

## ADAPTACIONES SANGUINEAS A BAJAS CONCENTRACIONES DE OXIGENO EN EL PEZ, *Batrachoides manglae*

OLIVIA FIGUERA & JULIO E. PÉREZ

*Instituto Oceanográfico, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela*

**RESUMEN.** *Batrachoides manglae* Cervigón, es un tipo de pez sapo de hábitos bentónicos, que puede permanecer fuera del agua por aproximadamente 12 horas. Con el fin de conocer los posibles mecanismos de adaptación sanguínea desarrollados por esta especie, se sometieron ejemplares a diferentes condiciones ambientales: un grupo permaneció en aguas aireadas, otro en aguas sin airear, un tercer grupo se mantuvo fuera del agua sobre arena húmeda. Algunos especímenes fueron sacrificados en su hábitaculo natural. En todos los especímenes se determinaron: el número de eritrocitos, el hematocrito, la concentración de la hemoglobina, y se calcularon: el volumen corpuscular medio, la hemoglobina corpuscular media, la concentración de la hemoglobina corpuscular media, el pH sanguíneo, la presión osmótica, la afinidad por el oxígeno de la sangre a 20 y 30° C. el efecto Root y el fenotipo electroforético de las hemoglobinas. Los resultados obtenidos señalan que los cambios más significativos ocurrieron en el grupo de peces mantenidos fuera del agua. Estos especímenes mostraron una disminución en el pH y en la afinidad por oxígeno y un aumento en el hematocrito, en la concentración de la hemoglobina y en la presión osmótica. En los otros dos grupos en cautiverio la afinidad por el oxígeno aumentó. El análisis electroforético reveló hemoglobinas múltiples en todos los especímenes.

**ABSTRACT:** The benthonic fish *Batrachoides manglae* Cervigón can survive out of water for approximately 12 hours. In order to understand the possible mechanism in blood adaptation of this species to different environmental conditions, specimens were maintained in the following laboratory environments: well aerated water (control group), water without oxygen, and air over wet sand. Other specimens were sacrificed in their natural habitat. In all specimens, the following determinations were made: number of red blood cells, hematocrit, hemoglobin concentration, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, blood pH, osmotic pressure, oxygen affinity of the blood at 20 and 30°C, Root effect and the electrophoretic phenotypes of the hemoglobins. The most significant changes were observed in the group maintained out of water. These specimens showed a decrease in pH, a decrease in oxygen affinity, and an increase in hematocrit, hemoglobin concentration and osmotic pressure. The other two captive groups showed an increase in oxygen affinity. All specimens had multiple hemoglobins, as revealed by electrophoretic analysis.

### INTRODUCCION

En la evolución de la respiración aérea, desarrollada por un buen número de especies de peces, se destacan dos tipos fundamentales, uno caracterizado por el desarrollo de un compartimiento hueco ricamente vascularizado, que puede ser el estómago, como en las especies de guara-guara *Plecostomus watawa* y *P. plecostomus*; o el intestino, como en los curitos o buscos *Hoplosternum littorale*, *H. thoracatum*, *H. oronocoi*; o cavidades branquiales, operculares o faríngeas como en *Symbranchus marmoratus*, *Anguilla anguilla*, *Hypopomus brevirostris* y *Pseudapocryptes lan-*

*ceolatus*. El otro tipo está basado en una rica vascularización de la piel, como en *Electrophorus electricus* que ha desarrollado pliegue y papilas muy vascularizadas en el epitelio bucal, mientras que en los "peces-sapo" de la familia *Batrachoididae*, como *Batrachoides manglae*, la piel ricamente irrigada se presenta en el tronco y en la cola del pez (GRIMALDI, *com.pers.*).

Además de evolucionar hacia la respiración aérea, los peces pueden presentar otras estrategias para enfrentar los cambios en la concentración de oxígeno en

el medio, pueden reducir los requerimientos energéticos, haciéndose muy inactivos y recurriendo principalmente al metabolismo anaeróbico, o pueden modificar su fisiología sanguínea.

*Batrachoides manglae*, conocido comúnmente como "sapo cotuero", pertenece a la familia Batrachoididae. Es un pez de hábitos bentónicos, que se encuentra entre las rocas, en las orillas de las playas. Esta especie fue descrita por CERVIGON (1964), quien la señaló solo para la Isla de Margarita. Sin embargo, se ha encontrado también en las costas de Cumaná y playas cercanas. Es un pez que ocasionalmente queda expuesto al aire en pequeñas charcas, y que puede permanecer vivo fuera del agua por aproximadamente 12 horas. *B. manglae* además de desarrollar la respiración aérea, puede recurrir al metabolismo anaeróbico, para el cual tiene un gran potencial (NUSETTI, *com. pers.*); y se supone que podría modificar algunos parámetros sanguíneos al ser expuestos al aire. Es la finalidad de este trabajo al estudiar esas posibles modificaciones.

#### MATERIALES Y METODOS

Los peces fueron colectados a mano, en las playas cercanas a Cumaná, Edo. Sucre, Venezuela, durante 1981 y 1982.

En el laboratorio después de un período de aclimatación de 72 horas se les dividió en tres grupos experimentales: el grupo control (a) se colocó en acuarios con aire burbujeando (6.0 a 8.0 ppm), el grupo hipóxico (b) fue mantenido en acuarios sin aireación (1.4-1.6 pp.) y un tercer grupo se mantuvo fuera del agua, sobre arena húmeda (c). Los peces de los tres grupos fueron sangrados al final del período experimental, de 24 horas para los grupos a y b y 12 horas para el grupo c. Un cuarto grupo, denominado natural (d), fue sangrado en el lugar de la captura.

La sangre se obtuvo por punción directa de la arteria caudal y fue empleada para determinar: el número de glóbulos rojos, el hematocrito, la concentración de la hemoglobina, el pH, los valores de  $p_{50}$  a diferentes temperaturas, el efecto Root, la presión osmótica y el fenotipo electroforético de la hemoglobina.

La metodología para determinar estos parámetros, las relaciones: volumen, hemoglobina y concentración de la hemoglobina corpuscular media, y las

condiciones de la electroforesis han sido previamente descritas (PÉREZ, 1979; 1980).

La presión osmótica se midió en muestras de 0.2 ml. de suero en un osmómetro Osmette, de Precisión System Inc.

Para analizar las diferencias presentadas en los diversos parámetros sanguíneos, entre los grupos estudiados, se aplicó el análisis de varianza (SOKAL y ROHLF, 1969) previa homogenización de las varianzas, y la comparación múltiple de medias (prueba a posteriori) de DUNCAN. Para analizar el  $P_{50}$  se utilizó un análisis de varianza doble.

Los ejemplares seleccionados para los diferentes grupos fueron similares en tamaño y peso.

#### RESULTADOS

El número de ejemplares estudiados fue variable para cada grupo y para los parámetros analizados. La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos para los cuatro grupos.

El mayor promedio de glóbulos rojos ( $0.73 \times 10^6$ ) se obtuvo en el grupo de peces mantenidos fuera del agua (c). En el otro extremo se encontraron los grupos hipóxico (b) y sangrados en el lugar de captura (d) ( $0.58 \times 10^6$ ). Los peces controles (a) presentaron un valor intermedio ( $0.64 \times 10^6/\text{mm}^3$ ). Sin embargo, al comparar los cuatro grupos no se encontraron diferencias significativas.

En el caso del hematocrito, se observó el promedio máximo en el grupo c (30, 38%), el cual difiere significativamente de los otros tres.

En cuanto a la concentración de la hemoglobina, se obtuvieron valores promedios de 5,10; 5,17 y 5,35 g/100 ml para los grupos d, a y b, respectivamente. Estos tres grupos forman un bloque de medias que no difieren significativamente. En el grupo mantenido fuera del agua (c), el promedio fue de 6,43 g/100 ml. Este fue el valor máximo con la menor desviación de los datos y formó un grupo aparte, significativamente diferente a los otros.

Para el volumen corpuscular medio no se hallaron diferencias significativas entre los grupos estudiados (Tabla 1), el mayor promedio se encontró en los

TABLA I. NUMERO DE GLOBULOS ROJOS (Nº g.r.), HEMATOCRITO (Hct) CONCENTRACION DE LA HEMOGLOBINA (Hb), VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (VCM), HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (HCM), CONCENTRACION DE LA HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA, (CHCM), pH, PRESION OSMOTICA (P. Osm), AFINIDAD DE LA SANGRE POR EL OXIGENO (P<sub>50</sub>) Y EFECTO ROOT, EN EJEMPLARES DE *Batrachoides manglae* SOMETIDOS A DIFERENTES CONDICIONES DE RESPIRACION. SE SEÑALA: LA MEDIA ± LA DESVIACION TIPICA, EL TAMAÑO DE LA MUESTRA Y EL VALOR DE RELACION ENTRE LAS VARIANZAS (Fs). LOS ASTERISCOS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS: \* 0,05 > P < 0,01 \*\* 0,01 > P < 0,01 y \*\*\* P < 0,001.

	CONTROL (a)	HIPOXICO (b)	FUERA DEL AGUA (c)	NATURAL (d)	Fs
Nº g.r. (×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	0,64 ± 0,22 22	0,58 ± 0,13 13	0,73 ± 0,21 15	0,58 ± 0,12 16	2,44
Htc. (%)	26,44 ± 5,90 27	25,21 ± 5,90 14	30,38 ± 5,62 13	23,94 ± 3,49 16	3,80 •
Hb (g/100 ml)	5,17 ± 1,17 23	5,35 ± 1,20 12	6,43 ± 0,55 10	5,10 ± 1,11 16	3,76 •
V.C.M. (μ <sup>3</sup> )	430,68 ± 81,90 18	425,16 ± 89,21 10	445,36 ± 90,27 9	427,76 ± 81,32 16	0,41
H.C.M. (pg)	79,32 ± 17,64 17	95,51 ± 19,24 12	85,06 ± 17,98 11	94,38 ± 15,79 16	2,83 •
C.H.C.M. (%)	19,50 ± 3,29 22	23,72 ± 3,10 12	22,11 ± 2,12 9	22,41 ± 3,65 16	5,27 •
pH	7,35 ± 0,14 18	7,29 ± 0,10 10	7,02 ± 0,17 15	7,28 ± 0,06 9	19,32 ***
P. Osm. (m Osm/L)	338,25 ± 40,83 4	354,66 ± 33,72 3	460,60 ± 51,97 5	333,50 ± 28,76 4	9,73 **
P <sub>50</sub> a 20°C (mm Hg)	11,23 ± 1,37 3	10,67 ± 0,58 3	17,17 ± 0,58 3	12,23 ± 1,04 3	14,94 ***
P <sub>50</sub> a 30°C (mm Hg)	13,33 ± 1,26 3	16,33 ± 1,53 3	18,00 ± 1,00 3	17,00 ± 0,87 3	8,54 •
Efecto Root (mm Hg)	23,42 ± 7,00 6	26,60 ± 4,78 5	20,20 ± 2,31 3	21,70 ± 2,41 4	2,30

ejemplares fuera del agua (c) 445,36 μ<sup>3</sup>, que constituyen el grupo con mayor desviación de los datos. El promedio menor se encontró en el grupo hipóxico (b).

En el caso de la hemoglobina corpuscular media, los más altos valores se hallaron en los grupos natural (d) e hipóxico (b) y los más bajos en el grupo control (a). Hubo diferencias significativas entre este último grupo y los dos primeros (Tabla 1).

Para la concentración de la hemoglobina corpuscular media, el promedio más bajo se halló en el grupo control, que se diferenció significativamente de los grupos natural e hipóxico.

En los peces mantenidos fuera del agua, el valor del pH fue el más bajo (7.02), este grupo diferió significativamente de los otros tres, que presentaron valores similares (Tabla 1).

En la Tabla 1 se puede observar que los valores de la presión osmótica, son similares en tres grupos, solamente fue diferente el mantenido fuera del agua, en el que alcanzó un promedio de 460,60 mOsm/l.

En relación a la afinidad de la sangre por el oxígeno, los valores de los P<sub>50</sub> a 20 °C, señalan una gran similitud entre los grupos natural, control e hipóxico, el grupo "fuera del agua" presentó un P mayor; el valor de Fs entre los 4 grupos fue no significativo, pero el análisis de varianza doble, señaló que este último grupo difiere significativamente de los otros.- A 30° todos los grupos disminuyeron su afinidad, siendo esta disminución mayor en los grupos b y d.

Para el efecto Root los valores encontrados fueron similares en los cuatro grupos, las diferencias entre el grupo hipóxico (máximo efecto Root) y los peces mantenidos fuera del agua (mínimo efecto

Root) no fueron significativas (Tabla 1).

El análisis electroforético de la hemoglobina de *B. manglae* (Fig. 1) determinó que la especie posee hemoglobinas múltiples.

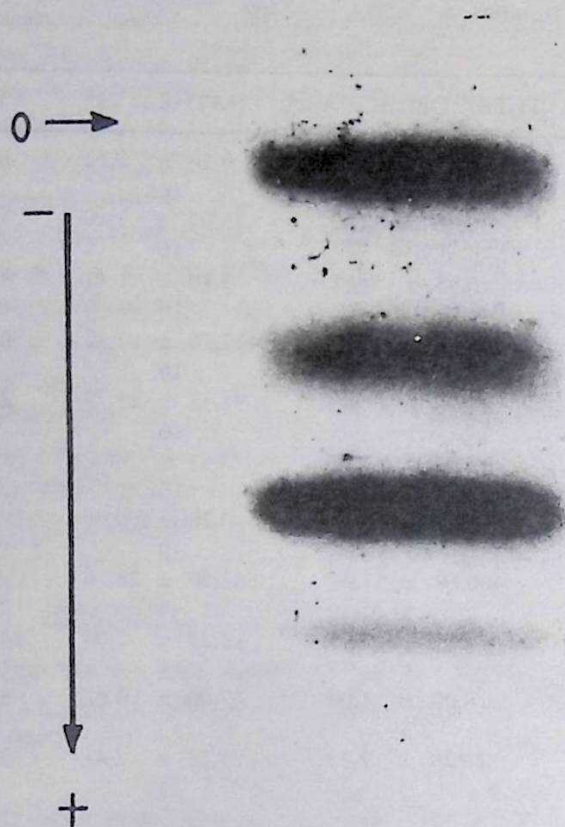


Fig. 1. Fenotipo electroforético de las hemoglobinas de *B. manglae*. Se señala el origen (O), el cátodo (-), el ánodo (+) y la dirección de migración.

## DISCUSION

En los peces, una primera respuesta a los cambios en la disponibilidad del oxígeno en el medio, es la modificación en los niveles de la hemoglobina circulante. Esto puede ocurrir por un aumento en el número, o en la concentración de la hemoglobina de cada eritrocito. Así por ejemplo, KIRK (1974), al someter a hipoxia a ejemplares de la especie *Ictalurus punctatus* halló un incremento del hematocrito, indicativo de un aumento del número de glóbulos rojo. En carpas *Cyprinus carpio*, sometidas a condiciones hipóxicas, SMIT & HATTING (1978), encontraron que el hematocrito

aumentó de 25,5 a 28,7% y que la concentración de la hemoglobina se elevó de 6,4 a 7,0 g/100 ml de sangre. También PÉREZ (1979) encontró que el número de eritrocitos aumentó al impedir la respiración aérea, a ejemplares del pez Siluriforme, *Hoplosternum littorale* (condición hipóxica).

En *Batrachoides manglae*, el número de glóbulos rojos sufrió un incremento (no significativo) en el grupo de peces mantenidos fuera del agua con respecto a los otros grupos estudiados (Tabla 1), esto aparentemente se debió a una pérdida de líquido del organismo (en este grupo aumentó la presión osmótica) más que a una mayor producción (o liberación) de células en los órganos eritropoyéticos (o de almacenamiento). En este grupo se observó además, un incremento significativo del hematocrito y de la concentración de hemoglobina (Tabla 1) en relación al grupo control. El no existir diferencias significativas en el VCM, en el HCM, en el CHCM, ni en el N<sup>o</sup> g.r., es indicativo de que el incremento de la hemoglobina, y del hematocrito, se debe principalmente a una pérdida de líquido. Este criterio se vio confirmado al observar los resultados de la presión osmótica: 338,25 en los peces controles, 460,60 ml mOsm/l en los peces fuera del agua.

Resultados similares en que un aumento en el número de glóbulos rojos, hematocrito y concentración de la hemoglobina, han sido provocadas por una pérdida de líquido reflejada en un aumento de la presión osmótica, han sido encontrados por DELANEY *et al* (1976) en peces pulmonados, *Protopterus aethiopicus*; en siluriformes, *Hoplosternum littorale* (PÉREZ, 1980); y MARUSIC *et. al.* (1981) en el "pejesapo" *Sicyases sanguineus*.

Los valores del pH de los peces de los grupos a, b y d no mostraron diferencias significativas (Tabla 1), esto parece indicar una perfecta adaptación al medio hipóxico. En el grupo mantenido fuera del agua, el pH bajó significativamente. Este descenso, que posiblemente determinó la baja afinidad de la sangre por el oxígeno, sumado a la pérdida del líquido que determina otros cambios, señala que en esta especie la respiración aérea no es importante. Así, al estar el pez fuera del agua se encontraría en una situación de hipoxia aguda, determinando esto, un aumento de la anaerobiosis con el consecuente aumento del ácido láctico y descenso del pH, descenso que puede ser

mayor por la dificultad de eliminación del  $\text{CO}_2$ . Experiencias previas han determinado que en esta especie, la enzima lactato deshidrogenasa, importante modulador del metabolismo anaeróbico, posee una alta actividad catalítica (COA & NUSSETTI, *com. pers.*). En condiciones anaeróbicas, el ácido láctico es el producto final de la secuencia glucolítica, el cual difunde a través de la membrana plasmática de la célula hacia el entorno, como producto de desecho.

Esta misma causa posiblemente determinó la disminución del pH en condiciones hipóxicas en la carpa *Cyprinus carpio*, (SMIT & HATTING, 1978); en *Orthodon microlepidotus* (CECH *et al.* 1979), en *Hoplosternum littorale*, (PÉREZ, 1980). Por su parte SOIVIO *et al.* (1980) encontraron en *Salmo gairdneri* que el pH de la sangre decreció significativamente al someterlos a una hora de hipoxia, pero suponen que la causa fue la liberación de pequeñas cadenas de ácidos grasos en la sangre, al iniciarse la anaerobiosis.

Otra adaptación importante en los organismos acuáticos ante la hipoxia, es modificar la afinidad de la sangre por el oxígeno. Como se puede apreciar en la Tabla 1, la afinidad (reflejada en los valores del  $P_{50}$ , la presión de oxígeno necesaria para saturar el 50% de la hemoglobina) sufre alteraciones. En el sapo cotuero, no se encontraron diferencias significativas en los valores de  $P_{50}$ , a 20 °C, entre los grupos a, b y d. El grupo c, se manifestó significativamente diferente a los otros. Este grupo que debemos también calificar de "hipoxia aguda" presentó una muy baja afinidad por el oxígeno, debido posiblemente al descenso en el pH. Esto pudiera indicar, que el pez cede con facilidad el escaso oxígeno que pasa a través de la piel, a los tejidos

aeróbicos. A 30 °C, la situación cambia, hay un apreciable aumento en los valores de  $P_{50}$  de los grupos a, b y d (disminución de la afinidad), lo que determinó valores similares en los cuatro grupos. En *B. manglae*, el efecto de la temperatura fue similar en los cuatro grupos: a mayor temperatura disminuyó la afinidad, siendo este efecto más notorio en los grupos a, b y d. A altas temperaturas se les presenta a los peces un doble problema: la disminución de la afinidad por el oxígeno y la menor solubilidad del  $\text{O}_2$  en el agua. Para contrarrestar estas dificultades, la mayoría de las especies han evolucionado hacia la adquisición de hemoglobinas múltiples con propiedades ligeramente diferentes (PÉREZ, 1975). Así, al subir la temperatura, la (s) hemoglobina (s) no afectadas en su afinidad por la temperatura, será (n) la (s) más importante (s). El análisis electroforético de la hemoglobina de *B. manglae*, reveló que posee hemoglobinas múltiples, pudiendo presentar un mecanismo como el señalado. Los peces poseen una mayor sensibilidad al pH y al  $\text{CO}_2$  que la de los mamíferos. Al disminuir el pH o al aumentar la presión del  $\text{CO}_2$ , la afinidad de la hemoglobina por el  $\text{O}_2$  disminuye tanto, que la hemoglobina no alcanza la saturación aun cuando la presión del  $\text{O}_2$  aumente muy por encima de los valores fisiológicos, este es el llamado "efecto Root", que fue similar en todos los grupos estudiados.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a CONICIT (Proyecto SI-667) y al Consejo de Investigaciones de la Universidad de Oriente (Proyecto 186). Nuestra gratitud al Dr. OSMAR NUSSETTI por la revisión crítica, del manuscrito.

#### REFERENCIAS

- CECH, J.J., S.J. MITCHELL & M.J. MASSINGILL. 1979. Respiratory adaptations of sacramento blackfish, *Orthodon microlepidotus* (Ayers), for hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 63: 411-415.
- CERVIGÓN, F. 1964. *Batrachoides manglae*, nov. sp. Una nueva especie de *Batrachoididae* en las costas de Venezuela. *Contr. N° 17 Est. Inv. Mar. Margarita*, 1-4.
- DELANEY, R.G., G. SHUB & A.P. FISHMAN. 1976. Hematologic observations on the aquatic and estivating African lungfish, *Protopterus aethiopicus*. *Copeia* 3: 423-434.
- KIRK, W.L. 1974. The effects of hypoxia on certain blood and tissue electrolytes of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) *Trans. Am. Fish. Soc.* 103 (3): 593-600.

- MARUSIC, E.T., F. BALBONTIN, S.M. GALLI-GALLARD, M. GARRATON, P.K.T. PANG & R.W. GRIFFITH. 1981. Osmotic adaptations of the Chilean Clingfish, *Sicyases sanguineus* during emersion. *Comp. Biochem. Physiol.* 68 A: 123-126.
- PEREZ, J.E. 1975. Hemoglobinas múltiples en peces. *Lagema* 35-36: 3-7.
- . 1979. Respiración aérea y acuática en peces de la especie *Hoplosternum littorale*. I. Parámetros sanguíneos. *Acta Cient. Venezolana*. 30: 314-317.
- . 1980. Respiración aérea y acuática en peces de la especie *Hoplosternum littorale*. II. Afinidad de sus hemoglobinas por el oxígeno. *Ibid.* 31: 449-455.
- SMIT, G.L. & J. HATTING. 1978. The effect of respiratory stress on carp haemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol.* 59 A: 369-374.
- SOIVIO, A., M. NIKINMA & K. WESTMAN. 1980. The blood oxygen binding properties of hypoxic *Salmo gairdneri*. *J. Comp. Physiol.* 136: 83-87.
- SOKAL, R. & F.J. ROHLF. 1969. *Biometry* (W.H. FREEMAN & Co) San Francisco USA. p. 776.

(Manuscrito recibido el 16 de febrero de 1984.)