

Rev. Soc. argent. Biol., 1961, 37, 215

**LA RATIO ALBUMINA/GLOBULINAS Y SU PROBABLE
SIGNIFICADO ECOLOGICO EN LOS ANFIBIOS
SUDAMERICANOS ***

J. M. CEI, F. BERTINI y G. C. GALLOPIN **

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

R E S U M E N

La relación Albúmina/Globulinas, examinada por vía electroforética en seroproteínas de 28 especies de Anfibios sudamericanos aparece más elevada en aquellas formas cuya ecología manifiesta un evidente grado de independencia ambiental, alcanzando su mayor valor en los Hylidos arborícolas y en algunas especies adaptativas de los ambientes áridos chaqueños y en formas especializadas de regiones salitrosas, como *Pleurodema nebulosa*. Factores filéticos parecen intervenir en la evolución del "pattern" seroproteínico.

La posición de transición de los anfibios, entre los Vertebrados decididamente acuáticos y los Tetrapodos terrestres, hacen interesante el estudio de los posibles mecanismos que pueden haber favorecido a aquéllos para su conquista del habitat terrestre.

La posibilidad de sintetizar mayores cantidades de seroalbumina, que en estos animales aparece en los últimos estadios embrionarios, puede haber intervenido como uno de los factores de regulación osmótica que hicieran posible tal cambio de ambiente.

Por estas razones, se ha querido en este trabajo analizar comparativamente el valor de la componente seroalbumínica, expresada por la relación A/G (Albumina/Globulinas) en seroproteínas de varias formas de Anuros neotropicales pertenecientes a ecotipos distintos.

La presencia de albumina en sueros de Anfibios, ha sido certificada por vía electroforética (Herner y Frieden, 1960).

* Presentado a la Sociedad de Biología de Cuyo el 26 de agosto de 1961.

** Becario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Con el primer método se comprueba que la seroalbumina mantiene en estos animales su característica de máxima movilidad en los ferogramas, análogamente a lo que ocurre en los Vertebrados superiores, y en base a esta propiedad, hemos elegido para avaluar nuestra ratio A/G, el procedimiento de electroforésis en papel.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó para el trabajo, un aparato de electroforesis Ciencu, con sistema de tiras verticales. Se usó Buffer de Veronal, de pH8,6 y fuerza iónica: 0,05. El voltaje aplicado fue de 9 volt/cm y la corriente de 1,5 mA/cm. El corrimiento fue efectuado en un lapso de 6 horas a 8^o-10^o C, en gabinete refrigerado. El papel elegido fue el Whatman 3 MM y la tinción se hizo con azul de bromofenol.

El porcentaje relativo de A/G, ha sido obtenido por elución del colorante y lectura por vía fotocolorimétrica.

Tratándose de un número relativamente elevado de formas, necesario para un trabajo comparativo, se ha utilizado sueros conservados en congelador, extraídos de animales recién capturados. Starr y Fosberg (1957) y Baril, Palmer y Bartel (1960), en efecto comprueban no encontrar variaciones significativas en los "patterns" electroforéticos de sueros conservados en congelador y recién extraídos, en individuos de la misma especie.

RESULTADOS

Se estudiaron muestras de las familias *Hylidae*, *Pseudidae*, *Leptodactylidae* y *Ceratophrydae*, cuyos resultados se tabularon en los cuadros 1 y 2. En el gráfico demostrativo de fig. 1 y en la discusión se utilizaron también algunos datos de trabajos realizados anteriormente por unos de los coautores. En la familia *Hylidae* el género trepador *Phyllomedusa*, caracterizado por su pulgar oponible, ofreció ratios A/G siempre elevadas, hasta 0,71, con muy pocas diferencias poblacionales, desde Jujuy hasta La Rioja (Fig. 2:8). Un valor alto mantiene la muestra individual de *Phrynohyas hebes*, especie arborícola que se refugia en los troncos huecos de la selva tropical. En tres formas del género *Hyla*, de dos distintos grupos, y menos es-

pecializados, se observaron valores siempre más bajos de A/G. *Pseudis*, cuya posición intermedia entre *Hylidae* y *Leptodactylidae* será más adelante recordada, comprende formas acuáticas pero, en determinados habitat (Chaco árido), obligadas a

TABLA I

Especies	Procedencia	Nº Ejemplares	ratio A/G
<i>Hylidae</i>			
<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	La Rioja	(8 M)	0.64 ± 0.07 (E.S.) (0.49 — 0.71)
	Santiago del Estero	1 M	0.70
	Tucumán	1 M	0.73
	Jujuy	pool 8 M	0.58
<i>Phrynohyas hebes</i>	Paraguay	1 H	0.68
<i>Hyla raddiana</i>	Jujuy	2 H	0.43
		pool (MH)	0.39
<i>Hyla raniceps</i>	Formosa	pool	0.23
<i>Hyla trachytorax</i>	Jujuy	1 H	0.30
<i>Pseudidae</i>			
<i>Pseudis paradoxa</i>	Surinam	3 M	0.48
		4 H	0.39
			(0.27 — 0.51)
<i>Pseudis</i> sp.	Buenos Aires	pool	0.24
		1 H	0.29
<i>Pseudis</i> sp.	Formosa	1 M	0.47
		3 H	0.66
		pool	(0.61 — 0.70) 0.67
<i>Leptodactylidae</i>			
<i>Telmatobiinae</i>			
<i>Telmatobius hauthali schreiteri</i>	Tucumán (3000 m)	1 M	0.24
<i>Calyptocephalellinae</i>			
<i>Calyptocephalella gayi</i>	Santiago de Chile	6 M	0.20 ± 0.01 (0.18 — 0.23)

Variación A/G en *Phyllomedusa*: 0.49 — 0.71; en *Hyla*: 0.23 — 0.43; en *Pseudis* de los grandes ríos: 0.24 — 0.48; en *Pseudis* del Chaco: 0.47 — 0.70.

M: machos; H: hembras; E.S.: error standard.

largos períodos de defensa contra la sequedad ambiental, reparándose en cavidades del barro de las lagunas secas, como otras formas anuras, o *Lepidosiren*. Muestras de los ríos de Surinam y del Río de la Plata evidencian una variación de A/G

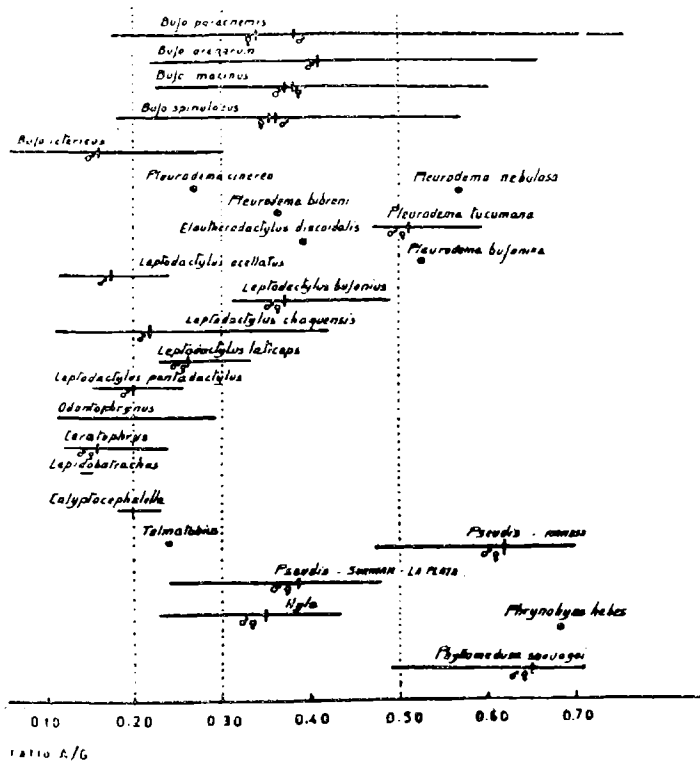


FIGURA 1. Esquema general de los ratios A/G (Albúmina/Globulinas) características de diferentes especies de anfibios sudamericanos. Se indican para cada grupo límites y término medio, (♂, machos; ♀, hembras; ♂♀, sexos reunidos).

entre 0,24-0,48, pero en las *Pseudis* de Formosa (Chaco Central) ésta se eleva a un "range" de 0,47-0,70 (Fig. 2:5,6). *Leptodactylidae* de las familias primitivas *Calyptocephalellinae* y *Telmatobiinae*, de vida netamente acuática, presentan ratios entre 0,18-0,25 (Fig. 2:1).

TABLA II

Especies	Procedencia	Nº Ejemplares	Ratio A/G
<i>Leptodactylidae</i>			
<i>Leptodactylidae</i>			
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	Misiones	6 M	0.20 ± 0.04 (0.15 — 0.25)
<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Mendoza	3 M	0.24
<i>Leptodactylus bufonius</i>	Formosa	pool	0.31
		1 H	0.49
		2 H	0.33
		pool	0.39
<i>Leptodactylus laticeps</i>	Formosa	1 M	0.33
		1 H	0.22
		1 M jov.	0.22
		1 H	0.25
	Santiago del Estero	2 H	0.27
<i>Eleutherodactylus discoidalis</i>	Tucumán	pool	0.39
<i>Pleurodema bibroni</i>	Santiago de Chile	pool	0.37
<i>Pleurodema bufonina</i>	Santa Cruz	pool	0.53
<i>Pleurodema cinerea</i>	Tucumán	pool	0.27
<i>Pleurodema tucumana</i>	Tucumán	pool M	0.51
		pool H	0.48
		pool	0.47
		1 H	0.60
<i>Pleurodema nebulosa</i>	Mendoza	pool	0.57
<i>Ceratophrydae</i>			
<i>Odontophrynus americanus</i>	Tucumán	9 M	0.15 ± 0.04 (0.11 — 0.24)
	Jujuy	3 M	0.18 (0.17 — 0.19)
		pool	0.30
	Formosa	5 H	0.15 ± 0.02 (0.11 — 0.18)
<i>Ceratophrys ornata</i>	Santiago del Estero	1 M	0.16
		1 H	0.14
	Formosa	1 M	0.24
		1 H	0.12
<i>Lepidobatrachus</i> sp.	Santiago del Estero	1 M	0.14
		1 H	0.15

Variación A/G en *Leptodactylus* de vida acuática; 0.15 — 0.25; en *Leptodactylus* de vida terrestre: 0.22 — 0.49; en *Pleurodema*: 0.27 — 0.60.

Leptodactylus, género versátil y polimorfo, pasa de formas acuáticas como *pentadactylus* (A/G 0,15-0,25) y *ocellatus* (0,24 en Mendoza), a formas de costumbres más terrestres co-

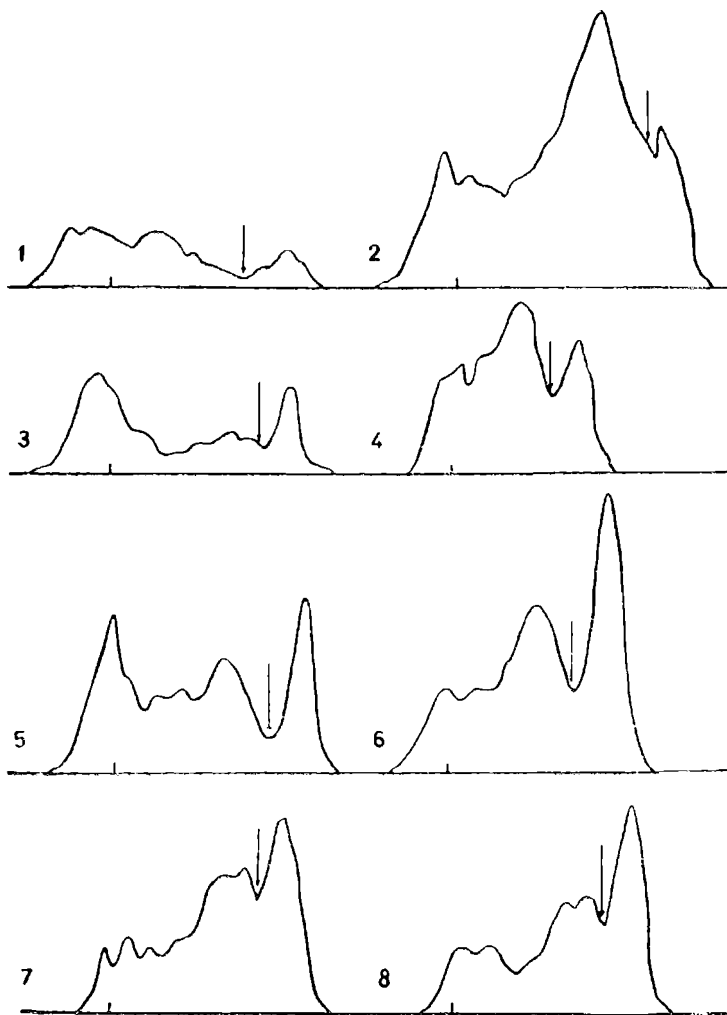


FIGURA 2. Curvas electroforéticas características de: 1) *Calyptocephalella gayi* (Santiago de Chile); 2) *Odontophrynus americanus* (Tucumán); 3) *Leptodactylus pentadactylus* (Misiones); 4) *Leptodactylus bufonius* (Formosa); 5) *Pseudis paradoxa* (Suriname); 6) *Pseudis* sp. (Formosa); 7) *Pleurodema tucumana* (Tucumán); 8) *Phyllomedusa sawagaei* (Jujuy). - La flecha indica la línea de corte de las tiras para la elución.

mo *laticeps* (0,22-0,33) y *bufonius* (0,31-0,49), propios del dominio chaqueño (Fig. 2:3,4).

Eleutherodactylus discoidalis, de la selva de Tucumán, perteneciente a un género con desarrollo directo en la envoltura del huevo, puesto en el terreno húmedo, también revela una ratio elevada (0,39). *Pleurodema*, cuyas variación en A/G cubre un "range" muy amplio (0,27-0,60), aún presenta especies como *bibroni* y *cinerea*, más vinculadas a nichos ecológicos acuáticos o a particulares condiciones de humedad ambiental (A/G 0,27-0,39), y especies como *tucumana* y *nebulosa*, muy adaptativas en condiciones de gran aridez y salinidad ambiental (A/G 0,47-0,60). (Fig. 2:7).

Ceratophrydae fueron todos estudiados en períodos de verano, cuando llevan vida decididamente o exclusivamente acuática (*Lepidobatrachus*, *Odontophrynus* y *Ceratophrys*). Sus ratios A/G son generalmente muy bajas (range: 0,11-0,30, pero en gran mayoría alrededor de 0,15) (Fig. 2:2).

Los bufonidos no se controlaron en este trabajo por haber sido ya estudiados por uno de los coautores (Bertini y Cei: en publicación). En estos anuros con notable variación individual las ratios mínimas se refieren a *Bufo ictericus*, que Cochran (1955) describe como forma de los arroyos de las selvas saturadas brasileñas (A/G entre 0.06 — 0.30; media 11 ♂ 0.16 ± 0.06), y valores intermedios se registran en *Bufo spinulosus* de distintos biotopos de Chile (A/G entre 0.18 — 0.57; media 30 ♂ 0.35 ± 0.10 , media 5 ♀ 0.36 ± 0.09). *Bufo marinus* (A/G entre 0.23 — 0.60; media 11 ♂ 0.37 ± 0.11 , media 5 ♀ 0.38 ± 0.19 , en Surinam). *Bufo arenarum* (A/G entre 0.22 — 0.66; media 43 ♂ 0.41 ± 0.9), todos ecológicamente muy versátiles, alcanzando límites máximos en *Bufo paracnemis* del dominio árido del bosque chaqueño y de las caatingas (A/G entre 0.17 — 0.76; media 17 ♂ 0.38 ± 0.14 , media 4 ♀ 0.34 ± 0.14).

DISCUSIÓN

Varias consideraciones sustentan la posibilidad de que valores elevados en la ratio Albumina/Globulina (A/G) en distintas especies de Anuros pueden ser de significado adaptativo ecológico, acompañándose a una mayor independencia del ambiente acuático. Desde cuando el empleo de la electroforesis

en papel introduce un método relativamente rápido y seguro para el análisis comparativo y taxonómico de las seroproteínas (Dessauer y Fox, 1959), numerosos trabajos realizados sobre Vertebrados indican que las fracciones de mayor movilidad, correspondientes a las albuminas de Mamíferos y Aves, son muy escasas o prácticamente ausentes en la mayoría de los peces estudiados, de los selaceos, en los Ciclostomos, en los Urodelos, y muy reducidas también en *Loricata* y *Quelonia*. Los Vertebrados de ecología netamente terrestres parecen ser también los que presentan la más elevada proteinemia. Otras observaciones, reunidas en las últimas contribuciones de Herner y Frieden (1960), subrayan el evidente papel del aumento de la albumina en la metamorfosis de los Anuros (géneros *Rana*, *Xenopus*), natural y provocada, la que con sus sustanciales transformaciones morfo-fisiológicas se relaciona con un evidente cambio de ambiente. Se ha atribuido el aumento de albumina, que se une en el metamorfosado a una mayor concentración total de proteínas en el plasma, a las necesidades aumentadas de un más complejo sistema circulatorio, bajo el punto de vista de los canjes osmóticos periféricos y el mantenimiento del volumen sanguíneo. En efecto la albumina, por su pequeño peso molecular y su estado de alta carga en condiciones de pH fisiológico, parece ser la proteína más adecuada para asegurar el balance osmótico. Aun se puso en evidencia su papel como "carrier", junto con otras proteínas, en el caso de un activo transporte de pequeñas moléculas requeridas por los tejidos, lo que caracteriza al líquido circulante sanguíneo más eficiente del anfibio, metamorfosado en comparación de su fase larvaria (Herner y Frieden). En las obras más clásicas de fisiología (Houssay, 1950; Prosser y Brown, 1961) se reconoce la mayor capacidad de la albumina para atraer y retener el agua ("esponja osmótica") y su mayor presión oncótica, calculándose que un 80 % de la presión osmótica de las proteínas totales del plasma, se debe en el hombre a la seroalbumina.

Los factores de regulación osmótica son de gran importancia en el problema complejo del balance hídrico de los anfibios. Las condiciones de vida, de reproducción, y el habitat de estos animales están en evidente relación con las modalidades fisiológicas de homeostásis de su medium interno, así que todo mecanismo que pueda haber representado un estado de mayor

defensa contra una pérdida o de mejor equilibrio hídrico en condiciones de dificultad ambiental, debe haber adquirido valor adaptativo en el curso de la evolución de un *phylum* y de la sucesiva especialización ecológica de sus formas.

Los resultados que aquí se exponen (fig. 1 y cuadro 1 y 2) parecen estar de acuerdo con esta posibilidad teórica. En las varias ramas de Anuros neotropicales consideradas, todas relacionadas con un probable tronco común leptodactilide cenozoico, se ha observado una ratio A/G baja en las especies con ecología fundamentalmente acuática o semiacuática, como *Calyptocephalella*¹, *Telmatobius*, ciertos *Leptodactylus* y *Bufo*, o en los Ceratofridos caracterizados por un período reproductivo de verano de vida frecuentemente acuática, alternando con períodos de hibernación total, a gran profundidad en el terreno. Se encontraron valores intermedios (entre 0,20-0,30) en formas con mayor independencia ambiental, como *Hyla*, *Bufo*, *Eleutherodactylus*, *Leptodactylus* (*chaquensis*, *laticeps*, *bufonius*), ciertas *Pleurodema* y *Pseudis*. Los valores más elevados, hasta de 0,60-0,70, se obtuvieron en los Hylidos más especializados, como *Phyllomedusa sauvagi*, arborícola, que construye su nido de espuma ovígera entre las ramas de los árboles, en ciertas *Pseudis* de los ambientes áridos de Formosa, y en el género *Pleurodema* (*Pl. tucumana*, *Pl. nebulosa*), pequeños batracios particularmente resistentes en condiciones excepcionales de aridez y de salinidad ambiental como los salares de la Argentina central, donde manifiestan mecanismos adaptativos osmóticos peculiares (Ruibal; com. personal).

Parecerían intervenir factores filéticos en la evolución del "pattern" seroprotéico, y por ende el aumento progresivo de albúmina puede acontecer a distintos niveles según los taxones considerados.

Pseudidae, por ejemplo, que revelan ratios singularmente elevadas, a pesar de ser formas con biología acuática, resultan directamente relacionadas con los Hylidos trepadores arborícolas, siendo considerados por algunos (Savage y Carvalho, 1935) como intermediarios morfológicos entre estos y *Leptodactylidae*, por otros como subfamilia de *Hylidae* (Burger, 1954). Proba-

(1) Es singular la similitud de los ferogramas de *Calyptocephalella* (adulto) con los obtenidos por Hierner y Frieden (1957, 1960) en ciertos estadios larvarios de Ranidos (*Rana hecksheri*, *Rana catesbeiana*).

blemente a raíz de distinto origen filogenético, y a causa de otro plan de organización estructural y fisiológico distinto del de nuestros grupos neotropicales, aquí estudiados, se podría entender los límites de valores mucho más elevados en la ratio A/G (hasta 0.90) observados en *Ranidae* por A. A. europeos (Lanza y Antonini, 1954) y americanos (Herner y Frieden, 1960) y también en *Xenopus*. En este representante de un grupo muy apartado y peculiar, *Aglossa*, el valor porcentual de la albúmina alcanza niveles parangonables a los de la especie humana.

La relación entre las características ecológicas y los valores de las ratios A/G, se hace bien evidente en la comparación de las varias especies de un género. Así en *Bufo* se pasa de valores mínimos en *B. ictericus*, forma casi acuática o de selva húmeda de Brasil sudoriental, a valores máximos en *Bufo paracnemis* del bosque árido chaqueño. En *Pleurodema* las especies se escalonan progresivamente por sus ratios, en completo acuerdo con su habitat: *cinerea* (0,27), *bibroni* (0,37), *bufonina* (0,53), *tucumana* (0,47-0,60), *nebulosa* (0,57).

El valor de la ratio A/G parece ser un carácter específico estable. El "pattern" electroforético general puede presentar en algunas formas cierta variación poblacional en los porcentajes relativos de las fracciones globulínicas (*Bufo arenarum*; Bertini y Ceí, 1960), habiéndose establecido en determinados casos sus rasgos generales de variación geográfica (Ceí y Bertini, *Bufo spinulosus*, en Chile, en publicación).

En series de *Phyllomedusa sauvagei* de distinta procedencia, asimismo que en *Odontophrynus americanus* o *Calyptocephalella*, por ejemplo, como se nota por los datos tabulados en fig. 1, los límites de variación individual son realmente modestos, y las desviaciones standard reducidas. Los resultados conseguidos pueden hacer confiar en la utilidad de estos métodos de observación, permitiendo evaluar por esta vía el estado evolutivo actual alcanzado por este mecanismo osmótico en la estabilización fisiológica de los Anfibios neotropicales estudiados, frente a los factores ambientales de selección adaptativa.

SUMMARY

The ratio A/G (Albumin - Globulin) was electrophoretically studied in 28 south - american frogs and toads. The highest values are shown by all the forms in which some ecological tendency to the aerial life or

environmental independence was demonstrated. Very high ratios are characteristic of some neotropical tree-frogs (*Phyllomedusa*, *Phrynohyas*), of adaptative species from the arid chacoan belt, and in some peculiar batrachians from the salt flat plains of the central Argentine (*Pleurodema nebulosa* and *tucumana*). Phyletic factors in the evolution of the sero-proteinic patterns are pointed out.

Se agradece al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas su apoyo para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. BARIL, E. F.; PALMER, J. L.; BARTEL, A. H.: *Science*, 1961, 133, 278. — 2. BERTINI, F.; CEI, J. M.: *Acta 1º Congr. Sudam. Zool. La Plata*, 1959. — 3. BERTINI, F.; CEI, J. M.: *Rev. Soc. argent. Biol.*, 1960, 36, 355. — 4. BURGER, W. L.: *Herpetologica*, 1954, 10, 194. — 5. CEI, J. M.; BERTINI, F.: *Acta 1º Congr. Sudam. Zool. La Plata*, 1959. — 6. CEI, J. M.; BERTINI, F.: *Copeia*, 1961, 3, 336. — 7. COCHRAN, D.: *U. S. Nat. Mus. Bull.*, 1955, 206, 1. — 8. DESSAUER, H.; FOX, W.: *Science*, 1956, 124, 225. — 9. HERNER, A. E.; FRIEDEN, E.: *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2845. — 10. HOUSSAY, B. A.: *Fisiología Humana*, El Ateneo, Buenos Aires, 1950, p. 6. — 11. LANZA, B.; ANTONINI, F. M.: *Monit. Zool. Ital.*, 1955, 63, 293. — 12. LECUONA, F. A.: *Comun. XXI Congr. Intern. Ciencias Fisiol.*, Buenos Aires, 9-15 de agosto de 1959, p. 161. — 13. PAGLINI, S.: *Rev. Soc. argent. Biol.*, 1955, 31, 79. — 14. PROSSER, L.; BROWN, F. A.: *Comparative Animal Physiology*, Philadelphia, 1961. — 15. SAVAGE, J. M.; CARVALHO, A. L.: *Zoologica*, 1953, 38, 193. — 16. STARR, TH. J.; FOSBERG, W.: *Copeia*, 1957, 4, 292.

