

JOSE M. CEI y FRANCISCO BERTINI

BIBLIOTECA
JORGE D. WILLI

COLECCION HERPETOLOGICA
Y BIBLIOTECA
Dr. José Miguel Ceí

PROTEINAS SÉRICAS DE BUFO SPINULOSUS: ESTUDIO
ELECTROFORETICO Y VARIACION GEOGRAFICA

DE ARCH. DE BIOQ., QUÍM. Y FARM.-TUCUMÁN — TOMO X - Nº 1
(Págs. 2-14)

TUCUMAN
(REPÚBLICA ARGENTINA)

1 9 6 2

PROTEINAS SERICAS DE BUFO SPINULOSUS: ESTUDIO ELECTROFORETICO Y VARIACION GEOGRAFICA

Por JOSE M. CEI y FRANCISCO BERTINI

SUMMARY

Serum proteins of *Bufo spinulosus*: electrophoretic study and geographic variation. — Sera of some representative populations of *Bufo spinulosus* from Chile and Argentine show a remarkable homogeneity in their electrophoretic patterns. That is in accord with real systematic value of this very adaptative and polymorphic toad, in its wide Andean distribution. An albumin like and some globulinic fractions of different electrophoretic mobility were demonstrated, but the first two globulinic fractions appear to unite in the stripes in a single and streaked big spot, both in the high cordilleran populations (Antofagasta) and in the isolated populations from the rare streams of the Atacama desert. On the other side the fastest globulinic fractions are clearly distinguishible in the samples from the central Chile populations. The lowest albumin like fraction was indicated for the specialized chilean population from Huasco River, in the Atacama Desert. Such a small albumin percent may be perhaps correlated with some peculiar adaptative trend of these toads, limited to a continous, uniform life, under the stones, in the isolated streams of the quite azoic Atacamean Desert.

Bufo spinulosus Wiegmann ha sido objeto de numerosas observaciones, aún recientes, en su extensa área de distribución, andina y pacífica, y se pueden ahora considerar suficientemente definidas las formas geográficas de este sapo, en Perú y en Chile, respectivamente, por los trabajos de VELLARD (1959) y CEI (1960).

Las formas geográficas chilenas se caracterizan por la delimitación de su habitat, que corresponde a biótupos peculiares. Grandes barreras ecológicas separan, de Norte a Sur, las siguientes formas reconocibles: un primer grupo de poblaciones que pertene-

ce a los arroyos y biocenosis alto-andinos, relacionándose con la forma típica de Perú, en el Cuzco; las poblaciones aisladas, con morfología singular, enclavadas en los pocos ríos y vertientes de los desiertos azoicos de Atacama, y muy especializadas por su biología; las poblaciones numerosas y más polimorfas de la región central, entre Coquimbo y Malleco; en fin las poblaciones poco conocidas de la selva húmeda austral valdiviana. *Bufo spinulosus* es en realidad especie politípica, que, a pesar de ser tan polimorfa y variable, por sus posibilidades adaptativas notables, no parece haber alcanzado, en su fase actual de expansión, mecanismos de aislamiento tan eficaces para determinar algún taxón de rango específico en los varios conjuntos poblacionales que la componen, aún en los más homeomorfos o geográficamente segregados.

Las formas geográficas que recordamos, se identifican por sus rasgos morfológicos, en ciertos casos de significado estadístico, los que se expresan en diferencias de las medidas o índices corpóreos, seguramente relacionadas con modificaciones funcionales de estos anuros, en relación con el ambiente en que viven, de acuerdo con su metabolismo, reproducción y sistema de correlación endócrina característico.

Observaciones preliminares de ROSEMANN, HOECKER y CAPURRO (1960) tuvieron por objeto las relaciones serológicas entre algunas de las formas chilenas mencionadas, en particular los sistemas de antígenos peculiares y comunes, a través de la reacción de precipitación en gel según la técnica de Outcherlony. A pesar de no revelar diferencias cualitativas evidentes, los autores señalan diferencias de orden cuantitativo entre las muestras de la zona central (Zapallar, Concepción) y las de Atacama (Copiapó).

Considerando las proteínas específicas, como un carácter sistemático representativo en el caso de las seroproteínas fabricadas por el mismo organismo, según sus propios "patterns" genéticos, hemos intentado ahora un estudio comparativo de las diversas poblaciones de *Bufo spinulosus*, utilizando la técnica de la electroforesis en papel. Ya desde casi dos décadas este tipo de observaciones sigue adelantándose continuamente en la práctica y en la bibliografía biológica, como se puede ver por las abundantes contribuciones, aún de

carácter zoológico, las más significativas de las cuales hemos indicado en unas notas informativas previas (CEF, 1961; BERTINI, 1961). Era interesante comprobar si la separación de las principales fracciones albúminas-globulínicas, por movilidad y carga eléctrica, se mantenía constante en la especie, en condiciones físico-químicas de análisis estandarizadas, y si eventuales diferencias cuali-cuantitativas en los ferogramas se pudieran interpretar como un aspecto de la diferenciación adaptativa de las formas geográficas indicadas, siendo expresión de uno de los múltiples estados posibles de equilibrio fisiológico de su *medium* interno.

MATERIAL Y METODOS

La sangre, obtenida por punción cardíaca en animales adultos y aparentemente sanos, se dejaba coagular y el suero extraído sin hemólisis y centrifugado se utilizaba en los más breves límites de tiempo posibles, para evitar el riesgo de eventuales procesos de desnaturalización. Se usó un aparato CIEN-CU (Ind. Argentina), con las siguientes características técnicas para el proceso electroforético seguido: papel Whatman 3 MM; Buffer (Veronal-Veronal Sódico)

pH 8.6, μ 0.05; 850 v, $\frac{\text{mA}}{\text{cm}}$ 1.5; corrimiento (*run*) 6 h.; 18 tiras

en cada operación. Se trabajó con suero tomado de muestras individuales, para considerar luego el significado estadístico de la muestra poblacional representativa. Para cada espécimen se prepararon tres tiras, colocadas en serie, y tratadas sucesivamente con la técnica de azul de bromofenol, evaluándose por elución fotocolorimétrica. Los valores consignados para cada espécimen son entonces el promedio de los valores de sus tres tiras.

Las muestras utilizadas en nuestras observaciones se reúnen en el siguiente cuadro:

Grupo 1 — Población de San Pedro de
Atacama (Antofagasta) 3.500
mtrs. Arroyo Vilana
(corresponde a *Bufo spinulosus*)

- spinulosus*) 3 machos, 5 hembras
15-XI-1959
- Grupo 2 — Población de Paposo, Cuesta del Peral, Atacama, 300 mtrs. (corresponde a *Bufo spinulosus atacamensis*) 11 machos
12-XI-1959.
- Grupo 3 — Población de Río Huasco, Val-llenar, [Desierto de Atacama (corresponde a *Bufo spinulosus atacamensis*) 10 machos
11-XI-1959.
- Grupo 4 — Población de Chile Central (Santiago) (corresponde a *Bufo spinulosus arunco*) 6 machos
1-IX-1960.

Todos los ejemplares se encontraban en actividad sexual, alimentados; prácticamente en las mismas condiciones fisiológicas naturales, tratándose de especie de ciclo sexual continuo.

Por control añadimos algunos ejemplares de poblaciones argentinas que consignamos en el siguiente elenco, habiendo sido tratados con la misma técnica de las muestras anteriores chilenas:

- Tafí del Valle (Tucumán) 3.000 mts. 1 macho, 1 hembra
15-XII-1959.
- Puente del Inca, Mendoza, 3.000 mts. 2 machos, 1 hembra
1-XI-1959.
- Guayquerías del Tunuyán, Mdza., 1.000 mts. 1 macho
15-V-1960.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las seroproteínas de *Bufo spinulosus* constituyen electroforéticamente un sistema que presenta ciertas analogías con el de *Bufo arenarum* de Argentina. Fundamentalmente se compone de cuatro

grandes fracciones: la de mayor movilidad, seguramente albúmina, que indicamos con el símbolo A (*albumin-like*), y las de menor carga, referibles a globulinas, que denominaremos con el símbolo general G.

No hay diferencias apreciables en el corrimiento relativo de estas fracciones en todas las muestras de los grupos 1, 2 y 3, como se puede observar en algunos de los ferogramas reproducidos (fig. 1). El grupo 4 y *Bufo spinulosus* de Guayquerías, que poseen cuatro fracciones bien visibles, presentan variaciones peculiares de movilidad relativa.

Los porcentajes relativos de elución de las fracciones mencionadas dan una expresión indicativa de la composición del suero en la especie y se representarán a continuación, en una tabla que resume los resultados de las observaciones electroforéticas.

Poblaciones:	fracciones sero-proteínicas			
	A	G' + G''	G'''	
S. Pedro de Atacama				
3 machos	30.72 \pm 3.39 S. E.) (24.66 — 36.36)	42.09 \pm 1.23 (40.73 — 44.55)	27.16 \pm 3.75 (22.63 — 34.60)	
5 hembras	26.88 \pm 2.20 (21.05 — 32.30)	42.52 \pm 0.73 (40.33 — 44.35)	30.59 \pm 2.44 (23.35 — 35.60)	
Paposo				
11 machos	30.10 \pm 1.18 (23.80 — 35.65)	40.64 \pm 1.42 (32.85 — 47.00)	29.26 \pm 2.14 (19.05 — 41.20)	
Río Huasco				
10 machos	20.56 \pm 1.13 (15.80 — 26.60)	40.66 \pm 1.16 (33.13 — 45.43)	38.73 \pm 1.67 (31.53 — 45.93)	
	A	G'	G''	G'''
Chile Central				
Santiago				
6 machos	23.97 \pm 1.14 (20.60 — 28.50)	22.39 \pm 1.20 (18.33 — 25.95)	25.30 \pm 0.67 (22.91 — 27.29)	28.24 \pm 2.47 (21.98 — 36.95)

	A	G' + G''	G'''	
Tafí del Valle				
1 macho	30.90	48.80	20.30	
1 hembra	23.05	56.20	20.75	
Puente del Inca				
2 machos	17.50	44.67	38.02	
1 hembra	20.40	32.55	47.05	
	A	G'	G''	G'''
Guyquerías de Tunuyán				
1 macho	34.30	23.90	16.90	24.40

La "unidad" general del sistema se mantiene fundamentalmente en todas las formas chilenas. Es esto un carácter más, fisiológico, a favor de la validez específica del conjunto de *spinulosus*, no obstante el polimorfismo, la adaptación, y el gran aislamiento geográfico de algunas de sus formas.

Analizamos ahora ciertas variaciones interesantes en el comportamiento electroforético de las fracciones proteínicas, que se pueden señalar en las poblaciones consideradas. Se evidencia una serie de muestras cuyas tiras se caracterizan por un "pattern" particular en las globulinas de mayor movilidad y carga. La tenemos en la forma de alta Cordillera (representada aquí por San Pedro de Atacama, pero acompañada por su comportamiento por los ejemplares alto-cordilleranos de la ladera argentina, de Tafí del Valle y Puente del Inca), y asimismo en las poblaciones fuertemente aisladas de los escasos biotopos utilizables del desierto de Atacama, en gran parte azoico (Paposo, Vallenar). En todas estas muestras las bandas de corrimiento correspondientes a las fracciones que denominamos G' y G'' no se pueden resolver en fracciones bien separadas, lo que nos ha obligado a considerarlas junto aún en el proceso de elución. Las dos fracciones se separan y se evidencian mejor en la muestra de Chile Central; en la Argentina ocurre lo mismo en la población aislada, relativamente lejos de la Cordillera, de los relieves erosionados y áridos, denominados Guayquerías del Tunuyán (Mendoza, 1.000 mts.).

Se sabe que las macromoléculas, tipo α -macroglobulinas, tienen tendencia, cuando separadas, a formar cadenas. Considerando el corrimiento relativo en los ferogramas de las globulinas homólogas de nuestro bufónidos chilenos, se puede pensar en una fuerte interrelación entre los dos grupos (G' y G''), que probablemente podrían aquí disociarse con otro pH, pero que se separan bien en estas mismas condiciones electroforéticas —como hemos visto— en muestras poblacionales de otra procedencia. Presumiblemente podría tratarse de interacción entre macromoléculas, en este caso debida a algún factor peculiar de carácter específico.

En otros trabajos, otros autores recuerdan (WIEME, 1958) que en electroforesis en gel se notaban agregaciones de fibras macromoleculares (p. e. en proteínas tiroideas aisladas, o en las proteínas del cristalino), debidas a proteínas cuyas bandas demostraban una disposición “veteada” característica, como de hebras. Hemos podido también comprobarlo en la fracción “confusa” o “conglobada” de las tiras del material donde señalamos este aspecto macroscópico del sistema sero-proteínico de *Bufo spinulosus*. Probablemente debería ser atribuído a la tendencia a la disposición en “cadena” de las macromoléculas, la que puede haberse acentuado en las poblaciones cordilleranas, pero más todavía en las muy aisladas de Paposo o Río Huasco. Cuando existe la mencionada tendencia a la probable interacción macromolecular el ferograma se hace más corto y es posible que la citada propiedad pueda aún modificar las características y movilidad de la albúmina.

La comparación de los porcentajes de elución proporciona otros datos dignos de relieve, prestándose para algunas consideraciones de cierto interés. La “ratio” Albúmina/Globulina representa siempre un valor de notable importancia fisiológica, y aún ecológica, cuando se tenga presente que la existencia de una elevada concentración de moléculas de albúmina puede intervenir en la regulación oncótica y osmótica de los líquidos vitales del ambiente interno de un organismo, interfiriendo por ende en los mecanismos adaptativos de su balance hídrico y de su relativa independencia del ambiente acuático. En efecto —aún por lo que se conoce a través de estudios electroforéticos— organismos exclusivamente acuáticos se

acompañan con la ausencia o la gran reducción de la albúmina, aumentando ésta de manera considerable en animales con actividad prevalentemente terrestre.

Por experiencia personal podemos afirmar que en este sentido *Bufo spinulosus* se ubica entre los anfibios no estrictamente vinculados a un habitat límnic. Esta condición fue subrayada por trabajos experimentales de Vargas y Espina (1959) quienes demostraron la máxima sensibilidad de este sapo a las hormonas neurohipofisarias, en relación con los demás anuros chilenos.

En todas nuestras muestras, menos Río Huasco, los límites individuales para los porcentajes de albúmina (A) están entre 20.60 — 36.36 %, con términos medios entre 23.97 — 30.72 %. Ahora bien, en los ejemplares capturados en el Río Huasco, *siempre en el agua, bajo las piedras en el lecho del río*, estos porcentajes bajan entre límites de 15.80 — 26.60 %, con un término medio de 20.56 %. La diferencia entre la población de Río Huasco y las de Paposó y de San Pedro de Atacama tiene, p. e., evidente significado estadístico (P de Fischer entre 0.01 — 0.001).

La disminución relativa de albúmina en los sapos xantodermos de Río Huasco, cuya piel sumamente lisa y suave parece relacionarse con una vida constantemente acuática, no resulta pues en desacuerdo con su adaptación y especialización ecológica. Presentan ciclo sexual continuo, reproduciéndose durante todo el año o en su mayor parte; encuentran en el río una biocenosis limitada, pero en óptimo equilibrio para sus necesidades alimenticias; esencialmente aparecen vinculados al medio acuático, del cual difícilmente podrían desprenderse, debido a que los ríos enclavados en la región erémica atacameña resultan rodeados por desiertos absolutos, pedregosos, absolutamente hostiles. El régimen de precipitaciones es allí casi nulo, por lo menos por enormes períodos, y la HR (humedad relativa) alcanza normalmente el 0 % o muy cerca del 0 %.

La población de Paposó, con un porcentaje mayor de albúmina sérica, vive al contrario casi siempre fuera del agua, representada por muy limitadas vertientes cristalinas, que utilizan para sus repetidos desoves. Constituyen su ambiente de elección los pedregales y las rocas con hierbas y arbustos a lo largo de la quebrada costera.

Según datos personalmente recolectados y observaciones personales directas la HR aparece allí suficientemente elevada (frecuentemente el 24 — 50 %), llueve con lluvia fina durante varios días en el año, el cielo es a menudo nublado, y sobre todo, tratándose de una cuesta costera con régimen peculiar climático, se verifica una continua condensación de la neblina marítima (camanchaca). Claro está que todos estos factores pueden concurrir facilitando la tendencia adaptativa de los sapos locales hacia una vida prevalentemente terrestre.

Los sapos de San Pedro de Atacama, que son muy distintos de los de las poblaciones del desierto atacameño, por el aspecto, estructura y gran corneificación de la piel, etc., viven en un ambiente de altura, árido (frecuente HR de 1 — 7 %), pero mucho más frío, en amplias quebradas andinas (como el arroyo Vilama) con pastizales y vegetación arbustiva. Se trata de otra forma, fisiológicamente distinta, probablemente con distintos rasgos adaptativos, aún de naturaleza endócrina y metabólica (enf. estructura y muda de la piel). Es interesante notar que los pocos ejemplares estudiados de Tafí del Valle (Norte Argentino) que viven en condiciones similares, manifestaron valores porcentuales de albúmina análogos a los de la muestra de San Pedro de Atacama.

CONCLUSIONES

1 — Estudiando por electroforesis en papel (850 V; pH 8.6; μ 0.05; papel Whatman 3 MM; run, 6 h.) muestras de sueros de distintas poblaciones de *Bufo spinulosus* Wiegmann de Chile y de Argentina, se comprueba la unidad general de su sistema sero-proteínico, con cuatro fracciones fundamentales, una homóloga a la Albúmina, las otras a Globulinas, de distinta carga eléctrica.

2 — Un grupo de poblaciones (Alta Cordillera, desierto de Atacama) presenta una peculiar condensación en las dos primeras bandas de globulinas, con disposición "veteada" (probable interacción macromolecular). Esto obliga a considerarlas junto como valores porcentuales de elución, y además todo el corrimiento elec-

troforético se hace algo más corto. Al contrario en las poblaciones de Chile Central (Santiago) las dos primeras bandas se hacen reconocibles y bien definidas.

3 — Existen diferencias poblacionales en los valores porcentuales de la fracción "albumin-like": los valores más bajos, estadísticamente significativos, se observan en los animales de vida constantemente acuática, confinados en los ríos del desierto de Atacama (Río Huasco).

4 — Se presentan algunas consideraciones sobre el probable valor adaptativo y el sentido ecológico de estas variaciones de la "ratio" Albúmina/Globulina, que parece ser más elevada en las formas más independientes del ambiente acuático.

RESUMEN

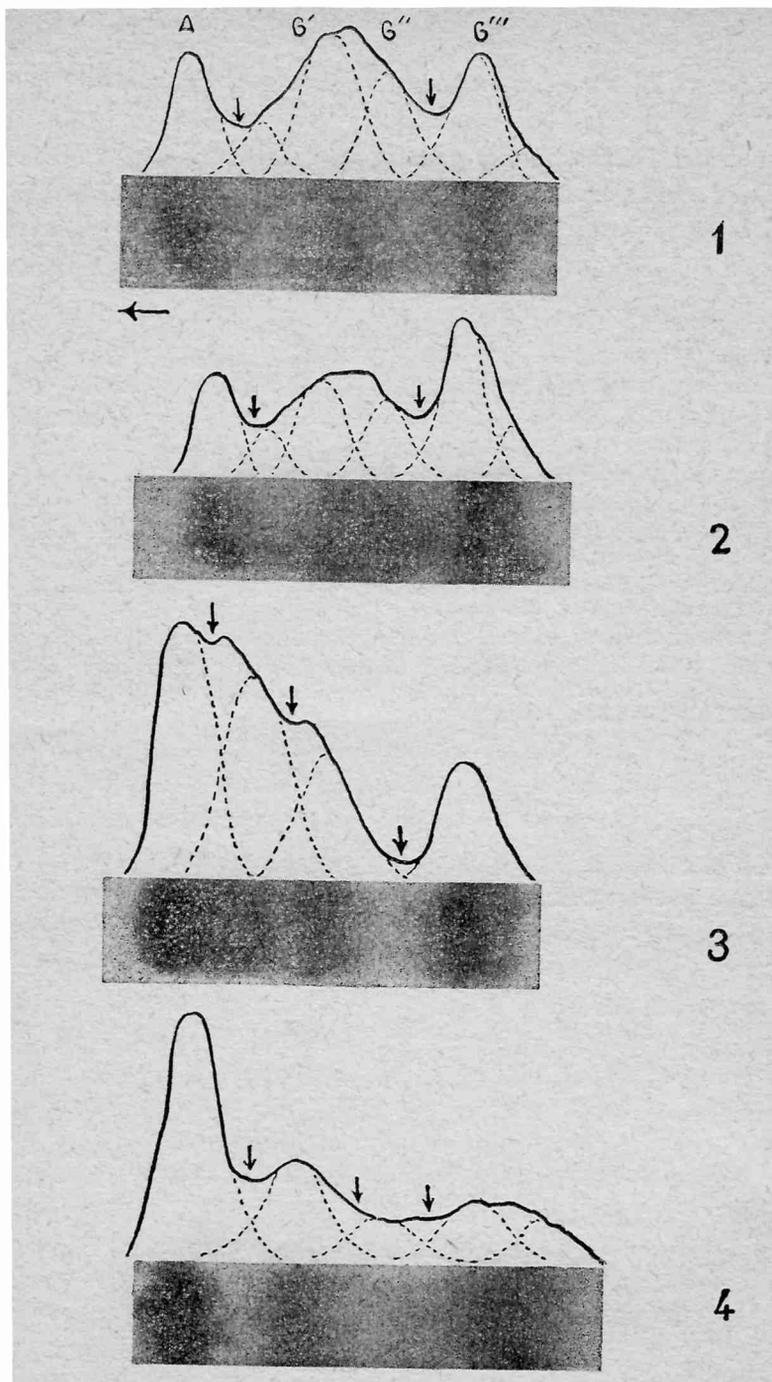
Las características electroforéticas del suero de poblaciones representativas de varias de las formas geográficas chilenas de *Bufo spinulosus* Wiegmann revelan una notable homogeneidad general en acuerdo con la posición sistemática de esta especie politípica, pero con evidente polimorfismo a lo largo de su amplia área de distribución cordillerana. Las fracciones proteínicas reconocibles son fundamentalmente cuatro, una referible a albúmina, las otras probablemente a globulinas. Las poblaciones del Norte, de la puna de Antofagasta, y de los escasos ríos y vertientes del desierto de Atacama, no permiten reconocer en los ferogramas las dos primeras fracciones globulínicas, presentando en aquellos una sola mancha con un aspecto "veteado" ("streaked") característico, probablemente por interacciones macromoleculares peculiares. Las dos fracciones globulínicas se hacen bien reconocibles en las muestras de Chile central, donde el ferograma presenta ciertas analogías con el de *Bufo arenarum*. La fracción referida a albúmina presenta la concentración relativa más baja en la población de Río Huasco (Atacama). Probablemente esa baja concentración de albúmina puede estar en cierta correlación —por razones ecológicas— con otros peculiares caracteres adaptativos de estos sapos aislados de los esca-

Los ambientes límnicos de los grandes desiertos del Norte, de vida permanentemente acuática, bajo las piedras en las aguas corrientes del río.

BIBLIOGRAFIA

1. BERTINI, F., *Holmbergia*. Buenos Aires (en prensa).
2. CEI, J. M., *Herpetologica*, 16, 243-50 (1960).
3. CEI, J. M., *Inv. Zool. Chil.*, 7, 59-81 (1961).
4. CEI, J. M., *Holmbergia*. Buenos Aires (en prensa).
5. CEI, J. M., *Holmbergia*. Buenos Aires (en prensa).
6. ROSEMAN, M., CAPURRO, L. F., HOECKER, G., Com. I Congr. Chileno Zool. (Santiago de Chile, setiembre 1960).
7. VARGAS, F., ESPINA, S., Res. Com. XXI Congr. Intern. Ciencias Fisiol., 283 (Buenos Aires, agosto 1959).
8. VELLARD, J., *Mem. Mus. Hist. Nat. Xavier Prado*, 8 (1959).
9. WIEME, R. J., *Étude de quelques facteurs propres au gel de gelose utilisé comme support pour l'électrophorèse. — Protides of the Biologic Fluids*, 127-130 (Elsevier, 1958).

Instituto de Biología
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Cuyo



Ferogramas característicos en: 1-*Bufo spinulosus spinulosus*, San Pedro de Atacama, y 2- *Bufo spinulosus atacamensis*, Río Huasco, Vallenar (corrimiento 8 horas; nótese la imbricación de las curvas correspondientes a las bandas intermedias, G' y G''), 3- *Bufo spinulosus arunco*, Santiago de Chile (corrimiento 8 horas), y 4- *Bufo spinulosus*, Guayquerías de Tunuyán (corrimiento 6 horas). Nótese en los dos últimos la distinta movilidad relativa de las bandas intermedias. Las flechas indican el punto en que se cortaron las bandas en las tiras para la elución. A — albúminas; G', G'' y G''', globulinas —

