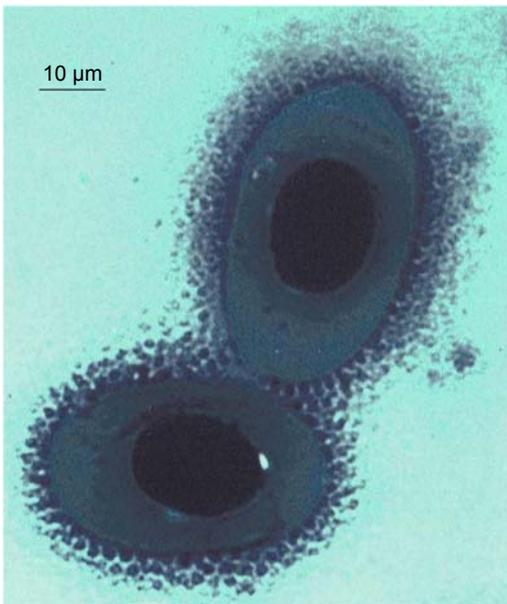
**Tabla 1:** Características morfométricas de los eritrocitos de *Triturus marmoratus*. dy: longitud del eje mayor de la célula, dx: longitud del eje menor de la célula, dn: longitud del eje mayor del núcleo, an: anchura máxima del núcleo, Sn: superficie del núcleo, Se: superficie del eritrocito,  $\epsilon$ : índice de excentricidad del eritrocito,  $\sigma$ : desviación estándar de la media, Mín.: valor mínimo, Máx.: valor máximo, g<sub>1</sub>: coeficiente de asimetría estandarizado al valor 0, g<sub>2</sub>: coeficiente de curtosis estandarizado al valor 0. Los asteriscos (\*) indican distribuciones normales al 95% para una prueba de dos colas.

Variable	Media	$\sigma$	Mín.	Máx.	g <sub>1</sub>	g <sub>2</sub>
dy ( $\mu\text{m}$ )	46,246	6,359	30,830	63,330	-0,069*	-0,119*
dx ( $\mu\text{m}$ )	30,183	4,766	19,160	38,330	-0,154*	-0,397*
dn ( $\mu\text{m}$ )	19,587	3,718	12,500	27,500	0,201*	-0,419*
an ( $\mu\text{m}$ )	16,090	3,423	10,830	23,330	0,768	-0,447*
Sn ( $\mu\text{m}^2$ )	255,634	101,373	120,443	503,892	0,955	0,096*
Se ( $\mu\text{m}^2$ )	1111,526	290,878	463,937	1865,222	0,155*	-0,213*
dn / dy	0,424	0,061	0,310	0,595	0,669*	0,198*
Sn / Se	0,229	0,056	0,128	0,356	0,536*	-0,328*
$\epsilon$	0,745	0,077	0,515	0,856	-0,611*	0,022*

que al incrementarse la longitud del eje mayor del hematíe (dy), el eje menor (dx) crece en menor proporción, mostrando la elipse que representa al eritrocito una mayor excentricidad ( $\epsilon$ ). La divergencia de m

respecto al valor 1 se determina mediante el estadístico t de Student-Fisher, para n - 2 grados de libertad, mediante la fórmula  $t = (1 - m) / \text{ESm}$ , siendo ESm el error estándar de la pendiente m (DOCAMPO & MILAGROSA VEGA, 1991; PÉREZ *et al.*, 2009).

**Figura 1:** Eritrocitos de *Triturus marmoratus* teñidos con Giemsa (100 x).



Por último, se utilizó la citada ecuación potencial  $Y = k X^m$  para comparar el tamaño del eritrocito de *T. marmoratus* con el de otras 38 especies de anfibios (16 urodelos, 21 anuros y un gimnofiónido), para las que se pudo recopilar información en la literatura. Para ello se realizó, por un lado, una representación gráfica de la relación existente entre el número de eritrocitos (N) y la longitud máxima del hematíe (dy), y por otro, entre N y la superficie del hematíe (Se). En dicha representación gráfica se incluyeron por separado los anuros chilenos del estudio de Ruiz *et al.* (1987) que viven a baja altitud (entre 200 y 2700 m) y los de alta altitud (3200-4300 m), donde la concentración de oxígeno atmosférico se reduce en 1/3 respecto de la existente al nivel del mar. También se incluyeron

**Tabla 2:** Contraste de la diferencia entre sexos en los principales factores morfométricos de los eritrocitos de *T. marmoratus*. dy, eje mayor del hematíe. t: estadígrafo de Student-Fisher utilizado para el contraste estadístico. Para el resto de abreviaturas consúltese la Tabla 1. Todas las diferencias entre medias son no significativas con  $P > 0,05$ .

Variable	Sexo	Media	$\sigma$	Mín.	Máx.	g <sub>1</sub>	g <sub>2</sub>	t
dy ( $\mu\text{m}$ )	♀	46,90	5,41	39,16	63,33	0,790	0,732	0,902
	♂	45,25	7,61	30,83	55,83	-0,350	-1,238	
dx ( $\mu\text{m}$ )	♀	29,95	3,90	22,50	38,33	0,295	-0,469	0,422
	♂	30,54	5,93	19,16	38,33	-0,444	-0,748	
dn ( $\mu\text{m}$ )	♀	19,64	3,26	14,16	27,50	0,411	-0,313	0,125
	♂	19,50	4,40	12,50	27,50	0,083	-0,781	
an ( $\mu\text{m}$ )	♀	15,89	3,49	10,83	23,33	0,963	-0,240	0,547
	♂	16,39	3,37	10,83	23,33	0,469	-0,614	
Sn ( $\mu\text{m}^2$ )	♀	252,33	97,68	120,44	503,89	1,142	0,318	0,000
	♂	260,66	108,78	122,72	503,90	0,716	-0,167	
Se ( $\mu\text{m}^2$ )	♀	1111,63	242,48	706,85	1865,22	0,854	1,175	0,297
	♂	1111,36	358,25	463,94	1680,72	-0,193	-1,152	
dn / dy	♀	0,42	0,059	0,310	0,569	0,627	0,179	0,654
	♂	0,43	0,065	0,328	0,595	0,688	0,104	
Sn / Se	♀	0,22	0,058	0,143	0,356	0,827	-0,016	0,744
	♂	0,23	0,053	0,128	0,333	0,042	-0,585	
$\epsilon$	♀	0,76	0,068	0,600	0,856	-0,682	-0,251	1,622
	♂	0,73	0,084	0,515	0,852	-0,462	-0,014	

por separado dos poblaciones de *Cryptobranchus alleganiensis* y otras dos de *Lissotriton vulgaris* para las que se obtuvieron datos. En la relación entre N y dy, la isometría se obtuvo para el valor de  $m = 3$ , mientras que en la relación entre N y Se, la isometría se calculó para  $m = 1,5 = 3/2$  (BEGON *et al.*, 1988; AGUILAR GUTIÉRREZ, 2000). En ambos casos, para comprobar la existencia de isometría se utilizó el estadístico t de Student-Fisher indicado anteriormente.

## RESULTADOS

El valor del hematocrito varió entre el

9% y el 19%, con una media aritmética ( $\pm$  SD) de  $14,6 \pm 3,3\%$  en hembras y  $13,7 \pm 4,0\%$  en machos, no existiendo diferencias entre sexos ( $t = 0,589$ , 20 g.l.,  $P = 0,562$ ). El peso medio ( $\pm$  SD) fue de  $15,6 \pm 3,0$  mg en hembras y  $12,0 \pm 2,2$  mg en machos, y la longitud total hocico-punta de la cola fue de  $150 \pm 10$  mm en hembras y  $133 \pm 7$  mm en machos.

La prueba de rachas determinó tanto para la longitud del eje mayor del eritrocito (mediana =  $47,08 \mu\text{m}$ ,  $E = 30$ ,  $\sigma = 3,77$ ,  $R = 26$ ) como para la del eje menor (mediana =  $30 \mu\text{m}$ ,  $E = 20,55$ ,  $\sigma = 3,756$ ,  $R = 22$ ) un valor del estadístico  $Z = 1,061$ , inferior al

valor crítico de rechazo de la hipótesis nula (dy:  $Z = 1,061$ , 26 g.l.,  $P > 0,05$ ; dx:  $0,386$ , 22 g.l.,  $P > 0,05$ ), lo que significa que la muestra de los 58 eritrocitos medidos fue seleccionada de forma aleatoria o independiente. Por otro lado, la fórmula del tamaño muestral mínimo determinó que  $N = 38,83$ , es decir, como mínimo se requiere medir 39 hematíes en el conjunto de 22 individuos para que la muestra sea estadísticamente significativa, lo que sirve para validar el tamaño de muestra empleado ( $N = 58$ ).

Los eritrocitos maduros presentaron contorno elíptico regular con un núcleo de perímetro aproximadamente circular o redondeado que representa en promedio el 23% de la superficie celular (Tabla 1). El citoplasma es acidófilo, en tanto que el núcleo mostró tinción basófila con elevada densidad de cromatina puesta de manifiesto en la intensa coloración azul del mismo (Fig. 1). En ninguno de los individuos analizados se detectaron hemoparásitos. Igualmente, ningún eritrocito mostró micronúcleos, lo que *a priori* es indicativo de

la ausencia de compuestos genotóxicos en sus hábitats. El análisis de la madurez celular permitió detectar eritrocitos inmaduros, caracterizados por una menor intensidad en su tinción nuclear (color azul violáceo claro y agregados de color intenso), una forma más circular o irregular redondeada y un mayor diámetro del núcleo. La frecuencia de aparición de los eritrocitos inmaduros fue muy baja, inferior al 0,5%, lo que corrobora el estado no patológico de los individuos analizados.

No se encontraron diferencias entre sexos en ninguna de las dimensiones analizadas en los eritrocitos (Tabla 2). Sin embargo, al comparar las células maduras e inmaduras se observaron diferencias en el valor de la excentricidad elíptica ( $\epsilon$ ), longitud (dn), anchura (an) y superficie del núcleo (Sn) y en la longitud del eje menor (dx) (Tabla 3). Las células inmaduras tienen un núcleo de mayor tamaño y una menor elongación que las maduras, lo que les confiere una forma menos elíptica. Los eritrocitos inmaduros se caracterizaron por mostrar una relación (dn / dy) > 0.5

**Tabla 3:** Comparación entre la morfometría de los hematíes maduros (dn /dy ≤ 0,5) e inmaduros (dn / dy > 0,5). Para las definiciones de las abreviaturas consúltese la Tabla 1. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre tipos de células para  $P < 0,05$ .

Variable	Maduros		Inmaduros		t	P
	Media	$\sigma$	Media	$\sigma$		
dy ( $\mu\text{m}$ )	46,323	6,480	45,830	5,996	0,2238	0,8237
dx( $\mu\text{m}$ )	29,401	4,669	34,441	2,634	4,5709	<0,001*
dn ( $\mu\text{m}$ )	18,729	3,190	24,257	2,902	5,1697	<0,001*
an ( $\mu\text{m}$ )	15,287	2,821	20,461	3,204	4,5326	<0,001*
Sn ( $\mu\text{m}^2$ )	230,071	79,071	394,808	99,670	4,6945	<0,001*
Se ( $\mu\text{m}^2$ )	1086,447	295,157	1248,062	235,808	1,8111	0,0753
dn / dy	0,405	0,042	0,531	0,033	10,0558	<0,001*
Sn/Se	0,213	0,405	0,315	0,041	1,7157	0,0917
$\epsilon$	0,765	0,062	0,653	0,074	4,4580	<0,001*

(i.e. mayor proporción de superficie nuclear), en tanto que en los maduros dicha relación es  $< 0.5$  (i.e. mayor superficie relativa del hematíe).

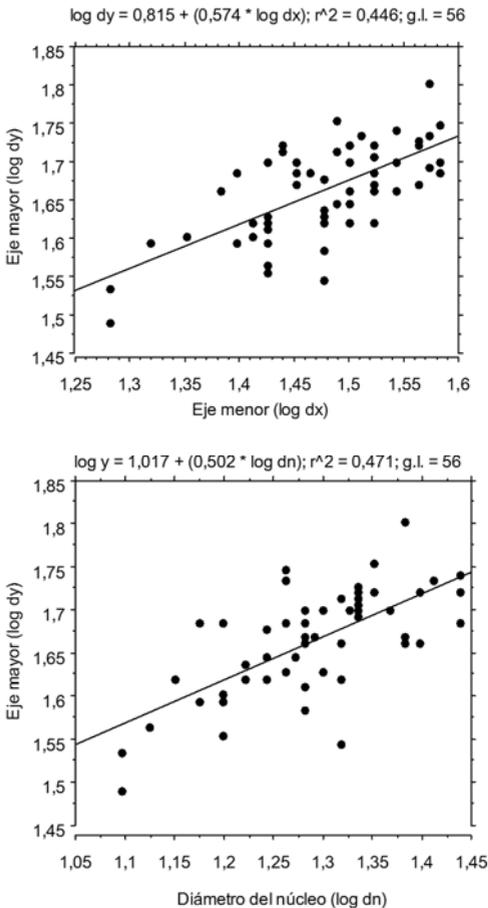
La correlación alométrica existente entre el eje mayor de la célula (dy) y el eje menor (dx) o al diámetro del núcleo (dn) se representa en la Figura 2. En ambos casos se obtuvieron valores de m estadísticamente inferiores a 1 (i.e. alometría negativa; dy-dx:  $t_{56} = 5,011$ ,  $P > 0,001$ ; dy-dn:  $t_{56} =$

$7,014$ ;  $P < 0,001$ ), lo que implica una deformación progresiva de la célula (GOULD, 1966; MARGALEF, 1989) que explicaría en parte la mencionada menor excentricidad de los eritrocitos inmaduros. Sin embargo, tras eliminar los eritrocitos inmaduros de las regresiones entre dy-dx y dy-dn, el coeficiente de determinación de Pearson ( $r^2$ ) en la correlación entre dy y dx se incrementa desde 0,446 hasta 0,543, y en la correlación entre dy y dn el  $r^2$  pasa de 0,471 a 0,644. Por lo tanto, además de la madurez, tienen que existir otros factores que contribuyan a la excentricidad de los eritrocitos.

La recopilación de información acerca del tamaño de los eritrocitos en varias especies de anfibios se muestra en la Tabla 4. El análisis alométrico de las relaciones entre el número de eritrocitos (N) y su tamaño, expresado tanto en función de la longitud del eje mayor (dy) como de la superficie celular (Se), en las diferentes especies de anfibios (Fig. 3) muestra que para la relación N-dy se obtiene un alometría negativa ( $t_{34} = 2,512$ ,  $P = 0,017$ ), mientras que para la regresión entre N y Se la relación es isométrica ( $t_{34} = 0,777$ ,  $P = 0,442$ ). Según la fórmula obtenida en la regresión entre N y dy, el número de eritrocitos que le correspondería a *T. marmoratus* estaría entre 23 200 y 140 126 eritrocitos /  $\text{mm}^3$  (media = 57 000), valor cuya corroboración se encuentra actualmente en estudio.

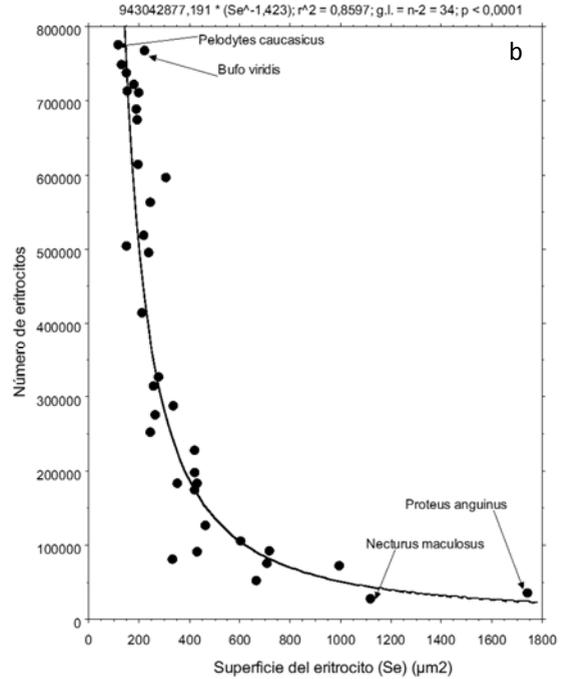
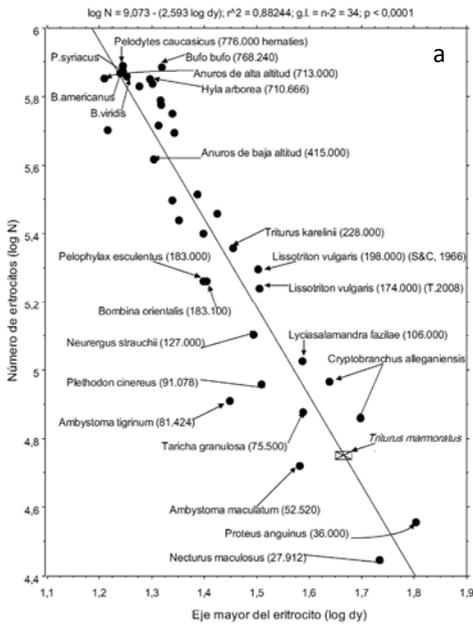
## DISCUSIÓN

Respecto a la morfología del eritrocito de *T. marmoratus*, extensible a la de otros anfibios, desconocemos si se trata de un disco elíptico o de un elipsoide, para lo cual sería preciso conocer la tercera dimensión, obtenible mediante microscopía



**Figura 2:** Relación de la longitud máxima del eritrocito (dy) con respecto a su anchura máxima (dx) y a la longitud máxima del núcleo celular (dn).

$$\text{Intervalo de confianza (95\%)} = \pm 1.194 \left[ 0.0277 + \frac{(\log dy - 1.41)^2}{0.820} \right]^{0.5}$$



**Figura 3:** Regresión entre los valores medios por especie o población del número de eritrocitos y (a) su longitud máxima o (b) su superficie.

electrónica. Mediante el microscopio óptico, el hematíe de *T. marmoratus* se dibuja con forma de elipse de perímetro regular y núcleo redondo, caracterizada por un alto valor de su excentricidad, mayor en la células maduras que en las inmaduras. Las medias aritméticas de la longitud del eje mayor, del eje menor y de la superficie celular son altas en comparación con las de 12 de los 16 urodelos estudiados en este trabajo. Los valores del hematocrito de *T. marmoratus* se encuentran dentro del rango del 10% al 40% observado en varios anfibios (KURAMOTO, 1981).

KAPLAN & SALTHER (1979) establecieron una relación entre el volumen total de la puesta de huevos y el volumen corporal en las hembras de 74 especies de salamandras. BLUEWEISS *et al.* (1978) determinaron

las relaciones entre distintos tipos de variables y taxones, tales como la existente entre la longevidad y el peso corporal en mamíferos, invertebrados, anfibios, reptiles, aves y peces, o entre el número de huevos por puesta y el peso corporal en los reptiles, entre otras. Todas estas relaciones, al igual que la obtenida por nosotros entre el número de eritrocitos y su tamaño son relaciones alométricas o isométricas de tipo filogenético, y están estrechamente ligadas a los ciclos biológicos de las distintas especies o taxones, implicando diferencias fisiológicas que limitan su tamaño y su eficiencia biológica (GOULD, 1966; SCHMIDT-NIELSEN, 1984; BEGON *et al.*, 1988).

En las relaciones isométricas, la transferencia de calor, agua, gases o nutrientes,

**Tabla 4:** Recopilación bibliográfica de los valores medios de la longitud del eje mayor de los hematíes (dy), su superficie (Se) y el número de eritrocitos en distintas especies de anfibios para individuos adultos (valores medios). N: población del río Niangua, W: población del río White (Missouri). Los asteriscos (\*) indican valores estimados a partir de la ecuación de regresión obtenida en la Figura 3.

Orden	Familia	Especie / población	dy ( $\mu\text{m}$ )	Se ( $\mu\text{m}^2$ )	Nº eritr. / $\mu\text{m}^3$	
Caudata	Ambystomatidae	<i>Ambystoma maculatum</i> <sup>1,2</sup>	38.20	666.0	52,5	
		<i>Ambystoma tigrinum</i> <sup>1,2</sup>	28.10	333.2	81,4	
	Amphiumidae	<i>Amphiuma tridactylum</i> <sup>1</sup>	70.00	2.270.5	19,4 (4,8-78,7)*	
	Cryptobranchidae	<i>Cryptobranchus alleganiensis</i> (N) <sup>3</sup>	43.50	717.5	92,7	
		<i>Cryptobranchus alleganiensis</i> (W) <sup>3</sup>	49.80	993.5	72,5	
	Plethodontidae	<i>Plethodon cinereus</i> <sup>1,2</sup>	32.30	431.2	91,1	
	Proteidae	<i>Necturus maculosus</i> <sup>1,2</sup>	54.20	1119.5	27,9	
		<i>Proteus anguinus</i> <sup>2,4</sup>	63.50	1740.5	36,0	
	Salamandridae	<i>Lissotriton vulgaris</i> <sup>5</sup>		31.80	419.4	198,0
				32.00	421.3	174,0
		<i>Neureergus strauchii</i> <sup>1</sup>	31.20	463.8	127,0	
		<i>Ommatotriton vittatus</i> <sup>7</sup>	28.06	367.0	208,0 (129,7-333,8)*	
		<i>Taricha granulosa</i> <sup>2,8,9</sup>	38.75	706.0	75,5	
		<i>Triturus karelinii</i> <sup>10</sup>	29.50	420.4	228,0	
		<i>Triturus marmoratus</i> (este trabajo)	46.24	1111.5	57,0 (23,2-140,1)*	
		<i>Lyciasalamandra fazilae</i> <sup>10</sup>	38.63	603.0	106,0	
		<i>Lyciasalamandra luschani</i> <sup>7</sup>	33.28	507.5	133,7 (75,5-236,6)*	
		<i>Salamandra salamandra</i> <sup>7</sup>	33.10	523.4	135,6 (76,9-238,9)*	
	Sirenidae	<i>Siren lacertina</i> <sup>11</sup>	60.50	1587.0	28,4 (8,4-96,0)*	
	Gymnophiona	Herpeliidae	<i>Boulengerula taitana</i> <sup>12</sup>	22.10	270.8	386,4 (134,4-636,9)*
Anura	Bombinatoridae	<i>Bombina bombina</i> <sup>1,13</sup>	21.80	258.14	340,0	
		<i>Bombina orientalis</i> <sup>1,14</sup>	25.00	428.98	183,1	
	Bufonidae	<i>Anaxyrus americanus</i> <sup>10,15</sup>	17.35	151.26	737,5	
		<i>Bufo bufo</i> <sup>1</sup>	20.85	221.22	768,2	
		<i>Bufoes viridis</i> <sup>13,16</sup>	17.86	179.18	721,7	
		<i>Rhinella fernandezae</i> <sup>17</sup>	16.42	150.79	505,0	
	Hylidae	<i>Rhinella marina</i> <sup>18,19</sup>	18.90	193.00	675,0	
		<i>Hyla arborea</i> <sup>14,20</sup>	19.80	200.33	710,7	
		<i>Hyla japonica</i> <sup>1,21</sup>	20.80	307.63	596,9	
		<i>Hyla versicolor</i> <sup>5,8</sup>	20.70	195.10	615,0	
Pelobatidae	<i>Pelobates syriacus</i> <sup>14,20</sup>	17.56	161.36	748,5		
Pelodytidae	<i>Pelodytes caucasicus</i> <sup>1</sup>	17.56	116.42	776,0		

Tabla 4 (cont.).

Orden	Familia	Especie / población	dy ( $\mu\text{m}$ )	Se ( $\mu\text{m}^2$ )	Nº eritr. / $\mu\text{m}^3$
	Ranidae	<i>Glandirana rugosa</i> <sup>1,21</sup>	26.60	336.36	288,3
		<i>Lithobates catesbeianus</i> <sup>1,21</sup>	25.00	243.47	252,0
		<i>Lithobates clamitans</i> <sup>1,21</sup>	22.50	265.07	275,6
		<i>Lithobates pipiens</i> <sup>1,21</sup>	22.00	239.48	496,0
		<i>Pelophylax esculentus</i> <sup>1,21</sup>	25.40	351.10	183,0
		<i>Pelophylax ridibundus</i> <sup>14,22</sup>	24.36	276.62	326,6
		<i>Rana dalmantina</i> <sup>1,20</sup>	19.99	190.47	689,3
		<i>Rana japonica</i> <sup>1,21</sup>	21.80	244.84	563,6
		<i>Rana macrocnemis</i> <sup>1,23</sup>	20.55	217.68	519,4
	Varías	Anuros de baja altitud <sup>24</sup>	20.10	212.33	415,0
		Anuros de alta altitud <sup>24</sup>	16.20	153.95	713,0

<sup>1</sup>ARIKAN & ÇIÇEK (2014), <sup>2</sup>OLMO & MORESCALCHI (1975), <sup>3</sup>JERRETT & MAYS (1973), <sup>4</sup>GRASSÉ (1978), <sup>5</sup>SZARSKI & CZOPEK (1966), <sup>6</sup>TOSUNOĞLU *et al.* (2008), <sup>7</sup>ATATÜR *et al.* (1998), <sup>8</sup>HUTCHISON & SZARSKI (1965), <sup>9</sup>FRIEDMANN *et al.* (1969), <sup>10</sup>TOK *et al.* (2009), <sup>11</sup>GULLIVER (1875), <sup>12</sup>WOOD *et al.* (1975), <sup>13</sup>WOJTASZEK & ADAMOWICZ (2003), <sup>14</sup>ATATÜR *et al.* (1999), <sup>15</sup>HALL (1966), <sup>16</sup>GÜL & TOK (2009), <sup>17</sup>CABAGNA ZENKLUSEN *et al.* (2011), <sup>18</sup>HARTMAN & LESSLER (1964), <sup>19</sup>KALOUSTIAN & DULAC (1982), <sup>20</sup>GÜL *et al.* (2011), <sup>21</sup>OLMO & MORESCALCHI (1978), <sup>22</sup>ARIKAN (1989), <sup>23</sup>ARSERIM & MERMER (2008), <sup>24</sup>RUIZ *et al.* (1987).

ya sea en el interior de un organismo o entre éste y su ambiente, tiene lugar de tal manera que al variar los factores implicados se produce un cambio de la eficiencia (PETERS, 1983; BEGON *et al.*, 1988). En este sentido, la relación isométrica existente entre el número de eritrocitos (N) y su superficie (Se) (Fig. 3b) implicaría una mayor eficiencia fisiológica en la captación de oxígeno disuelto para las especies con valores altos de la relación Se / N cuyos ciclos biológicos están muy ligados a la respiración en medios hipóxicos. A este respecto, consideramos que el factor limitante del tamaño y número de los eritrocitos en los anfibios es la concentración de oxígeno disuelto. El medio acuático es muy hipóxico respecto al terrestre. En condiciones muy favorables de saturación, a bajas temperaturas (0°C a 5°C) y

máxima presión atmosférica (1 atm), la solubilidad máxima del oxígeno en las aguas oligohalinas se encuentra entre 12,77 y 14,62 mg O<sub>2</sub> / l (APHA-AWWA-WPCF, 1992). La solubilidad del oxígeno disminuye al incrementarse la salinidad y al disminuir la presión atmosférica. La turbulencia en las aguas dulces naturales no añade una mayor concentración significativa de oxígeno disuelto, ya que hay que tener en cuenta la demanda biológica del mismo (WETZEL, 1981, MARGALEF, 1983; GARCÍA DE BIKUÑA & DOCAMPO, 1991). La fotosíntesis de la vegetación acuática sumergida sí tiene la capacidad de elevar la concentración de oxígeno por encima de la que le correspondería al equilibrio con la atmósfera; como se ha señalado en la descripción del área de estudio, los valores máximos de oxígeno

medidos en las aguas habitadas por *T. marmoratus* han sido 13,5 mg / l (121.5% del porcentaje de saturación con la atmósfera) y 15 mg / l (143%).

En el medio terrestre, el oxígeno adquiere valores muy superiores a los del agua, entre 255 mg / l (40°C y 1 atm en aire con una humedad relativa del 90%) y 298.53 mg / l (0°C y 1 atm en aire seco) (STOCKER & SEAGER, 1981; PICARD & FANG, 2002). Esto es, en el agua, el oxígeno apenas alcanza una concentración del 1,5% en peso en tanto que en el aire atmosférico como mínimo llega a ser del 23% (PICARD & FANG, 2002). Para una igual presión parcial del oxígeno ( $pO_2$ ) en ambos medios, la concentración de oxígeno en disolución llega a ser fisiológicamente entre 20 y 40 veces inferior en el medio acuático que en el aire (BARJA DE QUIROGA, 1993). Ni siquiera en los biotopos de alta altitud la concentración de oxígeno llega a ser tan limitante como en el medio acuático. En el caso de los anuros analizados por RUIZ *et al.* (1987) habitando zonas por encima de los 3500 m de altitud (0,5 a 0,6 atm de presión atmosférica), la concentración de oxígeno atmosférico varía entre 100 y 180 mg / l, esto es, de cinco a nueve veces superior a la que se registra en las aguas oligohalinas, incluyendo el efecto de la función clorofílica.

Como hipótesis plausible se plantea que la relación entre el número de eritrocitos y su tamaño en los anfibios está estrechamente relacionada con el tipo de respiración predominante en las distintas especies y en sus poblaciones y, como se ha indicado anteriormente para relaciones similares, este efecto muy probablemente tenga carácter filogenético. La respiración pulmonar implica una captación muy pa-

siva de gases (ley de Fick). Por el contrario, en el medio acuático, el oxígeno no se difunde tan fácilmente como en el aire debido a su menor concentración, lo que origina un menor gradiente entre el medio interno y el agua, y para compensar este déficit de gradiente se precisa incrementar las superficies de intercambio. La hemoglobina puede modificar su estructura para captar una mayor concentración de oxígeno pero tiene un límite de captación en su configuración más afín al oxígeno (MARTÍNEZ *et al.*, 1985) que consideramos que no compensaría el gran déficit de este gas existente en el agua respecto del aire.

BARJA DE QUIROGA (1993) recopila uno de los principios básicos de la respiración en los animales: “el intercambio de gases, tanto en el órgano respiratorio como en los tejidos, en absolutamente todos los animales conocidos, ocurre por difusión pasiva, nunca por transporte activo”. Las especies acuáticas desarrollan aparatos respiratorios que ofrecen una gran superficie de contacto con el agua y una gran densidad de drenaje, como son los casos de las branquias y de la piel. En este mismo sentido deben contemplarse los hematíes de los anfibios. Por un lado, en las especies acuáticas (predominio de la respiración branquial, cutánea y/o bucofaríngea) se observa una mayor densidad de drenaje superficial (capilar) en branquias, piel y/o mucosas gurgutales (GRASSÉ, 1978). Por otro lado, el mayor tamaño de los eritrocitos circulantes en estas especies acuáticas ofrece una mayor superficie de intercambio gaseoso con el medio externo y con los tejidos, condicionando un mayor tamaño de los capilares que en el caso de las especies terrestres con dominio de la respiración

por pulmones. La branquia, la piel y la mucosa bucofaringea llegan a actuar como una membrana muy permeable en el intercambio de gases por su gran vascularización (MOORE, 1964; GRASSÉ, 1978; BARJA DE QUIROGA, 1993).

Las especies de anfibios en las que predomina la respiración branquial y/o cutánea se sitúan en uno de los extremos del gradiente (mayor tamaño y menor número de eritrocitos; extremo inferior derecho de de las rectas de regresión en la Fig. 3), en tanto que en las que domina la pulmonar lo hacen en el extremo opuesto. VERNBERG (1955) cita a *Amphiuma tridactylum* como la especie que tiene los hematíes más grandes de todos los vertebrados ( $70 \times 40 \mu\text{m}$ ), correspondiéndole  $19\,440$  eritrocitos /  $\text{mm}^3$  (intervalo de confianza al 95%:  $4800 - 78\,740$ ). Se trata de una especie muy ligada al medio acuático, aunque suele desplazarse por el medio terrestre entre la vegetación húmeda. Le siguen *Necturus maculosus* y *Proteus anguinus*, ambas especies estrictamente neoténicas con predominio de la respiración branquial. En *N. maculosus* el 61,2% del oxígeno se obtiene a través de la superficie branquial, un 30,4% por la piel y un 8,4% en los pulmones. Si seguimos desplazándonos por el gradiente hacia las especies con más eritrocitos más pequeños, *Ambystoma maculatum* absorbe por la piel el 68,4% del oxígeno y por los pulmones el 31,6%. En *Lithobates pipiens*, la respiración cutánea aporta el 45,8% del oxígeno y la pulmonar el 54,2% (DUELLMAN & TRUEB, 1994). No es casualidad que en la parte de la escala correspondiente a menos eritrocitos más grandes aparezca *Plethodon cinereus*, especie carente de pulmones, con respiración dérmica

ca y a través de epitelios de la cavidad bucofaringea. En la parte alta de la escala del número de hematíes se sitúan principalmente los anuros terrestres como *Pelodytes caucasicus*, *Bufo bufo* e *Hyla arborea*, mientras que en su zona intermedia se ubican especies con predominancia de la respiración pulmonar aunque estén muy ligadas al medio acuático, tales como *Bombina orientalis*, *Lissotriton vulgaris*, *Pelophylax esculentus* o la salamandra *Neurergus strauchii*.

Respecto de *T. marmoratus* podemos afirmar que en los estanques del área de estudio durante la parada nupcial, que se corresponde con las temperaturas más bajas del año, los tritones permanecen sumergidos sin ascender a la superficie durante un mínimo de una hora (datos no publicados), lo que parece indicar que en el intercambio de gases predomina la respiración cutánea. El intercambio de oxígenos en los anfibios ocurre predominantemente por la piel a temperaturas bajas que deprimen su metabolismo, mientras que a altas temperaturas tiene lugar por vía pulmonar (BARJA DE QUIROGA, 1993). De las nueve especies de Salamandridae recopiladas en la Tabla 4, *T. marmoratus* es la que tiene los hematíes más grandes, situándose en el extremo del gradiente correspondiente a las especies con gran actividad subacuática (Fig. 3a). En nuestra área de estudio, la permanencia de *T. marmoratus* en el agua es de siete meses, desde finales de noviembre hasta finales de junio, y algunos individuos se han observado en el agua en agosto y septiembre. Desde el año 1980, cuando se iniciaron las investigaciones con esta especie, hasta la actualidad, no hemos podido corroborar su existencia

en el medio acuático durante el mes de octubre. Sin embargo, en la provincia española de Salamanca se han registrado poblaciones con actividad acuática durante todo el año (DIEGO-RASILLA & ORTIZ-SANTALIESTRA, 2009).

Otro factor que determina el carácter acuático del tritón jaspeado es su régimen alimenticio durante el citado periodo de actividad acuática entre noviembre y finales de junio, constituido casi exclusivamente (99.8%) por organismos que se desarrollan en el medio acuático, de los que el 92% eran ostrácodos (DOCAMPO *et al.*, 1988).

Cuando el oxígeno deja de ser el factor limitante en la distribución biómica de los anfibios, otros parámetros hemocitométricos adquieren relevancia en su adaptación a los distintos hábitats, entre ellos la concentración total de hemoglobina y la hemoglobina corpuscular media. Varios autores han demostrado que estos parámetros adquieren valores mayores en las especies de anuros terrestres con respecto a las semiacuáticas o acuáticas (MARTÍNEZ *et al.* 1985; GÜL *et al.*, 2011), pero también que se correlacionan con la actividad de los individuos (e.g., depredación, búsqueda de pareja) o con la poliploidía. En este contexto, RUIZ *et al.* (1987) observaron que los anuros chilenos en los hábitats de alta altitud, donde existe una necesidad fisiológica de suministrar oxígeno para compensar el déficit ambiental, presentaban una mayor concentración de hemoglobina y un número de hematíes más alto que los que vivían a menor altitud. Son también esperables variaciones poblacionales como las que se muestran en la Fig. 3 para *C. alleganiensis* y *L. vulgaris*, relacionadas con los factores

ambientales indicados anteriormente.

En nuestra línea de investigación, cabe preguntarse dónde se sitúan en la escala definida por el número y tamaño de los eritrocitos las especies que cohabitan con *T. marmoratus* en nuestra área de estudio, así como dónde se sitúan las larvas de todas ellas y sus formas neoténicas. En los casos de *T. marmoratus* y de *L. helveticus*, sería interesante averiguar si los adultos en fase terrestre durante la estivación presentan una morfometría de los eritrocitos distinta a la observada en el medio acuático.

#### Agradecimiento

Para la manipulación de los individuos de *T. marmoratus* utilizados en este trabajo se contó con el permiso del Servicio de Montes, Caza y Pesca de la Excma. Diputación Foral de Bizkaia, organismo que tiene las competencias para la Conservación de la Fauna y Flora de este Territorio Histórico.

#### REFERENCIAS

- AGUILAR GUTIÉRREZ, M. (2000). *Biomecánica: la Física y la Fisiología*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain.
- ALLENDER, M.C. & FRY, M.M. (2008). Amphibian hematology. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice* 11: 463-480.
- APHA-AWWA-WPCF (1992). *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales*. Díaz de Santos, Madrid, Spain.
- ARIKAN, H. (1989). Anadolu'daki *Rana ridibunda* (Anura:Ranidae) populasyonlarının kan hücrelerinin sayısı bakımından incelenmesi. *Doğa. Türk Zooloji Dergisi* 13: 54-59.
- ARIKAN, H. & ÇIÇEK, K. (2014). Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-Western Journal of Zoology* 10: 190-209.
- ARIKAN, H.; ATATÜR, M.K. & TOSUNOĞLU, M. (2003). A study on the blood cells of the

- Caucasus frog, *Pelodytes caucasicus*. *Zoology in the Middle East* 30: 43-47.
- ARSERIM, S.K. & MERMER, A. (2008). Hematology of the Uludağ frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ National Park (Bursa, Turkey). *E. U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 25: 39-46.
- ATATÜR, M.K.; ARIKAN, H. & MERMER, A. (1998). Erythrocyte sizes of some Urodeles from Turkey. *Turkish Journal of Zoology* 22: 89-91.
- ATATÜR, M.K.; ARIKAN, H. & ÇEVİK, I.E. (1999). Erythrocyte sizes of some anurans from Turkey. *Turkish Journal of Zoology* 23: 111-114.
- BARJA DE QUIROGA, G. (1993). *Fisiología Animal y Evolución. Hacia una Visión más Objetiva de los Seres Vivos*. Akal, Fuenlabrada, Spain.
- BEGON, M.; HARPER, J.L. & TOWNSEND, C.R. (1988). *Ecología. Individuos, poblaciones y comunidades*. Omega, Barcelona, Spain.
- BLUEWEISS, L.; FOX, H.; KUDZMA, V.; NAKASHIMA, D.; PETERS, R. & SAMS, S. (1978). Relationships between body size and some life history parameters. *Oecologia* 37: 257-272.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G. & HUNTER, J.S. (1989). *Estadística para Investigadores: Introducción al Diseño de Experimentos, Análisis de Datos y Construcción de Modelos*. Reverté, Barcelona, Spain.
- CABAGNA ZENKLUSEN, M.C.; LAJMANOVICH, R.C.; ATTADAMO, A.M.; PELTZER, P.M.; JUNGES, C.M.; FIORENZA BIANCUCCI, G. & BASSÓ, A. (2011). Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Revista de Biología Tropical* 59: 17-28.
- CAMPBELL, T.W. (2004). Hematology of amphibians, In M.A. Thrall (ed.) *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, pp. 291-297.
- DIEGO-RASILLA, F.J. & ORTIZ-SANTALIESTRA, M.E. (2009). *Naturaleza en Castilla y León. Los Anfibios*. Caja de Burgos, Burgos, Spain.
- DOCAMPO, L. (1995). Descripción y valoración ecológica de las masas de agua de la zona minera de Bizkaia. *Belarra* 12: 95-103.
- DOCAMPO, L. (1996). Ajuste de la integral de la ecuación normal y su aplicabilidad en hidrología y calidad de aguas. *Ingeniería Civil* 103: 83-90.
- DOCAMPO, L. & MILAGROSA VEGA, M. (1991). Determinación de la edad en *Rana perezi* Seoane, 1885. Aplicación al análisis del crecimiento somático de poblaciones. *Doñana, Acta Vertebrata* 18: 21-38.
- DOCAMPO, L.; RICO, E. & DEL CAMPO, C.A. (1988). Investigaciones sobre el tritón jaspeado, *Triturus marmoratus* (Latreille, 1768) en el Norte de España. *Biología Ambiental: Actas del Congreso de Biología Ambiental (II Congreso Mundial Vasco)* 2: 129-136.
- DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. (1994). *Biology of Amphibians*. John Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA.
- EVANS, G. (1939). Factors influencing the oxygen consumption of several species of plethodontid salamanders in aerial and aquatic media. *Ecology* 20: 74-95.
- FRIEDMANN, G.B.; ALGARD, F.T. & MCCURDY, H.M. (1969). Determination of the red blood cell count and haemoglobin content of urodele blood. *The Anatomical Record* 163: 55-57.
- GARCÍA DE BIKUÑA, B. & DOCAMPO, L. (1991). *Limmología de los Ríos de Vizcaya. Teorías, Aplicaciones e Implicaciones Biológicas*. Viceconsejería de Medio Ambiente, Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz, Spain.
- GLOMSKI, C.A.; TAMBURLIN, J.; HARD, R. & CHAINANI, M. (1997). The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The Amphibians. *Histology and Histopathology* 12: 147-170.
- GOBIERNO VASCO (2002). *Caracterización de las Masas de Agua Superficiales de la CAPV*. Departamento de Ordenación del Territorio y Medio Ambiente, Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz, Spain. Disponible en <https://www.euskadi.eus/u81-0003/eu/contenidos/>

- libro/caracterizacion\_masas\_agua/eu\_12298/adjuntos/sintesis.pdf. Consultado el 17/08/2014.
- GOULD, S.J. (1966). Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological Reviews* 41: 587-638.
- GRASSÉ, P.P. (1978). *Vertebrados. Tomo 3. Reproducción, Biología, Evolución y Sistemática (Agnatos, Peces, Anfibios y Reptiles)*. Toray-Masson, Barcelona, Spain.
- GREGORY, T.R. (2003). Variation across amphibian species in the size of the nuclear genome supports a pluralistic, hierarchical approach to the C-value enigma. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 329-339.
- GRENAT, P.; SALAS, N.E. & MARTINO, A.L. (2009). Erythrocyte size as diagnostic character for the identification of live cryptic *Odonotophrynus americanus* and *O. cordobae* (Anura: Cycloramphidae). *Zootaxa* 2049: 67-68.
- GÜL, Ç. & TOK, C.V. (2009). Blood cell counts and sizes of some anurans from Turkey. *Russian Journal Herpetology* 16: 83-88.
- GÜL, Ç.; TOSUNOĞLU, M.; ERDOĞAN, D. & ÖZDAMAR, D. (2011). Changes in the blood composition of some anurans. *Acta Herpetologica* 6: 137-147.
- GULLIVER, G. (1875). Observations on the sizes and shapes of the red corpuscles of the blood of vertebrates, with drawings of them to a uniform scale, and extended and revised tables of measurements. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1875: 474-495.
- HALL, F.G. (1966). Hemoglobin function in the blood of *Bufo marinus*. *Journal of Cellular Physiology* 68: 69-74.
- HARTMAN, F.A. & LESSLER, M.A. (1964). Erythrocyte measurements in fishes, amphibia, and reptiles. *Biology Bulletin* 126: 83-88.
- HUTCHISON, V.H. & SZARSKI, H. (1965). Number of erythrocytes in some amphibians and reptiles. *Copeia* 1965: 373-375.
- JERRETT, D.P. & MAYS, C.E. (1973). Comparative hematology of the Hellbender, *Cryptobranchus alleganiensis* in Missouri. *Copeia* 1973: 331-337.
- KALOUSTIAN, K.V. & DULAC, R.W. (1982). Relationships between red blood cell indices and the effects of thyroxine in three species of amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73A: 427-430.
- KAPLAN, R.H. & SALTRE, S.N. (1979). The allometry of reproduction: an empirical view in salamanders. *The American Naturalist* 113: 671-689.
- KREMER, B.P. (2012). *Manual de Microscopía*. Omega, Barcelona, Spain.
- KURAMOTO, M. (1981). Relationships between number, size and shape of red blood cells in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology* 69A: 771-775.
- MARGALEF, R. (1983). *Limnología*. Omega, Barcelona, Spain.
- MARGALEF, R. (1989). *Ecología, 6ª reimpression*. Omega, Barcelona, Spain.
- MARTÍNEZ, F.J.; MENDIOLA, P. & DE COSTA, J. (1985). Parámetros hematológicos de *Rana perezi* (Amphibia: Salientia). *Anales de Biología* 5: 73-78.
- MENDENHALL, W. & SINCICH, T. (1997). *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias, 4ª Edición*. Prentice-Hall Hispanoamericana, México D.F., México.
- MOORE, J.A. (1964). *Physiology of the Amphibia*. Academic Press, New York, NY, USA.
- OLMO, E & MORESCALCHI, A. (1975). Evolution of the genome and cell sizes in salamanders. *Experientia* 31: 804-806.
- OLMO, E. & MORESCALCHI, A. (1978). Genome and cell sizes in frogs: a comparison with salamanders. *Experientia* 34: 44-46.
- PEÑA SÁNCHEZ DE RIVERA, D. (1986). *Estadística. Modelos y Métodos. 1. Fundamentos*. Alianza Editorial, Madrid, Spain.
- PÉREZ ZABALLOS, J.; DÍAZ, J.A & GARCÍA MORENO, A. (2009). Modelos adaptativos en zoología (manual de prácticas). 2. Tamaño, forma y alometría. *Reduca (Biología) Serie Zoología* 2: 20-30.
- PETERS, R.H. (1983). *The Ecological Implications of Body Size*. Cambridge University Press, Cam-

- bridge, UK.
- PICARD, A. & FANG, H. (2002). Three methods of determining the density of moist air during mass comparisons. *Metrologia* 39: 31-40.
- RUIZ, G.; ROSENMAN, M. & VELOSO, A. (1987). Valores hematológicos y distribución altitudinal de anfibios chilenos. *Archivos de Biología y Medicina Experimental* 20: 79-84.
- RUIZ, G.; ROSENMAN, M. & VELOSO, A. (1989). Altitudinal distribution and blood values in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Comparative Biochemistry and Physiology* 94A: 643-646.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. (1984). *Scaling. Why is Animal Size so Important?* Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. (1980). *Métodos Estadísticos, 7ª Impresión*. Ed. Compañía Editorial Continental, México D.F., México.
- STOCKER, H.S. & SEAGER, S.L. (1981). *Química Ambiental. Contaminación del Aire y del Agua*. Blume, Barcelona, Spain.
- SZARSKI, H. & CZOPEK, G. (1966). Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Sciences* 14: 433-437.
- TOK, C.V.; TOSUNOĞLU, M.; AYAZ, D.; ÇIÇEK, K. & GÜL, Ç. (2009). Hematology of the Lycian salamander, *Lyciasalamandra fazilae*. *North-Western Journal of Zoology* 5: 321-329.
- TOSUNOĞLU, M.; TOK, C.V.; GÜL, Ç. & GÜLDALI, G. (2008). The blood cells of West Anatolian *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758). *Herpetozoa* 21: 87-91.
- VERBERG, F.J. (1955). Hematological studies on salamanders in relation to their ecology. *Herpetologica* 11: 129-133.
- WALPOLE, R.E. & MYERS, R.H. (1999). *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*. Prentice-Hall Hispanoamericana, México D.F., México.
- WEISSTEIN, E.W. (2009). *CRC Encyclopedia of Mathematics, Third Edition*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- WETZEL, R.G. (1981). *Limnología*. Omega, Barcelona, Spain.
- WOJTASZEK, J. & ADAMOWICZ, A. (2003). Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina orientalis* L. *Comparative Clinical Pathology* 12: 129-134.
- WOOD, S.C.; WEBER, R.E.; MALOY, G.M.O. & JOHANSEN, K. (1975). Oxygen uptake and blood respiratory properties of the caecilian *Boulengerula taitanus*. *Respiration Physiology* 24: 355-363.