

SUBSTANCIAS ACTIVAS DE LA PIEL Y SU INTERES PARA LAS RELACIONES TAXONÓMICAS GENERALES DE LOS HYLIDOS

BIBLIOTECA  
JORGE D. WILLIAMS

J.M.Cei y V.Erspamer

El estudio de las sustancias de la piel de los Anfibios, producidas por enzimas específicas a partir de aminoácidos y dotadas de actividad biológica, nos ha permitido reunir y analizar para la gran superfamilia Hylidae una larga serie de datos sobre aminas biógenas y polipéptidos de acción hipotensora. Nuestras observaciones, por su extensión y por los datos que a continuación se exponen, pueden servir para una discusión de las relaciones evolutivas y taxonómicas generales del grupo.

Las técnicas empleadas en el reconocimiento de las aminas y polipéptidos, realizadas en los Laboratorios del Instituto de Farmacología de la Universidad de Parma, se han fundado en la cromatografía en papel y elución en columna de alumina, en la cromatografía por intercambio iónico sobre columna de Amberlita GG50, y en ensayos de actividad biológica sobre órganos aislados. Los extractos metanólicos o acetónicos de pieles secas, siempre obtenidos de especímenes vivos y en condiciones naturales, oportunamente decantados y filtrados se conservan bien durante mucho tiempo. En los procesos cromatográficos se han utilizado varias mezclas de solventes, patrones de alta pureza química, y se han comparado numerosos reactivos. La concentración de alquilaminas en nuestras evaluaciones será expresada siempre en µg/gr de piel seca.

Se debe destacar en seguida la gran pobreza de aminas biógenas -indólicas, fenólicas e imidazólicas- presentada en general por todos los Hylidos, en comparación por ejemplo con los Leptodactylidos. Los representantes neotropicales del género Hyla, de los cuales hemos examinado 22 especies, desde México hasta Argentina, aparecen prácticamente "vacíos" de aquellos derivados del triptófano, de la tirosina y de la histidina. En particular la 5-HT está en ellos casi siempre ausente o en trazas despreciables: algo diferente parece ser pues la actividad de la triptófano-5-hidroxilasa en las formas del stock euro-asiático arborea (80-100 µg/gr en arborea arborea; 10 µg/gr en arborea japónica) y aun más en las formas australianas (Hyla coerulea, Hyla infrafronata: 200 µg/gr de 5-HT; Hyla aurea, abundantes trazas: Erspamer y Col., en publicación).

Las aminas fenólicas, cuando están presentes, aparecen sumamente reducidas en todas las Hylas. Existen cantidades modestas de leptodactilina (entre  $<1$  y  $17$ ) en Hyla raddiana (= pulchella), semiguttata, faber, laniciformis, raniceps, albomarginata, ansper, fuscovaria, multilineata, sólo trazas en havi, septentrionalis y en cinerea de Estados Unidos; son aparentemente del todo "vacías", maxima, rosenbergi, legleri, chaneque, boulengeri, uranochroa, versicolor, rufioculus. Un poco más elevado resultaría el contenido de leptodactilina en el grupo rubra: máximos de hasta  $50 \mu\text{g}/\text{gr}$  en Hyla nasica de Tucumán, y  $8,5$  en trachytorax de la misma región y de Misiones (Argentina).

No se ha podido señalar histamina u otros derivados imidazólicos en ninguna Hyla neotropical, pero las especies australianas del grupo coerulea (en estudio por Erspamer, Eudean y Col.), aun manteniendo como las neotropicales una extraordinaria escasez o ausencia de leptodactilina y demás fenolalquilaminas, presentan una concentración notable de histamina y otras imidazolalquilaminas, todavía en estudio, subrayando nuevamente grandes diferencias en la evolución de los sistemas enzimáticos de la piel entre las dos ramas australes del género Hyla, tan aisladas por su distribución geográfica.

Prácticamente "vacíos" de aminas biógenas resultan los géneros Sphaenorkynchus (sólo  $1 \mu\text{g}/\text{gr}$  de leptodactilina en aurantiacus), Pternophyla (P.fodiens), Osteocephalus (sólo  $2 \mu\text{g}/\text{gr}$  de leptodactilina en taurinus), Trachycephalus (T.nigromaculatus), y también Aparasphenodon (A.brunci), Diaglena (D.reticulata) y Tripidon (T.petasatus). Phrynohyas hebes (= Hyla venulosa Laurenti) del Gran Chaco, a pesar de su renombre, como otros congéneres, de anfibio dotado de secreciones sumamente irritantes, no ha revelado al análisis cromatográfico, más que trazas de leptodactilina y concentración limitada de histamina ( $30-50 \mu\text{g}/\text{gr}$ ) con fuertes variaciones individuales.

Las indolalquilaminas están presentes sólo en Anotheca coronata de México ( $125 \mu\text{g}/\text{gr}$  de 5-HT) y en Smilisca de la misma región: entre  $12-35 \mu\text{g}/\text{gr}$  en phaecota-baudini-gyanosticta, trazas poco reconocibles en puma, sordida, sila y xystocera. Todas las "Hylas marsupiales" hasta aquí examinadas (Gastrotheca boliviana, marsupistum, peruana) se han demostrado en fin. completamente carentes de alquilaminas.

Llegamos ahora a una rama especializada de Hylidos neotropicales, probablemente muy independiente en su evolución de las otras ramas del phylum, lo que es dado sospechar también por consideraciones serológicas preliminares (Cei, 1963). Se trata de Phyllomedusa y Bradymedusa, arborícolas, caracterizadas

por las modificaciones adaptativas de sus extremidades, por sus curiosas oviposturas entre las hojas, y por su biología casi completamente independiente de la vida acuática.

Las revisiones principales del género Phyllomedusa han sido las de Boulenger (1882) y de Funkhouser (1957), que ha subrayado su interés filético y su probable relación directa con Hyla, a través de una serie de estadios adaptativos, en particular de la sección Agalychnis, menos especializada. Contribuciones importantes sobre estos Anuros han sido dadas también por Bertha Lutz (1950). Tenemos datos sobre formas del grupo centro-americano Agalychnis (anna, callidryas callidryas, callidryas taylori, saltator, helenae) las que se caracterizan por falta de glándulas parótidas y membranas interdigital amplia; del grupo mexicano afín Dacnicolor (dacnicolor); del grupo brasileño-chaqueño Burmeisteri (burmeisteri, sauvagii), altamente especializados por sus parótidas alargadas y sus dedos oponibles, y del grupo Bradymedusa (hypochondrialis, rhodei), las dos últimas correspondientes a Pithecopus de Lutz.

La piel de todas las Phyllomedusas presenta cantidades muy modestas de fenol- e indolalquilaminas, faltando prácticamente de imidazolalquilaminas. En P. sauvagii de Tucumán, por ejemplo, la leptodactilina no supera 7,5 µg/gr de piel seca, y la 5-HT 8-11 µg/gr (medida, ésta última, por su actividad biológica en útero de cobayo aislado). Pero —a gran diferencia de todos los géneros de Hylidos neotropicales estudiados, y análogamente a lo que se observa en ciertos Hylidos australianos (Hyla coerulea, H. infrafrenata), en los Ránidos, en los Liopelmátidos, y en algunos géneros de Leptodactílidos (Physalaemus, ciertos Leptodactylus, por ejemplo)— la piel de Phyllomedusa produce mezclas de polipéptidos de poderosa actividad bradiquinínica, cuya identificación, secuencia estructural y dosaje farmacológico se encuentran en un estado avanzado de investigación.

Estas sustancias, cuya inactivación se provoca fácilmente por incubación mediante quimotripsina, se han estudiado hidrolizando las eluciones de las manchas obtenidas por partición cromatográfica, y su actividad biológica ha sido medida preliminarmente mediante ensayos de los extractos metanólicos brutos en varios tests fisiológicos, como la presión sanguínea del perro, el efecto sobre el útero aislado de rata o el intestino grueso de perro y conejo. Así, por ejemplo, Phyllomedusa sauvagii produce efectos sobre la caída de la presión sanguínea del perro comparables a los de 800-1200 µg/gr de bradiquinina por gr. de tejido; en Phyllomedusa rhodei son comparables a los de 1500-200 µg/gr de bradiquinina (Erspamer, Bertaccini y Cei,

1962).

Por elución en concentración progresivamente reducida de alcohol etílico sobre residuos secos de extractos metanólicos de piel fresca, absorbidos en columna de alumina alcalina, se han podido observar en P. sauvagii "maximus" diferentes de intensidad en la actividad polipeptídica, correspondientes a las eluciones en alcohol 70%, 6% y 50-40%, respectivamente. Se puede considerar pues que actúan en esta especie por lo me nos tres grupos de polipéptidos: el polipéptido A (70%), el más parecido farmacológicamente a la bradiquinina, el polipép tido B (60%), de efectos hipotensivos muy largos, mucho más largos que los provocados por toda otra sustancia similar, y el polipéptido C (50-40%), cuya curva de contracción en el test sobre ileon de cobayo aislado resulta drásticamente dife rente de la de las bradiquininas.

La producción y la mezcla de polipéptidos en Phyllome dusa parece seguir siempre un patrón específico: así Phyllome dusa rhodei y Phyllomedusa hypochondrialis abundan en polipép tidos de analogías bradiquinínicas parecidas al polipéptido A de sauvagii, pero son pobres en polipéptidos B y C, conteniendo por otro lado abundantes polipéptidos pequeños, triptofáni cos. Una verdadera variación geográfica parece ocurrir en al gunas de estas especies. Así, muestras de hypochondrialis de Rondonia (Amazonia, Brasil), presentan actividades polipeptídi cas de 20-200 veces más intensas que las muestras de Resistencia (Chaco Austral). También Phyllomedusa burmeisteri revela un poderoso efecto hipotensivo, como el de sauvagii, probable mente debido a las mismas sustancias, provisoriamente indica das como polipéptido B. Es notable la mayor densidad de estos productos de la actividad glandular en la región parotídea, en burmeisteri como en sauvagii. Los efectos fisiológicos de los extractos parotídeos de burmeisteri son en efecto 6 veces más activos que los del resto de la piel.

Sumamente activos, estando todavía en estudio, son en fin los extractos cutáneos de otras especies, del grupo Dacni color-Agalychnis. Phyllomedusa annae, por ejemplo, presenta una actividad biológica sobre ileon de cobayo aislado, por ca da gr. de su piel seca, equivalente a la de 20 mg de bradiqui nina pura, y contiene, como otras formas afines, también las sustancias hipotensivas de "efecto muy largo" características de sauvagii.

Resumiendo: una vez que se hayan completado nuestras investigaciones sobre los productos en equilibrio funcional del metabolismo y de las actividades enzimáticas de la piel de los

anfíbios, será posible establecer verdaderas claves de identificación de especies y grupos naturales, en base a su diferenciación evolutiva bioquímica. Por el momento nos permitimos subrayar con suficiente énfasis: 1°) la gran especialización y la probable independencia, o por lo menos la muy precoz separación filética, de Phyllomedusa, con rasgos adaptativos propios, del gran stock ancestral de los Hylidos; 2°) la gran convergencia de Phyllomedusa neotropical con ciertos grupos de Hylidos australianos, como coerulea e infrafronata, cuya revisión futura merece toda atención; 3°) la uniformidad manifiesta entre las formas neotropicales del género Hyla por la especialización de las actividades enzimáticas de su piel, uniformidad fundada sobre todo en caracteres negativos (carencia o suma escasez de aminas biógenas y polipéptidos activos); 4°) la pobreza general de indolalquilaminas y de polipéptidos activos (con la excepción de escasas triptotoquininas) presentada por los géneros numerosos de Hylidos neotropicales, aun altamente especializados como Gastrotheca, Osteocephalus, Aparasphenodon, Shoenorhynchus, Triplicon, Pternohyla, Trachycephalus, Diadlena. Interesante la existencia de cantidades más elevadas de indolalquilaminas en Anotheca coronata y en Smilisca, grupo éste último quizás en proceso de especiación actual (cfr: Duellman, com. pers.).

Se concluye que hasta que no se definan las relaciones reales entre Hylidos de Australia y de Sudamérica, sería por lo menos justificada, en base a la constancia y significado de nuestras observaciones, sustentar una mejor separación taxonómica entre Phyllomedusinae e Hylinae neotropicales, grupos que evidentemente han seguido in situ, desde un tiempo muy extenso, un proceso propio de evolución, probablemente independiente, en sus estructuras de información genética y en sus expresiones adaptativas.

## RESUMEN

La comparación de los espectros específicos, cuali-cuantitativos, de aminas biógenas y polipéptidos activos, producidos por actividad enzimática de la piel, lleva a conclusiones de interés taxonómico también en la super familia Hylidae (Amphibia, Anura). Se subraya la gran especialización y probable separación filética precoz de Phyllomedusa, en sus varias secciones, caracterizada por el escaso contenido de aminas, pero por una extraordinaria variedad y abundancia de polipéptidos, en algunos casos dotados de acción hipotensora poderosa, y más activos que las bradiquininas clásicas. Estas características se hallan en común con especies australianas del género Hyla que además son ricas en derivados imidazólicos. Las especies neotropicales del género Hyla son todas sumamente pobres de alquilaminas, y también de polipéptidos activos. Asimismo los géneros neotropicales Osteocephalus, Sphoenorhynchus, Pternohyla, Tripurion, Aparasphenodon, Trachycephalus, Diaglena, Gastrotheca, carecen prácticamente de aminas y polipéptidos activos. Cantidades algo apreciables de 5-HT se encuentran solamente en Anothea coronata y en algunas formas del grupo Smilisca.

## SUMMARY

The comparison of the specific spectra, qualitative-quantitative of the biogenic amines and active polypeptides, produced by enzyme activity in the skin, leads to interesting taxonomic conclusions on the super family Hylidae (Amphibia; Anura). It must be underlined the great specialization and probably early origin of Phyllomedusa, in its various sections, which is characterized by the limited number of amines, but extraordinarily varied and abundant polypeptides, in some cases endowed with powerfully hypertensive action, and the most active of the classical bradykinines. These characteristics are shared in common with some Australian species of the genus Hyla, which are furthermore rich in the derived imidazoles. The Neotropical species of the genus Hyla are all exceedingly poor in alkylamines and also active polypeptides. Likewise the Neotropical genera Osteocephalus, Sphoenorhynchus, Pternohyla, Tripurion, Aparasphenodon, Trachycephalus, Diaglena, and Gastrotheca, lack practical

In all anurans and active polypeptides. Appreciable quantities of 5-HT are found only in Anotheca coronata and some forms of the group Smilisca.

---

Se agradece la valiosa colaboración de los Dres. W. Duellman de la Kansas University, Lawrence, U.S.A. y C.G. Goin de la Florida State University, Gainesville, U.S.A. y del Ing. V.G. Roig de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, a quienes se debe interesante material de la región centro-americana.

---

#### BIBLIOGRAFÍA

- BOULENGER, G.A. 1882. Catal. Batr. Sal. Brit. Mus., pp. 422-430.
- CEI, J.M. 1963. Some precipitin tests and preliminary remarks on the systematic relationships of four Southamerican families of Frogs. Serol. Bull. Rutgers Univ., 30: 4-6.
- FUNKHOUSER, A. 1957. A review of the neotropical tree-frogs of the genus Phyllomedusa. Occ. Pap. Nat. Hist. Museum Stanford Univ., 5: 1-90.
- LUTZ, B. 1950. Anfíbios Anuros da Coleção A. Lutz do Inst. O. Cruz. Mem. Inst. O. Cruz, 48: 599-637.

— 0 —

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

---