

RELACIONES TAXONOMICAS Y EVOLUCION BIOQUIMICA DE LAS AMINAS
BIOGENAS EN EL GENERO LEPTODACTYLUS.

J.M.Cei y V.Erspamer

La utilización de datos, fisiológicos o bioquímicos, para la caracterización taxonómica, ya pertenece a métodos corrientes en sistemática desde hace varios años y ha contribuido positivamente a la definición de relaciones y afinidades discutidas. La producción por un organismo de cualquier compuesto o grupo de compuestos afines corresponde a reacciones moleculares, fundamentalmente enzimáticas, cuyo principio específico de información genética se indica actualmente en términos de códigos nucleotídicos. Nuestras observaciones tienen principalmente por objeto compuestos derivados de aminoácidos, aminas y polipéptidos. La presencia en un sistema funcional, en especies diversas, del mismo espectro de sustancias, debidas a la acción de enzimas similares, es índice evidente de parentesco o de raíces filogenéticas comunes. El análisis de los patrones funcionales o metabólicos, como resultados de líneas evolutivas distintas en un cierto phylum, lleva así a conclusiones comparables con las conclusiones de la morfología.

El género Leptodactylus, de la familia o superfamilia de los anfibios anuros Leptodactylidos, representa un conjunto bastante heterogéneo de formas neotropicales, reunidas por algunos caracteres osteológicos y exosomáticos, pero separadas en varios "stocks" por su biología: reproducción, canto, etología, etc.. Se debe a A.Lutz (1927, 1930), un bosquejo preliminar de sus grupos fundamentales, el que es todavía aceptable en sus grandes rasgos. Varios autores han trabajado luego profundizando el conocimiento de algunas especies, desmembrando otras, estableciendo gradientes de afinidad, etc., pero, como en el planteo de Lutz, cuatro líneas morfo-fisiológicas se evidencian en la evolución general del taxon, a saber: el conjunto de formas mayores, denominado Pachypus por el llamativo desarrollo braquial en el sexo masculino, de canto grave y espaciado, de desove en masas de espuma no flotantes sino puestas en depresiones circulares en los bordes de las lagunas; el conjunto numeroso de formas de tamaño mediano, o Cavícola, sin caracteres sexuales secundarios osteo-miológi

cos evidentes, de canto o silbido agudo y repetido, de des-
ve limitado en masas ovoidales de espuma densa, en nidos sub-
terráneos característicos; las formas de transición pequeñas,
o Platymantis, de canto apagado, de caracteres sexuales pare-
cidos a los de Psichopus, pero más deprimidos, de reproduc-
ción acuática; y, en fin, las formas diminutas, de canto agu-
do y de reproducción directa, con posturas en ambientes te-
rrestres húmedos, o conjunta "marmoratus" ("nanus"). Como
veremos aquí la pertenencia a aquellos grupos resulta inequi-
vocable para algunas formas, más incierta para otras, a la
vez por su morfología y por el estudio de algunas de sus sus-
tancias funcionales activas: como siempre ocurre en un análi-
sis o reconstrucción de procesos evolutivos.

La piel de estos anfibios, verdadera mina de produc-
tos biógenos, nos ha ofrecido, con las alquilaminas, indóli-
cas, fenólicas e imidazólicas, derivadas del triptófano, de
la tirosina y de la histidina, respectivamente, un elemento
muy interesante de investigación. A pesar de que quedan al-
go inciertos algunos de los eslabones químicos que llevan
desde el triptófano, y su derivado inmediato o 5-hidroxitrip-
tófano, a la 5-hidroxitriptamina y sus numerosas formas meti-
ladas, se conoce en general la serie de procesos enzimáticos,
de decarboxilación, transaminación, etc., que aseguran las
transformaciones de los compuestos indólicos de origen bióge-
no. Asimismo se han identificado compuestos fenólicos cono-
cidos, tal como la leptodactilina, la p-tyramina, e la candi-
cina, y compuestos imidazólicos, como la histamina e la spi-
naceamina y sus formas metiladas (Erspamer y Col., 1963, 1964).
Sin duda la presencia de tan amplio espectro de aminas bióge-
nas es prueba de que la piel de estos anuros posee en grado
mayor o menor actividad de ácido-aromático-decarboxilasa, de
triptófano-5-hidroxilasa, y de N-metiltransferasa. La repar-
tición, exaltación o limitación de tales poderes enzimáticos,
reviste sin embargo una decidida fisonomía sistemática, cuyas
consecuencias pueden traducirse en una verdadera clasificac-
ción, que será a continuación indicada.

Señalamos brevemente los materiales y técnicas utili-
zados. A la separación del tegumento total del animal fresco
y su desecación -alguna vez reemplazada por una extracción
acetónica o metanólica directa- sigue la extracción acetónica
o metanólica, la decantación del extracto, la reextractación
y la filtración del extracto total, muy estable. Las técni-
cas de estudio para el reconocimiento y evaluación cuantitati-
va de las sustancias activas, cuyos valores se darán luego de

esta comunicación siempre en $\mu\text{g}/\text{gr}$ de piel seca, se han realizado en los Laboratorios del Instituto de Farmacología de la Universidad de Parma, por cromatografía ascendente unidimensional, con papel Whatman-1- y solventes n-butanol-ácido acético-agua (4: 1: 5), n-butanol monometilamina 30% (8: 3) etc. Se usaron patrones químicamente puros y numerosos reactivos (Pauly, p-nitroanilina, Gibbs, Folin-Ciocalteu, etc.). Se realizaron además ensayos biológicos sobre útero de rata atropinizado, ileón de cobayo en solución de Krebs, y músculo rectus-abdominis de rana. Exponemos ahora rápidamente los resultados en sus aspectos zoológicos.

El grupo Pachypus es el más rico en aminas biógenas, permitiendo su distribución agrupar a sus formas, con un paralelismo llamativo con los caracteres morfológicos. Una primera sección comprende el grupo ocellatus (Linné), con las especies crípticas chaquensis Gei y, según Gallardo, macrosternum Miranda-Riveiro, más el afín bolivianus Boulenger, especie de la "Hylaea", o alto amazónica. Todos tienen leptodactilina: en menor cantidad chaquensis (55-530 $\mu\text{g}/\text{gr}$), más bolivianus (420-1100 $\mu\text{g}/\text{gr}$) y aun más ocellatus (300-7000 $\mu\text{g}/\text{gr}$); con máximos de hasta 10.000 o 20.000 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en muestras de la región litoral!...). Las variaciones cuantitativas de leptodactilina no parecen significativas en distintas estaciones del año, ni tampoco revisten significado sexual, pero sí rasgos de variación geográfica, particularmente evidente en poblaciones de ocellatus. Además de las fenolalquilaminas, la piel de los leptodáctilos de esta sección, no posee ninguna otra amina, ni indólica, ni imidazólica.

Una segunda sección abarca a las especies de gran tamaño del conjunto pentadactylus Laurenti y laticeps Boulenger. Todas resultan sumamente pobres en leptodactilina (2-15 $\mu\text{g}/\text{gr}$) pero poseen cantidades apreciables de 5-HT y en algunos casos de sus derivados, y también compuestos imidazólicos, probablemente en relación estos últimos con las fuertes propiedades alérgicas de estos Anuros. La probable poca consistencia biológica de una sola especie pentadactylus es confirmada por nuestro "screening". Varios autores entre los cuales Bockerman (1957) y Gallardo (1964) ya aceptaron como buena especie flavopictus Lutz, y también, cuando se conozca mejor su biología y etología, deberá considerarse la jerarquía específica de labyrinthicus de Misiones y sur de Brasil, de pentadactylus de Amazonia, y de danzleri centroamericano.

Leptodactylus pentadactylus labyrinthicus posee una notable cantidad de 5-HT (200-1900 $\mu\text{g}/\text{gr}$), pero carece de sus de

rivados metilados; entre los imidazoles una cantidad apreciable de histamina (100-740 $\mu\text{g}/\text{gr}$), de N-metil-histamina (100-670 $\mu\text{g}/\text{gr}$), de N,N-dimetil-histamina, de spinaceamina (20-120 $\mu\text{g}/\text{gr}$) y de 6-metil spinaceamina (100-425 $\mu\text{g}/\text{gr}$). L. pentadactylus pentadactylus posee menor cantidad de 5-HT (140 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en muestras de Iquitos, Perú, 230 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en Cumaná, Venezuela), pero también un compuesto análogo a la leptodactilina, pero menos activo, la candicina, nunca encontrada en organismos animales, trazas de p-tyramina, y sólo cantidades limitadas de histamina (10-20 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en Iquitos, pero 150 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en Cumaná, Venezuela). L. pentadactylus dengleri se caracteriza por el contenido mínimo de 5-HT (20-65 $\mu\text{g}/\text{gr}$) pero elevado es el contenido de bufotenidina (600 $\mu\text{g}/\text{gr}$) con trazas de N-metil-5-HT y dehidrobufotenina; la histamina baja a 25-35 $\mu\text{g}/\text{gr}$, los otros derivados imidazólicos están ausentes. Se puede pues concluir que la actividad enzimática de la piel de las tres formas trinomialles de pentadactylus es completamente distinta, y sin duda es esto un elemento crítico que merece consideración en una próxima revisión del conjunto.

Leptodactylus laticeps se acerca a los pentadactylus. Contenido harto elevado de 5-HT (280 $\mu\text{g}/\text{gr}$) y de histamina (280 $\mu\text{g}/\text{gr}$); trazas de spinaceamina, como labyrinthicus.

El grupo Cavicola, estudiado en las especies bufonius, prognathus (a la vez la forma prognathus Boulenger y anceps Gailardo), sibilatrix, metacina, gracilis, de diferentes localidades, se identifica netamente por sus caracteres negativos; sólo escasa cantidad de leptodactilina (1-7, excepcionalmente 15 $\mu\text{g}/\text{gr}$), ausencia de indoles, imidazoles y de cualquier otra sustancia activa. Un grupo bien homogéneo, por la actividad enzimática de la piel, así como por los caracteres bio-químicos.

Sobre el conjunto Marmoratus lamentamos no tener hasta ahora noticias suficientes por la escasez casi total del material disponible, pero datos interesantes pueden analizarse y discutirse para algunas formas de la sección Platymantis de Lutz, y para algunas de aquellas formas pertenecientes al conjunto rubido-vilarsi, cuya posición necesita todavía una aclaración mejor.

A pesar de la opinión de Cochran (1955), una atenta discusión crítica que no cabría en el presente tema, permite sustentar la validez de Leptodactylus caliginosus, terra typica Río de Janeiro, como forma representativa de platymantis, reemplazada en otras regiones por formas vicarias como podicipinus, petersi, pustulatus, natalensis, etc. y en relación con las po

blaciones de melanonotus, las que llegan al Norte hasta México. De acuerdo con nuestras observaciones hay afinidades entre estas formas. Las aminas biógenas de su piel consisten siempre en leptodactilina (3100-5300 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en podicipinus, 750 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en petersi, 255 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en melanonotus), en cantidades bastantes variables de 5-HT (640 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en podicipinus, 1-1.5 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en petersi, 35 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en melanonotus) y pequeñas cantidades de bufotenidina (15-20 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en podicipinus, 2.5-3 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en petersi, 25 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en melanonotus). Pueden así comprobarse diferencias cuantitativas (y probablemente en la "turnover rate") pero sustancialmente el patrón enzimático parece ser común, y se puede reconocer una fisonomía propia bajo este aspecto, a la sección Platymantis de Lutz.

Las especies del grupo amazónico rubido y el localizado Leptodactylus curtus Barbour y Noble, alto amazónico, y de la costa de Tumbes, en Perú, subrayan por un lado convergencias hacia los grandes Pachypus (caracteres sexuales secundarios; considerando además el gran tamaño de los vitelinos); por otro, ciertas relaciones morfológicas, pigmentarías, etc. y probablemente etológicas con los Platymantis. Todas estas formas presentan en común una glándula lumbar evidente, acen tuada en curtus y en ciertas muestras de rubido. Modestos matices glandulares, pero femorales, han sido señalados por Gallardo en Locallatus de Argentina. Asimismo algunos caracteres somáticos, en especial la morfología del cráneo, podrían hacer confundir Leptodactylus curtus con ciertos representantes de los Cavicola.

Pero el cuadro de las aminas biógenas acerca estas especies al sistema propio de Platymantis. Modesta presencia de 5-HT (7 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en rubido, 60-70 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en curtus), de bufotenidina (40-45 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en rubido, 10 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en curtus) y contenido más elevado de leptodactilina (200 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en rubido; 1000 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en curtus). Las relaciones filéticas resultan entonces mucho mayores entre Platymantis y Pachypus, que entre ambos grupos y Cavicola. Es posible que foras, probablemente de un "stock" filético antiguo, de las cuales hayan derivado los actuales curtus y rubido, puedan representar un estadio más generalizado y quizás más primitivo en el largo proceso de especiación de Leptodactylus.

Hay finalmente otro hallazgo de notable importancia, todavía en estudio por Espanner y Col., que acentúa las relaciones entre las mencionadas ramas evolutivas de Leptodactylus y sus aspectos bioquímicos. Existe en las especies mayores del grupo Pachypus una sustancia de efecto hipotensivo poderoso,

diferente de las bradiquininas clásicas. Este factor, de naturaleza polipeptídica, cuyo aislamiento está en curso, parece existir también en rubido y en curtus, pero resultaría ausente en el conjunto ocellatus-chaquensis, además que en Cavicola. La similitud entre la evolución bioquímica de las aminas biógenas y la de los polipéptidos hipotensores es un dato que merece atención, y refrenda nuestras argumentaciones anteriores. Su singular paralelismo con las conclusiones de la morfología subraya la gran independencia filética de Cavicola y Pachypus, y en esa última rama sugiere una separación precoz del conjunto ocellatus, probablemente en especiación actual, de Leptodactylus laticeps, y del conjunto pentadactylus, al cual más directamente se aproximaría el grupo rubido, a su vez en relación posible pero más lejana con formas ancestrales de Platymantis. Muy interesantes las afinidades encontradas aquí entre rubido y curtus, especie peculiar, con probable significado de relicto, aun por su aislada distribución geográfica, en la costa noroeste de Perú, donde ocupa ecotipos tropicales especializados, enclavados en verdaderos desiertos y carentes de otros representantes del género Leptodactylus.

RESUMEN

La comparación de los patrones específicos de las aminas biógenas en la piel de los anuros del género Leptodactylus, permite establecer claras afinidades de valor taxo-genético y sistemático. Los grupos originariamente propuestos por Lutz corresponden a la distribución específica de los patrones mencionados. El grupo "Cavicola" se caracteriza por una casi absoluta ausencia de aminas biógenas. El grupo "pachypus" al contrario manifiesta una variedad extraordinaria de aminas indólicas e imidazólicas (pentadactylus-laticeps) o gran producción de aminas fenólicas (ocellatus-chaquensis-bolivianus). Otros patrones característicos diferencian a las formas del grupo "platymantis" y a las del conjunto rubido. Estos métodos bioquímicos se revelan pues de interés para integrar conclusiones derivadas del análisis morfológico y ecológico en un planteo sistemático moderno.

SUMMARY

The comparison of the patterns of the biogenic amines in the skin of species of anurans in the genus Leptodactylus, permits us to establish clear affinities of taxo-genetic and systematic value. The groupings originally proposed by Lutz correspond to the distribution of the species patterns mentioned above. The group "cavicola" is characterized by an almost absolute absence of biogenic amines. The "pachypus" group on the other hand, shows an extraordinary variety of indoles and imidazoles (L.pentadactylus, L.laticeps) or great amounts of phenolic amines (L.ocellatus, L.chaquensis, L.bolivianus). Other characteristic patterns differentiate the forms of the "platymantis" group and those of the allied L.rubido. These biochemical methods are revealed as of interest for inclusion with conclusions derived from morphological and ecological analysis in a modern systematic treatment.

Agradecemos a los Colegas Dres. R.Donoso B., J.Vial e Ing. V. G.Roig, por su colaboración en la obtención de materiales de Venezuela y Costa Rica.

LITERATURA CITADA

- BOKERMAN, W.C.A. 1957. Notas sobre la biología de Leptodactylus flavopictus Lutz, 1926. Rev. Bras. Biol., 17, 4: 495-500.
- COCHRAN, D.M. 1955. Frogs of Southeastern Brasil. Unit. States Nat. Mus. Bul., 206: 1-422
- ERSPAMER, V., CEI, J.M. y M. ROSEGHINI. 1963. Occurrence of Candicine (p-hidroxyphenylethyltrimethylammonium) in extracts of the skin of Leptodactylus pentadactylus pentadactylus. Life Science, 11: 825-827.

- ERSPAMER, V., VITALI, T., ROSEGHINI, M. y J.M. CEI. 1963. Occurrence of new imidazolealkylamines (spinaceamine and 6-methylspinaceamine) in skin extracts of Leptodactylus pentadactylus labyrinthicus. Experientia, 19, 346: 1-4
- ERSPAMER, V., VITALI, T., ROSEGHINI, M. y J.M. CEI. 1964. The identification of new histamine derivatives in the skin of Leptodactylus. Arch. Biochem. Biophys., 105, 3: 620-629
- ERSPAMER, V., ROSEGHINI, M. y J.M. CEI. 1964. Indole-imidazole- and phenylalkylamines in the skin of thirteen Leptodactylus species. Bioch. Farmac., 13: 1083-1093
- GALLARDO, J.M. 1964. Consideraciones sobre Leptodactylus ocellatus (L) y especies aliadas. Physis, 24, 68: 373-384
- LUTZ, A. 1926. Observações sobre Batrachies brasileiros: I-O genero Leptodactylus Fitzinger. Mem. Inst. O.Cruz, 19, 2: 139-174
- 1930. Segunda memoria sobre especies brasileiras do genero Leptodactylus incluindo outras aliadas. Mem. Inst. O.Cruz, 23, 1: 2-34

Instituto de Biología
Universidad Nacional de Cuyo
Mendoza (Argentina)

e Instituto di Farmacologia
Università di Parma
Italia

Publicado en Acta III° Congreso Latinoamericano de Zoología.
Santiago de Chile - Octubre 1965. Investigaciones Zoológicas
Chilenas