

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Colomascirtus larinopygion* (HYLIDAE) SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* Y *Staphylococcus aureus***



**MARÍA ALEXANDRA LAZO IDROBO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BILOGÍA  
POPAYÁN  
2017**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA SECRECIÓN  
CUTÁNEA DE *Colomascirtus larinopygion* (HYLIDAE) SOBRE LAS CEPAS  
BACTERIANAS *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* Y  
*Staphylococcus aureus***

**MARÍA ALEXANDRA LAZO IDROBO**

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de Bióloga**

**DIRECTOR**

**JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS, Ph. D**

**ASESORA**

**LILIANA CALDAS ARIAS, M. Sc.**

**ASESOR**

**ANDRÉS FELIPE LIÉVANO BONILLA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**POPAYÁN**

**2017**

Nota de aceptación

---

---

---

Director: \_\_\_\_\_

Jimmy Alexander Guerrero Vargas, Ph.D

Jurado: \_\_\_\_\_

Sandra Carlina Rivas, M. Sc

Jurado: \_\_\_\_\_

Melissa Carolina Patiño Portela, B. Sc

Fecha de sustentación: Popayán 19 de julio de 2017

*No importa  
lo difícil que parezca,  
siempre hay un camino,  
cuando la fuerza viene del  
corazón. 😊*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al destino por haberme llevado hasta el maravilloso camino del estudio de la vida.

A la Universidad del Cauca y a los docentes del departamento de Biología por permitirme estudiar esta hermosa carrera y por todas sus enseñanzas y guía durante estos años.

A la profesora Liliana Caldas, por sus importantes aportes a la investigación y por abrir las puertas de su laboratorio permitiéndome enriquecer y culminar mi formación como bióloga.

Al profesor Jimmy Alexander Guerrero, por sus importantes aportes en este trabajo y por guiarme en la última etapa de la carrera.

Al Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas por sus comentarios constructivos al trabajo.

A Gloria Ávila y a Mirtha Olave en el laboratorio de Inmunología de la facultad de ciencias de la salud por su colaboración, aportes y paciencia en el desarrollo de la investigación.

Mis más sinceros agradecimientos a mis padres, mi hermano y mi abuela por su apoyo incondicional, su perseverancia y su amor durante esta etapa que finaliza y toda mi vida.

Andrés Felipe Liévano, agradezco tus valiosos aportes, tus buenos consejos y especialmente tu amistad en este tiempo que compartimos.

Santiago Orozco, te agradezco por todo tu apoyo y colaboración, por tu dedicación y por todos los buenos momentos y conocimientos compartidos.

Alvaro Javier Patiño, te agradezco por ser un gran apoyo, por tu colaboración y por compartir esta bella etapa de estudios y formación repleta de inolvidables recuerdos.

A todas las personas de las cuales recibí de alguna manera aportes para culminar con éxito mi investigación, resaltando a Isabel Álvarez por compartir las comunicativas horas de escritura y por su amistad.

Finalmente agradezco a todas aquellas personas que de alguna manera participaron, aportaron y a los que tuvieron sus buenos deseos para este trabajo investigativo.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	15
1. JUSTIFICACIÓN.....	16
2. OBJETIVOS .....	17
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. MARCO TEÓRICO .....	18
3.1. ANFIBIOS .....	18
3.1.1. <i>Colomascirtus larinopygion</i> (Duellman, 1973).....	18
3.1.2. Secreción cutánea de los anfibios.....	20
3.2. BACTERIAS.....	21
3.2.1. Pared Celular.....	21
3.2.2. Membrana plasmática.....	22
3.2.3. <i>Escherichia coli</i> .....	22
3.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	22
3.2.5. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
3.2.6. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	23
3.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	23
4. ANTECEDENTES.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE COLECTA.....	28
5.2. COLECTA DE INDIVIDUOS.....	29
5.3. SECRECIÓN CUTÁNEA.....	30
5.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	30
5.4.1. Inóculo.....	31
5.4.2. Dilución en la microplaca.....	31
5.4.3. Concentración inhibitoria mínima (CIM).....	33
5.5. PRUEBA DE HEMÓLISIS.....	33
5.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1. SECRECIÓN CUTÁNEA.....	35

6.2.	DILUCIÓN EN MICROPLACA.....	35
6.3.	SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	36
6.3.1.	EFEECTO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA SOBRE <i>E. coli</i> .....	36
6.3.2.	EFEECTO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA SOBRE <i>P. aeruginosa</i> .	39
6.3.3.	EFEECTO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA SOBRE <i>S. aureus</i> .....	41
6.3.4.	EFECTOS DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA SOBRE <i>E. faecalis</i> .....	44
6.4.	EFEECTO HEMOLÍTICO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA: .....	45
7.	DISCUSIÓN.....	48
8.	CONCLUSIONES .....	52
9.	RECOMENDACIONES .....	53
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	54

## TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de <i>Colomascirtus larinopygion</i> . .....	19
Figura 2. Individuo de <i>Colomascirtus larinopygion</i> .. .....	20
Figura 3. Ubicación geográfica de la localidad de colecta de <i>C. larinopygion</i> . .....	28
Figura 4. Bosque en la cuenca alta del río Molino, vereda Santa Elena. ....	29
Figura 5. Individuo <i>C. larinopygion</i> en cautiverio.....	29
Figura 6. Estimulación eléctrica de Individuo <i>C. larinopygion</i> .....	30
Figura 7. Dilución en microplaca para cultivo celular. ....	32
Figura 8. Distribución de tratamientos en el microplato para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.. .....	33
Figura 9. Secreción cutánea de <i>C. larinopygion</i> .....	35
Figura 10. Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea .....	37
Figura 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> dependiente de la concentración de secreción cutánea de <i>C. larinopygion</i> . .....	38
Figura 12. Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea 48 horas después de la incubación.....	39
Figura 13. Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa <i>P. aeruginosa</i> frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea. ....	40
Figura 14. Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa <i>S. aureus</i> frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea: La concentración 0,6 mg/mL presenta diferencia significativa con respecto al control negativo (C-). ....	42
Figura 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento de la cepa <i>S. aureus</i> dependiente de la concentración de secreción cutánea de <i>C. larinopygion</i> . ..	43
Figura 16. Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa <i>S. aureus</i> frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea, después de 48 horas. ....	44

Figura 17. Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa *E. faecalis* frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea, después de 24 horas. .... 45

Figura 18. Efecto hemolítico en eritrocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de secreción de *C. larinopgion*.....46

Figura 19. Curva Dosis Respuesta muestra la concentración de la secreción contra el porcentaje de hemolisis causado en eritrocitos humanos. .... 47

## TABLA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de absorbancias registradas en la prueba de susceptibilidad para las cuatro cepas bacterianas.....	36
Tabla 2. Prueba de Kruskall-Wallis en la inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> por la secreción cutánea de <i>C. larinopygion</i> transcurridas 24 horas de incubación. 37	
Tabla 3. Prueba de Kruskall-Wallis en la inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> por la secreción cutánea de <i>C. larinopygion</i> transcurridas 48 horas de incubación.....	39
Tabla 4. Prueba de ANOVA de una vía para la inhibición de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> por la secreción cutánea de <i>C. larinopygion</i> después de 24 horas .....	40
Tabla 5. Prueba de ANOVA de una vía para la inhibición de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> por la secreción cutánea de <i>C. larinopygion</i> después de 48 horas. ....	41
Tabla 6. Prueba de Kruskall-Wallis para la inhibición de crecimiento de <i>S. aureus</i> debida a la secreción, después de 24 horas.....	41
Tabla 7. Prueba de Kruskall-Wallis para inhibición de crecimiento de <i>S. aureus</i> frente a la secreción cutánea de <i>C. larinopygion</i> , después de 48 horas.....	43.
Tabla 8. Prueba de Kruskall-Wallis para la inhibición de crecimiento de <i>E. faecalis</i> frente a la secreción cutánea de <i>C. larinopygion</i> después de 24 horas.....	44
Tabla 9. Prueba de Kruskall-Wallis para la inhibición de crecimiento de <i>E. faecalis</i> frente a la secreción cutánea de <i>C. larinopygion</i> .....	45
Tabla 10. Prueba de Kruskall-Wallis para la hemólisis de eritrocitos frente a la secreción cutánea de <i>C. larinopygion</i> .....	46
Tabla 11. IC50 de secreción cutánea calculada para la prueba de hemólisis. ....	47
Tabla 12. Contraste de CIM (mg/mL) para péptidos aislados de secreciones totales y secreciones totales de anuros. Tomado y modificado de Coral, 2010: Pates <i>et al.</i> , 2004; Lohner & Prossnigg, 2009 y Fernandez <i>et al.</i> , 2009. ....	49

## TABLA DE ANEXOS

Anexo 1. Resolución para trabajo de grado titulado: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE <i>Hyloscirtus larinopygion</i> (HYLIDAE) SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	59
Anexo 2. Artículo: Phylogenetics, Classification, And Biogeography Of The Treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae) .....	61
Anexo 3. Consentimiento informado para muestra de sangre de 4 mL en la prueba de hemólisis.....	62

## NOTAS DE ACLARACIÓN

- I. Hasta la fecha de inscripción de este trabajo de grado con Resolución N° 002 del 21 de enero de 2016 (Anexo 1), se aceptaba a la especie estudiada como *Hyloscirtus larinopygion*; durante el desarrollo de esta investigación, específicamente en el mes de abril de 2016, fue publicado un artículo titulado Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae) por Duellman, W. y colaboradores (Anexo 2), en el cual la especie estudiada pasa a conocerse como *Colomascirtus larinopygion*.
  
- II. Durante el desarrollo de esta investigación fue adicionada la cepa bacteriana de *Enterococcus faecalis*, con el fin de ampliar el conocimiento sobre la actividad de la secreción cutánea de *Colomascirtus larinopygion*, pero debido a los acuerdos institucionales establecidos para trabajos de grado no es incluida en el título o en objetivos de este trabajo.

## RESUMEN

En la actualidad se ha despertado el interés científico por el desarrollo de investigaciones que involucren las secreciones de la piel de los anfibios, puesto que en ellas se encuentran presentes sustancias con actividad biológica y un considerable potencial farmacológico. Los tratamientos farmacológicos se ven limitados en cuanto a su implementación debido a que las bacterias, poseen una eficiente capacidad de adaptación a condiciones del entorno, lo que les permite desarrollar mecanismos de resistencia a los antibióticos; En este trabajo fue realizada una prueba de susceptibilidad antimicrobiana de dilución determinando el potencial antibiótico de la secreción cutánea de *Colomascirtus larinopygion* (HYLIDAE), para las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*; el potencial antibiótico que presentó esta secreción cutánea fue considerable para bacterias gram negativas con una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 0.075 mg/mL y gram positivas con una CIM de 0,01875 mg/mL, lo cual promueve realizar futuras investigaciones que caractericen las moléculas responsables de la inhibición de crecimiento bacteriano y su posible aplicación farmacológica. También fue realizada una prueba de hemólisis sobre eritrocitos humanos determinando que la secreción tiene efecto citotóxico en las células de los mamíferos

**Palabras clave:** *Colomascirtus larinopygion*, secreción cutánea, actividad antibiótica.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, Colombia es el segundo país con mayor riqueza de especies de anfibios (800 spp.), siendo los anuros el grupo más abundante con 748 spp (Acosta-Galvis & Cuentas, 2017). Este grupo de vertebrados posee un sistema de defensa bioquímica, que está involucrado en la regulación de la acción fisiológica cutánea; dicho sistema de defensa contiene moléculas bioactivas que representan una importante fuente de péptidos, aminas, esteroides y alcaloides con una gama amplia de funciones biológicas, destacándose la actividad antimicrobiana (Bowie *et al.*, 2006). El hecho de que las secreciones cutáneas en anfibios presente esta capacidad genera la posibilidad de emplear estas sustancias en el control de infecciones, en la desinfección de implementos, además de brindar herramientas para la conservación de hábitats, fuentes de agua y la protección de especies vulnerables o que se encuentren en algún tipo de amenaza (Coral, 2010). Por otra parte en Colombia el estudio del fenómeno de la resistencia bacteriana a los antibióticos, es de vital importancia, puesto que existe reducida información al respecto (Vargas *et al.*, 2010).

Con este estudio se identificó la actividad antibiótica que presenta la secreción cutánea de *C. larinopygion* frente a cuatro cepas bacterianas ATCC (*American Type Culture Collection. EU*) diferentes y la toxicidad de esta ante células humanas, brindando alternativas a la problemática de resistencia bacteriana a antibióticos y además estimulando investigaciones futuras que permitan identificar las moléculas activas y su posible aplicación biotecnológica.

## 1. JUSTIFICACIÓN

Las toxinas de origen animal han despertado un interés particular en la investigación, puesto que representan una fuente de compuestos biológicamente activos que podrían tener utilidad farmacológica (Guerrero-Vargas *et al.*, 2008). Las moléculas que constituyen las secreciones están siendo identificadas, y en nuestro país los estudios en este campo son escasos, a pesar de tener una alta diversidad y riqueza de anuros, resaltando la gran diversidad presente en zonas como la región Andina (Galeano *et al.*, 2006), hecho que amerita aumentar las investigaciones en este campo. Se ha demostrado que la secreción granulosa de la piel de los anfibios contiene una variedad de compuestos que contribuyen con sus mecanismos de defensa (Carvalho *et al.*, 2015), por lo anterior, es importante identificar la actividad antibiótica puesto que podría tener aplicaciones biotecnológicas. En la actualidad se conoce que las bacterias generan resistencia a los medicamentos empleados en tratamientos farmacológicos (García *et al.*, 2015), incrementando de cierta forma el consumo de estos y generando un impacto epidemiológico y económico en lugares de Latinoamérica (Pallares *et al.*, 2012). Por todo lo planteado se hace necesario investigar nuevos compuestos con actividad antimicrobiana.

Con el propósito de avanzar en el conocimiento disponible sobre esta temática para Colombia y para el Departamento del Cauca, en este estudio fue analizado el efecto antimicrobiano de la secreción cutánea de *C. larinopygion* sobre cuatro cepas bacterianas responsables de infecciones en los seres humanos, proyectando posibles aplicaciones biotecnológicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antibiótica de la secreción cutánea de *Colomascirtus larinopygion* sobre las cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer la capacidad antibiótica de la secreción cutánea de *Colomascirtus larinopygion* por medio de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

Identificar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la secreción cutánea de *C. larinopygion* sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Comprobar si la secreción cutánea de *Colomascirtus larinopygion* causa hemólisis de eritrocitos humanos.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. ANFIBIOS

Los anfibios (Clase Amphibia) son miembros de los vertebrados tetrápodos. En la actualidad existen más de 6.000 especies divididas en tres órdenes: Gymnophiona, Anura y Caudata. Anura (ranas y sapos) es el grupo con mayor número de especies, presentan formas variadas de cuerpo, con cuatro extremidades y ausencia de cola en estadios adultos; el orden Caudata (salamandras y tritones) ocupa el segundo puesto en cuanto riqueza de especies de anfibios, tienen la forma del cuerpo de tetrápodos primitivos, con cuatro extremidades y cola larga, también se presenta una tendencia de alargamiento del cuerpo y finalmente Gymnophiona (cecilias) es el más pequeño de los órdenes, organismos con hábitos fosoriales y no presentan extremidades (Stuart *et al.*, 2008).

##### 3.1.1. *Colomascirtus larinopygion* (Duellman, 1973)

###### **Posición taxonómica:**

Clase: Amphibia

Orden: Anura

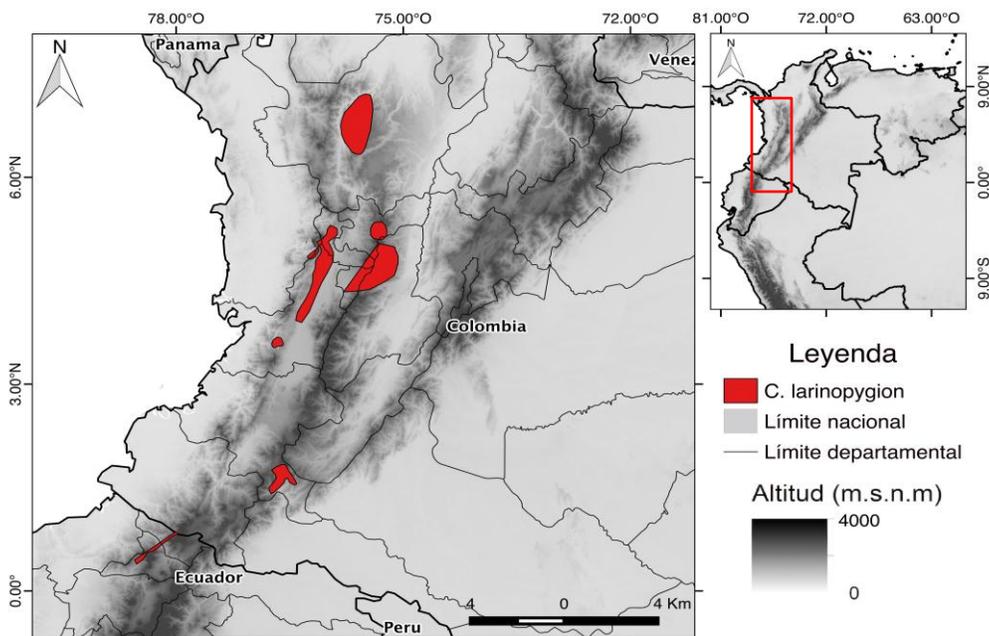
Familia: Hylidae

Género: *Colomascirtus*

Especie: *Colomascirtus larinopygion* (Duellman 1973)

Hylidae es la familia más rica en especies de anfibios (más de 800 spp. descritas), de ranas arborícolas en su mayoría, los organismos pertenecientes a esta familia presentan dedos manuales y pediales con discos adhesivos bien desarrollados, todos los miembros tienen un corto cartílago intercalar entre la penúltima falange y falange terminal en forma de garra, las coloraciones y tamaños varían; se encuentran sobre todo en América del sur y Central, así como en la región Australo-Papúa (Stuart *et al.*, 2008; Gray, 1825). Esta familia ha tenido cambios a nivel taxonómico donde se reorganizan los géneros y las especies pertenecientes

a la misma, entre estos cambios es revalidado el género *Hyloscirtus* donde se incluye el epíteto específico *larinopygion* (Faivovich *et al.*, 2005) anteriormente *Hyla larinopygion*; posteriormente Duellman *et al.*, 2016 realizan nuevas modificaciones taxonómicas y sistemáticas dentro de la familia Hylidae describiendo el género *Colomascirtus*, al cual le asignan el epíteto específico *larinopygion* quedando entonces esta especie validada como *Colomascirtus larinopygion*. Dicha especie se distribuye en los Andes de Colombia y Ecuador, con un rango altitudinal de 1950 – 3100 msnm (Figura 1), generalmente en proximidad a fuentes de agua con poca corriente; La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) categoriza en su Lista Roja a la especie como casi amenazada (NT) (Bolívar *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2013); *C. larinopygion* presenta un tamaño moderado, coloración del dorso uniformemente marrón, flancos y las superficies ocultas de muslos de color gris con barras negras verticales, zona ventral color crema con puntos negros, región anal enormemente hinchada, bordeada anteriormente por un pliegue cutáneo transversal, dedos palmeados basalmente y los pies palmeados aproximadamente la mitad (Duellman, 1973; Rivera-Correa *et al.*, 2013). (Figura 2)



**Figura 1.** Distribución geográfica de *Colomascirtus larinopygion*.



**Figura 2.** Individuo de *Colomascirtus larinopygion*. Foto: Andrés Felipe Liévano-Bonilla, 2016.

### **3.1.2. Secreción cutánea de los anfibios**

La piel de los anfibios juega un papel muy importante en la respiración y las actividades de osmorregulación, para lo cual está formada por una capa delgada de células, pobladas a su vez, por glándulas mucosas o hidratantes que facilitan el intercambio gaseoso y glándulas granulares encargadas de secretar rápidamente una amplia gama de componentes químicos (Nascimento *et al.*, 2003). Así pues debido a estas glándulas, la epidermis y especialmente el estrato córneo funciona como un complejo mecanismo de defensa (Prates *et al.*, 2004), protegiendo a los individuos de predadores y de infecciones causadas por microorganismos como bacterias o protozoos, puesto que contiene potentes agentes antimicrobianos. (Nascimento *et al.*, 2003). Es por esto que las secreciones de la piel de anfibios constituyen una importante fuente de moléculas para la investigación de fármacos antimicrobianos que permitan enfrentar la creciente resistencia de los patógenos a los antibióticos convencionales.

Existen dos tipos de glándulas acinares en la piel de anfibios: mucosas y granulares, las mucosas están presentes en mayor número y se encargan del mantenimiento de la humedad de la piel y la termorregulación, por medio de secreción de mucinas (Nascimento *et al.*, 2003); por otra parte las glándulas

granulares son responsables de secretar sustancias que contienen compuestos farmacológicamente activos como: aminos biógenas, esteroides, alcaloides, bufodienolides, péptidos y proteínas, estas sustancias muestran actividades biológicas como neurotóxicas, vasoconstrictoras, alucinógenas, hipotensoras, antimicrobianas y efectos citotóxicos (Rinaldi, 2002).

## **3.2. BACTERIAS**

Son pequeños organismos procariotas que carecen de membrana nuclear, en ellas se pueden encontrar estructuras como la pared bacteriana, membrana citoplasmática, citoplasma, ribosomas, flagelos (en algunos casos), entre otros; las bacterias están involucradas en diversos procesos en los ecosistemas e incluso en la síntesis de vitaminas en los intestinos de algunos animales, pero en algunos casos llegan a representar el origen de enfermedades tanto en animales como en plantas (García *et al.*, 2000).

### **3.2.1. Pared Celular**

Las bacterias están rodeadas por paredes celulares rígidas que les otorga su forma característica y les permite vivir en medios hipotónicos, esta estructura se encuentra ubicada sobre la membrana plasmática; la pared celular bacteriana está compuesta por una red macromolecular denominada péptidoglucano, este se conforma por un esqueleto de hidrato de carbono dispuesto en hileras que se unen por medio de polipéptidos, (Totorá *et al.*, 2007).

Por medio de la tinción de Gram las bacterias pueden clasificarse como grampositivas, cuando tienen una pared gruesa que rodea su membrana plasmática, y como gramnegativas, cuando la pared celular es delgada y está cubierta por una membrana exterior compleja que posee importancia médica considerable pues es responsable de la virulencia bacteriana (Totorá *et al.*, 2007). Una de las funciones de la pared celular es la exclusión de sustancias tóxicas para las bacterias, incluyendo la tinción Gram, es por ello que las bacterias gramnegativas son más resistentes a antibióticos que las grampositivas, en

contraste existen sustancias antibióticas que actúan alterando la estructura de la pared, debilitando su funcionamiento y finalizando con una muerte celular (Voet *et al.*, 2009).

### **3.2.2. Membrana plasmática:**

La membrana es una estructura vital para las células bacterianas, es delgada y se ubica internamente con respecto a la pared celular y rodeando el citoplasma de la célula. En las bacterias esta se compone principalmente de fosfolípidos y proteínas; a diferencia de las células eucarióticas la membrana plasmática bacteriana no contiene esteroides, lo cual le confiere mayor flexibilidad (Totorá *et al.*, 2007). La membrana está cargada negativamente lo cual le permite interactuar con sustancias antimicrobianas catiónicas como los péptidos (Yount *et al.*, 2006).

### **3.2.3. *Escherichia coli***

Es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia; esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de microbiota normal, pero existen cepas que pueden ser patógenas (enterotoxigénicas, enterohemorrágicas, enteroinvasivas, entre otras) y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea principalmente en niños, infecciones urinarias e infecciones intrahospitalarias (Rodríguez 2002).

### **3.2.4. *Pseudomonas aeruginosa***

Es una bacteria gramnegativa frecuente, perteneciente al grupo de los bacilos, ocasiona graves infecciones crónicas que resultan fatales para pacientes hospitalizados, especialmente los inmunocomprometidos, víctimas de quemaduras, enfermos de fibrosis quística y aquellos con cáncer neutropénico. Son causa frecuente de infecciones nosocomiales porque tienen altas tasas de supervivencia y están asociados con la capacidad de resistencia a antibióticos debida a una exposición a largo plazo en los tratamientos.(Soheili *et al.*, 2015).

### **3.2.5. *Staphylococcus aureus***

Estas bacterias son cocos grampositivos, muy resistentes al calor y a la desecación, colonizan las fosas nasales, la piel y el tracto gastrointestinal. Poseen diferentes proteínas de superficie que median la adherencia a los tejidos del huésped. Han emergido cepas resistentes a meticilina además de otros agentes hospitalarios lo que conlleva a infecciones sistémicas preocupantes (Pahissa, 2009).

### **3.2.6. *Enterococcus faecalis***

Durante el desarrollo de esta investigación fue incluida una cepa bacteriana de la especie *E. faecalis*. Esta bacteria es un coco grampositivo, además es un anaerobio facultativo; esta bacteria es abundante en el lumen intestinal humano y en la mayoría de las circunstancias no representa peligro a sus huéspedes. Por otra parte resiste condiciones ambientales extremas. Son reconocidos como patógenos nosocomiales que ocasionan infecciones como meningitis bacteriana, bacteriemia, entre otras. Se han identificado patrones de resistencia y sensibilidad disminuida a la vancomicina (Stuart, 2006).

## **3.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA**

Para la determinación de la susceptibilidad que un agente antimicrobiano puede tener sobre una bacteria son empleadas las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, estas se dividen en dos categorías: pruebas de dilución y pruebas de difusión cuya ventaja son los bajos costos. La prueba de difusión involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobianos en un reservorio (discos de papel) ubicados sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. La prueba de dilución en caldo se utiliza para medir cuantitativamente la actividad "*in vitro*" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano, se preparan una serie de tubos con medio de cultivo líquido, a los cuales se les agrega el antibiótico en distintas concentraciones, luego se inoculan cada uno de los tubos con una suspensión estandarizada del microorganismo en

estudio. Las pruebas se examinan después de incubar 18 a 24 horas a 37°C y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado (Malbrán, 2001).

Las pruebas de susceptibilidad están indicadas para cualquier microorganismo, contribuyendo así a orientar el tratamiento terapéutico de los procesos infecciosos. (Malbrán, 2001)

### **3.4. HEMÓLISIS DE ERITROCITOS**

Los eritrocitos constituyen la masa principal del componente celular hemático, en promedio en las mujeres se encuentran 4,6 y en los hombres 5,2 millones de eritrocitos por  $\mu\text{L}$  de sangre. Para el mantenimiento de la forma normal de los eritrocitos es necesaria una sobrepresión osmótica en el interior de este, pero bajo determinadas situaciones se puede ocasionar el rompimiento de la membrana celular, provocando la destrucción globular y dejando libre la hemoglobina en el plasma, por ejemplo la hemólisis osmótica desencadenada por variaciones en la presión osmótica, la hemólisis química mediante disolventes orgánicos como cloroformo, éter o detergentes sintéticos capaces de disolver los componentes lipídicos de la membrana y finalmente la hemólisis tóxica debida a la exposición de los eritrocitos a toxinas animales o bacterianas. (Thews, *et al.*, 1983)

#### 4. ANTECEDENTES

Los anfibios emplean su piel como barrera ante agentes y sustancias amenazantes con el objetivo de garantizar su supervivencia, para ello las secreciones cutáneas presentan sustancias farmacológicamente activas, destacándose los péptidos antimicrobianos, por ejemplo Bombinin péptido purificado de la especie *Bombina variegata* en la década de 1970 y Magainins purificado de la especie *Xenopus laevis* en 1987 (Nascimento *et al.* 2003). Estos fueron los inicios de importantes investigaciones que han perfeccionado sus métodos de estudio con la disponibilidad de equipos y técnicas analíticas a través de los años.

Batista *et al.*, 1999, purificaron diferentes péptidos de la secreción cutánea de *Phyllomedusa distincta* (Hylidae), siendo Q2, Q1, L, M y K los primeros péptidos informados para esta especie, adicionalmente identificaron la estructura primaria para cada uno y demostraron la potente actividad antimicrobiana de los mismos contra bacterias Gram negativas y gram positivas (*E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*), presentando CIM entre 0,6 y 40 mM.

Batista *et al.*, 2001, purificaron el péptido Distinctin del extracto crudo de glándulas granulares de la piel de *P. distincta* (Hylidae), también determinaron la actividad antibiótica de la secreción para las cepas *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, con CIM entre 14,5 y 28  $\mu$ M, y analizaron las propiedades estructurales del péptido.

Mangoni *et al.*, 2001, compararon el efecto antimicrobiano de la secreción de piel de dos poblaciones de *Rana esculenta*, sometidas a condiciones diferentes de esterilidad, demostrando que las ranas mantenidas en ambiente estéril no producen péptidos antimicrobianos; también documentaron los cambios morfológicos de las glándulas granulares en los anuros ante dichas condiciones.

Brand *et al.*, 2002, aislaron y determinaron la estructura primaria y la actividad biológica del péptido antimicrobiano DS 01, en la secreción cutánea de

*Phyllomedusa oreades*. El péptido mostró propiedades antibacterianas contra bacterias grampositivas y gramnegativas en un intervalo de 3-25  $\mu\text{M}$ , además no presentó toxicidad frente eritrocitos y glóbulos blancos en una concentración lítica.

Nascimento *et al.*, 2003, resaltan la función de las secreciones cutáneas de los anuros como primera barrera contra las infecciones microbianas debido a la actividad contra microorganismos, comparando diferentes péptidos aislados de anuros y especificando los mecanismos de acción antimicrobiana según su estructura.

Riera *et al.*, 2003, aislaron dos lectinas de la piel de *Bufo arenarum* (Bufonidae), LBP1 y LBP2, determinando la actividad bacteriostática contra las cepas *E. coli*, *Proteus morganii* y *Enterococcus faecalis*, ambos péptidos en una concentración de 3,25  $\mu\text{g/mL}$ .

Nascimento *et al.*, 2004, purificaron tres péptidos (Ocellatin 1, 2 y 3) antimicrobianos de la secreción cutánea de *Leptodactylus ocellatus*. Estos péptidos presentaron actividad hemolítica contra eritrocitos humanos y también son activos frente a *Escherichia coli* en concentraciones entre 2 y 4  $\mu\text{g/mL}$ .

Prates *et al.*, 2004, aislaron Hylaseptin, un péptido catiónico antimicrobiano de la secreción cutánea de *Hyla punctata* (Hylidae), verificaron su actividad contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con una CIM en un intervalo de 0,008 a 0,032  $\mu\text{g/mL}$ .

Yount *et al.*, 2006, construyeron un listado de péptidos antimicrobianos aislados de diferentes grupos taxonómicos, ubicando para cada uno de ellos su estructura, peso molecular y sitio activo, resaltando que péptidos antimicrobianos acceden más allá de la membrana citoplasmática mientras actúan, lo que confiere la resistencia de las bacterias.

Brand *et al.*, 2006, aislaron seis nuevos péptidos antimicrobianos (DSHypo 01, 02, 03, 04, 06 y 07) de la secreción cutánea de *Phyllomedusa hypochondrialis*, se demostró la actividad de cada uno de los péptidos no solo contra *E. coli* y *S. aureus* (CIM hasta 64  $\mu\text{M}$ ), sino también contra *Leishmania amaonnsis* y además

la actividad hemolítica contra eritrocitos, que para DShypo 01 es nula por encima de 53  $\mu\text{M}$ .

Ashcroft *et al.*, 2007, analizaron la actividad de dos péptidos (brevinin-2 y temporin-1SPb) aislados de la secreción cutánea de *Litobathes septentrionalis* contra bacterias aisladas del hábitat del anfibio: *Pseudomonas sp.*, *Serratia sp.*, *Bacillus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Burkholderia sp.* y *Microbacterium sp.*, con CIM en el intervalo 25 y 500  $\mu\text{M}$ .

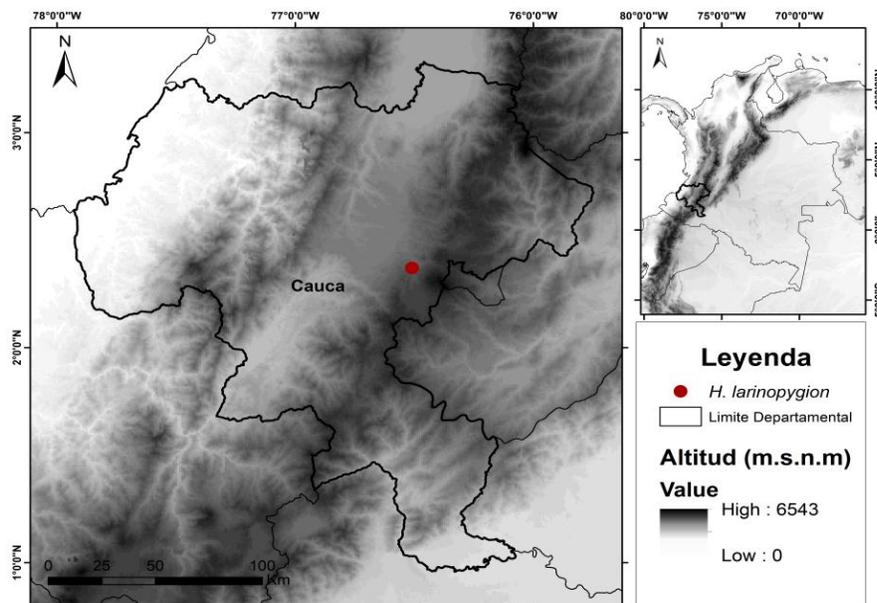
Coral, 2010, comparó la actividad antibiótica de la secreción de dos poblaciones de *Dendropsophus columbianus* sobre las cepas *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (CIM entre 4,6 y 8,6  $\mu\text{mL}$ ), encontrando una variación de la actividad en relación a la intervención del hábitat de cada población y una correlación entre la inhibición de crecimiento bacteriano y las altas concentraciones de secreción.

Entre las funciones que han sido objeto de estudio se resalta la actividad antimicrobiana, debida al contenido de péptidos en dichas secreciones; hasta el 2015 una revisión realizada por Xu y Lai, mostró que habían sido descritos 1900 péptidos antimicrobianos a partir de secreciones de 178 especies de anfibios; los péptidos secretados por las glándulas granulares proporcionan una defensa efectiva y de acción eficiente contra microorganismos (Xu & Lai, 2015).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE COLECTA:

La sub-cuenca Río Molino se localiza al sur occidente de Colombia, en el centro del Departamento del Cauca, hacia el oriente del municipio de Popayán, la cuenca alta del río Molino se encuentra ubicada en la vereda Santa Elena, corregimiento Santa Bárbara, con una altitud de 2880 msnm (Plan de Ordenación y Manejo Subcuenca Río Molino – Pubús, 2006).



**Figura 3.** Ubicación geográfica de la localidad de colecta de *C. larinopygion*.

Los sitios de muestreo seleccionados corresponden a bosques ribereños en la cuenca alta del río Molino, zona considerada como bosque húmedo Montano (bh-M) según la clasificación de zonas de vida de Holdridge. En los bosques se destacan plantas de tipo leñoso, gran número de lianas y una variedad de plantas herbáceas (Figura 4). La posición geográfica de la zona de colecta fue: W: 76° 30'34", N: 02° 22'21", altitud: 2692 msnm (GPS Commander compass Lite, versión 3.7.11 Apps Apple).



**Figura 4.** Bosque en la cuenca alta del río Molino, vereda Santa Elena. Foto: Andrés Felipe Liévano-Bonilla, 2016.

## **5.2. COLECTA DE INDIVIDUOS:**

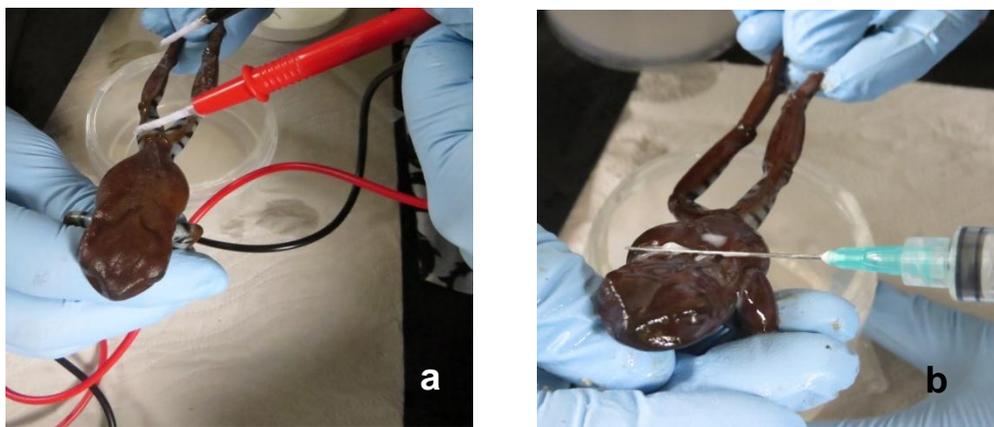
Los individuos de *C. larinopygion* fueron colectados durante un periodo de dos días a partir de las 17:00 hasta las 22:00 horas; aplicando la técnica de búsqueda completa no restringida (Rueda *et al.*, 2006). Se colectaron siete individuos adultos que fueron mantenidos en cautiverio por 24 horas consecuentes a la colecta (Figura 5) para realizar la extracción de la secreción cutánea y posteriormente se regresaron a su hábitat garantizando su bienestar.



**Figura 5.** Individuo *C. larinopygion* en cautiverio. Foto: Santiago Orozco-Chamorro, 2016

### 5.3. SECRECIÓN CUTÁNEA:

Siguiendo el método estandarizado por Coral, 2010, la secreción cutánea se obtuvo por estimulación eléctrica de las glándulas cutáneas en el anfibio (Figura 6), usando un voltaje de 0,01 mA, de corriente directa e incrementando gradualmente hasta alcanzar los 100 voltios; los eventos de estimulación duraron tres segundos y se realizaron separados por intervalos de un segundo. Para ello fue empleado un estimulador eléctrico portátil con voltaje graduable y corriente directa, llevado hasta el sitio de colecta donde fue realizada la extracción. La secreción fue recogida por medio de lavados con agua desionizada estéril y raspados del sobrante con una aguja en recipientes plásticos con tapa de rosca nuevos, luego fue congelada. Finalmente se liofilizó y refrigeró para su posterior uso.



**Figura 6.** Extracción de la secreción cutánea: **a.** Estimulación eléctrica de Individuo *C. larinopygion*. **b.** Raspado de sobrante de secreción en el individuo. Foto: Andrés Felipe Liévano-Bonilla, 2016.

### 5.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se realizaron los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana por el método de dilución o microdilución en caldo, según el Comité Nacional de estándares de laboratorio clínico (NCCLS), ahora denominado CLSI (Clinical and Laboratory

Standars Institute), manejado por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca y basándose en el protocolo estandarizado por Coral, 2010.

#### **5.4.1. Inóculo:**

Para la preparación del inóculo fue empleado un cultivo fresco de bacterias, por lo cual se realizó la resiembra de las cepas bacterianas ATCC de referencia: *E. coli* 25922, *P. aeruginosa* 27853, *S. aureus* 25923 y *E. faecalis* 29212, 24 horas previas al desarrollo de la prueba, todas en agar Müller Hinton. Transcurridas las 24 horas se tomaron entre tres y cinco colonias de cada cepa bacteriana e independientemente se introdujeron en tubos que contenían 5mL de medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion), posteriormente se incubaron a 37°C por 4-6 horas, de esta manera se alcanza una concentración de 1 a  $2 \times 10^8$  UFC/mL, este ajuste de concentración se realizó por medio del equipo densimat.

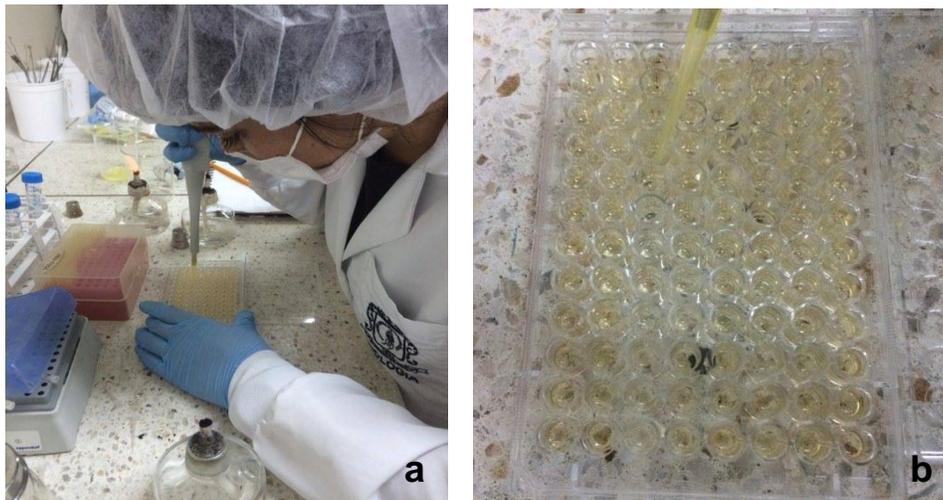
15 minutos previos a la realización de la prueba fueron diluidos 2mL de la suspensión McFarland preparada anteriormente, en 38 mL de agua desionizada, destilada y estéril, así se obtuvo una concentración final del inóculo de  $5 \times 10^5$  UFC/mL, esta fue la concentración para cada uno de los pozos de la microplaca. Todo este procedimiento se realizó aplicando los protocolos de asepsia pertinentes.

#### **5.4.2. Dilución en la microplaca:**

En dos microplacas para cultivo celular de 96 pozos (Figura 7), fue realizada la dilución de los tratamientos con la secreción cutánea; inicialmente se dispuso una solución de concentración 1,2 mg/mL de la secreción cutánea diluida en agua destilada, desionizada y estéril, modificado de Coral, 2010; a partir de esta se realizaron las diluciones seriadas en la microplaca: 0,6; 0,3; 0,15; 0,075, 0,0375 y 0,0187 mg/mL, modificado de Coral, 2010; como control positivo se utilizó

cloranfenicol en una concentración de 2mg/mL para las cepas de *S. aureus* y *E. faecalis* y Trimetoprim en 2mg/mL para *E. coli* y *P. aeruginosa*; en cada microplaca fueron inoculadas dos cepas bacterianas con la siguiente distribución: en la microplaca 1 fueron ubicadas *E. coli* (cepa 1) y *P. aeruginosa* (cepa 2) y en la microplaca 2, *S. aureus* (Cepa 3) y *E. faecalis* (cepa 4). Como control negativo se empleó caldo BHI e inóculo de cada bacteria. Se realizaron 6 repeticiones para cada uno de los tratamientos (Figura 8).

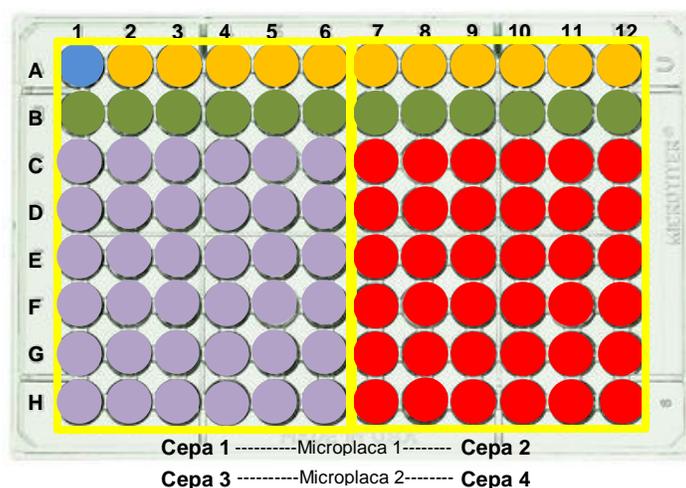
Una vez realizadas las diluciones de la secreción cutánea, quedando un volumen de 100uL de tratamiento en cada pozo, fueron aplicados 10uL de los diferentes inóculos de bacterias en cada tratamiento, finalmente se sellaron las microplacas con sus respectivas tapas y posteriormente se incubaron a 37°C por espacio de 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de absorbancia para cada tratamiento por medio de un analizador Stat Fax 2100.



**Figura 7.** Dilución en microplaca para cultivo celular. **a.** Aplicación con micropipeta de los tratamientos en cada pozo de la microplaca. **b.** Microplaca con el cultivo para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Foto: Alvaro Javier Patiño-Jaramillo (2016)

Para las cepas bacterianas que fueron inhibidas por la secreción después de 24 horas de incubación, fue realizada una segunda lectura de absorbancia

transcurridas 48 horas a partir de la siembra por medio de un analizador Stat Fax 2100.



**Figura 8.** Distribución de tratamientos en la microplaca para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Dos cepas bacterianas para cada microplaca: *E. coli* (cepa 1) y *P. aeruginosa* (cepa 2) en microplaca 1 y *S. aureus* (cepa 3) y *E. faecalis* (cepa 4) en microplaca 2. La microplaca 1 fue distribuida de la siguiente manera: A1: pozo vacío (Azul), A2-6: control negativo de cepa 1 (amarillo), A7-12: control negativo de cepa 2 (amarillo), B1-6: control positivo de cepa 1 (verde), B7-12: control positivo de cepa 2 (verde). Desde la fila C hasta la fila H se encuentran las diluciones de la secreción cutánea: C:1-6 dilución 0,6 mg/mL, D1-6: dilución 0,3 mg/mL, E1-6: dilución 0,15 mg/mL, F1-6 dilución 0,075mg/mL, G1-6: dilución 0,15 mg/mL, H1-6: dilución 0,15 mg/mL todas con la cepa 1 (morado); C:7-12 dilución 0,6 mg/mL, D1-6: dilución 0,3 mg/mL, E7-12: dilución 0,15 mg/mL, F7-12 dilución 0,075mg/mL, G7-12: dilución 0,15 mg/mL, H7-12: dilución 0,15 mg/mL todas con la cepa 2 (rojo). En la microplaca 2 la distribución de los tratamientos se realizó de igual forma para las cepas 3 y 4.

### 5.5. PRUEBA DE HEMÓLISIS:

La actividad hemolítica de la secreción de *C. larinygion* fue determinada empleando 4mL de sangre humana de tipo O+, colectada en un vacutainer con heparina, de un donante masculino quien fue informado respecto a los procedimientos de esta prueba (Anexo 3). Esta etapa de obtención de la muestra

sanguínea se llevó a cabo en las instalaciones de la unidad de salud integral de la Universidad del Cauca. Posteriormente la separación de las células sanguíneas del plasma se realizó mediante centrifugación por 3 minutos a 3670 rpm, todo a temperatura ambiente. Los eritrocitos fueron lavados tres veces con solución Tris-salina (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4). Se añadieron 6 concentraciones de secreción cutánea (similares a la prueba de susceptibilidad antimicrobiana) diluidas en Tris-salina (1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,625 y 0,3125 mg/mL) a una suspensión de eritrocitos al 3% en Tris-salino. Esta mezcla se homogenizó mediante pipeteo suave, se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min. Se tomó el sobrenadante (200uL) y fue transferido a un microplato, finalmente se midió la absorbancia a 540 nm en un analizador Stat Fax 2100. Se utilizó agua desionizada con eritrocitos como control positivo y solución salina con eritrocitos como control negativo. Fueron realizadas seis repeticiones para el experimento. (Taniyama *et. al.*, 2003; Prates, *et al.*, 2004).

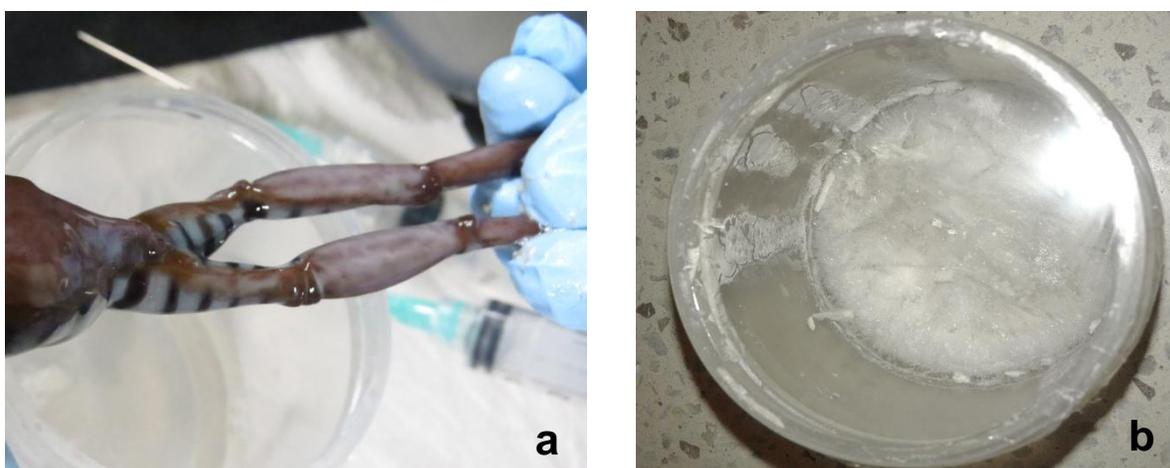
## **5.6. DISEÑO EXPERIMENTAL:**

La comparación del poder inhibitorio de la secreción cutánea contra las diferentes cepas se analizó a través de un diseño completamente al azar (DCA), se aplicaron las pruebas de ajuste a la curva normal de los datos y homegeneidad de varianzas entre los diferentes tratamientos, en los experimentos que cumplieron con estos criterios se aplicó la prueba paramétrica de ANOVA de una vía y para los experimentos donde no se cumplieron estos dos criterios, la inferencia estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, usando el software Bioestat 5,3. En las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana donde se registró actividad de inhibición de crecimiento bacteriano y en la prueba de hemólisis, se realizó una regresión logaritmica, usando el Software GraphPad Prism 5,0.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. SECRECIÓN CUTÁNEA:

La secreción cutánea de *C. larinopygion* colectada después de la estimulación fue una sustancia de consistencia viscosa, color blanco, olor muy fuerte y persistente, en cada uno de los individuos. Así mismo, la secreción cutánea liofilizada presentó apariencia fibrosa, un color blanco y el mismo olor fuerte. Se obtuvo un total de 600 mg de secreción liofilizada. (Figura 9)



**Figura 9.** Secreción cutánea de *C. larinopygion*. **a.** Secreción cutánea líquida inmediatamente posterior a la electroestimulación. Foto: Andrés Felipe Liévano-Bonilla, 2016. **b.** Secreción cutánea liofilizada. Foto: Alexandra Lazo-Idrobo, 2016.

### 6.2. DILUCIÓN EN MICROPLACA

Inmediatamente después de realizar el procedimiento de dilución en las microplacas, se observó un color amarillento traslucido en cada uno de los pozos inoculados, estos registraron una absorbancia de 0,045; transcurridas las 24 de incubación se evidenció un incremento en la absorbancia para todas las cepas empleadas (Tabla 1), lo que asegura que si se desarrolló crecimiento de las bacterias.

### 6.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA:

La secreción cutánea de *C. larinopygion* generó diferentes efectos sobre el crecimiento de las cuatro cepas bacterianas, en primer lugar se destaca la inhibición del crecimiento en cepas bacterianas tanto gram positivas como gram negativas (*S. aureus* y *E. coli* respectivamente); en segundo lugar, para las cepas *E. faecalis* y *P. aeruginosa* no fue registrada actividad inhibitoria ante la exposición a la secreción. Adicionalmente esta secreción presentó variación en los efectos inhibitorios en cada una de las cepas, con respecto a la concentración de secreción cutánea empleada para cada tratamiento (0,6; 0,3; 0,15; 0,075; 0,0375 y 0,01875 mg/mL), fue atribuido el efecto inhibitorio más eficiente a las concentraciones más altas; este hecho fue revelado mediante el análisis de varianzas.

**Tabla 1.** Comparación de absorbancias registradas en la prueba de susceptibilidad para las cuatro cepas bacterianas.

<b>CEPAS BACTERIANAS</b>	<b>Absorbancia BHI</b>	<b>Absorbancia Control negativo</b>	<b>Absorbancia 0,6 mg/mL de secreción 24 horas</b>	<b>Absorbancia 0,3 mg/mL de secreción 24 horas</b>
<i>E. coli</i>	0,045	0,115	0,044	0,073
<i>P. aeruginosa</i>	0,045	0,089	0,061	0,069
<i>S. aureus</i>	0,045	0,070	0,048	0,049
<i>E. faecalis</i>	0,045	0,153	0,128	0,154

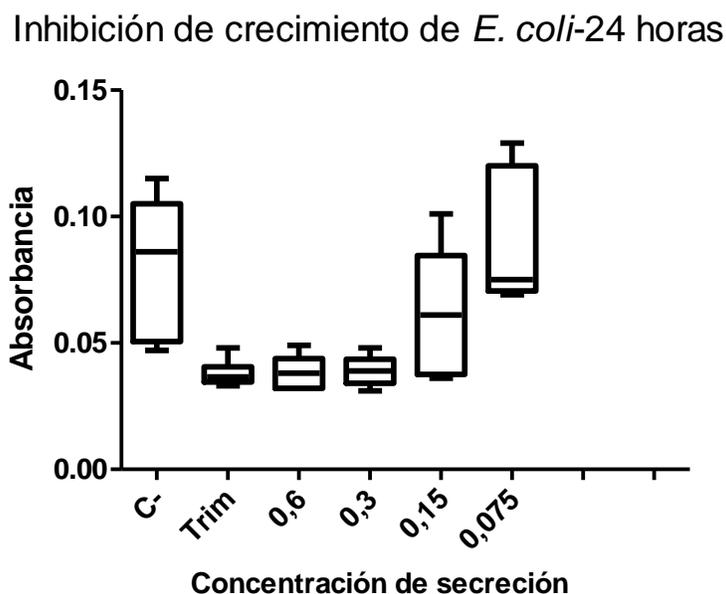
#### 6.3.1. EFECTO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA SOBRE *E. coli*

Transcurridas 24 horas a partir del desarrollo de la prueba de susceptibilidad, la cepa *E. coli* presentó una diferencia en la inhibición de crecimiento ante las concentraciones de secreción, estas variaciones fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 2) y arrojaron que los efectos inhibitorios del crecimiento bacteriano son altamente significativos en las concentraciones de 0,6

y 0,3 mg/mL de secreción cutánea frente al control negativo (Figura 10), además de que este efecto es similar a la inhibición generada por el medicamento Trimetoprim empleado como control positivo.

**Tabla 2.** Prueba de Kruskal-Wallis en la inhibición de crecimiento de *E. coli* por la secreción cutánea de *C. larinopygion* transcurridas 24 horas de incubación.

Prueba de Kruskal-Wallis	
H	20,7325
p	0,0009

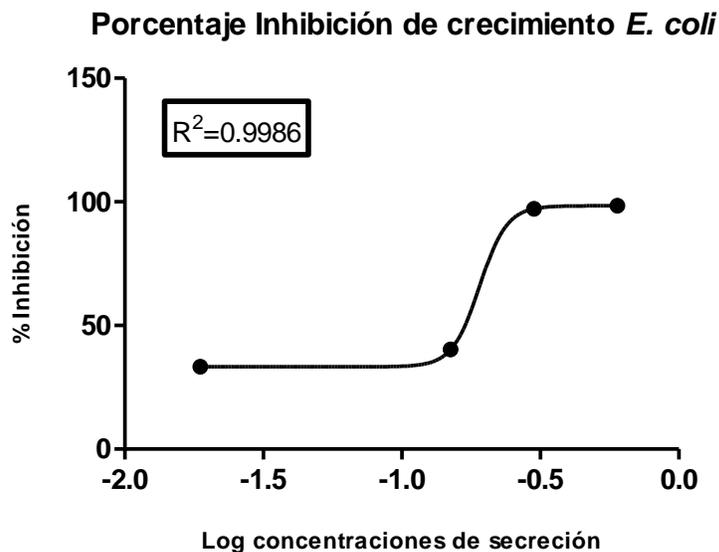


**Figura 10.** Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa *E. coli* frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea: Las concentraciones de 0,6 y 0,3 mg/mL presentan diferencia significativa con respecto al control negativo (C-).

Tomando en cuenta que el efecto inhibitorio de crecimiento bacteriano para la cepa *E. coli* se magnifica a medida que la concentración de la secreción cutánea es incrementada, es posible resaltar que la mayor concentración empleada (0,6 mg/mL) tiene la capacidad de inhibir en un 100% el crecimiento bacteriano, en

contraste las concentraciones más bajas de secreción (0,01875 mg/mL) inhiben porcentajes cercanos al 25% del crecimiento (Figura 11).

Por medio de la regresión logarítmica que indica los porcentajes de inhibición de crecimiento para la cepa *E. coli* fue posible estimar el valor de CIM para la secreción de *C. larinopygion*, que equivale a 0,075 mg/mL.



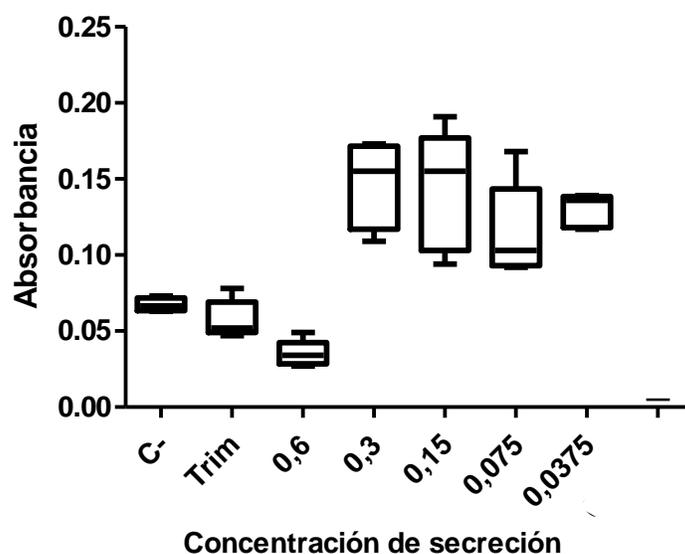
**Figura 11.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de la cepa *E. coli* dependiente de la concentración de secreción cutánea de *C. larinopygion*.

Transcurridas 48 horas a partir del desarrollo de la prueba de susceptibilidad, la cepa *E. coli* conservó una diferencia en la inhibición de crecimiento ante las concentraciones de secreción, estas variaciones fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 3) y arrojaron que el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano es altamente significativo para la concentración de 0,6 mg/mL de secreción cutánea frente al máximo crecimiento bacteriano (Figura 12); este hecho sugiere que el efecto de la secreción es bactericida para la cepa *E. coli* en dicha concentración.

**Tabla 3.** Prueba de Kruskal-Wallis en la inhibición de crecimiento de *E. coli* por la secreción cutánea de *C. larinygion* transcurridas 48 horas de incubación.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis	
H	22,1041
<b>P</b>	0,0005

Inhibición de crecimiento de *E. coli*-48 horas



**Figura 12.** Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa *E. coli* frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea 48 horas después de la incubación.

### 6.3.2. EFECTO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA SOBRE *P. aeruginosa*

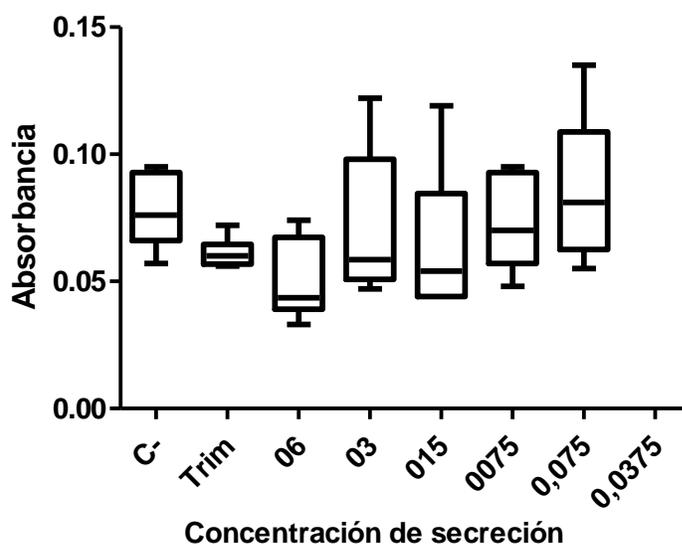
La medida de absorbancia posterior a 24 horas desde el desarrollo de la prueba de susceptibilidad, la cepa *P. aeruginosa* presentó diferencias en la inhibición de crecimiento ante las concentraciones de secreción, estas variaciones fueron analizadas mediante la prueba de ANOVA de un criterio (Tabla 4) indicando que

los efectos inhibitorios del crecimiento bacteriano no fueron significativos frente al control negativo (Figura 13), La secreción cutánea de *C. larinopygion* no presentó efecto antibiótico sobre esta cepa.

**Tabla 4.** Prueba de ANOVA de una vía para la inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa* por la secreción cutánea de *C. larinopygion* después de 24 horas.

Prueba ANOVA de una vía	
F	1,6233
<i>p</i>	0,1566

Inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa*-24 horas



**Figura 13.** Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea.

48 horas después del desarrollo de la prueba de susceptibilidad, no se registró diferencia estadísticamente significativa (Tabla 5) para la cepa *P. aeruginosa* ante las concentraciones de secreción cutánea a las que fue expuesta.

**Tabla 5.** Prueba de ANOVA de una vía para la inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa* por la secreción cutánea de *C. larinopygion* después de 48 horas.

Prueba ANOVA de una vía	
F	1.9261
<i>p</i>	0.0903

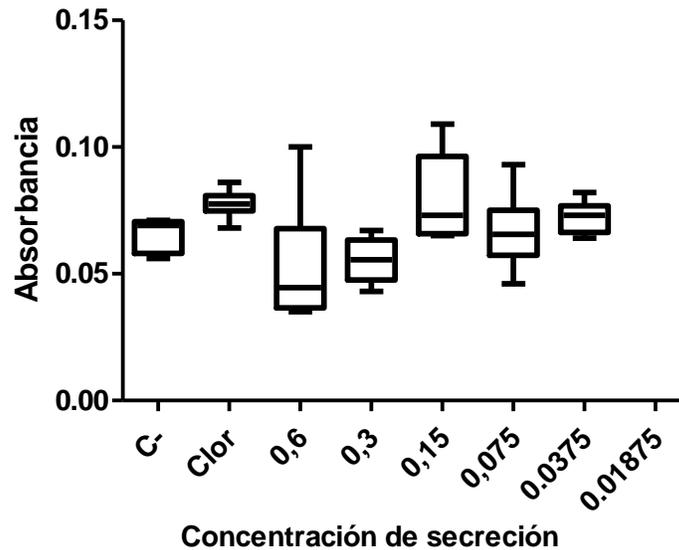
### 6.3.3. EFECTO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA SOBRE *S. aureus*

Esta cepa mostró un comportamiento similar a *E. coli*, 24 horas posteriores al desarrollo de la prueba de susceptibilidad, la cepa *S. aureus* presentó diferencias en la inhibición de crecimiento bacteriano ante las concentraciones de secreción, estas variaciones fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 6) estableciendo que el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano es altamente significativo en la concentración de 0,6 mg/mL de secreción cutánea frente al control negativo (Figura 14).

**Tabla 6.** Prueba de Kruskal-Wallis para la inhibición de crecimiento de *S. aureus* debida a la secreción, después de 24 horas.

Prueba de Kruskal-Wallis	
H	18:8460
<i>p</i>	0.0087

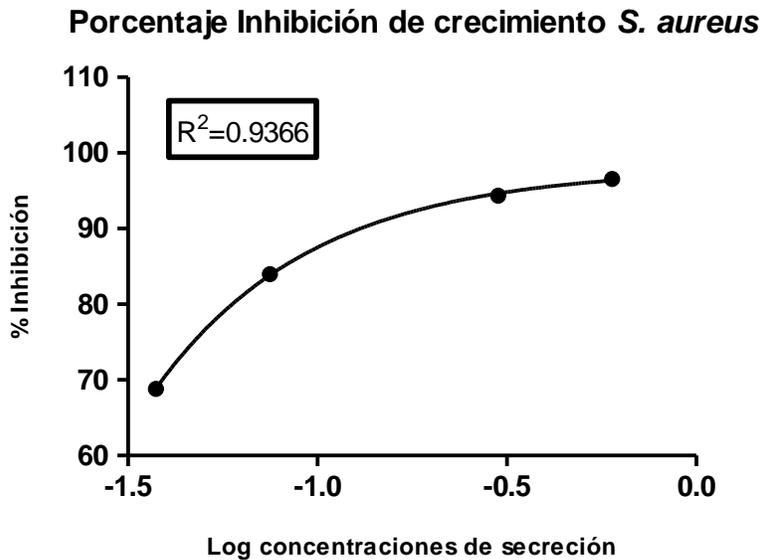
### Inhibición de crecimiento de *S. aureus*-24 horas



**Figura 14.** Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa *S. aureus* frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea: La concentración 0,6 mg/mL presenta diferencia significativa con respecto al control negativo (C-).

Es claro que el efecto inhibitorio de crecimiento bacteriano para la cepa *S. aureus* incrementa a medida que la concentración de la secreción cutánea es mayor, por lo cual se afirma que la mayor concentración empleada (0,6 mg/mL) tiene la capacidad de inhibir en un 100% el crecimiento bacteriano, en contraste las concentraciones más bajas de secreción (0,01875 mg/mL) no inhiben el crecimiento (Figura 15).

Empleando la regresión logarítmica que indica los porcentajes de inhibición de crecimiento para la *S. aureus* fue posible estimar el valor de CIM para la secreción de *C. larinopygion*, que equivale a 0,01875 mg/mL y es notoriamente menor que en la cepa *E. coli*.



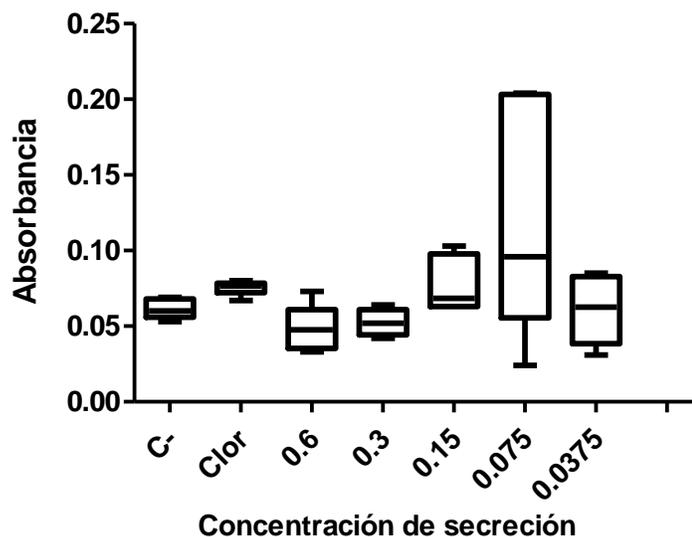
**Figura 15.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de la cepa *S. aureus* dependiente de la concentración de secreción cutánea de *C. larinygion*.

48 horas después del desarrollo de la prueba de susceptibilidad, la cepa *S. aureus* mantuvo variaciones en la inhibición del crecimiento bacteriano, estas fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 7), y arrojaron que el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano es significativo para la concentración de 0,6 mg/mL de secreción cutánea frente al máximo crecimiento bacteriano (Figura 16); este hecho sugiere que el efecto de la secreción es bactericida para la cepa *S. aureus* en dicha concentración.

**Tabla 7.** Prueba de Kruskal-Wallis para inhibición de crecimiento de *S. aureus* frente a la secreción cutánea de *C. larinygion*, después de 48 horas.

Prueba de Kruskal-Wallis	
H	15,4099
<i>p</i>	0,0173

### Inhibición de crecimiento de *S. aureus*-48 horas



**Figura 15.** Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa *S. aureus* frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea, después de 48 horas.

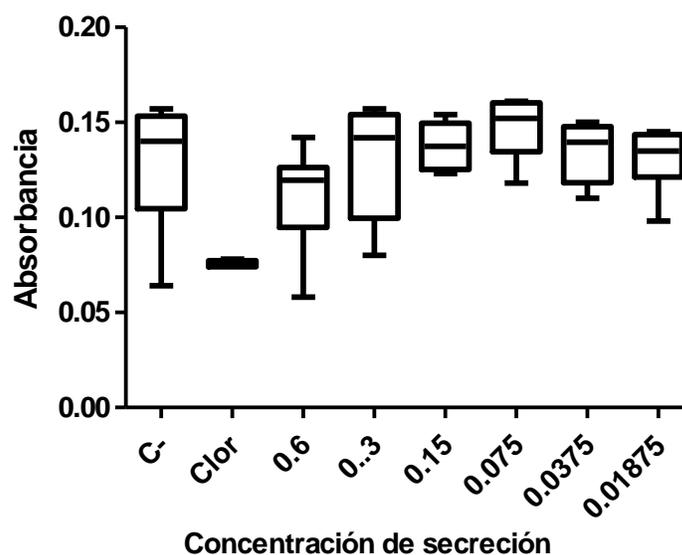
#### 6.3.4. EFECTOS DE LASERECIÓN CUTÁNEA SOBRE *E. faecalis*

24 horas después del desarrollo de la prueba de susceptibilidad, la cepa *E. faecalis* presentó diferencias pequeñas en la inhibición de crecimiento ante las concentraciones de secreción, estas variaciones fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 8) comprobando que los efectos inhibitorios del crecimiento bacteriano no fueron significativos frente al control negativo (Figura 17), La secreción cutánea de *C. larinopygion* no presentó efecto antibiótico sobre esta cepa bacteriana.

**Tabla 8.** Prueba de Kruskal-Wallis para la inhibición de crecimiento de *E. faecalis* frente a la secreción cutánea de *C. larinopygion* después de 24 horas.

Prueba de Kruskal-Wallis	
H	8,3599
<i>p</i>	0,2129

### Inhibición de crecimiento de *E. faecalis*-24 horas



**Figura 16.** Varianza en la inhibición de crecimiento de la cepa *E. faecalis* frente a diferentes concentraciones de secreción cutánea, después de 24 horas.

Transcurridas 48 horas a partir del desarrollo de la prueba de susceptibilidad, no se registró diferencia estadísticamente significativa (Tabla 9) para la cepa *E. faecalis* ante las concentraciones de secreción cutánea a las que se expuso.

**Tabla 9.** Prueba de Kruskal-Wallis para la inhibición de crecimiento de *E. faecalis* frente a la secreción cutánea de *C. larinopygion*

Prueba de Kruskal-Wallis	
H	5.8040
<i>p</i>	0,3258

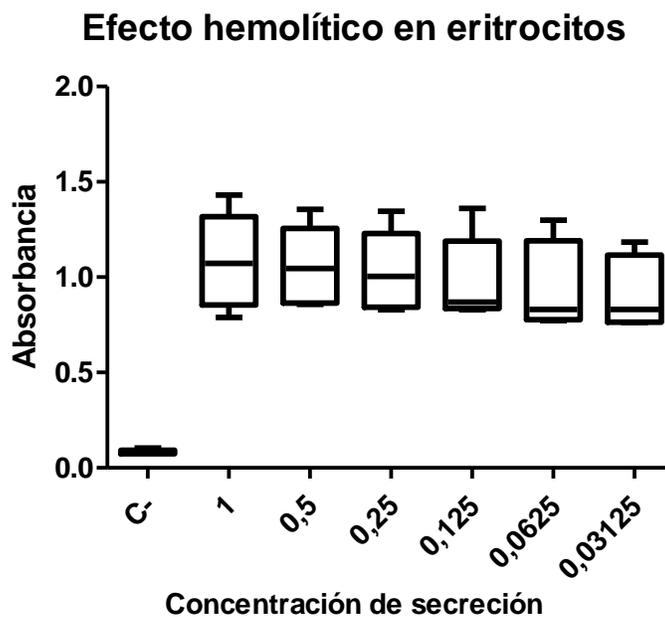
#### 6.4. EFECTO HEMOLÍTICO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA:

La secreción cutánea de *C. larinopygion* tiene efecto hemolítico sobre eritrocitos humanos. Por medio del análisis mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 10)

se encontró una diferencia significativa de las seis concentraciones de secreción cutánea empleadas (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0,0312 mg/mL) frente al control negativo (Figura 18)

**Tabla 10.** Prueba de Kruskal-Wallis para la hemólisis de eritrocitos frente a la secreción cutánea de *C. larinopygion*

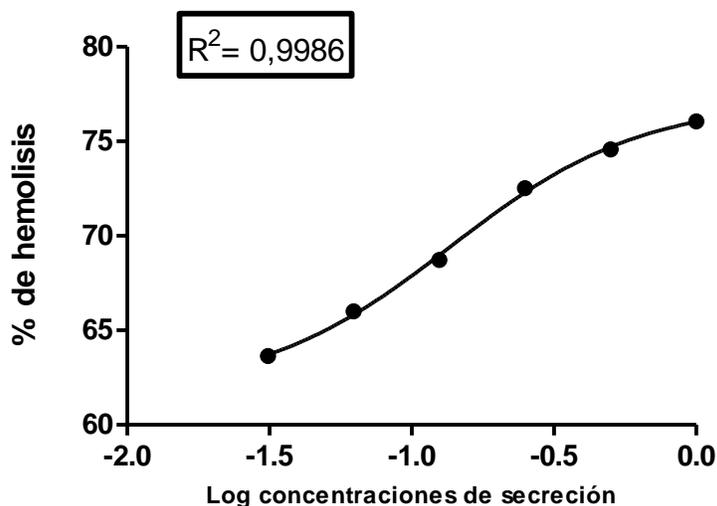
Prueba de Kruskal-Wallis	
H	20,0415
<i>p</i>	0,0027



**Figura 18.** Efecto hemolítico en eritrocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de secreción de *C. larinopygion*.

Las concentraciones de secreción cutánea empleadas en esta prueba generaron porcentajes altos de hemólisis (entre 50 y 80%), adicionalmente se puede asegurar que el efecto hemolítico incrementa a medida que la concentración de la secreción es mayor. Por otra parte, los valores de CIM para las cepas *E. coli*

(0,075 mg/mL) y *S. aureus* (0,01875 mg/mL) se encuentran dentro del rango de concentraciones donde se generó hemólisis de eritrocitos humanos (Figura 19).



**Figura 17.** Regresión logarítmica que muestra la concentración de la secreción contra el porcentaje de hemólisis causado en eritrocitos humanos.

A partir de la regresión logarítmica para los porcentajes de hemólisis fue estimada la concentración de la secreción donde se registra el 50% de hemólisis en los eritrocitos de la muestra. (Tabla 11)

**Tabla 11.** IC50 de secreción cutánea calculada para la prueba de hemólisis

IC50 HEMOLISIS	
<b>IC50</b>	0,1368 mg/mL

## 7. DISCUSIÓN

*C. larinopygion* secretó por medio de la estimulación eléctrica sobre toda la piel una considerable cantidad de secreción (peso liofilizada 600 mg de 7 individuos), en comparación con la secreción de *D. columbianus* (peso sin liofilizar 50 mg de 14 individuos) registrada en una mezcla de agua desionizada y secreción (Coral, 2010). La secreción de *C. larinopygion* presentó un particular olor que además es muy fuerte y duradero, esto seguramente debido a que fue secretada a partir de glándulas granulares en la piel que son las encargadas de secretar sustancias tóxicas que sirven para la defensa ante patógenos microbianos que comúnmente se encuentran en su hábitat y por tanto presentar olores característicos (Colon, 2011).

La secreción cutánea de *C. larinopygion* presentó actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas y gram negativas, esta especie de anuro se encuentra en hábitats conservados y semiconservados, específicamente sobre fuentes de agua con corriente lenta, sin embargo naturalmente están expuestas a bacterias en su medio, hecho justificado debido a que las secreciones de los anfibios representan una importante fuente de sustancias con actividad biológica, tales como péptidos, aminas, esteroides y alcaloides (Bowie *et al.*, 2006). E incluso se he comprobado puesto que funciones como esta han sido objeto de estudio especialmente se resalta la actividad antimicrobiana, debida al contenido de péptidos en las secreciones (Xu & Lai, 2015). Otra característica presente en la secreción de *C. larinopygion*, fue que en el momento de realizar la dilución de la secreción liofilizada en agua desionizada, esta se tornó algo hidrofóbica, esta situación puede atribuirse a la característica de los péptidos aislados de secreciones cutáneas de *H. biobeba* que contienen numerosos residuos hidrofóbicos (Castro *et al.*, 2005).

El hecho de que la secreción de *C. larinopygion* presente actividad antibiótica frente a las cepas bacterianas *E. coli* y *S. aureus* sugiere que en el medio donde habitan estos anuros se encuentran expuestos a estas bacterias y ante ello deben

poseer moléculas con la capacidad de contrarrestarlas y evitar que afecten sus procesos vitales (Mangoni *et al.*, 2001)

Respecto a la determinación del efecto antibiótico de la secreción cutánea sobre las cuatro cepas bacterianas empleadas en este trabajo, fue posible identificar un efecto inhibitorio de crecimiento en las cepas *E. coli* y *S. aureus*, por el contrario, no se registró actividad antibiótica en las cepas *P. aeruginosa* y *E. faecalis*. Debe tenerse en cuenta que el efecto evaluado se encontró por medio de una secreción con el total de sus componentes, sin embargo se registró una significativa actividad de la secreción pues la inhibición de crecimiento abarca bacterias gram negativas y gram positivas; en los experimentos donde se registró efecto inhibitorio fue posible calcular CIM resultando un valor semejante a algunos CIM de péptidos aislados de secreciones totales (Tabla 12), (Coral, 2010; Prates, *et al.*, 2004; Lohner & Prossnigg, 2009; Fernandez *et al.*, 2009).

**Tabla 12.** Contraste de CIM (mg/mL) para péptidos aislados de secreciones totales y secreciones totales de anuros. Tomado y modificado de Coral, 2010: Pates *et al.*, 2004; Lohner & Prossnigg, 2009 y Fernandez *et al.*, 2009

Péptido	Secreción total		Autoria
	CIM <i>E. coli</i>	CIM <i>S. aureus</i>	
HSP1	0,032	0,008	Prates <i>et al.</i> (2004)
PGLa	0,032	0,064	Lohner & Prossnigg (2009)
Mag2	0,064	0,256	Lohner & Prossnigg (2009)
Caerin 1	> 0,1	0,003	Fernandez <i>et al.</i> (2009)
Maculatin 1	> 0,1	0,006	Fernandez <i>et al.</i> (2009)
Citropin	> 0,1	0,025	Fernandez <i>et al.</i> (2009)
Aurein 1.1	> 0,1	0,05	Fernandez <i>et al.</i> (2009)
Sec. Total <i>C. larinopygion</i>	0,1531	0,07507	Este trabajo
Sec. Total <i>Dendropsophus columbianus</i>	8,61	4.60	Coral (2010)

La actividad antibiótica que representó la secreción cutánea de *C. larinopygion* fue más eficiente para la cepa de *S. aureus*, hecho que se ha registrado en la actividad de péptidos aislado de secreciones de anuros como HSP1, Caerin 1,

Maculation 1, Citropin, Aurein 1.1 y la secreción total de *C. larinopygion* (Coral, 2010; Pates *et. al.*, 2004; Lohner & Prossnigg, 2009; Fernandez *et. al.*, 2009).

Se conoce que el péptido encontrado en *H. punctata* destruye a los organismos patógenos por medio de la interacción directa con la membrana celular, desencadenando un proceso progresivo de permeabilización y lisis celular (Prates *et al.*, 2004); este proceso puede inferirse como el causante de la actividad antibacteriana de *C. larinopygion*, pero cabe resaltar que la secreción cutánea causó inhibición en bacterias de tipo gram negativas y gram positivas, que tienen composiciones desiguales de pared, esto sugiere una buena eficiencia del poder antibiótico a pesar de no registrarse actividad sobre dos de las cepas estudiadas (*P. aeruginosa* bacteria gram negativa y *E. faecalis* bacteria gram positiva). Adicionalmente, la mayor actividad antibiótica registrada se relaciona respectivamente con las concentraciones más elevadas de la secreción cutánea.

La secreción cutánea mantuvo el efecto inhibitorio en las dos cepas bacterianas durante las primeras 48 horas, este hecho permite sugerir que la actividad registrada es bactericida en la concentración de 0,6 mg/mL para ambos casos.

Finalmente la actividad hemolítica registrada para la secreción de *C. larinopygion* fue considerablemente alta, mayor al 50% para las concentraciones desde 1mg/mL hasta 0,03125 mg/mL, relacionando un aumento de hemólisis en los eritrocitos con las concentraciones más altas de secreción. Los péptidos antimicrobianos que se encuentran en secreciones de anuros tienen la capacidad de interactuar con las células y lizarlas (Aoki *et al.* 2012), esto lleva a considerar que los péptidos y las secreciones totales presenten actividad hemolítica; como sucede con los péptidos aislados de la secreción cutánea de la rana *Hyla biobeba* (Castro *et al* 2005), también se ha comprobado que el péptido de la secreción de *H. punctata* produjo un efecto hemolítico mínimo (inferior al 5%) sin embargo la concentración hemolítica es mucho mayor que la concentración antibiótica (Prates *et al.*, 2004).

De esta forma se define que el efecto hemolítico ocasionado por la secreción total de *C. larinopygion* resultó muy alto, por lo cual se puede visualizar una aplicación

diferente a un fármaco para la secreción, sin embargo es necesario realizar un estudio profundo de los componentes de la secreción para encontrar aplicaciones biotecnológicas pertinentes para sus componentes.

## 8. CONCLUSIONES

La secreción cutánea de individuos de *C. larinopygion* tiene actividad inhibitoria de crecimiento sobre bacterias gram negativas y gram positivas, de las cepas *E. coli* y *S. aureus*.

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la secreción cutánea de *C. larinopygion* sobre *E. coli* y *S. aureus*, es 0.1531 y 0.07507 mg/mL respectivamente, resultando valores similares a los de algunos péptidos aislados de secreciones totales.

La secreción cutánea causa hemólisis sobre los eritrocitos de los seres humanos en porcentajes altos.

La secreción cutánea no presenta actividad inhibitoria de crecimiento ante las cepas bacterianas de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*.

El mayor porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano en las dos cepas se presenta en las mayores concentraciones de la secreción cutánea, la concentración de 0,6 mg/mL fue la más eficiente en dicha inhibición.

Este potencial brinda nuevas herramientas que le dan mayor valor biológico a este tipo de herpetofauna, facilitando e incrementando las estrategias para conservación de los anfibios en Colombia.

## 9. RECOMENDACIONES

Es conveniente realizar estudios posteriores que permitan identificar las sustancias presentes en la secreción cutánea de *C. larinopygion* y su funcionamiento en los procesos de inhibición de crecimiento bacteriano.

Es preciso evaluar el potencial de la secreción en otros agentes infecciosos como hongos o parásitos, con el fin de seguir explorando las actividades que se desconocen de la secreción de esta especie.

Es importante analizar los factores ambientales a los que se expone *C. larinopygion* con el fin de tener una relación y un mejor entendimiento del potencial de esta secreción cutánea.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Galvis, A. R. & D. Cuentas 2017. Lista de los Anfibios de Colombia: Referencia en línea V.07.2017.0 (Fecha de acceso). Página web accesible en <http://www.batrachia.com>; Batrachia, Villa de Leyva, Boyacá, Colombia.

Ashcroft, J., Zalinger, B., Bevier, C. & Fekete, F. (2007). Antimicrobial Propeptides Of Two Purified Skin Peptides From The Mink Frog (*Rana Septentrionalis*) Against Bacteria Solated From The Natural Hábitat. *Comparative Biochemestr And Physiology*. 146, 325-330.

Aoki, W., Kuroda, K., & Ueda, M. (2012). Next Generation Of Antimicrobial Peptides As Molecular Targeted Medicines. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 114(4), 365–370. [Http://Doi.Org/10.1016/J.Jbiosc.2012.05.001](http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.05.001)

Batista, C. V., Rosendo Da Silva, L., Sebben, A., Scaloni, A., Ferrara, L., Paiva, G., Bloch, C. (1999). Antimicrobial Peptides From The Brazilian Frog Phyllomedusa Distincta1. *Peptides*, 20(6), 679–686.

Batista, C. V., Scaloni, A., Rigden, D. J., Silva, L. R., Rodrigues Romero, A., Dukor, R., Bloch, C. (2001). A Novel Heterodimeric Antimicrobial Peptide From The Tree-Frog Phyllomedusa Distincta. *Febs Letters*, 494(1-2), 85–89.

Bolívar, W., Coloma, L., Ron, S., Renjifo, J. (2010). *Hyloscirtus Larinopygion*. The IUCN Red List Of Threatened Species (2010): E.T55531a11328178. [Http://Dx.Doi.Org/10.2305/Iucn.Uk.2010-2.Rlts.T55531a11328178.En](http://dx.doi.org/10.2305/iucn.uk.2010-2.rlts.t55531a11328178.en). Downloaded On December 2015.

Bowie, J. H., & Tyler, M. J. (2006). Host Defense Peptides From Australian Amphibians: Caerulein And Other Neuropeptides. *Handbook Of Biologically Active Peptides*, 283–289.

Brand, G. D., Leite, J.R., Silva, L., Albuquerque, S., Prates, M., Azevedo, R., Carregaro, V., Silva, J., Sa, V., Branndao, R. & Bloch, C. (2002). Dermaseptins From Phyllomedusa Oreades And Phyllomedusa Distincta. Anti-Trypanosoma Cruzi Activity Without Cytotoxicity To Mammalian Cells. *Journal Of Biological Chemistry*, 277(51), 49332–49340.

Brand, G. D., Leite, J. R. S. A, De Sá Mandel, S. M., Mesquita, D. A., Silva, L. P., Prates, M. V., Bloch, C. (2006). Novel Dermaseptins From Phyllomedusa Hypochondrialis (Amphibia). *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 347, 739–746.

Carvalho, A., Márquez, C., Azevedo, R., Joanitti, G., Júnior, O., Fontes, W., & Castro, M. (2015). Cytotoxic Activity And Antiproliferative Effects Of Crude Skin

Secretion From *Physalaemus Nattereri* (Anura: Leptodactylidae) On In Vitro Melanoma Cells. *Toxins*, 7(10), 3989–4005.

Castro, M. S., Matsushita, R. H., Sebben, A., Sousa, M. V. & Fontes, W. (2005). Hylins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian tree-frog *Hyla biobeba*. *Protein Pept Lett.*, 12(1), 89-93

Conlon, J. M. (2011). The Contribution Of Skin Antimicrobial Peptides To The System Of Innate Immunity In Anurans, 201–212. [Http://Doi.Org/10.1007/S00441-010-1014-4](http://doi.org/10.1007/S00441-010-1014-4)

Coral, E. R. (2010) Determinación De La Actividad Antimicrobiana De La Secreción Cutánea De Dos Poblaciones De *Dendropsophus Colombianus* (Hylidae) Provenientes De Sitios Con Diferente Estado De Alteración En Popayán-Cauca. Trabajo De Grado, Universidad Del Cauca, Colombia.

Duellman, W. E. (1973). Herpetologists' League Descriptions Of New Hylid Frogs From Colombia And Ecuador Descriptions Of New Hylid Frogs From Colombia And Ecuador. *Herpetologica*, 29(3), 219–227.

Duellman, W. E., Marion, A. B. & Hedges, S. B. (2016). Phylogenetics, Classification, And Biogeography Of The Treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae) (Vol. 4104).

Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P. C. A., Frost, D. R., Campbell, J. A., & Wheeler, W. C. (2005). Systematic Review Of The Frog Family Hylidae, With Special Reference To Hylinae: Phylogenetic Analysis And Taxonomic Revision. *Bulletin Of The American Museum Of Natural History*, 294(1), 1.

Fernandez, D. I., Gehman, J. D., & Separovic, F. (2009). Biochimica et Biophysica Acta Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian frogs. *BBA - Biomembranes*, 1788(8), 1630–1638. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.007>

Galeano, S. P., Urbina, J. C., Gutierrez-C, P. D., Rivera-C, M., & Paez, V. P. (2006). Los Anfibios De Colombia, Diversidad Y Estado De Conocimiento. *Informe Nacional Sobre El Avance En El Conocimiento Y La Información De La Biodiversidad 1998-2004, 2004*, 106–118.

García, J., García, E., Martín-Del-Rey, Á., & García-Merino, E. (2015). Las Bacterias Anaerobias 150 Años Después De Su Descubrimiento Por Pasteur. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 33(2), 119–128.

García, J.A., Picazo, J. (2000), Compendio De Microbiología Médica. *Ediciones Harcourt, S.A.* 22-30

Gray, J.E. 1825. A synopsis of the genera of reptiles and amphibia, with a description of some new species. *Annals of Philosophy* (2)10:193–217.

Guerrero, J., Silva, M., & De Souza, M. (N.D.). Aplicación Biotecnológica De La Toxinología. *Biología*.

Lohner, K., & Prossnigg, F. (2009). Biochimica et Biophysica Acta Biological activity and structural aspects of PGLa interaction with membrane mimetic systems. *BBA-Biomembranes*, 1788(8), 1656–1666. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.05.012>

Malbrán, C. (2001). Manual De Procedimientos Para La Determinación De La Sensibilidad A Los Antimicrobianos En Bacterias Aisladas De Humanos. *Ministerio De Salud*, 1–69.

Mangoni, M. L., Miele, R., Renda, T., Barra, D. & Simmaco, M. (2001). The Synthesis Of Antimicrobial Peptides In The Skin Of *Rana Esculenta* Is Stimulated By Microorganisms. *The FASEB Journal*, 00–0695fje–.

Nascimento, A. C. C., Fontes, W., Sebben, A., & Castro, M. S. (2003). Antimicrobial Peptides From Anurans Skin Secretions. *Protein And Peptide Letters*, 10(3), 227–38.

Nascimento, A. C. C., Zanotta, L. C., Kyaw, C. M., Schwartz, E. N. F., Schwartz, C. A., Sebben, A., Castro, M. S. (2004). Ocellatins: New Antimicrobial Peptides From The Skin Secretion Of The South American Frog *Leptodactylus Ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Protein Journal*, 23(8), 501–508.

Ortiz, D. A., Coloma, L. A., Frenkel, C., Ron, S. R. Y Quiguango-Ubillús, A. (2013). *Hyloscirtus Larinopygion*. En: Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. A. Y Nicolalde, D. A. 2014. *Amphibiawebecuador*. Version 2014.0. Museo De Zoología, Pontificia Universidad Católica Del Ecuador. <<http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/fichaespecie.aspx?id=1304>>, Acceso Diciembre 10, 2015.

Pahissa, A. (2009). Infecciones Producidas Por *Staphylococcus Aureus*. Primera Edición. *Icg Marge Sl*.

Pallares, C., & Martínez, E. (2012). Implementación De Un Programa De Uso Regulado De Antibióticos En 2 Unidades De Cuidado Intensivo Médico-Quirúrgico En Un Hospital Universitario De Tercer Nivel En Colombia. *Infectio*, 16(4), 192–198.

Plan de Ordenación y Manejo Subcuenca Río Molino – Pubús, (2006) CONVENIO 1130-12-04 Corporación Autónoma Regional Del Cauca (CRC) - Fundación Pro Cuenca Río Las Piedras.

<http://crc.gov.co/files/ConocimientoAmbiental/POMCH/Rio%20Molino-Pubus/Plan%20de%20Ordenacion%20y%20Manejo.pdf>

Prates, M. V., Sforça, M. L., Regis, W. C. B., Leite, J. R. S. A, Silva, L. P., Pertinhez, T. A., Bloch, C. (2004). The Nmr-Derived Solution Structure Of A New Cationic Antimicrobial Peptide From The Skin Secretion Of The Anuran Hyla Punctata. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(13), 13018–13026.

Riera, A., Daud, A., Gallo, A., Genta, S., Aybar, M. & Sanchez, S. (2003). Antibacterial Activity Of Lactose-Binding Lectins From *Bufo Arenarum* Skin. *Biocell*, 27(1), 37-46

Rinaldi, A. C. (2002). Antimicrobial Peptides From Amphibian Skin: An Expanding Scenario: Commentary. *Current Opinion In Chemical Biology*, 6(6), 799–804.

Rivera-Correa, M., and J. Faivovich. 2013. A new species of Hyloscirtus (Anura: Hylidae) from Colombia, with rediagnosis of Hyloascirtus larinopygion (Duellman, 1973). *Herpetologica* 69: 298–313.

Rodríguez-Angeles, M. G. (2002). Principales Características Y Diagnóstico De Los Grupos Patógenos De Escherichia Coli. *Salud Publica De Mexico*, 44(5), 464–475.

Rueda, J. V., Castro, F., & Cortez, C. (2006). Técnicas para el inventario y muestreo de anfibios: una compilación. In A. Angulo, J. V. Rueda–Almonacid, J. vicente Rodríguez–Mahecha, & E. La Marca (Eds.), Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina. Conservación Internacional. *Serie Manuales de Campo No 2*. (pp. 135 – 172). Bogotá D.C.: Panamericana Formas e Impresos S.A.

Soheili, V., Bazzaz, B. S. F., Abdollahpour, N., & Hadizadeh, F. (2015). Investigation Of Pseudomonas Aeruginosa Quorum-Sensing Signaling System For Identifying Multiple Inhibitors Using Molecular Docking And Structural Analysis Methodology. *Microbial Pathogenesis*, 89, 73–78.

Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P., And Young, B.E. (Eds.) (2008). Threatened Amphibians Of The World. *Lynx Edicions, Barcelona, Spain*; Iucn, Gland, Switzerland; And Conservation International, Arlington, Virginia, Usa.

Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006). Enterococcus Faecalis: Its Role In Root Canal Treatment Failure And Current Concepts In Retreatment, 32(2), 93–98.

Taniyama, S., Arakawa, O., Terada, M., & Nishio, S. (2003). *Ostreopsis* sp ., a possible origin of palytoxin ( PTX ) in parrotfish *Scarus ovifrons*, 42(September 1997), 29–33. [http://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00097-7](http://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00097-7)

Thews, G., Mutschler, E. & Vaupel, P., (1983). Capítulo 6, La Sangre, Anatomía, fisiología y patofisiología – Manual para farmacéuticos y Biólogos, Editorial reverté, S.A., Barcelona, 127-130.

Titora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2007). Introducción A La Microbiología. *Médica Panamericana*. 9ª Edición. Buenos Aires. 86-92

Vargas, J., Máttar, S., & Monsalve, S. (2010). Bacterias patógenas con alta resistencia a antibióticos: Estudio Sobre Reservorios Bacterianos En Animales Cautivos En El Zoológico De Barranquilla. *Infectio*, 14(1), 6–19.

Voet, D., Voet, J. & Pratt, C. (2009). Fundamentos De Bioquímica, La Vida A Nivel Molecular, Segunda Edición. *Editorial Médica Panamericana*. Sección 8-3, 223-224.

Xu, X., & Lai, R. (n.d.). The Chemistry and Biological Activities of Peptides from Amphibian Skin Secretions. <http://doi.org/10.1021/cr4006704>

Yount, N. Y., Bayer, A. S., Xiong, Y. Q., & Yeaman, M. R. (2006). Advances In Antimicrobial Peptide Immunobiology. *Biopolymers*, 84(5), 435–458. <Http://Doi.Org/10.1002/Bip.20543>

## ANEXOS

**Anexo 1.** Resolución para trabajo de grado titulado: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Colomascirtus larinopygion* (HYLIDAE) SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*



Universidad  
del Cauca

8.5.2-90

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación  
Consejo de Facultad

RESOLUCION No.002  
(21 de Enero de 2016)

Por la cual se aprueba la inscripción de un Trabajo de Grado y nombra su Director

EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA, en uso de sus Facultades legales, y

### CONSIDERANDO:

1. La reglamentación vigente sobre trabajos de grado en la Universidad del Cauca se recoge en los Acuerdos 033 de 1985, 051 de 2001 y 074 de 2009.
2. Que el Acuerdo 027 del 25 de julio de 2012, expedido por el Consejo Superior de la Universidad del Cauca, reglamentó el Trabajo de Grado en los Programas de Pregrado en la Universidad del Cauca.
3. Que es un deber de la Facultad hacer cumplir las disposiciones vigentes que tengan que ver con los aspectos académicos.

### RESUELVE:

**ARTICULO PRIMERO:** Autorizar la inscripción del Trabajo de Grado en la modalidad trabajo de investigación titulado "Determinación de la actividad antibiótica de la secreción cutánea de *Hyloscirtus larinopygion* (Hylidae) sobre las cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*", presentado por la estudiante del programa de Biología **María Alexandra Lazo Idrobo**.

**ARTICULO SEGUNDO:** Nombrar al Doctor Jimmy Alexander Guerrero como Director y Liliana Caldas Arias como Asesora del trabajo de grado en mención.

**ARTICULO TERCERO:** Según lo establece el artículo 12 del Acuerdo 027 de julio 25 de 2012, El tiempo límite para la realización de todas las modalidades de trabajo de grado será el aprobado por el Consejo de Facultad respectivo, sin que exceda de un año. En caso de presentarse una situación de fuerza mayor que retrase la terminación del trabajo y demande mayor tiempo del estipulado en el cronograma, el estudiante podrá solicitar ante el Consejo de Facultad una única prórroga por un máximo de tres meses.

**PARÁGRAFO.** La prórroga debe ser solicitada quince días antes del vencimiento del tiempo establecido para la terminación del Trabajo de Grado, y debe contar con el visto bueno del director de trabajo y coordinador de programa. En caso de no realizar el trámite a tiempo, el trabajo se considera no aprobado y el estudiante deberá iniciar el trámite para la aprobación de un nuevo proyecto de Trabajo de Grado por una segunda y única oportunidad.

**ARTICULO CUARTO:** Reiterar a las estudiantes el cumplimiento de lo estipulado en los Acuerdos antes señalados, expedidos por el Consejo Superior de la Universidad del Cauca y el Consejo de Facultad, respectivamente.

**ARTICULO QUINTO:** Enviar copia de la presente providencia vía e-mail al Director, y original a la hoja de vida del estudiante.

**ARTICULO SEXTO:** La presente Resolución rige a partir de la fecha de su expedición.

#### COMUNÍQUESE Y CUMPLASE

Dada en Popayán, en el salón de sesiones del Consejo de Facultad, a los veintiún (21) días del mes de enero de dos mil diez y seis (2016).

  
Luis Guillermo Jaramillo Echeverri  
Presidente Consejo

  
Ruth Isabel Gámez Farias  
Secretaria Consejo

EN LA FECHA 02 Febrero 2016 NOTIFICO PERSONALMENTE A Alexandra Lazo Idrobo IDENTIFICADO CON LA CÉDULA DE CIUDADANÍA O TARJETA DE IDENTIDAD No. 1061756957 EXPEDIDA EN Popayán, DEL TEXTO DE LA RESOLUCIÓN QUE ANTECEDE ADVIRTIÉNDOLE QUE CONTRA ELLA PROCEDE EL RECURSO DE REPOSICIÓN ANTE EL CONSEJO DE LA FACULTAD Y DE APELACIÓN ANTE EL CONSEJO ACADÉMICO SIEMPRE Y CUANDO SE INTERPONGAN DENTRO DE LOS CINCO (5) DÍAS SIGUIENTES A SU NOTIFICACIÓN.

IMPUESTO:

FIRMA: Alexandra Lazo I.

*Fancy Stella*

**Anexo 2.** Artículo: Phylogenetics, Classification, And Biogeography Of The Treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae)

 Zootaxa 4104 (1): 001–109  
<http://www.mapress.com/jzt/>  
Copyright © 2016 Magnolia Press

**Monograph**

ISSN 1175-5326 (print edition)  
**ZOOTAXA**  
ISSN 1175-5334 (online edition)

<http://doi.org/10.11646/zootaxa.4104.1.1>  
<http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:D598E724-C9E4-4BBA-B25D-511300A47B1D>

**ZOOTAXA**

4104

**Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs  
(Amphibia: Anura: Arboranae)**

WILLIAM E. DUELLMAN<sup>1,3</sup>, ANGELA B. MARION<sup>2</sup> & S. BLAIR HEDGES<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Biodiversity Institute, University of Kansas, 1345 Jayhawk Blvd., Lawrence, Kansas 66045-7593, USA*

<sup>2</sup>*Center for Biodiversity, Temple University, 1925 N 12<sup>th</sup> Street, Philadelphia, Pennsylvania 19122-1601, USA*

<sup>3</sup>*Corresponding author. E-mail: [duellman@ku.edu](mailto:duellman@ku.edu)*



Magnolia Press  
Auckland, New Zealand

*Accepted by M. Vences: 27 Oct. 2015; published: 19 Apr. 2016*

### Anexo 3.



Universidad  
del Cauca

Popayán, enero 18 de 2017

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

##### Título de la investigación:

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Colomascirtus larinopygion* (HYLIDAE) SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* Y *Staphylococcus aureus*

##### Objetivos específicos de la Investigación:

- Establecer la capacidad antibiótica de la secreción cutánea de *Colomascirtus larinopygion* por medio de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.
- Identificar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la secreción cutánea de *C. larinopygion* sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
- Comprobar si la secreción cutánea de *Colomascirtus larinopygion* causa **hemólisis de eritrocitos** humanos.

##### ¿Qué se propone con este estudio?

Para cumplir con el tercer objetivo de la investigación es necesaria la obtención de una muestra sanguínea de humano (4mL) con la cual será posible desarrollar la prueba de hemólisis de la secreción de *C. larinopygion*.

##### Características del participante:

Se requiere únicamente un donante, de género masculino o femenino, joven y sano.

##### Riesgos y beneficios:

El estudio no conlleva ningún riesgo y el paciente no recibe ningún beneficio.

##### Compensación:

No se dará ninguna compensación económica por participar.

##### Participación voluntaria:

La participación es estrictamente voluntaria.

##### Derecho de reiterarse del estudio:

El participante tendrá el derecho de retirarse de la investigación en cualquier momento. No habrá ningún tipo de sanción o represalias.

##### A quien contactar en caso de preguntas:

Investigadora: estudiante María Alexandra Lazo Idrobo del programa de biología, Universidad del Cauca, teléfono 322 645 2974.

Director: Profesor Jimmy Alexander Guerrero Vargas, Ph D. Departamento de Biología, Universidad del Cauca, teléfono 321 781 5067.

Yo **Santiago Orozco Chamorro**, con documento de identidad N° 1061767075 de Popayán, certifico que he sido informado con la claridad y veracidad debida respecto a la prueba de hemólisis a la que la estudiante María Alexandra Lazo Idrobo, me ha invitado a participar; que actúo consecuente, libre y voluntariamente como donador de la muestra de 4 mL de sangre para esta investigación.

*SANTIAGO OROZCO CHAMORRO*

---

Santiago Orozco Chamorro  
cc. 1061767075, Popayán

*María Alexandra Lazo I.*

---

María Alexandra Lazo Idrobo  
cc. 1061756957 Popayán  
Estudiante investigadora