

COLECCION HERPETOLOGICA
Y BIBLIOTECA
Dr. José Miguel Ceí

J. M. CEI

BIBLIOTECA
JORGE WILLIAMS

RADIOACTIVIDAD NATURAL Y ESTADO FUNCIONAL DEL
APARATO CUTANEO EN BUFO SPINULOSUS WIEGMANN

DE ARCH. DE BIOQ., QUÍM. Y FARM. - TUCUMÁN — TOMO XII - Nº 1-2
(Págs. 105-112)

TUCUMAN
(REPÚBLICA ARGENTINA)

1 9 6 5

RADIOACTIVIDAD NATURAL Y ESTADO FUNCIONAL DEL APARATO CUTANEO EN BUFO SPINULOSUS WIEGMANN

Por J. M. CEI

S U M M A R Y

Samples of dried skins of *Bufo spinulosus* from the Southern Territories of Mendoza Province (Argentina) have been studied by paper chromatography and the content of biogenic indolalkylamines was measured. Specific aminic spectrum of *Bufo spinulosus* shows a very low content of 5HT besides a limited quantity of Bufotenine and Bufotenidine, but greater amounts of Dehydrobufotenine and Bufothionine were pointed out.

Comparison between samples from a strongly radioactive area (uraniferous ground neighbouring the Minas Huemul mines) and samples from a non-radioactive region (Bardas Blancas, Rio Grande River, South of Minas Huemul) indicates some statistically significant differences in the Bufothionine and 5-HT contents of the skin. At a lesser extent a lowered level of Bufotenidine in the Minas Huemul samples may be stressed.

A discussion on the natural factors as soil radiation acting on the enzymatic chains determining the aminic content of the skin was carried out.

Las primeras observaciones comparadas sobre indolalquilaminas en la secreción cutánea de los Bufónidos neotropicales, a los cuales pertenece *Bufo spinulosus* Wiegmann, se deben desde 1938 a Deulofeu y Mendi-ve (4), quienes establecieron la existencia de bufotenina, y luego en 1944 a Deulofeu y Duprat (3), en su examen de varias especies del continente sudamericano. Entre ellas figuraban *Bufo chilensis* de Santiago de Chile, y *Bufo spinolusus* de Perú, ambas pertenecientes al mismo conjunto específico-subespecífico, o conjunto de *spinulosus*, reconocido morfológicamente por Vellard (1959) y por Tihen (1962). En esta segunda serie de observaciones, los autores encontraron dehidrobufotenina y su derivado sulfo-conjugado, la bufotionina, además de su producto de reducción, o bufo-

tenina, la que se evidenció con seguridad en la forma *chilensis*, pero se consideró como "probable" —debido a la limitada cantidad de material analítico disponible— en *spinulosus* de Perú. No se hizo todavía mención evidentemente en aquellas observaciones de la 5-HT, o "enteramina", añadiéndose aún, como probable, en *spinulosus* la presencia de modestas cantidades de bufotenidina.

En el curso de investigaciones combinadas, que se desarrollan desde hace años entre nuestro laboratorio y el laboratorio del Instituto de Farmacología de la Universidad de Parma, Italia, dirigido por V. Erspamer, el espectro comparado de los derivados indólicos, o mejor dicho triptofánicos, en los Bufónidos sudamericanos, se ha ido paulatinamente delineando, a través de técnicas cromatográficas, cuali-cuantitativas, y en repetidos ensayos refrendados por la reconocida autoridad de Erspamer en el campo de las aminas biógenas. Sin mayores detalles, que serán objeto de comunicaciones más completas por parte de Erspamer y colaboradores, puedo aquí anticipar que se encuentra adelantado un estudio general de la variación geográfica de la distribución de los derivados indólicos de la piel de *Bufo*, y en particular de *spinulosus*. En base a estos datos que aquí solamente recuerdo de una manera preliminar, según las evaluaciones de Erspamer y colaboradores, todos los sapos del grupo *spinulosus* han evidenciado su llamativa pobreza en 5-HT, que falta por completo en algunas de las subespecies del conjunto, y por otro lado han demostrado —naturalmente con diferentes patrones cuantitativos— la presencia de dehidrobufotenina, bufotenina, bufotionina, en algunos casos bufotenidina, confirmándose así los primeros hallazgos analíticos de Deulofeu y colaboradores.

Los *Bufo spinulosus* de la región Sur de Mendoza, a los cuales brevemente nos referiremos, pertenecen a un stock poblacional que presenta en la piel cantidades mínimas de 5-HT, a la cual se acompañan cantidades notables de dehidrobufotenina y de bufotionina, en menor cantidad bufotenina, y menos aún bufotenidina. Durante nuestras recolecciones sistemáticas de material, a lo largo de la Cordillera, se obtuvieron, en el mes de marzo de 1964, dos muestras de ejemplares adultos, aproximadamente del mismo tamaño, casi todos del sexo masculino. Observaciones llevadas a cabo en ésta y en otras especies afines, no han podido por otra parte revelar hasta ahora en muestras de la misma época del año, diferencias se-

xuales estadísticamente significativas en el contenido de cada una de las indolalquilaminas características de cada espectro específico.

El peso medio de las pieles, que se prepararon y desecaron a la brevedad, remitiéndose luego las muestras al laboratorio de análisis cromatográfico, era alrededor de 1.800 g. Las muestras mencionadas, cuya comparación en la evaluación cromatográfica justifica este comentario, procedían de las minas uraníferas de Huemul, a pocos Kms. al Sur de Malargüe, Mendoza, y de la zona cercana de Río Grande, en Bardas Blancas, a unos 30 Kms. al Sur de Huemul, respectivamente. Estamos entonces en presencia de dos muestras, una perteneciente a una zona de fuerte radioactividad superficial, la otra procedente de ambientes naturales donde la radioactividad es escasa o nula. En efecto, gracias a la cortesía del señor Jefe del Departamento de Evaluación de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Dr. A. E. Belluco, a quien fueron solicitados los datos informativos necesarios, se pudo establecer el rango general de emanación radiactiva superficial en dicha área, el que se esquematiza en la tabla sintética I. Como se ve en la zona de Huemul prospectada, la radioactividad oscila, en el suelo y en los desagües — donde probablemente es aún mayor— en los cuales se capturaron los animales— entre 0,10 y más de 5,0 MR/H sobre un fondo normal o background de aproximadamente 0,010 MR/H. Hay evidentes zonas de gran densidad de emanación, y zonas donde la erosión

TABLA I

VALORES DE RADIOACTIVIDAD (*) MEDIDOS EN LAS AREAS
PROSPECTADAS (CNEA): EN MINAS HUEMUL (DE NORTE A SUR)

0,025	—	0,015	—	0,018	—	0,020	—	0,036	—	0,450	—	0,180	—	0,050	—	0,300
>5,000	—	0,500	—	0,030	—	1,600	—	0,010	—	0,030	—	0,025	—	0,080	—	0,100
0,050	—	0,200	—	0,050	—	0,080	—	0,300	—	0,020	—	0,015	—	0,035	—	0,040
0,150	—	1,000	—	0,030	—	0,100	—	0,300	—	0,100	—	0,080	—	0,500	—	0,500

Fondo o background: de 0,010 a 0,013 MR/H
 límites generales o rango de los valores superficiales entre 0,010 y >5,000 MR/H
 En Bardas Blancas: puntos aislados a más de 15 km de distancia: 0,050 — 0,025
 Fondo o background: 0,008 a 0,010 MR/H

(*) Expresados en miliroentgens/hora (MR/H).

ha ensanchado grandemente las condiciones generales de afloramiento de los bancos uraníferos en estos terrenos del Diamantino (Cretácico Medio Superior). En cambio, en la zona prospectada de Bardas Blancas son solamente esporádicos los puntos donde se pudo comprobar cierta radiactividad, con un background ligeramente inferior, y sus efectos se pueden allí considerar nulos por su valor biológico, contrariamente a los terrenos de la zona de Huemul.

Los animales fueron recolectados de noche, bajo las piedras o arrastrándose lentamente en los bordes de los desagües en la zona de Huemul: en Bardas Blancas se encontraban en las aguas correntosas y frías del Río Grande. Las muestras estudiadas consisten en seis especímenes de Minas Huemul (M. H.) surtidos al azar, y de seis especímenes de Bardas Blancas (B. B.). Los cromatogramas efectuados en el laboratorio del Instituto de Farmacología de Parma, se realizaron con técnicas de uso corriente o con métodos particulares según las necesidades de las reacciones. Fundamentalmente los solventes usados fueron las mezclas de n-butanol-ácido acético, o n-butanol-monometilamina en solución acuosa; entre los reactivos para revelados especialmente el NNCD, el reactivo de Pauly, las sales de diazonio de la paranitroanilina y el reactivo de Ehrlich o de la p-dimetilaminobenzaldeída.

Como se desprende de la Tabla II, a pesar del limitado número de individuos de las muestras, algunas diferencias estadísticamente significativas aparecen en la comparación de los datos. La cantidad de 5-HT, muy baja en la muestra de B. B. (media $5,8 \mu\text{g}/\text{gr}$ de piel seca) se eleva a casi 4 veces en la muestra de M.H. ($22.5 \mu\text{g}/\text{gr}$). Por el contrario, disminuyen apreciablemente el contenido de bufotionina y bufotenidina, con diferencias también significativas en base a un inmediato análisis estadístico, utilizando el *t* de Student y el porcentaje de probabilidad de Fisher. Aparente tendencia a una disminución parecen también indicar bufotenina y dehidrobufotenina, pero en este caso no se pueden comprobar diferencias estadísticamente significativas. Debido al reducido número de individuos de las muestras, se ha pretendido aplicar a su comparación otro método estadístico además de los comúnmente usados. En especial se ha empleado un método no paramétrico para comparar dos series de medidas independientes, el "Wilcoxon rank sum test", cortésmente aconsejado por el Dr. Fertig, profesor de estadística en la Columbia University. De acuerdo con este test, cuyos resultados se esquematizan en la Tabla III, las diferencias

encontradas entre M. H. y B. B. para la 5-HT, la bufotionina y la bufotenidina son significativas: para la bufotenina y dehidrobufotenina, no lo son.

Se puede pues concluir que la población de Minas Huemul revela diferencias no debidas a casualidad en el contenido de indolalquilaminas de la piel, en comparación de la población de Bardas Blancas. ¿Cuál puede ser la causa de esas diferencias? ¿Cuál su mecanismo fisiológico? Por el hecho de proceder de la misma región geográfica; por pertenecer al mismo conjunto biocenótico (altitud, clima, ambiente natural); por ser formas escasamente migratorias; por no presentar las muestras diferencias morfológicas definidas, como en el caso de las entidades subespecíficas del conjunto *spinulosus* (p.e. las formas *atacamensis*, *chilensis*, *trifolium*, *limensis*, etc.), considerándose por ende como pertenecientes a la misma subespecie; por estar excluidos los factores sexuales y estacionales, el origen de las diferencias registradas es sospechoso de radicar en algunas influencias ambientales capaces de una alteración, presumiblemente fenotípica, de la cadena normal de reacciones enzimáticas que presiden a la metabolización en la piel de los mencionados amino-derivados triptofánicos. En el caso de la bufotenidina y de la bufotionina, p. ej. los pro-

TABLA II

INDOLALQUILAMINAS: CONTENIDO EN MICROGRAMOS/GRAMO DE PIEL SECA EN LAS MUESTRAS DE *BUFO SPINULOSUS* DE:

Minas Huemul (MH)				
5-HT	Bufotenina	Dehidrobufotenina	Bufotenidina	Bufotionina
22,5 ± 6,8	122 ± 12,4	1553,3 ± 573	34,1 ± 10,5	665 ± 117
(10-50)	(20-250)	(370-4000)	(15-80)	(300-1600)
Bardas blancas (BB)				
5-HT	Bufotenina	Dehidrobufotenina	Bufotenidina	Bufotionina
5,8 ± 0,7	170,1 ± 5,3	2100 ± 283	58,3 ± 7,0	2075 ± 433
(5-10)	(65-400)	(1200-3300)	(35-80)	(750-3600)
t - según Student				
2,45	0,96	0,75	1,92	3,14
P - según Fisher				
0,05	0,40	0,50	0,10	0,02

TABLA III
 DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS ENTRE LAS MUESTRAS DE *BUFO SPINULOSUS* DE MINAS HUEMUL (MH) Y DE BARDAS BLANCAS (BB). POR EL WILCOXON RANK SUM TEST:

A — Resueltas por aproximación natural			
	T'	Z	P
5-HT	23	2,54	<0,02
Bufotenina	36	0,47	>0,50
Dehidrobufotenina	33	0,95	>0,30
Bufotenidina	29	1,51	>0,10
Bufotionina	24	2,38	<0,002

B — Resueltas por los valores de α según el Wilcoxon Rank Sum Test:			
	T'	$T'_{1-\alpha}$	α
5-HT	23	55	0,004
Bufotenina	36	42	0,350
Dehidrobufotenina	33	45	0,197
Bufotenidina	29	49	0,066
Bufotionina	24	54	0,008

(Siendo $\frac{n_{MH} (n_{MH} + n_{BB} + 1)}{2} = 39$)

cesos de interconversión, con respecto a bufotenina y 5-HT, aun no bien claros, como ya en pasado subrayaba Deulofeu, involucran acciones enzimáticas complejas con especial intervención de transmetilasas para la bufotenidina, base de amonio-cuaternaria, aún más en comparación de la amina terciaria bufotenina.

Como se nota por los S. E. (errores standard) la dispersión de los valores individuales es constantemente mayor en la muestra de Minas Huemul, como si la reacción individual frente a un cierto factor ambiental fuera allí más evidente e irregular.

Considero por el momento prematura o arriesgada cualquier tentativa directa de explicación de nuestro hallazgo sobre la base de las condiciones naturales de radiactividad superficial en la zona de Minas Huemul y de sus efectos biológicos, pero es también oportuno exponer desde ahora brevemente las consideraciones siguientes que en mi opinión se vinculan a esta línea de fenómenos.

En otros países se están realizando estudios sobre radioactividad natural en regiones de yacimientos uraníferos y sus efectos sobre la fauna. En Utah p. ej. Tanner tiene en estudio sobre bases ecológicas las áreas radiactivas del Upper Basin, ricas en radiaciones gamma y beta. Datos preliminares de ese autor indican para ese territorio valores de radioactividad superficial de 20 o más microroentgens/H, con máximos hasta más de 100 microroentgens/H. Débese notar que en nuestros yacimientos los valores proporcionales en el área prospectada oscilan entre 0,10 y 5 miliroentgens, es decir son incomparablemente mayores de los citados por Tanner en su relación. Es imposible establecer la suma de radiaciones — expresada en roentgens— a la cual pudiera haber estado expuesto un organismo del tipo de *Bufo spinulosus* en nuestra área de Huemul, pero si consideramos hipotéticamente un valor medio superficial de unos 2-5 MR/H (y en profundidad, aún de pocos decímetros, los efectos radiactivos, como es notorio, aumentan sensiblemente), tendríamos un valor siempre hipotético de unos 26-43 roentgens por año, que en presencia de un organismo que hubiera permanecido en las mencionadas condiciones naturales por un espacio, p. ej. de cinco años, se elevaría a un total, siempre evidentemente hipotético e indicativo de unos 130-215 roentgens. Valores de esta índole no se pueden considerar biológicamente nada despreciables, cuando se recuerda que una dosis de unos 325 roentgens representa el límite de mortalidad 50 en el perro, y una dosis de 450 en el hombre.

Desde los trabajos de Dale, Holmes, Lea, etc., referidos por Lea (1947), bien se conoce el efecto de inactivación provocado por las radiaciones sobre las enzimas, particularmente en su estado de solución o concentración muy baja como en el caso de las enzimas celulares. Las curvas exponenciales dadas por aquellos autores son significativas y demuestran la evidente sensibilidad de estos compuestos macromoleculares proteínicos frente a los agentes ionizantes. Además, siempre en tema de proteínas y de su reacción a la irradiación merecen mención las recientes investigaciones de Leone (7, 10, 11, 12, 13, 14) sobre las alteraciones producidas por dosis progresivas de rayos X y gamma en el plasma de las aves, en ovoalbúmina o en las globulinas, aún humanas. La depresión de la actividad antigénica de las proteínas plasmáticas en las aves por ejemplo, controlada inmunológicamente, ya se evidencia con dosis de 660 y 990 roentgens, tolerándose hasta 330 roentgens, dosis de 1320 roentgens

resultando mortales en el espacio de 24 horas. En los Anfibios, aparte las indicaciones de Preda y Velluda (15), recordaré en fin las observaciones de Blair (1,2) en *Bufo valliceps*, demostrándose que ya una dosis de irradiación de unos 300 roentgens es suficiente para provocar serias anomalías del desarrollo, deficiencias pigmentarias, metabólicas, etc.

La enumeración de estas diferentes fuentes de información y su probable relación con la sencilla evidencia de nuestros datos preliminares aquí consignados, junto con el gran interés biológico representado por nuestras áreas sureñas de radiactividad natural, permiten refrendar nuestro interés de profundizar con otras series de investigaciones estos temas, lo que nos proponemos, o por lo menos intentaremos realizar con varios trabajos en curso.

BIBLIOGRAFIA

1. BLAIR, W. F., Texas J. Sc., 12, 3-4, 216-227 (1960).
2. BLAIR, W. F., Recent Advances Bot. (Rad-Ecol), Univ. Toronto Press, 1377-1381 (1961).
3. DEULOFEU, V., DUPRAT, E., J. Biol. Chem., 153, 2, 459-463 (1944).
4. DEULOFEU, V.; MENDIVE, J. R., J. Liebigs Ann. Chem. 543, 2-4, 288-292 (1938).
5. FRICKE, H., LANDMANN, W. LEONE, C., VINCENT, J., J. Physic. Chem., 63, 932-935 (1959).
6. LEONE, C. A., Rad. Res., 5, 4, 34 (1956).
7. LEONE, C. A., Feder. Proceed. 16, 1, 1809 (1957).
8. LEONE, C. A., Trans. Kansas Acad. Sc., 60, 3, 301-315 (1957).
9. LEONE, C. A., Feder. Proceed., 18, 1, 2276 (1959).
10. LEONE, C. A., Feder. Proceed., 19, 1, 1 (1960).
11. LEONE, C. A., J. Immunol., 85, 2, 107-111 (1960).
12. LEONE, C. A., J. Immunol. 85, 2, 112-119 (1960).
13. LEONE, C. A., Rad. Res. 14, 4, 91 (1961).
14. LEONE, C. A.; SWEET, G. H., Feder. Proceed., 21, 2 (1962).
15. PREDÁ, V.; VELLUDA, C. C., Com. Acad. Rep. Pop. Rom., 4, 61-64 (1954).

Instituto de Biología
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Cuyo.

