

FICHADO

0704 147

BIBL. JORGE WILLIAMS

J. M. CEI

CORRELACION EVOLUTIVA DE
CARACTERES BIOQUIMICOS EN
UN ANURO ALTO-AMAZONICO:
LEPTODACTYLUS VILARSI MELIN

De ACTA ZOOLOGICA LILLOANA, tomo XXIX, págs. 261 - 269

TUCUMAN
REPÚBLICA ARGENTINA
1972

CORRELACION EVOLUTIVA DE CARACTERES
BIOQUIMICOS EN UN ANURO ALTO-AMAZONICO:
LEPTODACTYLUS VILARSI MELIN.

por J. M. CEI

SUMMARY

Evolutionary correlation of biochemical characters in a high-amazonic anuran: *Leptodactylus vilarsi* Melin. Biogenic amines and active polypeptides in the skin of *Leptodactylus vilarsi* from Ecuador are quite similar to the biogenic amines and active polypeptides in the skin of *Leptodactylus dengleri* from Panamá, but they differ from the biogenic amines and active polypeptides in the skin of *Leptodactylus labyrinthicus* (Misiones). Such a biochemical phyletic and evolutive trend shows a striking parallelism with the serological relationships within these *Leptodactylus* frogs as evidenced by the crossed precipitin tests.

En un trabajo anterior (Cei, 1965) había expuesto algunas consideraciones, taxinómicas y morfológicas, sobre una rara especie de *Leptodactylus* de las regiones alto-amazónicas del Ecuador y Perú: *Leptodactylus vilarsi* Melin (1941) Este notable anuro, cuya biología es todavía escasamente conocida, vive en zonas ecuatoriales o tropicales de selva húmeda. Su aspecto, el tamaño y varios caracteres morfológicos lo acercan a las formas del mismo género pertenecientes al conjunto "*pentadactylus*" (sensu lato). Al mismo tiempo, otros caracteres, como el fuerte desarrollo y la estructura de las formaciones glandulares acinosas, látero-inguinales, pueden sugerir afinidades con otro grupo de *Leptodactylus*, tampoco suficientemente definido: el grupo *rubido*, distribuido en las mismas áreas neotropicales propias de *vilarsi* y de los "*pentadactylus*".

La distribución hasta ahora conocida de *Leptodactylus vilarsi* en la selva oriental puede indicarse en la fig. 1. Todavía, según informaciones preliminares obtenidas en Quito por gentileza del Dr. Gustavo Orcés V., y según materiales examinados, recolectados por él, parece existir también en las selvas occidentales de la ladera atlántica ecuatoriana. En ambos casos podría llegar a ser simpátrida con *Leptodactylus (pentadactylus) dengleri* Melin (cfr. mapa fig. 1) y, en la ladera alto-amazónica oriental, también con *Leptodactylus (pentadactylus) pentadactylus* (L.), cuyas relaciones taxinómicas con *dengleri* nunca han sido sometidas a revisión. Por otra parte, investigaciones bioquímicas comparativas sobre las secreciones cutáneas (aminas biógenas) en *pentadactylus* y *dengleri* han permitido subrayar evidente especificidad de los sistemas enzimáticos que las determinan en ambas formas; y aún más, esto se observa en *labyrinthicus* (Spix) de los planaltos del este brasileño y de Misiones. Este último miembro del conjunto "*pentadactylus*" posee, en efecto, un complejo sistema enzimático de metiltransferasas y enzimas "ciclizantes" que producen en su piel derivados de la histamina como la N-Metil-histamina, la N,N-Dimetil-histamina, la spinaceamina y la 6-Metil-spinaceamina, de las cuales *dengleri* y *pentadactylus* son carentes (Erspamer, Roseghini y Cei, 1964; Cei, Erspamer y Roseghini, 1967).

Luego de una breve campaña de estudio en Ecuador, en 1967, se pudo disponer en el Napo-Pastaza, para ensayos comparativos bioquímicos, de un ejemplar vivo de gran tamaño de *Leptodactylus vilarsi*, cuya sangre fue totalmente extraída por punción cardíaca, utilizándose el suero para tests cruzados de precipitinas con otros *Leptodactylus*, según la técnica fotronreflectométrica otras veces citada (Cei y Cohen, 1965). La piel, extraída y preparada de acuerdo con las instrucciones especialmente recibidas, fue remitida al Dr. V. Erspamer, en Parma (Italia), para proceder al análisis cromatográfico de su contenido en aminas biógenas: indólicas, fenólicas e imidazólicas. Los resultados de aquellas observaciones, que citaremos oportunamente en la discusión, han sido objeto de publicación aparte por Erspamer y col. (en prensa).



FIG. 1. — Distribución de los *Leptodactylus* del grupo *pentadactylus* y de *Leptodactylus vilarsi*.

RESULTADOS

Suero inmune anti-*vilaris*, preparado en conejo utilizando el adyuvante de Freund, se hizo reaccionar con antígeno homólogo, y con los antígenos séricos heterólogos de *dengleri*, *labyrinthicus* y *Leptodactylus ocellatus* (L.). Los sueros heterólogos habían sido obtenidos en la misma época, respectivamente, en ejemplares de Panamá (*dengleri*), de Misiones (*labyrinthicus*) y de Mendoza (*ocellatus*). El resultado del test aparece en el gráfico de la fig. 2. La afinidad serológica de *vilaris* y *dengleri* es inobjetable, a un nivel que nosotros, en base a nuestra repetida experiencia de casos similares, consideramos propio de procesos de especiación "relativamente recientes". La reacción cruzada, con suero anti-*dengleri* preparado con la misma técnica en conejo, y los antígenos heterólogos de *vilaris*, *labyrinthicus* y *ocellatus*, vuelve a confirmar el dato anterior: 85,5 % de área integrada común, en la curva fotronreflectométrica de anti-*dengleri* versus *vilaris*, contra 83,8 % de anti-*vilaris* versus *dengleri* (fig. 3). También la posición de *labyrinthicus* frente a *dengleri* es parecida a la manifestada antes frente a *vilaris*.

El tercer test recíproco, con suero anti-*labyrinthicus*, resulta completamente congruente con los otros. La distancia de *dengleri* y *vilaris* es similar frente a *labyrinthicus*, pero entre *labyrinthicus* y *dengleri* la cantidad de antígenos comunes es ligeramente mayor que entre *labyrinthicus* y *vilaris* (fig. 4). En todos los tests mencionados evidentemente la especie que siempre se coloca a la máxima distancia de todas las demás es *ocellatus*. Un suero anti-*ocellatus* fue aun ensayado como reacción cruzada recíproca con *vilaris*, *dengleri* y *labyrinthicus*, y los porcentajes de áreas integradas homoheterólogas fueron también: 42,5 %, 48,1 % y 48,5 % respectivamente.

Las observaciones referidas demuestran que *Leptodactylus vilaris* presenta una notable afinidad serológica con *dengleri*, a nivel de "especie cercana", una afinidad mucho menor con *labyrinthicus* y una evidente distancia serológica desde *ocellatus*. Con test adicionales se pudo probar que esta

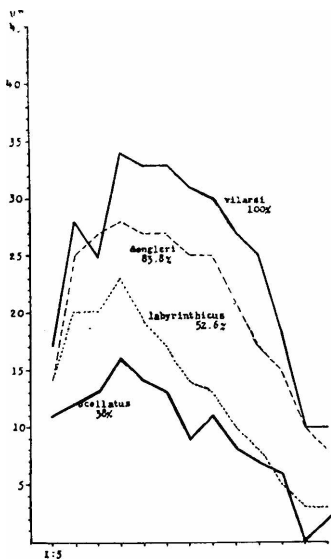


FIG. 2. — Curvas de las medidas fotoneflectométricas de las reacciones precipitativas de un suero anti-*Leptodactylus vilarsi* con suero homólogo y sueros de *L. dengleri*, *L. labyrinthicus* y *L. ocellatus*. (U. P. Unidades Photoner de Libby; diluciones progresivas de los antígenos a partir del 1:5, en Buffer de Evans.)

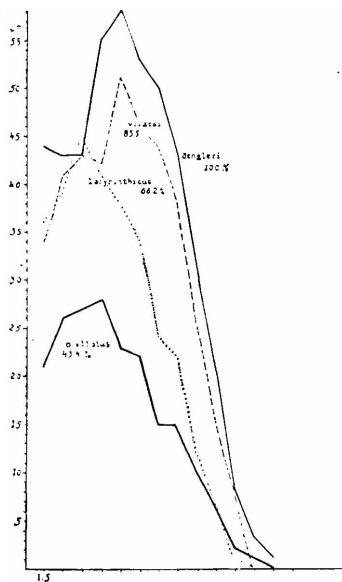


FIG. 3. — Curvas fotoneflectométricas de las reacciones homo-heterólogas de precipitinas entre un suero anti-*dengleri* y sueros de *vilarsi*, *labyrinthicus* y *ocellatus*.

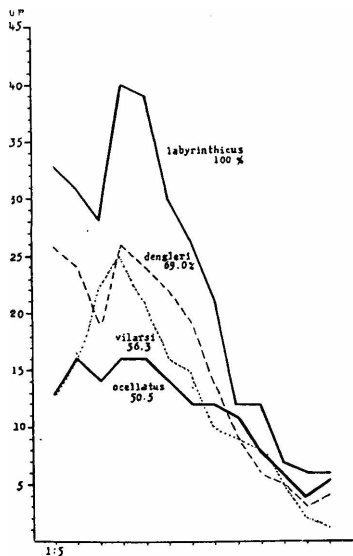


FIG. 4. — Curvas fotoneflectométricas de las reacciones homo-heterólogas de precipitinas entre un suero anti-*labyrinthicus* y sueros de *dengleri*, *vilarsi* y *ocellatus*.

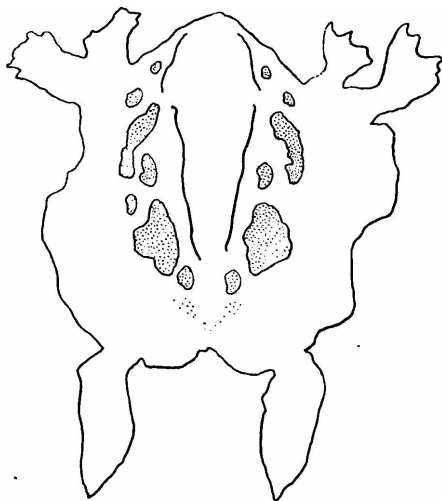


FIG. 5. — Macizos glandulares dorsales de *Leptodactylus vilarsi* (0,5. x).

última es del orden de la reinante entre *vilarsi* y otras formas del género *Leptodactylus* taxinómicamente muy diferenciadas: *laticeps* Boul. con 41,4 %; *bufonius* Boul. con 48,2 % y 50 % en las reacciones cruzadas, anti-*vilarsi* versus *bufonius* y anti-*bufonius* versus *vilarsi*.

DISCUSION

Se puede ahora comprobar que los resultados de las reacciones de precipitinas, donde se comparan sistemas específicos de proteínas, como las proteínas séricas, concuerdan completamente con los resultados analíticos, cromatográficos y biológicos, obtenidos sobre el mismo material por Erspamer y col. con respecto a otros sistemas altamente específicos de proteínas: los de las cadenas enzimáticas que determinan la biosíntesis de las aminas en las glándulas cutáneas y su peculiar "turnover-rate" individual.

La Tabla 1 resume el "espectro amínico" en *denngleri* y en *vilarsi*, siendo expresadas las sustancias activas en μg por g de tejido seco. Aparece clara la similitud general cualitativa de las sustancias encontradas, aminas indólicas, como la 5 HT y derivados, aminas fenólicas, como la leptodaetilina y aminas imidazólicas, como la histamina. Igualmente está presente, en ambos, con valores muy elevados, un polipéptido de poderoso efecto hipotensor, la ceruleína. Muy interesante es la absoluta evidencia de una intensa concentración de la actividad enzimática en los macizos glandulares que caracterizan la estructura de la piel látero-dorsal de *Leptodactylus vilarsi* (fig. 5). La bufotenidina, amina con efectos hipertensores relevantes, se halla en dosis de 7900 $\mu\text{g/g}$ en las glándulas y de 310 $\mu\text{g/g}$ en el resto de la piel; la misma 5-HT puede concentrarse allí de 295 $\mu\text{g/g}$ a 1600 $\mu\text{g/g}$, y lo mismo ocurre con la N-Metil-5 HT y la dehidrobufotenina, casi despreciables en la parte no glandular del tegumento. Enorme resulta también las síntesis peptídicas de la ceruleína en los macizos glandulares: desde 80-110 $\mu\text{g/g}$ a 4000-5500 $\mu\text{g/g}$. No cabe por el momento ninguna deducción ecofisiológica sobre el significado funcional o adaptativo de una diferenciación tisular tan intensa.

TABLA I

Contenido en aminas biógenas y polipéptidos hipotensores del tegumento de *Leptodactylus vilarsi* y *Leptodactylus dengleri* en $\mu\text{g/g}$ tejido seco. (Según Erspamer y col., 1969).

Sustancias activas	<i>Leptodactylus vilarsi</i> (Ecuador, 1968)		en todo el tegumento	<i>Leptodactylus dengleri</i> (Costa Rica, 1964). en todo el tegumento
	macizos glandulares	parte no glandular del tegumento		
INDOLICAS				
5 - HT	1600	65	295	20
N-Metil-5-HT	65	—	10	1
Bufotenina	—	—	—	—
Bufotenidina	7900	310	1440	550
Dehidrobufotenina	200	?	35	3
FENOLICAS				
Leptodactilina	300	57	95	11
IMIDAZOLICAS				
Histamina	870	32	155	25
POLIPEPTIDOS				
Afines a Ceruleína	4000--5500	80—110	670—910	40

Cuantitativamente el espectro amino-peptídico de *vilarsi* representa una exaltación del mismo patrón cualitativo existente en *dengleri*. Hemos visto por ende que en el mismo tegumento de *vilarsi* hay áreas diferenciadas cuya actividad biosintética aparece aumentada, desde 5 hasta 50 veces la actividad de las áreas no glandulares. Puede deducirse entonces que, si bien las "baterías enzimáticas" que provocan los procesos de hidroxilación, decarboxilación, transmetilación y ciclización desde los aminoácidos precursores, son las mismas a la vez en *dengleri* y en *vilarsi*, en este último su actividad se acrecienta sensiblemente. Quizá por diferencias específicas en el "optimum" del sustrato citoplasmático en el cual operan, quizá por diferencias, muy probablemente específicas, en el principio de información genómica que las determina.

Por otro lado la comparación del espectro amínico de *vilarsi* con los espectros amínicos de *labyrinthicus* (Misiones, Brasil) y aún de *pentadactylus* (Iquitos, Venezuela) no deja lugar a ninguna duda sobre sus reales afinidades. Mientras con *dengleri* —hemos visto— las diferencias son meramente “cuantitativas”, con *pentadactylus* y *labyrinthicus* son eminentemente cualitativas, y de envergadura. *L. pentadactylus* carece de bufotenidina, presente en *dengleri-vilarsi* y posee candicina, ausente en aquellos. También *labyrinthicus* carece de bufotenidina, presentando además cuatro peculiares derivados histamínicos. Aquí no se trata solamente de “refuerzos”, o menos, de efectos fisiológicos cuantitativos. Se trata sin embargo de falta respectiva, específica, de sistemas enzimáticos para ciertos tipos de biosíntesis; pues de proteínas altamente caracterizadas, cuya ausencia o presencia es consecuencia ineludible de cierta información codónica, o no, en base a los conceptos genéticos corrientes.

Por lo que se ha ido sucesivamente exponiendo, estamos en presencia de dos vías evolutivas paralelas seguidas en el curso de la diferenciación filética del género *Leptodactylus*, por los sistemas genéticos de información, determinantes por un lado de la síntesis de las albuminoglobulinas séricas, con valor de antígenos específicos, y por el otro de las enzimas destinadas a la biosíntesis aminopeptídica del tegumento. Es dado pensar que *L. vilarsi* haya estado en más estrecha relación filética con los precursores de *dengleri* que con los de *labyrinthicus*, o de otras formas del género. La correspondencia actual de los espectros amínicos y de la cantidad de antígenos séricos comunes está en favor de esa posibilidad. Es poco probable que el mencionado paralelismo en la determinación genómica de ambos sistemas de información sea casual, en formas morfológicamente tan cercanas y pertenecientes, por su distribución geográfica, a la misma área de génesis. La coincidencia de resultados analíticos obtenidos con métodos del todo diferentes y teniendo por objeto caracteres fisiológicos independientes, vuelve así a sustentar la eficaz aplicación de criterios no morfológicos a la taxinomia y filogenia.

BIBLIOGRAFÍA

- CEI, J. M., 1965. Observaciones preliminares sobre las formas alto-ama-zónicas de *Leptodactylus* del grupo *rubido-vilarsi*. Acta IIIº Congr. Latinamer. Zool. Santiago de Chile. Oct. 1965. Investnes zool. chil. (en prensa).
- CEI, J. M. y R. COHEN, 1965. Serological relationships in the *Leptodactylus (pachypus)* species group. Copeia, 2:155-158.
- CEI, J. M., V. ERSPAMER, and M. ROSEGHINI, 1967. Taxonomic and evolutionary significance of biogenic amines and polypeptides occurring in amphibian skin. I. Neotropical leptodactylid frogs.-Syst. Zool., 16:328-342.
- ERSPAMER, V., M. ROSEGHINI, and J. M. CEI, 1964. Indole, imidazole, and phenylalkylamines in the skin of thirteen *Leptodactylus* species.-Biochem. Pharmac., 13:1083-1093.
- FALCONIERI ERSPAMER, G. y J. M. CEI, 1969. Biogenic amines and active polypeptides in the skin of *Leptodactylus vilarsi* Melin.-Biochem. Pharmac., (en prensa).
- MELIN, D., 1941. Contributions to the knowledge of the Amphibia of South-America. Göteborgs K. Vetensk.-o. VitterhSamh. Handl.

Instituto de Biología Animal, Fac. Cienc. Agrarias, Univ. Nac. de Cuyo, Mendoza, Argentina.