

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Identificación de secreciones peptídicas de 15 especies de anuros
amazónicos con actividad antimicrobiana y anticancerígena, y su aporte
como servicio ecosistémico de tipo provisión**

**Tesis previa a la obtención del título de Magíster
en Biología de la Conservación**

GUILLERMO MAURICIO VALLEJO RODRÍGUEZ

Quito, 2016

CERTIFICACIÓN

Certifico que la tesis de Maestría en Biología de la Conservación del candidato Guillermo Mauricio Vallejo Rodríguez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Miryan Rivera Íñiguez

Directora de Tesis

Quito, 25 de abril del 2016

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) y al Laboratorio de Investigaciones de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) por las facilidades de infraestructura y financiamiento prestado en el desarrollo de esta tesis.

A Ecofondo y Ecociencia por todo el apoyo prestado en el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la Magíster Miryan Rivera por su valioso soporte sin el cual no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A Tjitte de Vries Ph.D y Santiago Ron Ph.D por sus valiosas recomendaciones en la elaboración de este manuscrito.

Al Laboratorio de Herpetología del Museo QCAZ, y de manera especial a Santiago Ron Ph.D y al Lic. Fernando Ayala por su colaboración con el permiso de colección y las identificaciones taxonómicas.

A la Dra. Ligia Ocampo por su ayuda en la obtención de las células cancerígenas.

A la Máster Mercedes Rodríguez e Iliana Alcocer Ph.D por su decidida ayuda.

A Rommel Montúfar Ph.D, Santiago Espinosa Ph.D y Cecilia Fernández por su constante apoyo.

A mis amigos y compañeros Ailín Blasco, Camila Sáenz, Carolina Viteri, Elizabeth Vásquez, Gabriela Castillo, Lizeth Montero, María Belén Trujillo, Sofía Yumiseba, Verónica Andrade, Verónica Jara, Yerka Sagredo, Miguel Llumiquinga, Po Hao Chuang y Víctor Samaniego.

A mi familia, gracias por creer en mi esfuerzo.

A mi esposa Moni y mis hijos Moni y Joaquín

**El científico encuentra su recompensa en lo que Henri Poincaré llama el placer de
la comprensión, y no en las posibilidades de aplicación que cualquier
descubrimiento pueda conllevar**

Albert Einstein

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	3
3.	INTRODUCCIÓN.....	5
4.	JUSTIFICACIÓN.....	17
5.	OBJETIVOS.....	19
	5.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
	5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
6.	METODOLOGÍA.....	21
	6.1 RECOLECCIÓN DE ANUROS EN EL CAMPO Y MANEJO DE ESPECÍMENES.....	21
	6.2 PROCEDIMIENTOS DE EXPERIMENTACIÓN <i>IN VITRO</i>	21
	6.2.1 EXTRACCIÓN DE SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS.....	22
	6.2.2 LIOFILIZACIÓN DE SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS.....	23
	6.2.3 PREPARACIÓN DE DOSIS DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS Y ESTABLECIMIENTO DE LOS CONTROLES NEGATIVO Y POSITIVO.....	25
	6.2.4 EXPERIMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> SOBRE CÉLULAS BACTERIANAS.....	27
	6.2.4.1 PRUEBAS ANTIBACTERIANAS REALIZADAS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO.....	28

6.2.4.2 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA REALIZADAS POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.....	31
6.2.5 EXPERIMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> SOBRE CÉLULAS CANCERÍGENAS.....	33
6.2.5.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	34
6.2.5.2 SEPARACIÓN DE LINFOBLASTOS POR EL MÉTODO DE GRADIENTE DE DENSIDAD FICOLL- HYPAQUE.....	35
6.2.5.3 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD Y CONCENTRACIÓN DE LOS LINFOBLASTOS, PREVIO A SU CULTIVO.....	36
6.2.5.4 CULTIVO <i>IN VITRO</i> Y MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	39
6.2.5.5 ENSAYOS ANTICANCERÍGENOS <i>IN VITRO</i> Y PRUEBA COLORIMÉTRICA MTT.....	41
6.2.6 EXPERIMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> SOBRE ERITROCITOS HUMANOS (PRUEBAS HEMOLÍTICAS).....	43
6.3 ELABORACIÓN DE PERFILES CROMATOGRÁFICOS Y DETERMINACIÓN DE ANUROS PROMISORIOS.....	46
6.4 ESTIMACIÓN DEL BENEFICIO ECONÓMICO QUE POTENCIALMENTE PUEDEN GENERAR LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS.....	47

7.	RESULTADOS.....	48
7.1	RECOLECCIÓN DE ANUROS EN EL CAMPO.....	48
7.2	PRUEBAS ANTIBACTERIANAS REALIZADAS CON EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO.....	48
7.3	PRUEBAS ANTIBACTERIANAS REALIZADAS CON EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.....	50
7.4	PRUEBAS ANTICANCERÍGENAS.....	51
7.5	PRUEBAS HEMOLÍTICAS E ÍNDICE TERAPÉUTICO.....	52
7.6	DETERMINACIÓN DE ANUROS PROMISORIOS.....	54
7.7	ESTIMACIÓN DEL POTENCIAL ECONÓMICO DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS MEDIANTE EL CÁLCULO DEL VALOR DE USO DIRECTO (VUD).....	56
8.	DISCUSIÓN.....	58
9.	CONCLUSIONES.....	78
10.	RECOMENDACIONES.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Especies de anuros amazónicos a las que se les extrajo la secreción cutánea para realizar las pruebas antibacterianas, anticancerígenas y hemolíticas.

Figura 2. Resultado de la prueba antibacteriana realizada por el método de difusión en disco con *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y la secreción cutánea de *Phyllomedusa tarsius*.

Figura 3. Resultado de la prueba antibacteriana realizada por el método de difusión en disco en *Escherichia coli* ATCC 25922 con la secreción cutánea de *Phyllomedusa tomopterna*.

Figura 4. Porcentaje de supervivencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) frente a distintas dosis de secreción cutánea, de anuros amazónicos, que inhibieron al menos el 50% de bacterias.

Figura 5. Porcentaje de supervivencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) frente a distintas dosis de secreción cutánea, de anuros amazónicos, con las que más de la mitad de las bacterias sobrevivieron.

Figura 6. Porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* (ATCC 25922) frente a distintas dosis de secreción cutánea, de anuros amazónicos, que inhibieron al menos el 50% de bacterias.

Figura 7. Porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* (ATCC 25922) frente a distintas dosis de secreción cutánea, de anuros amazónicos, con las que más de la mitad de las bacterias sobrevivieron.

Figura 8. Porcentaje de supervivencia de células de leucemia linfoblástica aguda frente a distintas dosis de secreción cutánea de las especies de anuros

amazónicos que SÍ tuvieron actividad anticancerígena.

Figura 9. Porcentaje de supervivencia de células de leucemia linfoblástica aguda frente a distintas dosis de secreción cutánea de las especies de anuros amazónicos que NO tuvieron actividad anticancerígena.

Figura 10. Porcentaje de hemólisis de eritrocitos frente a distintas dosis de secreción cutánea de las especies de anuros amazónicos que producen baja actividad hemolítica.

Figura 11. Porcentaje de hemólisis de eritrocitos frente a distintas dosis de secreción cutánea de las especies de anuros amazónicos que producen alta actividad hemolítica.

Figura 12. Porcentaje de hemólisis de eritrocitos frente a distintas dosis de secreción cutánea de las especies de anuros amazónicos que producen baja y alta actividad hemolítica.

Figura 13. Perfil cromatográfico de *Agalychnis hulli*

Figura 14. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas boans*

Figura 15. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas calcaratus*

Figura 16. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas cinerascens*

Figura 17. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas geographicus*

Figura 18. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas lanciformis*

Figura 19. Perfil cromatográfico de *Leptodactylus mystaceus*

Figura 20. Perfil cromatográfico de *Leptodactylus wagneri*

Figura 21. Perfil cromatográfico de *Phyllomedusa tarsius*

Figura 22. Perfil cromatográfico de *Phyllomedusa tomopterna*

Figura 23. Perfil cromatográfico de *Phyllomedusa vaillantii*

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de especies de anuros amazónicos colectados en las localidades de Arajuno, Kurintza, Oglán, Pomona y Zanjarajuno de la provincia de Pastaza, Ecuador.

Tabla 2. Prueba de susceptibilidad por difusión en disco de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213) y *Escherichia coli* (ATCC® 25922) frente a la dosis de 4000 µg/ml de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

Tabla 3. Porcentaje del Efecto Inhibitorio Relativo y Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213) frente a la dosis de 4000 µg/ml de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

Tabla 4. Porcentaje del Efecto Inhibitorio Relativo y Susceptibilidad de *Escherichia coli* (ATCC® 25922) frente a la dosis de 4000 µg/ml de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

Tabla 5. Porcentajes de viabilidad obtenidos de los ensayos antibacterianos realizados por el método de microdilución en caldo con *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) frente a diferentes dosis de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

Tabla 6. Porcentajes de viabilidad obtenidos de los ensayos antibacterianos realizados por el método de microdilución en caldo con *Escherichia coli* (ATCC 25922) frente a diferentes dosis de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

Tabla 7. Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de las secreciones cutáneas, de anuros amazónicos, que tuvieron un efecto antibacteriano mayor al 50% en *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Tabla 8. Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de las secreciones cutáneas, de anuros amazónicos, que tuvieron un efecto antibacteriano mayor al 50% en *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Tabla 9. Porcentaje de supervivencia de células de leucemia linfoblástica aguda, proveniente de médula ósea, sometidas a diez dosis diferentes de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

Tabla 10. Dosis Letal Media (DL_{50}) de las secreciones cutáneas, de anuros amazónicos, que presentaron efecto anticancerígeno positivo contra células de leucemia linfoblástica aguda.

Tabla 11. Porcentaje de hemólisis de eritrocitos frente a diez dosis diferentes de secreción cutánea, de 15 especies de anuros amazónicos.

Tabla 12. Concentración Hemolítica Media (CH_{50}) de las secreciones cutáneas de 15 especies de anuros amazónicos.

Tabla 13. Índice Terapéutico (IT) calculado en base a la Concentración Hemolítica Media (CH_{50}), obtenida de las pruebas de hemólisis eritrocitaria, y a la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de los ensayos antibacterianos realizados en *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) por el método de microdilución en caldo.

Tabla 14. Índice Terapéutico (IT) calculado en base a la Concentración Hemolítica Media (CH_{50}), obtenida de las pruebas de hemólisis eritrocitaria, y a la

Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de los ensayos antibacterianos realizados en *Escherichia coli* (ATCC 25922) por el método de microdilución en caldo.

Tabla 15. Índice Terapéutico (IT) calculado en base a la Concentración Hemolítica Media (CH_{50}), obtenida de las pruebas de hemólisis eritrocitaria, y a la Dosis Letal Media (DL_{50}) de los ensayos anticancerígenos realizados con células de leucemia linfoblástica aguda.

Tabla 16. Especies promisorias de anuros amazónicos, que tuvieron actividad antibacteriana y anticancerígena positiva y que mostraron perfiles cromatográficos diferentes.

Tabla 17. Cálculo de los costos generados por un tratamiento extenso de quimioterapia de Leucemia Linfoblástica Aguda en un niño que pesa 20 kg y mide 1,15 m de altura.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Técnica de extracción de secreciones cutáneas de anuros.

Anexo 2. Liofilización de secreciones cutáneas de anuros.

Anexo 3. Cepas ATCC® con las que se realizaron los ensayos antibacterianos.

Anexo 4. Prueba antibacteriana realizada por el método de difusión en disco en cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* (29213) y *Escherichia coli* (25922).

Anexo 5. Prueba antibacteriana por el método de microdilución en caldo.

Anexo 6. Preparación de medio de cultivo celular RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino al 10%, y dispensación en frascos de cultivo.

Anexo 7. Células humanas de leucemia linfoblástica aguda proveniente de médula ósea.

Anexo 8. Cultivo de leucemia linfoblástica aguda y control de contaminación por hongos.

Anexo 9. Subcultivo de células de leucemia linfoblástica aguda.

Anexo 10. Pruebas anticancerígenas realizadas en placas de microtitulación.

Anexo 11. Obtención de muestras de sangre para realizar las pruebas hemolíticas.

1. RESUMEN

Los Servicios Ecosistémicos son los beneficios que las personas obtienen de los ecosistemas para poder subsistir. Por lo tanto, el estudio y la conservación de la naturaleza nos permitirá asegurar los bienes y servicios básicos que se pueden obtener de ésta, para que la humanidad sobreviva en el largo plazo. En este trabajo de investigación, como una estrategia de conservación, se planteó el objetivo de identificar las secreciones peptídicas de 15 especies de anuros amazónicos que presenten actividad antimicrobiana y anticancerígena, indicando su aporte como servicio ecosistémico de tipo provisión. Para esto, se evaluó la actividad antimicrobiana, anticancerígena y hemolítica *in vitro* y se determinó el potencial económico que pueden ofrecer las secreciones anticancerígenas para un tratamiento de quimioterapia. Las pruebas antimicrobianas se realizaron probando diferentes dosis de secreción cutánea, para cada especie de anuro frente a *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 (Gram positiva) y *Escherichia coli* ATCC® 25922 (Gram negativa), y calculando la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀). Las pruebas anticancerígenas se realizaron probando diferentes dosis de secreción cutánea en células de leucemia linfoblástica aguda, y calculando la Dosis Letal Media (DL₅₀). Las pruebas hemolíticas se realizaron probando diferentes dosis de secreción cutánea en eritrocitos humanos, y calculando la Concentración Hemolítica Media (CH₅₀). Con los datos de CI₅₀, DL₅₀ y CH₅₀ se calculó el Índice Terapéutico (IT) de la secreción “total” de cada especie de anuro promisorio. Se comprobó que *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. geographicus*, *Leptodactylus mystaceus*, *L. wagneri*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P.*

vaillantii tuvieron acción antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y/o *Escherichia coli*, mientras que las secreciones cutáneas de *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas calcaratus*, *H. cinerascens*, *H. lanciformis*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* tuvieron actividad anticancerígena sobre células de leucemia linfoblástica aguda. El Índice Terapéutico indicó un nivel de seguridad peligroso o mortal para el uso de la secreción cutánea “total” de todas las especies promisorias; sin embargo, no se descarta el potencial uso biomédico de la secreción cutánea de estas especies, mientras no se realicen las pruebas *in vitro* con las moléculas peptídicas por separado. Por otro lado, se determinó que cada una de estas especies provee potencialmente un servicio ecosistémico diferente ya que presentaron distintos perfiles cromatográficos de moléculas peptídicas. Finalmente, para estimar el potencial económico de las secreciones cutáneas de estas especies, se determinó que el Valor de Uso Directo calculado para el tratamiento de quimioterapia en niños menores de 12 años en el Ecuador es de \$1´104.562 USD anual.

PALABRAS CLAVE

Agalychnis, antibacteriano, anticancerígeno, Anura, conservación, *Hypsiboas*, *Leptodactylus*, leucemia, *Phyllomedusa*, ranas, servicios ecosistémicos.

2. ABSTRACT

Ecosystem services are benefits that people obtain from nature to survive. Therefore, the study and conservation of nature enable us to ensure basic goods and services we get from it, for helping humanity to survive in the long term. In this research, as a conservation strategy, I proposed the objective of identify the peptide secretions of 15 Amazonian anuran species presenting antimicrobial and anticancer activity, indicating their contribution as provision ecosystem services. For this goal, the antimicrobial, anticarcinogenic and hemolytic *in vitro* activity was evaluated, and the economic potential of the secretions for anti-cancer chemotherapy treatment was assessed. Antimicrobial assays were performed testing different doses of skin secretion for each anuran species against *Staphylococcus aureus* ATCC ® 29213 (Gram positive) and *Escherichia coli* ATCC® 25922 (Gram negative), and calculating Median Inhibitory Concentration (IC₅₀). Anticancer assays were performed testing different doses of skin secretion against acute lymphoblastic leukemia cells, and calculating the Median Lethal Dose (LD₅₀). Hemolytic assays were performed testing different doses of skin secretion in human erythrocytes, and calculating the Median Hemolytic Concentration (HC₅₀). Therapeutic Index (TI), of the "total" secretion for each promissory anuran species, was calculated using IC₅₀, LD₅₀ and HC₅₀ data. I found that *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. geographicus*, *Leptodactylus mystaceus*, *L. wagneri*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* and *P. vaillantii* had antibacterial action against *Staphylococcus aureus* (Gram positive) and/or *Escherichia coli* (Gram negative), while the skin secretions of *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas calcaratus*, *H. cinerascens*, *H. lanciformis*, *Phyllomedusa tarsius*,

P. tomopterna and *P. vaillantii* had anticancer activity against acute lymphoblastic leukemia cells. Therapeutic Index showed a dangerous or deadly level of safety for "total" skin secretion of all promising species; however, I don't rule out the potential biomedical uses of these skin secretions, while *in vitro* assays are not conducted with peptide molecules separately. Each of these species can potentially provide a different ecosystem services because they had different chromatographic profiles of peptide molecules. Finally, to realize the economic potential of skin secretions of these species, it was determined that the Direct Use Value for a chemotherapy treatment in children aged less than 12 years old in Ecuador is US\$ 1'104.562 annually.

KEYWORDS

Agalychnis, antibacterial, anticancer, Anura, conservation, ecosystem services, frogs, *Hypsiboas*, *Leptodactylus*, leukemia, *Phyllomedusa*.

3. INTRODUCCIÓN

Conforme las sociedades humanas se vuelven más complejas y tecnológicamente más avanzadas, es fácil pensar que ya no dependemos de los sistemas naturales. Esta pérdida de empoderamiento y respeto por la naturaleza se ha dado por el aumento de ambientes dominados por estructuras construidas por el hombre, lo que ha llevado a pensar que el entorno natural es algo para ser disfrutado el fin de semana, si es que las preocupaciones diarias lo permiten. Incluso en las zonas rurales, la conservación de los espacios naturales es a menudo percibido como un lujo que poco tiene que ver con el bienestar de la población local; por ejemplo, un pantano podría ser visto como un lugar inútil e improductivo que tendría valor sólo si se lo drena y se lo transforma en tierra de cultivo (Millennium Ecosystem Assessment, 2005a).

Desde el inicio de la industrialización, a mediados del siglo XVIII en Europa y principios del siglo XIX en América y Asia, ha existido una gran presión sobre el medio natural para satisfacer las necesidades humanas; sin embargo, desde mediados del siglo XX es cuando más agresivamente se da este desarrollo, lo que ha llevado a la desaparición de especies y ecosistemas a un ritmo alarmante (Millennium Ecosystem Assessment, 2005b). La transformación de los ecosistemas durante los últimos 50 años ha sido tan rápida y extensa que no tiene comparación con otro momento de la historia del ser humano (Millennium Ecosystem Assessment, 2005b). Este hecho provocó que en el año 2000 el Secretario General de Las Naciones Unidas, Kofi Annan, convoque a un grupo

internacional e interinstitucional de trabajo llamado La Evaluación de los Ecosistemas del Milenio, con la finalidad de que valore científicamente las consecuencias que pesan sobre el bienestar humano la degradación de los ecosistemas. Este grupo realizó su investigación entre los años 2001-2005 y propuso las acciones necesarias para mejorar la conservación y el uso sostenible de los mismos (Millennium Ecosystem Assessment, 2005c).

Las conclusiones de la Evaluación de los Ecosistemas del Milenio se compilaron en cinco volúmenes técnicos y seis informes de síntesis, disponibles para el mundo y los tomadores de decisiones, en los que se indica la condición y la tendencia de los ecosistemas del planeta y los servicios que éstos proveen. También informan sobre las opciones para restaurarlos, conservarlos y mejorar el uso sostenible de los mismos (Millennium Ecosystem Assessment, 2005d).

Este grupo de trabajo, definió a los “Servicios Ecosistémicos” como los beneficios que las personas obtienen de los ecosistemas para poder subsistir y consideró que mantener estos servicios a largo plazo implica conservar los espacios naturales, y de este modo, asegurar los materiales básicos para una subsistencia viable (Millennium Ecosystem Assessment, 2005e). Hay cuatro tipos de servicios ecosistémicos que se clasifican en: 1) Servicios de Provisión tales como alimentos, agua, madera, fibra, recursos genéticos, productos naturales, bioquímicos, médicos y farmacéuticos; 2) Servicios de Regulación que son los que afectan el clima, inundaciones, enfermedades, desechos, polinización, calidad de agua y aire; 3) Servicios Culturales que proporcionan beneficios recreativos,

estéticos y espirituales; y, 4) Servicios de Soporte tales como la formación del suelo, fotosíntesis, producción primaria, ciclo de nutrientes, entre otros (Millennium Ecosystem Assessment, 2005a, 2005c, 2005e).

Entre los principales servicios ecosistémicos identificados en la Amazonia están el abastecimiento y regulación de agua, almacenamiento de carbono, regulación climática, provisión de plantas y animales para alimentación, medicina natural, biodiversidad y recursos genéticos asociados, control de la erosión, ciclo de nutrientes, regulación de patógenos y enfermedades, sistemas agroforestales, provisión de madera y fibras, polinización, recursos bioquímicos y farmacéuticos, recreación y espiritualidad (Portela y Rademacher, 2001; Tejada *et al.*, 2013) entre otros.

Por ejemplo, en la Reserva de la Biósfera Yasuní, se han identificado de forma general cuatro funciones que brindan los ecosistemas: 1) provisión de madera y productos forestales no madereros; 2) prevención de la erosión, protección de cuencas y depósito de carbono; 3) valores de opción y de existencia relacionados al disfrute por parte de las generaciones futuras y, 4) potencial para el desarrollo turístico (Farías y Maldonado, 2010). De manera específica, están evaluados siete servicios ecosistémicos de tipo provisión que son: 1) madera; 2) productos forestales no maderables de origen animal y vegetal para alimentación y plantas medicinales; 3) recursos hídricos tales como agua para consumo humano, agua para producción, ríos y lagunas para transporte y pesca; 4) cultivos y ganadería; 5) recursos genéticos básicos para aseguramiento alimenticio y de

plantas medicinales; 6) albergue y 7) chacras indígenas. (Farías y Maldonado, 2010), existiendo distintos bienes y servicios como la polinización, los flujos de energía, la diversidad genética y otros que no han sido evaluados detalladamente.

En la provincia de Pastaza, están identificados el agua y la biodiversidad como productores de bienes y servicios tales como el transporte fluvial, pesca, generación de energía hidroeléctrica, ecoturismo, madera, artesanías de origen natural, regulación hidrológica, control de erosión y espiritualidad (MAE, 2013; Rivas, 2015).

En la provincia de Orellana, están identificados dos tipos de ecosistemas que proveen bienes y servicios, y éstos corresponden a las aguas superficiales (ríos, lagunas y humedales) y al bosque húmedo tropical del bosque siempre verde de tierras bajas del Napo-Curaray (MAE, 2013; GAD García Moreno, 2015). Los potenciales servicios ecosistémicos de provisión presentes en esta área son agua, alimento, recursos genéticos, combustibles, precursores bioquímicos, medicinas naturales, productos farmacéuticos, y recursos ornamentales; y de manera específica se han determinado al consumo de agua y al aprovechamiento de varias especies maderables los bienes utilizados de forma común. Los servicios regulatorios son el control de erosión, control biológico, polinización, purificación de agua, regulación climática e hídrica. Los de soportes son hábitat y soporte de cadenas tróficas. Los culturales son espiritualidad, inspiración, recreación, comunicación, ecoturismo, valores paisajísticos y patrimonio cultural (MAE, 2013; GAD Parroquia García Moreno, 2015).

Los ejemplos anteriores nos dan una visión de que en la Amazonia ecuatoriana existe información general y pocos datos específicos sobre el estado de los servicios ecosistémicos; y además, no se dispone de información sobre el valor económico de los servicios no comercializados. Por lo tanto, profundizar en más estudios concretos sobre los bienes y servicios que proveen los diferentes ecosistemas amazónicos, sería muy útil para mantener el bienestar de la naturaleza y del ser humano.

La Amazonia es el bosque húmedo tropical más extenso del planeta, y alberga una gran cantidad de especies de flora, fauna y microorganismos (WWF, 2009). La extensión de esta región es de aproximadamente 6.7 a 7.3 millones de km² y los países que la conforman son Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Guyana, Perú, Surinam y Venezuela (Programa de Cooperación Hispano Peruano *et al.*, 200; WWF, 2009). Las zonas oriental de Ecuador y nororiental de Perú, que forman parte de la Amazonia Occidental se consideran como el lugar más diverso y como núcleo amazónico debido a la estabilidad de los regímenes de lluvias y fenómenos ecológicos macro que han llevado a la evolución de los altos niveles de biodiversidad; por lo tanto, esta zona se convierte en prioritaria en términos de conservación ya que ante un futuro evento de cambio climático, con sequía prolongada, esta área sería la más húmeda de la Amazonia (Killen y Solórzano, 2008). Un mapeo realizado con superposición de datos de distribución de cuatro grupos taxonómicos (anfibios, aves, mamíferos y plantas) indica que el este de Ecuador y el norte del Perú son las regiones más biodiversas del mundo (Bass *et al.*, 2010).

En lo que se refiere a la diversidad de anfibios, a escala de paisaje, los lugares más diversos del mundo son la cuenca alta del Amazonas de Ecuador y Perú, y el Bosque Atlántico en el este de Brasil (Bass *et al.*, 2010). Comparado con otras regiones similares, a nivel de paisaje, Yasuní posee el récord mundial de riqueza de especies de anfibios con 150 especies (28%) de las 527 documentadas en la Amazonia (Bass *et al.*, 2010).

La clase Anfibia está conformada por tres órdenes: Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras) y Gymnophiona (cecilias) de los cuáles, los anuros constituyen la gran mayoría. La diversidad de anfibios de Ecuador cuenta con 566 especies descritas (534 son anuros) constituyéndose en la tercera más diversa del mundo, luego de Brasil y Colombia; y la más abundante por unidad de superficie con aproximadamente 2 especies por cada 1.000 km² (Ron *et al.*, 2016), es decir que posee tres veces más especies por kilómetro cuadrado que Colombia y 21 veces más que Brasil (Centro Jambatu, 2011-2015). Esta riqueza representa aproximadamente el 9% de la diversidad mundial (Centro Jambatu, 2011-2015). En el Bosque Húmedo Tropical de la Amazonia ecuatoriana están presentes 168 especies de anfibios y en el Parque Nacional Yasuní se tiene registros de 121 especies (Ron *et al.*, 2016). Cabe resaltar que a escala local, Bass *et al.* (2010) indican que la Estación Biológica Tiputini, que se encuentra en el Parque Nacional Yasuní, posee el récord mundial en diversidad alfa de anfibios al tener 139 especies en 6,5 km².

El estudio de los anfibios es importante porque este grupo se encuentran entre los animales menos conocidos y más propensos a desaparecer, inclusive de áreas que se encuentran protegidas (Stuart *et al.*, 2004; Gascon *et al.*, 2007), y también porque forman parte de los bienes y servicios ecosistémicos: los anfibios cumplen un importante rol en el funcionamiento de los ecosistemas ya que son parte de procesos como la dispersión, polinización, regulación de patógenos, flujo de energía y nutrientes, al ser presas y depredadores (Valencia *et al.*, 2012; Ron *et al.*, 2015) y además son fuente de recursos económicos en aquellas comunidades donde son usados como especies de interés turístico-recreativo (Kandus *et al.*, 2010).

Además de tener un papel importante dentro de la naturaleza, los anuros y otros anfibios son proveedores de un número significativo de compuestos químicos con potencial uso médico (Valencia *et al.*, 2012). La secreción cutánea de los anuros está compuesta por varias moléculas químicas que pueden ser alcaloides, aminos biogénicas, esteroides y péptidos, y éstas sustancias que forman parte de su mecanismo de defensa, son utilizadas para contrarrestar depredadores y enfermedades producidas por parásitos y patógenos tales como los helmintos, protozoarios, anélidos, artrópodos, virus, bacterias y hongos (Duellman y Trueb, 1994). Estas moléculas son secretadas a través de la glándulas granulares o también llamadas de veneno, que están distribuidas por casi toda la piel (Duellman y Trueb, 1994; Simmaco *et al.*, 1998; Grenard, 2008).

Una de las razones de mayor peso por la que los anfibios constituyen un importante recurso biológico para los países, se fundamenta en el hecho de que las sustancias producidas en su piel tienen propiedades analgésicas y antibióticas, útiles para la salud humana (Ron *et al.*, 2015). En la actualidad varios investigadores alrededor del mundo están estudiando este arsenal químico y descubriendo moléculas con propiedades antimicrobianas, especialmente de tipo peptídico, como las dermaseptinas (Hancock y Chapple, 1999).

Varios estudios han mostrado que los péptidos tienen efecto antimicrobiano sobre virus, protozoos, bacterias Gram+, Gram- y hongos (Hui *et al.*, 2002; Mangoni *et al.*, 2003) y también poseen actividad anticancerígena (Wegener *et al.*, 1999; Rozek *et al.*, 2000a; Zasloff, 2002; Doyle *et al.*, 2003; Dennison *et al.*, 2006; Hoskin y Ramamoorthy, 2008) gracias a su naturaleza catiónica y anfipática que les permite destruir la membrana de las células sobre las que inciden (Hancock y Scott, 2000; Chan *et al.*, 2006).

Parece ser que el principal mecanismo de acción de los péptidos catiónicos se basa en la fuerte atracción electrostática que se establece entre la carga positiva de los péptidos y los componentes negativamente cargados de las membranas de las células cancerígenas y de microorganismos como los antes mencionados, con la consiguiente disrupción de su membrana celular (Wegener *et al.*, 1999; Rozek *et al.*, 2000a; Doyle *et al.*, 2003).

Sin embargo, aunque en menor proporción que con los fármacos tradicionales, las propiedades que les permiten a las bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, ser resistentes a la acción de los péptidos, están las que tienen que ver con la carga y estructura de los polisacáridos presentes en la membrana externa, la composición de los lípidos, la presencia de un potencial electroquímico en la membrana citoplasmática, la velocidad de respuesta de las bacterias a los cambios ambientales o el estrés (Téllez y Castaño, 2010). Tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas producen cambios en el tipo de proteínas que se alojan en la membrana haciendo que cambie la carga eléctrica o que se produzcan enzimas que impidan, retarden o eliminen la acción de los péptidos (Castrillón *et al.*, 2007; Téllez y Castaño, 2010). Hay evidencia de que las bacterias sufren un gran estrés cuando están sometidas a la presencia de los antibióticos, y para poder sobrevivir captan de manera fortuita el ADN de otras bacterias circundantes, que si estas son resistentes les confieren la misma capacidad de resistencia, e incluso las vuelve más infecciosas (Bakkali, 2013).

En Ecuador se han realizado algunos estudios de aplicación biomédica con péptidos de anfibios; por ejemplo, se han hecho ensayos antibacterianos con secreciones peptídicas de varias especies de anuros principalmente de las familias Hylidae, Dendrobatidae, Ranidae, Bufonidae y Strabomantidae sobre bacterias Gram+ y Gram- como son: *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Salmonella* sp., con resultados prometedores (Proaño, 2004; Caicedo, 2007; Ramírez, 2012). De todas las especies muestreadas resalta *Agalychnis spurrelli* con la que se ha

tenido resultados muy positivos de actividad antifúngica (*Candida* spp.), antibacteriana y anticancerígena (Proaño, 2004; Caicedo, 2007; Ramírez, 2012, Vargas, 2012; Chuang, 2012).

Pese a los notables avances en las terapias contra el cáncer y a que la cirugía y/o la radioterapia son usadas en el control de algunos tipos de carcinomas localizados, la quimioterapia (terapia en base a químicos) es la alternativa más usada para su tratamiento (Dennison *et al.*, 2006; Hoskin y Ramamoorthy, 2008). Uno de los principales inconvenientes con el tratamiento químico es que a largo plazo las células cancerígenas pueden desarrollar resistencia a las drogas terapéuticas (Smith *et al.*, 2000; Dennison *et al.*, 2006; Kerr y Middleton, 2006; Kuo, 2009). A esto se suma el hecho de que la mayoría de drogas usadas en quimioterapias anticancerígenas actúan inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos (Espinosa *et al.*, 2003; Dennison *et al.*, 2006), y son aplicadas en concentraciones sumamente altas lo que provoca que además de controlar la proliferación de las células malignas, afecten a las células sanas, causando por lo tanto efectos colaterales altamente indeseables (Dennison *et al.*, 2006; Kuo, 2009).

Un ejemplo del potencial uso biomédico que puede darse a los péptidos catiónicos provenientes de la piel de anfibios, se observa en el estudio realizado por Rozek *et al.* (2000b), en el que se probó la actividad anticancerígena de un grupo de péptidos llamados Aureinas, provenientes de las ranas australianas *Litoria aurea* y *Litoria raniformis*, en el que determinaron que las aureinas 1.2, 3.2

y 3.3 inhibían el crecimiento de más del 90% de células neoplásicas provenientes de 60 diferentes tumores humanos.

Tomando en cuenta que: el cáncer es una de las principales causas de mortalidad prematura en la población humana mundial, a que existe resistencia de las células cancerígenas a los fármacos; y a los efectos colaterales en células sanas causados por la quimioterapia convencional, son importantes las investigaciones de posibles aplicaciones biomédicas del efecto anticancerígeno de los péptidos catiónicos contenidos en las secreciones cutáneas de anuros al mostrar nuevos mecanismos de acción (Dennison *et al.*, 2006).

Además de la importancia para el bienestar humano, los anuros son considerados prioritarios para su estudio y conservación, debido a que enfrentan un proceso de extinción global (Collins y Storfer, 2003; Gascon *et al.*, 2007). Entre los factores que afectan la supervivencia de los anfibios están: el cambio climático, la introducción de especies exóticas, la sobreexplotación, el cambio de cobertura y uso del suelo, el aumento en el uso de pesticidas y otros productos químicos, y la aparición de enfermedades infecciosas (Collins y Storfer, 2003; UICN, 2015).

La Lista Roja de Especies Amenazadas UICN™ ha identificado a los anfibios como el grupo de vertebrados más amenazado que se ha evaluado hasta ahora, con alrededor del 41% de especies en riesgo de extinción, debido a la pérdida de hábitat, la contaminación, los incendios, el cambio climático, las enfermedades y

la sobreexplotación (UICN, 2015); mientras que el 66% de especies no consideradas actualmente amenazadas de extinción, están identificadas como muy vulnerables a los impactos del cambio climático, por lo que se recomienda actuar con urgencia para proteger las poblaciones de anfibios en todo el mundo (Foden *et al.*, 2013).

4. JUSTIFICACIÓN

Ante el distanciamiento que hemos tenido con la naturaleza, la degradación a la que la hemos sometido y el desconocimiento de los enormes beneficios que ésta nos brinda para nuestra supervivencia, debemos enfocar nuestros esfuerzos en conocer cuáles son los servicios que los ecosistemas nos ofrecen y transmitir el mensaje al conglomerado humano de la completa dependencia que tenemos de éstos, de manera que la conciencia de las personas se encamine a la protección de los espacios naturales.

Por lo tanto, como una estrategia de conservación, con esta investigación se pretende visibilizar ante la sociedad la importancia que tienen las ranas y sapos, mediante la evaluación y caracterización de los servicios ecosistémicos de tipo provisión que estos anfibios ofrecen. Para tal fin se realizará la detección de secreciones peptídicas con actividad antimicrobiana y anticancerígena, provenientes de la piel de anuros amazónicos.

Se eligió investigar a los anuros (ranas y sapos) porque este grupo vertebrado se encuentra entre los animales menos conocidos y más propensos a desaparecer; además, porque es un recurso forestal no maderable del que podemos beneficiarnos los seres humanos.

Por la actividad antimicrobiana y anticancerígena que demuestran tener los péptidos, y por la gran diversidad de anuros que se traduce en diversidad de

moléculas químicas, Ecuador no puede estar exento de realizar investigaciones exhaustivas en este campo, cuyo aporte contribuiría notablemente con la conservación de los espacios naturales de este grupo vertebrado, ya que de manera tangible, formarían parte de los Servicios Ecosistémicos de Provisión. Asimismo, este tipo de investigación fomentaría el cambio de la matriz productiva del país y contribuiría con el Buen Vivir de los ecuatorianos y de la humanidad.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar las secreciones peptídicas de 15 especies de anuros amazónicos que presenten actividad antimicrobiana y anticancerígena, y su aporte como servicio ecosistémico de tipo provisión.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Incrementar el banco de secreciones cutáneas del Laboratorio de Investigaciones de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios de la PUCE, con los extractos de 15 especies de anuros amazónicos.

Probar *in vitro* el efecto citotóxico de diferentes concentraciones de secreción peptídica de anuros amazónicos sobre dos cepas bacterianas ATCC, sobre células cancerígenas y sobre eritrocitos humanos.

Caracterizar el perfil peptídico de las secreciones cutáneas, de las diferentes especies de anuros, que demuestren tener efecto antimicrobiano y/o anticancerígeno positivo.

Establecer como un servicio ecosistémico de tipo provisión, a cada secreción peptídica que tenga un perfil cromatográfico distinto y que evidencie tener efecto citotóxico positivo en bacterias o células de cáncer.

6. METODOLOGÍA

6.1 RECOLECCIÓN DE ANUROS EN EL CAMPO Y MANEJO DE ESPECÍMENES

Para la recolección de los anuros amazónicos, se realizaron algunas salidas al campo a diferentes localidades de la provincia de Pastaza, en las que se colectaron las 15 especies utilizadas en esta investigación. Todos los individuos colectados fueron georeferenciados y transportados vivos hasta el Laboratorio de Investigaciones de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) dentro de un cooler, en tarrinas plásticas perforadas y humedecidas que permitieron el paso adecuado de oxígeno y que mantuvieron la temperatura y humedad adecuadas. A su llegada al laboratorio, las ranas fueron colocadas en terrarios individuales y mantenidas vivas para acceder a la secreción cutánea durante el tiempo que duró la investigación. La alimentación de los individuos se basó en una dieta de grillos provenientes del criadero de la Balsa de los Sapos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

6.2 PROCEDIMIENTOS DE EXPERIMENTACIÓN *IN VITRO*

Los procesos de extracción, liofilización y cromatografía de secreciones cutáneas de anuros; y, las pruebas antimicrobianas, anticancerígenas y de

citotoxicidad con eritrocitos humanos (pruebas hemolíticas) se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigaciones de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, en condiciones controladas de laboratorio y con estrictas medidas de asepsia para evitar contaminación.

6.2.1 EXTRACCIÓN DE SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS

A un total de 56 individuos (Tabla 1), pertenecientes a 15 especies, se les extrajo la secreción cutánea usando un Estimulador Transcutáneo para Anfibios (TAS) (Anexo 1) según las especificaciones de Grant y Land (2002). A continuación se detalla la técnica de extracción de secreciones cutáneas de anuros.

A cada individuo se le da un baño inicial con 10 ml de agua ultra pura deionizada (milliQ), para limpiar impurezas y humedecer la piel. Con el uso del Estimulador Transcutáneo de Anfibios se somete la piel del anuro a choques eléctricos leves e intermitentes durante un minuto. El voltaje será de tres a seis voltios, dependiendo del tamaño y la delicadeza del anfibio. Luego de la estimulación eléctrica, se realiza un segundo baño con 10 ml de agua milliQ, el mismo que sirve para recoger en una caja Petri la secreción que exuda la piel. La secreción recogida en la caja Petri se tapa y se sella con parafilm, y se la almacena a una temperatura de -20 °C hasta el momento de la liofilización.

6.2.2 LIOFILIZACIÓN DE SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS

Los extractos (secreción cutánea de cada individuo que fue recogida en una caja Petri con 10 ml de agua milliQ, por separado) fueron sometidos al proceso de liofilización que consiste en el desecado al vacío a baja temperatura, para obtenerlos en forma concentrada y poder usarlos en los ensayos antimicrobianos, anticancerígenos y hemolíticos (Anexo 2). Los extractos liofilizados, obtenidos de diferentes individuos de una misma especie, fueron almacenados en un mismo tubo, para luego ser pesados, etiquetados y almacenados a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Una parte de la secreción extraída de cada especie fue corrida en HPLC para obtener el perfil cromatográfico correspondiente. A continuación se describe en detalle el proceso de liofilización:

Primero se prende el computador acoplado al liofilizador, y luego se enciende el equipo de liofilización; después se prende el compresor de aire dejándolo en automático. Luego, se limpian los marcos y bandejas del liofilizador con alcohol y se coloca sobre las bandejas las cajas Petri destapadas que contienen las secreciones (cada bandeja tiene una capacidad de contener 6 cajas Petri). Después, se pone un sensor de temperatura en cada bandeja sujetándolo en el marco respectivo con cinta "masking" y procurando que la punta del sensor tope la muestra de la caja Petri. Se colocan dentro del liofilizador las bandejas que tienen las muestras, observando que la perilla de separación de bandejas esté en posición central para que las platinas no se unan y no aplasten las cajas

Petri. Se conectan los sensores de temperatura según su respectivo número y se guardan los cables a un lado de las platinas para cerrar la puerta. Se verifica que el filo de caucho donde se cierra la puerta contenga vaselina, para asegurarse de que exista un sellado óptimo al momento de generarse el vacío.

En el computador, se abre el Programa de liofilización, se selecciona el protocolo PÉPTIDO 6 y se lo transfiere al equipo con el comando RECIPE WRITE TO WIZARD. Se mira en la pantalla del liofilizador que se haya cargado el protocolo y se seleccionan en el computador los comandos EXIT RECIPE EDIT y después START. En este momento empieza el proceso de liofilización. Se espera cinco minutos para confirmar que se genere vacío y empiece a funcionar el equipo sin que se prenda ninguna alarma. A continuación, se dejan prendidos todos los equipos aproximadamente 16 horas, que es el tiempo en el que ocurre el proceso de liofilización.

Al siguiente día, cuando el proceso haya terminado, se finaliza el mismo y se espera aproximadamente 3 minutos hasta que se libere la presión interna del equipo, luego de lo cual se puede abrir la puerta y sacar las muestras. Se desconectan los sensores, se sacan las cajas Petri con los extractos liofilizados y se limpia el equipo. Luego de sacar los productos liofilizados del equipo, se los pesa, etiqueta y guarda en tubos falcon o criotubos, para almacenarlos a -20 °C, hasta su uso.

6.2.3 PREPARACIÓN DE DOSIS DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS Y ESTABLECIMIENTO DE LOS CONTROLES NEGATIVO Y POSITIVO

Antes de realizar las pruebas *in vitro*, se prepararon diferentes dosis a partir de la secreción cutánea liofilizada de cada especie de rana, usando diferentes disolventes según el tipo de ensayo que se realizó.

Para las pruebas antibacterianas el disolvente utilizado corresponde a una solución de albúmina de suero bovino Sigma-Aldrich® al 0,2% con ácido acético glacial J.T.Baker® al 0,01% (BSA 0,2% - AAG 0,01%), la misma que se preparó mezclando suavemente 0,02g de albúmina de suero bovino purificada con 10ml de agua ultra pura-deionizada (milliQ) y un μ l de ácido acético glacial. El disolvente usado en las pruebas anticancerígenas, fue medio de cultivo celular líquido RPMI 1640, Gibco®. Para las pruebas hemolíticas se usó tampón fosfato salino, PBS pH 7.2, Gibco®.

Las dosis utilizadas en las pruebas antibacterianas, anticancerígenas y hemolíticas fueron preparadas con la secreción cutánea liofilizada de cada especie de rana, siguiendo los métodos de Factor de dilución y Diluciones seriadas (Robyt y Bernard, 1987). En primer lugar, para obtener la dosis de 4000 μ g/ml se diluyen 0,004g (4000 μ g) de secreción liofilizada con un ml del disolvente correspondiente. Luego, a esta dosis inicial se la dividió en dos partes (0,5 ml cada una); una se guardó para los ensayos y a la otra se le aumentó 0,5 ml de

disolvente para obtener la siguiente dosis que corresponde a 2000 $\mu\text{g/ml}$; el resto de dosis seriadas sigue el mismo factor de dilución 1:2, hasta obtener las dosis restantes.

Para las pruebas antimicrobianas realizadas por los métodos de difusión en disco y microdilución en caldo se hicieron ocho dosis con las siguientes concentraciones: 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 $\mu\text{g/ml}$. Mientras que, para las pruebas anticancerígenas y hemolíticas se prepararon diez dosis de secreción cutánea: 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 64, 32, 16 y 8 $\mu\text{g/ml}$.

En lo referente al establecimiento de los controles positivos y negativos, para las pruebas antibacterianas realizadas por los métodos de susceptibilidad por difusión en disco y microdilución en caldo, se utilizaron: como control negativo de inhibición una mezcla de bacterias con el disolvente (BSA 0,2% - AAG 0,01%) y como control positivo de inhibición una muestra de bacterias con la secreción cutánea de *Agalychnis spurrelli* en una dosis de 4000 $\mu\text{g/ml}$, ya que en estudios previos de Proaño (2004), Caicedo (2007) y Chuang (2012) la secreción de esta especie de rana ha resultado ser efectiva contra la proliferación de bacterias y células de leucemia linfocítica aguda.

Además, para las pruebas antibacterianas realizadas por el método de microdilución en caldo se usó como control de contaminación el medio de cultivo Mueller-Hinton-Broth (MHB BD™).

En las pruebas anticancerígenas se usó como control positivo de inhibición una muestra de células de leucemia junto a una dosis de 4000 $\mu\text{g/ml}$ de secreción cutánea de *Agalychnis spurrelli*, y como control negativo de inhibición se usó una mezcla de medio RPMI 1640 Gibco® con células de cáncer.

En las pruebas de toxicidad sobre eritrocitos humanos (pruebas hemolíticas) se usó como control negativo de hemólisis una mezcla de tampón fosfato salino Gibco® (PBS pH 7.4) con eritrocitos; y, como control positivo agua ultra pura deionizada (milliQ) con eritrocitos.

6.2.4 EXPERIMENTACIÓN *IN VITRO* SOBRE CÉLULAS BACTERIANAS

Las pruebas *in vitro* del efecto antimicrobiano que tiene cada una de las secreciones cutáneas, de las 15 especies de ranas escogidas, se realizaron sobre una cepa bacteriana Gram positiva de *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 y una Gram negativa de *Escherichia coli* ATCC® 25922 (Anexo 3), mediante dos tipos de pruebas de susceptibilidad: una corresponde al método de difusión en disco (antibiograma) y otra al método de microdilución en caldo. Las dos técnicas están basadas en las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2012); además, los antibiogramas siguen el procedimiento de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966) y el método de microdilución en caldo sigue los lineamientos sugeridos por Wiegand *et al.* (2008).

Para cada una de las pruebas antimicrobianas se realizaron tres repeticiones con la secreción de cada especie de anuro y con cada cepa bacteriana. Las especies de ranas cuya secreción cutánea tuvo un efecto inhibitorio positivo en cualquiera de las dos bacterias, se designaron como promisorias.

6.2.4.1 PRUEBAS ANTIBACTERIANAS REALIZADAS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

Tomando en cuenta que se hicieron tres repeticiones de cada ensayo, por cada especie de rana y para cada cepa bacteriana se utilizaron seis cajas Petri, 36 discos en blanco para antibiograma de 6 mm (Oxoid™) y 102 μ l de cada dosis y control; es decir que, para las 15 especies de anuros y las dos cepas bacterianas se usaron en total 180 cajas Petri, 1080 discos para antibiograma y 3060 μ l de cada dosis y control.

A continuación se describe el protocolo para realizar las pruebas antibacterianas por el método de difusión en disco.

Primero se descongeló la cepa bacteriana que estaba refrigerada a -10 °C, llevándola a temperatura ambiente; luego, con un asa bacteriológica se cogió una muestra y se la estrió en una caja Petri de 9 cm previamente acondicionada con Agar Mueller-Hinton (MHA Difco™); inmediatamente se colocó la caja Petri en una incubadora a 37 °C por 18 horas.

Al siguiente día, antes de controlar el crecimiento bacteriano, se prepararon las diferentes dosis de secreción cutánea y los controles negativo y positivo; y se las guardó en el refrigerador hasta su uso.

Luego, se retiró de la incubadora la caja Petri y se observó que las bacterias hayan formado colonias separadas (Anexo 3), con las que se preparó una suspensión bacteriana en medio de infusión de vacuno Corazón-Cerebro (BHI BD™), llevándolas a un valor de 0.5 en la escala de turbidez McFarland que equivale de 1 a 2×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Para llegar a este valor de turbidez, en el espectrofotómetro Spectronic™ 20D+ de ThermoScientific™, se calibró la densidad óptica de 625 nm y se inocularon las bacterias en el medio de infusión hasta alcanzar el valor entre 0,08 y 0,1. Después, se impregnó un hisopo estéril con esta suspensión y se la inoculó en varias cajas Petri de 9 cm acondicionadas con Agar Mueller-Hinton (MHA Difco™).

Luego de la siembra bacteriana, para realizar cada una de las tres repeticiones del ensayo antimicrobiano con la secreción cutánea de una de las 15 especies de rana, se escogieron dos cajas Petri en las que en un tiempo no mayor a 15 minutos se colocaron los discos de antibiograma impregnados con 17 μ l de cada dosis y cada control. En la primera caja se colocaron cuatro discos con las dosis de 4000, 2000, 1000 y 500 μ g/ml respectivamente, uno de control negativo (BSA/AGG) y uno de control positivo (4000 μ g/ml de secreción de *Agalychnis spurrelli*). En la segunda caja se colocaron otros seis discos de difusión: cuatro

impregnados con las dosis de 250, 125, 62,5 y 31,25 $\mu\text{g/ml}$, y los otros dos discos impregnados con los controles negativo y positivo respectivamente. Después, se pusieron a incubar las cajas a 37 °C durante 18 horas (Anexo 4).

Al siguiente día, después de la incubación, se notó si existió o no la formación de un halo de inhibición alrededor de cada disco, se midió con un calibrador el diámetro del halo en mm y se obtuvo el promedio del mismo para calcular el porcentaje de inhibición.

La susceptibilidad de cada cepa bacteriana frente a las diferentes secreciones cutáneas de anuros, se determinó mediante el cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo con respecto al control positivo (Martínez *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 2010), usando la siguiente fórmula.

$$\text{PEI} = (\text{MDHI secr.} / \text{MDHI C+}) \times 100$$

Dónde:

PEI = porcentaje del efecto inhibitorio

MDHI secr. = media del diámetro del halo de inhibición de la secreción cutánea

MDHI C+ = media del diámetro del halo de inhibición del control positivo

Finalmente, los resultados de la susceptibilidad bacteriana se expresaron como: SENSIBLE, cuando se formó un halo alrededor del disco con un diámetro igual o mayor al 95% con respecto al control positivo; INTERMEDIO, cuando el

halo formado estuvo entre 5-95% y RESISTENTE cuando el halo no se formó o fue menor al 5%.

Las especies de anuros, cuya secreción tuvo un efecto antimicrobiano que se expresó como SENSIBLE, fueron designadas como promisorias.

6.2.4.2 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA REALIZADAS POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

Para realizar las pruebas antibacterianas por el método de microdilución en caldo, se siguió el protocolo que a continuación se describe:

El primer día se activaron las dos cepas bacterianas, se las cultivaron en cajas Petri de 9 cm con Agar Mueller-Hinton (MHA Difco™) y se incubaron a 37 °C entre 18 y 24 horas. El segundo día, se escogieron entre cuatro y cinco colonias bacterianas de la caja Petri previamente incubada, se las puso en medio de crecimiento Mueller-Hinton-Broth (MHB BD™) y se incubó este inóculo a 37 °C por 18 horas. El tercer día, se sacó el inóculo de la incubadora y se preparó uno nuevo con medio fresco Mueller-Hinton-Broth (MHB BD™), a escala 0,5 McFarland que equivale a $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml); y a partir de esta suspensión bacteriana se hizo una dilución con medio Mueller-Hinton-Broth hasta ajustar a 5×10^5 unidades formadoras de colonias por mililitro (por ejemplo: a 0,1 ml del inóculo 0,5 McFarland se le aumentan 19,9 ml

de medio MHB para obtener 20 ml de 5×10^5 UFC/ml).

Luego, en una placa de polipropileno de 96 pocillos para microtitulación Corning®, se hicieron las pruebas usando las filas para distinguir cada especie de rana y las columnas para cada dosis y los respectivos controles. En ocho pocillos de una fila, se colocaron 90 μ l de la dilución bacteriana (5×10^5 UFC/ml) y se agregaron 10 μ l de cada dosis de secreción cutánea de anuro (un pocillo diferente para cada dosis). Para el control negativo de inhibición bacteriana se colocaron en un pocillo 90 μ l de bacterias con 10 μ l del disolvente (BSA 0,2% - AAG 0,01%), como control de contaminación se pusieron en un pocillo 100 μ l de medio Mueller-Hinton-Broth y como control positivo de inhibición bacteriana se pusieron 90 μ l de dilución bacteriana (5×10^5 UFC/ml) con 10 μ l de 4000 μ g/ml de secreción de *Agalychnis spurrelli*.

Se incubó la placa a 37 °C por 18 a 24 horas (Anexo 5), y después se la llevó a un lector de Elis, para medir la densidad óptica a una longitud de onda de 630 nm, en el Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, a partir de la que se calculó el porcentaje de viabilidad, en base a la siguiente fórmula.

$$PV = (DO_{tr} / DO_{c-}) \times 100$$

Dónde:

PV = porcentaje de viabilidad

DO tr = densidad óptica del pocillo con tratamiento (bacterias con dosis)

DO c- = densidad óptica del control negativo de inhibición (bacterias con disolvente)

Con los porcentajes de viabilidad obtenidos, se escogieron las especies de anuro cuyas secreciones cutáneas produjeron al menos un 50% de mortalidad bacteriana con cualquiera de las dosis, para calcular en Microsoft® Excel, la Concentración Inhibitoria Media CI_{50} (expresadas en $\mu\text{g/ml}$) mediante los métodos de regresión de respuesta binaria Logit y Probit.

6.2.5 EXPERIMENTACIÓN *IN VITRO* SOBRE CÉLULAS CANCERÍGENAS

El ensayo *in vitro* del efecto anticancerígeno se hizo aplicando diferentes dosis de secreción cutánea liofilizada de cada especie de anuro, sobre células de leucemia linfoblástica aguda proveniente de médula ósea humana.

Primero se preparó el medio de cultivo en el que crecieron las células (Anexo 6). Luego, se procedió con la separación de los linfoblastos de la muestra de médula ósea, por el método Ficoll-Hypaque (Anexo 7) y se los cultivó para obtener la cantidad necesaria de células para realizar las pruebas anticancerígenas. A las células linfoblásticas se las hizo crecer en diferentes frascos de cultivo y se controló que no exista contaminación por hongos (Anexos

8 y 9). A continuación, para realizar las pruebas de citotoxicidad, se tomó una muestra del cultivo y se la puso en placas de microtitulación junto a diferentes dosis de secreción cutánea, de cada especie de rana, y se incubó a 37 °C (Anexo 10). Posteriormente, a estas placas se las sometió a una prueba colorimétrica MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniletrozol), y se las incubó nuevamente a 37 °C, para después colocarlas en un lector de Elisás y obtener datos de mortalidad o supervivencia celular en función de la densidad óptica. Finalmente, los datos de absorbancia conseguidos con el lector fueron usados para obtener el porcentaje de mortalidad o supervivencia celular y para calcular la Dosis Letal Media DL₅₀ por los métodos Logit y Probit.

6.2.5.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

La preparación del medio base donde se cultivaron las células de leucemia linfoblástica aguda, se realizó siguiendo las especificaciones de cultivo de la línea celular RS4;11 - ATCC® CRL1873™ (American Type Culture Collection, 2014). Para esto, se utilizó un frasco estéril de 250 ml, de vidrio claro y con tapa rosca al que se le colocaron 100 ml de medio completo RPMI 1640 1X (suplementado con 25 mM de HEPES y L-glutamina), 20 ml de suero fetal bovino al 10%, 1 ml de fitohemaglutinina y 1,5 ml de antibiótico al 1% (penicilina-estreptomicina 5000 U/ml); todos de marca Gibco® (Anexo 6). Esta preparación se rotuló y se guardó a -10 °C hasta su uso. Para poder utilizar el medio de cultivo, este se descongeló en baño maría a 37 °C.

6.2.5.2 SEPARACIÓN DE LINFOBLASTOS POR EL MÉTODO DE GRADIENTE DE DENSIDAD FICOLL-HYPAQUE

Antes de cultivar las células de leucemia linfocítica aguda, primero se las separó de la muestra de médula ósea por el método de fraccionamiento por gradiente de densidad continuo mediante centrifugación con Ficoll. Para realizar este procedimiento, se siguió la técnica propuesta en Guerrero *et al.* (2005) y Lonza (2011), pero modificada y adaptada a las necesidades de esta investigación.

En un tubo cónico Falcon™ de 50 ml se colocaron 5 ml de médula ósea y se diluyó con 15 ml de medio de cultivo RPMI 1640. Luego, en otro tubo cónico Falcon™ de 15 ml se pusieron 3 ml de medio de separación de linfocitos marca Lonza que contiene Ficoll® y diatrizoato de sodio (Lonza, 2011) junto a 4 ml de la médula diluida con RPMI 1640, y se centrifugó a temperatura ambiente a 400 xg durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se sacó el tubo de la centrífuga procurando no mezclar las fases formadas: en la capa superior se dispuso una fase formada por residuos adiposos de la médula y otros restos, luego se dispuso otra fase correspondiente al medio de cultivo, después se formó una pequeña interfase turbia conteniendo los linfoblastos, a continuación se dispuso una capa acuosa que corresponde al Ficoll y finalmente, al fondo del tubo, se precipitó una capa más oscura formada por eritrocitos (Anexo 7).

Después, procurando no mezclar las capas, primero se desechó la fase

superior constituida por los restos de grasa de la médula y luego se eliminó las tres cuartas partes de la capa formada por el medio de cultivo. A continuación, se colocó en otro tubo Falcon™ de 15 ml el resto del medio de cultivo y la interfase correspondiente a los linfoblastos. A este sobrenadante recuperado, se le añadieron ocho ml de tampón fosfato salino PBS Gibco® y se centrifugó a 100 xg por cinco minutos. Se desechó el sobrenadante y se colocaron otros ocho ml de tampón fosfato salino, se centrifugó a 100 xg por cinco minutos y se desechó nuevamente el sobrenadante. Este lavado con PBS se repitió una vez más para obtener un pellet lo más puro posible de células linfoblásticas.

Luego de los lavados, el pellet obtenido fue resuspendido con 5 ml de medio de cultivo e inmediatamente se realizó un conteo de células vivas para realizar los ajustes correspondientes antes de su incubación y cultivo.

6.2.5.3 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD Y CONCENTRACIÓN DE LOS LINFOBLASTOS, PREVIO A SU CULTIVO

Antes de iniciar el cultivo de los linfoblastos, primero se ajustó la concentración a 1×10^5 células vivas/ml. Para esto, se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer, a partir de una mezcla isovolumétrica de linfoblastos con azul tripano.

En un tubo Ependorf de 1 ml se mezclaron 100 μ l de células linfoblásticas con 100 μ l del colorante azul tripano al 0,4% (Razón 1:1, Factor de dilución 1:2) y se mezcló suavemente. Luego, se colocaron 10 μ l de esta mezcla en una cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad (0,01 cm) y 9 mm² de cuadrícula (0,09 cm²). Se puso la cámara en el microscopio y se esperó un minuto hasta que las células se quedaran inmóviles para empezar el conteo; el mismo que se realizó en menos de diez minutos, porque pasado este tiempo el azul tripano tiñe todas las células.

Para el conteo se utilizaron los cuatro cuadrados grandes (formados por 16 subcuadrados cada uno) que están en las esquinas de la cuadrícula de la cámara. Se tomaron en cuenta las células transparentes que corresponden a las que estuvieron vivas y se descartaron del recuento las células teñidas de azul porque son las que estuvieron muertas.

Por convención, el orden de conteo es en zig-zag: la primera fila de subcuadrados se contó de izquierda a derecha, la segunda fila se contó de derecha a izquierda y así sucesivamente. Además, se tomaron en cuenta las células que tocaban los bordes superior e izquierdo de los cuadrados y subcuadrados, y se excluyeron las células que tocaban los bordes inferior y derecho (Lomonte, 2009; www.celeromics.com, 2014). Si el conteo se dificulta por el amontonamiento de células, se deben mezclar 10 μ l de linfoblastos con 90 μ l de azul tripano (Razón 1:9, Factor de dilución 1:10).

Una vez que se obtuvo el total de células vivas, para calcular la concentración de linfoblastos/ml se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{NTC}}{0,0004 \text{ ml}} \times \frac{1}{\text{FD}}$$

Donde:

NTC= número total de células contadas en los cuatro cuadrantes esquineros

FD = factor de dilución.

Esta fórmula se utiliza con cámaras de 0,1 mm de profundidad y 1mm² de superficie por cada cuadrante esquinero, obteniéndose un volumen total de conteo de 0,4 mm³ (0,0004 ml).

El factor de dilución se calculó para corregir la concentración inicial de las células que se diluyeron con el colorante azul tripano, y se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{FD} = \frac{\text{VC}}{\text{VC} + \text{VAT}}$$

Donde:

FD = Factor de dilución

VC = Volumen de la muestra de células

VAT = Volumen del azul tripano

Finalmente, con el dato de concentración obtenido luego del conteo, se calculó el volumen de aforo al que se debe llegar añadiendo medio de cultivo a la muestra que contiene los linfoblastos, para empezar la incubación y proliferación celular. La fórmula es la siguiente:

$$V_2 = \frac{C_1 \times V_1}{C_2}$$

Donde:

V_2 = volumen de aforamiento, utilizando medio de cultivo

C_1 = concentración obtenida en el conteo

V_1 = volumen de la muestra que se quiere cultivar (en este caso: 5ml)

C_2 = concentración inicial de cultivo (en este caso: 100.000 células/ml)

6.2.5.4 CULTIVO *IN VITRO* Y MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Con la finalidad de tener suficiente cantidad de células para los ensayos, se realizó el cultivo celular de los linfoblastos aislados de la muestra de médula ósea, añadiendo el medio base preparado anteriormente.

El procedimiento de cultivo y subcultivo celular (Anexos 8 y 9) se basó en las especificaciones técnicas de la línea celular RS4;11 - ATCC® CRL1873™

(American Type Culture Collection, 2014) y se realizó de la siguiente manera:

Primero, se descongeló en baño maría el medio de cultivo (RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino) y después se lo puso en la incubadora durante 15 minutos, para permitir que llegue a su pH normal (7,0 a 7,6) y evitar una excesiva alcalinidad. Luego, en una cabina de flujo laminar, se colocó el medio con la muestra de linfoblastos aislados, ajustando la concentración a 1×10^5 células por ml. Una vez obtenida la concentración requerida, se dispensaron 5 ml de las células en varios frascos de cultivo de 25 cm², se rotularon y se pusieron a incubar a 37 °C y 5% de CO₂ durante dos días.

Luego de este tiempo, se revisó en un microscopio invertido que los frascos de cultivo no hayan estado contaminados por hongos; después, se analizaron cada uno de los frascos para comprobar en qué cantidad crecieron las células y si es que necesitaron ser subcultivadas. Para este paso, se vertió el contenido de una caja en un tubo Falcon de 15 ml, el que luego fue centrifugado a 125 xg por 5 a 10 minutos (el tiempo de centrifugación dependió de que se haya formado un buen pellet de células). Después, se retiró el sobrenadante y cuidadosamente se resuspendió el pellet con 5 ml de medio de cultivo fresco. Posteriormente, se tomó una muestra de 100 μ l de células y se la mezcló con 100 μ l de azul tripano para realizar el conteo celular en una cámara de Neubauer y determinar la concentración de células vivas. Dependiendo de la densidad poblacional alcanzada luego de 48 horas de cultivo, los frascos que tuvieron una concentración igual o mayor a 1×10^6 células/ml fueron subcultivadas ajustado la

concentración a 1×10^5 células/ml. Aquellos frascos que no tuvieron una densidad poblacional alta, fueron revisados al siguiente día para realizar el subcultivo.

6.2.5.5 ENSAYOS ANTICANCERÍGENOS *IN VITRO* Y PRUEBA COLORIMÉTRICA MTT

Para realizar las pruebas anticancerígenas se usaron placas de 96 pocillos para microtitulación Corning®, en las que se colocaron 50 μ l de cada dosis de secreción cutánea (4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 64, 32, 16 y 8 μ g/ml) sobre 100 μ l de linfoblastos, previamente separados de la muestra de leucemia linfoblástica aguda de médula ósea; utilizando un pocillo para cada dosis y los respectivos controles, y una fila de pocillos para cada especie de rana. Las placas se incubaron por 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂ (Anexo 10). Las pruebas se hicieron por triplicado.

Después de la incubación, para determinar el efecto citotóxico de las secreciones cutáneas en las células de leucemia, se realizó una prueba colorimétrica MTT siguiendo las recomendaciones de Thermo Fisher Scientific (2002). En cada pocillo, que contiene las pruebas, se añadieron 20 μ l de colorante MTT y se incubó por 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂, tiempo en el cuál se esperó que se formen cristales de formazán en donde hubieron células vivas. Luego, se eliminó el sobrenadante, se pusieron 100 μ l de SDS y se dejaron las placas a temperatura ambiente hasta que se solubilizaron los cristales de

formazán. Después, se colocaron las placas en un lector de Elisás y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 550nm.

Esta prueba colorimétrica nos ayuda a determinar la viabilidad celular y se basa en que las células vivas realizan una reducción metabólica del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniletiazol), que en un principio es de color amarillo, y a través de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa se produce un compuesto de color azul (cristales de formazán) que es proporcional a la cantidad de células que sobreviven al tratamiento.

Con los datos de absorbancia obtenidos en el lector de Elisás, se determinaron los porcentajes de viabilidad, en base a la siguiente fórmula.

$$PV = (DO \text{ tr} / DO \text{ c-}) \times 100$$

Dónde:

PV = porcentaje de viabilidad

DO tr = densidad óptica del pocillo con tratamiento (linfoblastos con dosis de secreción cutánea)

DO c- = densidad óptica del control negativo (medio RPMI 1640 con linfoblastos)

Con los porcentajes de viabilidad obtenidos, se calculó en Microsoft® Excel la Dosis Letal Media DL_{50} (expresadas en $\mu\text{g/ml}$), mediante los métodos de regresión de respuesta binaria Logit y Probit.

6.2.6 EXPERIMENTACIÓN *IN VITRO* SOBRE ERITROCITOS HUMANOS (PRUEBAS HEMOLÍTICAS)

Para identificar el efecto citotóxico de la secreción cutánea de cada especie de anuro sobre eritrocitos humanos, se siguió el procedimiento sugerido en Chuang (2012) y Chu (2015).

Se obtuvo una muestra de sangre venosa humana en tubos de recolección BD Vacutainer™ ref. 367525, que contienen anticoagulante EDTA (Anexo 11). La muestra de sangre se transfirió a un tubo cónico BD Falcon™ de 15 ml y se centrifugó por cinco minutos a 800 xg. Luego, con un marcador se señaló en el tubo los límites del plasma y de los eritrocitos. Se quitó el plasma con una pipeta y se puso tampón fosfato salino con pH 7,4 (PBS Gibco®) en la misma cantidad de lo que se retiró, y se mezcló suavemente para lavar los eritrocitos. Esta mezcla de eritrocitos con tampón fosfato salino se centrifugó por cinco minutos a 800 xg y se retiró el tampón. Este lavado se repitió tres veces más y se desechó el tampón. Luego, al pellet de eritrocitos se le colocó nuevamente tampón fosfato salino en una Razón 1:9 (Factor de dilución 1:10) y se mezcló suavemente para obtener una muestra de eritrocitos al 10%.

Las pruebas hemolíticas se realizaron en placas de polipropileno de 96 pocillos para microtitulación Corning®. En diferentes pocillos de una misma fila se colocaron 50 μ l de dosis de secreción cutánea con 50 μ l de eritrocitos al 10% (un pocillo diferente para cada dosis probada); para el control negativo de hemólisis

se pusieron 50 μ l de PBS con 50 μ l de eritrocitos al 10% y para el control positivo se usaron 50 μ l de agua milliQ con 50 μ l de eritrocitos al 10%. Después, se puso a incubar la placa de microtitulación a 37 °C por 24 horas.

Al siguiente día, se recogió la muestra de cada pocillo con una pipeta y se puso en distintos tubos de polipropileno tipo Ependorf previamente rotulados. Se centrifugaron los tubos por cinco minutos a 800 xg, se recogió el sobrenadante (que debe tener hemoglobina liberada de los eritrocitos muertos) y se lo colocó en una placa de microtitulación, en el mismo orden de pocillos en el que se hicieron las pruebas hemolíticas.

El resultado fue leído en un lector de Elisás, a una longitud de onda de 540 nm, en el Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de hemólisis con la siguiente fórmula:

$$\%H = (DO \text{ tr} / DO \text{ c+}) \times 100$$

Donde:

%H = porcentaje de hemólisis

DO tr = densidad óptica del pocillo con tratamiento (eritrocitos con dosis de secreción cutánea)

DO c+ = densidad óptica del control positivo (eritrocitos con agua milliQ)

A su vez, con los datos de porcentaje se calculó la Concentración Hemolítica Media (CH_{50}), que es la concentración a la que una dosis de secreción cutánea de anuro generó el 50% de hemólisis, mediante los métodos Logit y Probit.

Los datos de la CH_{50} se usaron junto a los de CI_{50} de las pruebas antibacterianas y DL_{50} de las pruebas anticancerígenas (de las secreciones que tuvieron un efecto citotóxico positivo), para determinar el Índice Terapéutico (IT) de las respectivas secreciones cutáneas.

El Índice Terapéutico se utiliza en farmacología para medir el nivel de seguridad de un medicamento, y se calcula dividiendo la Dosis Letal Media de un agente citotóxico sobre la Dosis Media del Efecto deseado (DL_{50} / DE_{50}) (Arias, 1999); en este caso sería la división de la Concentración Hemolítica Media sobre la Concentración Inhibitoria Media ($IT = CI_{50}/DL_{50}$) y sobre la Dosis Letal Media ($IT = CH_{50}/DL_{50}$). Cuando el valor es superior a 10 se interpreta que el agente citotóxico es seguro y si el valor es menor a 10, se interpreta como peligroso; cuando el valor se acerca a uno se considera que la secreción puede ser mortal.

Si alguna de las secreciones cutáneas presenta valores altos de índice terapéutico, se debe aumentar el nivel de seguridad de su potencial uso mediante el cálculo del Factor Determinado de Seguridad o Índice de Seguridad que

corresponde a dividir la Dosis letal mínima del citotóxico sobre la Dosis efectiva máxima (Arias, 1999), que en el caso de esta investigación sería la Concentración hemolítica mínima (1%) sobre la Dosis letal máxima (99%): $IS = CH_1 / DL_{99}$.

El valor ideal que debe poseer un citotóxico para ser considerado seguro tiene que ser igual o mayor a dos (≥ 2).

6.3 ELABORACIÓN DE PERFILES CROMATOGRÁFICOS Y DETERMINACIÓN DE ANUROS PROMISORIOS

Se elaboró una lista de anuros promisorios con las especies cuyas secreciones cutáneas tuvieron efecto antibacteriano y/o anticancerígeno positivo y se identificó como un único servicio ecosistémico de provisión a cada secreción que mostró un perfil cromatográfico diferente.

Para elaborar los cromatogramas se usó un HPLC con Sistema Binario de Bombas de Alta Presión Waters 1525, con una columna semipreparativa C18, acoplado a un detector de luz UV/Visible Waters 2489 y a un Autosampler Waters 2707. Se inyectó una muestra de secreción cutánea de cada especie de anuro promisorio y se corrió a 214nm para detectar la presencia de moléculas peptídicas, que se sabe tienen propiedades antimicrobianas y citotóxicas.

6.4 ESTIMACIÓN DEL BENEFICIO ECONÓMICO QUE POTENCIALMENTE PUEDEN GENERAR LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS

Para comprender y visibilizar el potencial económico que se puede obtener de las secreciones cutáneas de anuros, siguiendo los ejemplos descritos en León *et al.* (2012) y WWF (2014), se calculó el Valor de Uso Directo (VUD) mediante un análisis del costo de los medicamentos anticancerígenos que se usan en quimioterapia para tratar una leucemia linfoblástica aguda estándar; y para proponer un ejemplo, se contrastó el valor monetario derivado de este cálculo con el número de niños diagnosticados cada año con leucemia en el Ecuador.

7. RESULTADOS

7.1 RECOLECCIÓN DE ANUROS EN EL CAMPO

En las localidades de Arajuno, Kurintza, Oglán, Pomona y Zanjarajuno de la provincia de Pastaza se colectaron 56 individuos correspondientes a 15 especies de anuros amazónicos y que pertenecen a las familias Bufonidae, Hylidae y Leptodactylidae: *Agalychnis hulli* (3 individuos), *Dendropsophus bifurcus* (8 individuos), *Hypsiboas boans* (5 individuos), *H. calcaratus* (1 individuo), *H. cinerascens* (8 individuos), *H. geographicus* (4 individuos), *H. lanciformis* (5 individuos), *Leptodactylus mystaceus* (2 individuos), *L. wagneri* (6 individuos), *Lithodytes lineatus* (1 individuo), *Osteocephalus planiceps* (1 individuo), *Phyllomedusa tarsius* (3 individuos), *P. tomopterna* (3 individuos), *P. vaillantii* (4 individuos) y *Rhinella marina* (2 individuos) (Figura 1; Tabla 1).

7.2 PRUEBAS ANTIBACTERIANAS REALIZADAS CON EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

El resultado de las pruebas antibacterianas, realizadas por el método de difusión en disco, indicaron que *Staphylococcus aureus* es sensible a la dosis de 4000 µg/ml de secreción cutánea de *Phyllomedusa tarsius* (100% de sensibilidad)

(Figura 2, Tablas 2 y 3); tiene susceptibilidad intermedia con la dosis de 4000 µg/ml de *Hypsiboas geographicus* (26% de sensibilidad), *H. lanciformis* (26% de sensibilidad), *Phyllomedusa tomopterna* (91% de sensibilidad) y *P. vaillantii* (81% de sensibilidad) (Tablas 2 y 3); mientras que, es resistente a las secreciones *Agalychnis hulli*, *Dendropsophus bifurcus*, *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. cinerascens*, *Leptodactylus mystaceus*, *Leptodactylus wagneri*, *Lithodytes lineatus*, *Osteocephalus planiceps* y *Rhinella marina* (Tablas 2 y 3).

Las pruebas realizadas con *Escherichia coli* indican que esta cepa es sensible a la dosis de 4000 µg/ml de secreción cutánea de *Phyllomedusa tomopterna* (108% de sensibilidad) (Figura 3, Tablas 2 y 4); tiene susceptibilidad intermedia con la dosis de 4000 µg/ml de *Phyllomedusa tarsius* (90% de sensibilidad) y *P. vaillantii* (83% de sensibilidad) (Tablas 2 y 4); mientras que, es resistente a las secreciones *Agalychnis hulli*, *Dendropsophus bifurcus*, *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. cinerascens*, *H. geographicus*, *H. lanciformis*, *Leptodactylus mystaceus*, *Leptodactylus wagneri*, *Lithodytes lineatus*, *Osteocephalus planiceps* y *Rhinella marina* (Tablas 2 y 4).

Las especies de anuros, cuya secreción tuvo un efecto antimicrobiano que se expresó como sensible, fueron *Phyllomedusa tarsius* y *P. tomopterna* (Figuras 2 y 3).

7.3 PRUEBAS ANTIBACTERIANAS REALIZADAS CON EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

El resultado de las pruebas antibacterianas realizadas por el método de microdilución en caldo con *Staphylococcus aureus* indicaron que las secreciones cutáneas de *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. geographicus*, *Leptodactylus mystaceus*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* tuvieron un efecto inhibitorio por lo menos del 50% con alguna de las dosis probadas; mientras que con las secreciones cutáneas de *Dendropsophus bifurcus*, *Hypsiboas cinerascens*, *H. lanciformis*, *Leptodactylus wagneri*, *Lithodytes lineatus*, *Osteocephalus planiceps* y *Rhinella marina*, más de la mitad de las bacterias sobrevivieron (Figuras 4 y 5; Tabla 5).

En los ensayos realizados con *Escherichia coli* se vio que las secreciones cutáneas de *Agalychnis hulli*, *Leptodactylus wagneri*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* tuvieron un efecto inhibitorio por lo menos del 50% con alguna de las dosis probadas; mientras que con las secreciones cutáneas de *Dendropsophus bifurcus*, *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. cinerascens*, *H. geographicus*, *H. lanciformis*, *Leptodactylus mystaceus*, *Lithodytes lineatus*, *Osteocephalus planiceps* y *Rhinella marina*, más de la mitad de las bacterias sobrevivieron (Figuras 6 y 7; Tabla 6).

La Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) calculada por los métodos Logit y Probit para las secreciones cutáneas que produjeron al menos un 50% de

mortalidad bacteriana en *Staphylococcus aureus* fue de 148 a 150 µg/ml con *Agalychnis hulli*, 578 a 588 µg/ml con *Hypsiboas boans*, 2710 a 2732 µg/ml con *H. calcaratus*, 1348 a 1361 µg/ml con *H. geographicus*, 2076 a 2183 µg/ml con *Leptodactylus mystaceus*, 40 a 43 µg/ml con *Phyllomedusa tarsius*, 45 a 46 µg/ml con *P. tomopterna* y 167 a 168 µg/ml con *P. vaillantii* (Tabla 7).

La Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) calculada para las secreciones cutáneas que produjeron al menos un 50% de mortalidad bacteriana en *Escherichia coli* fue de 29 a 30 µg/ml con *Agalychnis hulli*, 2340 a 2350 µg/ml con *Leptodactylus wagneri*, 36 a 37 µg/ml con *Phyllomedusa tarsius*, 32 a 33 µg/ml con *P. tomopterna* y 89 a 91 µg/ml con *P. vaillantii* (Tabla 8).

7.4 PRUEBAS ANTICANCERÍGENAS

La secreción cutánea de las especies *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas calcaratus*, *H. cinerascens*, *H. lanciformis*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* tuvieron actividad citotóxica sobre las células de leucemia linfoblástica aguda, inhibiendo al menos el 50% de las mismas, con una o más de las dosis probadas; mientras que, las especies *Dendropsophus bifurcus*, *Hypsiboas boans*, *H. geographicus*, *Leptodactylus mystaceus*, *Leptodactylus wagneri*, *Lithodytes lineatus*, *Osteocephalus planiceps* y *Rhinella marina*, no tuvieron actividad anticancerígena (Figuras 8 y 9; Tabla 9).

La Dosis Letal Media (DL₅₀) calculada por los métodos Logit y Probit para las secreciones cutáneas que tuvieron actividad anticancerígena sobre las células de leucemia linfoblástica aguda fue de 930 a 936 µg/ml con *Agalychnis hulli* e *Hypsiboas calcaratus*, 914 a 955 µg/ml con *H. lanciformis*, 6 µg/ml con *Phyllomedusa tomopterna* y menor a 8 µg/ml con *H. cinerascens*, *P. tarsius* y *P. vaillantii* (Tabla 10).

7.5 PRUEBAS HEMOLÍTICAS E ÍNDICE TERAPÉUTICO

El resultado de las pruebas hemolíticas indican que las secreciones cutáneas de *Dendropsophus bifurcus*, *Leptodactylus mystaceus*, *L. wagneri* y *Rhinella marina* producen un efecto citolítico menor al 50% en los eritrocitos (Figura 10; Tabla 11). Al contrario, las especies que producen un alto porcentaje de hemólisis (mayor al 50%), con todas las dosis probadas, son *Hypsiboas cinerascens*, *Osteocephalus planiceps*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* (Figura 11; Tabla 11). Por otro lado, *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. geographicus*, *H. lanciformis* y *Lithodytes lineatus* presentaron hemólisis mayor al 50% con las dosis más altas y menor al 50% con dosis más bajas (Figura 12; Tabla 11).

Los resultados de la Concentración Hemolítica Media (CH_{50}) indican que las secreciones cutáneas de *Dendropsophus bifurcus*, *Leptodactylus mystaceus*, *L. wagneri* y *Rhinella marina* deben ser preparadas en dosis mayores a 4000 $\mu\text{g/ml}$ (la más alta utilizada en los ensayos) para provocar el 50% o más de mortalidad de los eritrocitos; mientras que las secreciones de *Hypsiboas cinerascens*, *Osteocephalus planiceps*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* deben ser preparadas en dosis menores a 8 $\mu\text{g/ml}$ (la más baja utilizada en los ensayos); y, la Concentración Hemolítica Media de las secreciones de *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. geographicus*, *H. lanciformis* y *Lithodytes lineatus* presentaron valores entre los 4000 y 8 $\mu\text{g/ml}$ que son los rangos máximo y mínimo de las diez dosis usadas en los ensayos (Tabla 12).

En lo referente al Índice Terapéutico (IT) calculado con las Concentraciones Inhibitorias Medias (CI_{50}) de las pruebas realizadas en *Staphylococcus aureus*, se obtuvo un nivel de seguridad catalogado como PELIGROSO con las secreciones de *Hypsiboas boans* y *Leptodactylus mystaceus*, mientras que se catalogaron como MORTALES las secreciones de *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas calcaratus*, *H. geographicus*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* (Tabla 13)

El Índice Terapéutico (IT) calculado con las Concentraciones Inhibitorias Medias (CI_{50}) de las pruebas realizadas en *Escherichia coli*, indicó un nivel de seguridad PELIGROSO con las secreciones de *Agalychnis hulli* y *Leptodactylus*

wagneri; mientras que se catalogaron como MORTALES las secreciones de *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* (Tabla 14).

El Índice Terapéutico calculado con la Dosis Letal Media (DL₅₀) de las secreciones que tuvieron actividad anticancerígena con las células de leucemia linfoblástica, indicó un nivel de seguridad catalogado como MORTAL para *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas calcaratus*, *H. cinerascens*, *H. lanciformis*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* (Tabla 15).

Los resultados indicaron que ninguna de las secreciones cutáneas, que tienen actividad antibacteriana y anticancerígena, presentan un nivel de seguridad SEGURO.

7.6 DETERMINACIÓN DE ANUROS PROMISORIOS

Aunque el cálculo del Índice Terapéutico indicó un nivel de seguridad peligroso o mortal para el uso de la secreción cutánea “total” de todas las especies de anuros que tuvieron actividad antimicrobiana y anticancerígena, no se descarta el potencial uso biomédico de la secreción cutánea de cada una de éstas, ya que los péptidos antimicrobianos y/o anticancerígenos pueden ser

diferentes de las moléculas que producen hemólisis, y no tener actividad citotóxica contra los eritrocitos.

Dicho esto, de las 15 especies evaluadas, se identificaron once anuros promisorios cuyas secreciones cutáneas mostraron tener un efecto antibacteriano y/o anticancerígeno positivo; es decir, que el 73% de las especies muestreadas tienen importancia biomédica: nueve especies pertenecen a la familia Hylidae (*Agalychnis hulli*, *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. cinerascens*, *H. geographicus*, *H. lanciformis*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii*) y dos especies son de la familia Leptodactylidae (*Leptodactylus mystaceus* y *L. wagneri*) (Figura 1, Tabla 16).

De estos once anuros promisorios, se determinó que la secreción cutánea del 73% de especies (53% de las 15 totales) inhibe al menos la mitad de bacterias de una muestra de *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 (Figura 4, Tabla 7), la secreción del 45% de especies (33% de las 15 totales) inhibe al menos la mitad de bacterias de una muestra de *Escherichia coli* ATCC® 25922 (Figura 6, Tabla 8) y las secreciones del 64% de las especies (47% de las 15 totales) inhibe al menos la mitad de células neoplásicas de una muestra de leucemia linfoblástica aguda (Figura 8, Tabla 10).

Además, los cromatogramas de estas especies indicaron la presencia de moléculas peptídicas y mostraron tener perfiles cromatográficos diferentes

(Figuras 13 a 23), por lo que se considera que cada una de estas especies tiene el potencial de proveer un servicio ecosistémico diferente.

Las secreción cutánea de las especies *Dendropsophus bifurcus*, *Lithodytes lineatus*, *Osteocephalus planiceps* y *Rhinella marina*, no tuvieron efecto antibacteriano y/o anticancerígeno.

7.7 ESTIMACIÓN DEL POTENCIAL ECONÓMICO DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS MEDIANTE EL CÁLCULO DEL VALOR DE USO DIRECTO (VUD)

En base a los valores establecidos en la “Lista de Precios Techo de Medicamentos Estratégicos y Registrados”, elaborada por el Consejo Nacional de Fijación y Revisión de Precios de Medicamentos de Uso y Consumo Humano (2015), y aplicando un protocolo completo (*in extenso*) sugerido por Jasso *et al.* (2012) para tratar una leucemia linfoblástica aguda de riesgo estándar en un niño que pesa 20 kg y mide 1,15 m de altura (percentil 50 = 0.8 m²SC), se pudo estimar que el costo de los medicamentos usados en una quimioterapia es de \$4.844,57 USD. De este valor, el 95% (\$4.602,9 USD) corresponde a medicamentos anticancerígenos y el 5% (\$241,67 USD) corresponde a medicamentos para contrarrestar los efectos secundarios (Tabla 17).

No existen datos estadísticos oficiales, o por lo menos públicos, sobre la incidencia de los diferentes tipos de cáncer en el Ecuador; sin embargo se puede estimar la cantidad aproximada de casos de leucemia en niños, si tomamos en cuenta que según el Registro Nacional de Tumores de Solca Quito, cada año existen en el país 17 nuevos casos de cáncer por cada 100.000 menores de 19 años, es decir un 0,017%. Según datos del último censo poblacional, en Ecuador existen 4'040.020 niños y niñas menores de 12 años (INEC, 2010); por lo tanto, cada año se reportarían 687 nuevos casos de cáncer. Por otro lado, se estima que la leucemia es el tipo de cáncer más común en la población infantil, con un 35% de incidencia, entonces anualmente habría 240 nuevos pacientes menores de 12 años con leucemia y que deben ser tratados con quimioterapia. Finalmente, el Valor de Uso Directo (VUD) derivado de una quimioterapia en este segmento poblacional sería de \$1'162.697 USD; y, sólo el costo de los medicamentos anticancerígenos, alcanzaría el valor de \$1'104.562 USD cada año.

8. DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación aportan al conocimiento de los servicios ecosistémicos de tipo provisión, ya que demuestran el potencial antibacteriano y anticancerígeno de las moléculas contenidas en la piel de once especies de ranas amazónicas, y porque explican el potencial beneficio económico que se puede obtener por la comercialización de un fármaco producido con estas moléculas. En este sentido, la evaluación y valoración de los Servicios Ecosistémicos son pasos iniciales significativos, realizados para reconocer cómo es que la naturaleza contribuye al bienestar humano y a las economías. Hacer conocer el valor de la gran variedad de bienes y servicios que proveen los diferentes ecosistemas es importante para influir en los tomadores de decisiones, quienes a su vez deberían fomentar una mayor inversión en la protección y gestión de los sistemas naturales (Gavilán *et al.*, 2011; Ministerio del Medio Ambiente de Suecia, 2013).

En los resultados obtenidos se observa que la secreción cutánea de cada especie tiene un tipo diferente de bioactividad; así, tal como se constata en la tabla 16, *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. geographicus*, *Leptodactylus mystaceus*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* son capaces de controlar el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, mientras que *A. hulli*, *L. wagneri*, *P. tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* controlan el crecimiento de *Escherichia coli*, y *A. hulli*, *H. calcaratus*, *H. cinerascens*, *H. lanciformis*, *P. tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* inhiben el crecimiento de los linfoblastos. Esta variación en el tipo de actividad citotóxica, que presentan las distintas

especies de anuros, nos indica que deben existir diferentes moléculas en la piel de cada una, y que éstas deben tener diferentes tipos de acción según las células sobre las que actúan, ya sean bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas o células de leucemia linfoblástica aguda.

Se puede presumir que de la variedad de moléculas presentes en las secreciones cutáneas, la acción citotóxica comprobada en la presente investigación proviene de los péptidos. Esta aseveración se realiza en base a la evidencia mostrada por los perfiles cromatográficos que indican la presencia de moléculas peptídicas (Figuras 13 a 23) y además porque la secreción cutánea se extrajo a partir de individuos mantenidos en cautiverio con una dieta a base de grillos. Por ejemplo, esta presunción de que son los péptidos y no otro tipo de moléculas como los alcaloides, las sustancias que tienen efecto antimicrobiano y anticancerígeno, se puede afirmar en base a que los alcaloides producidos en la piel de los anuros son sustancias formadas por bioacumulación, es decir que su presencia depende de la dieta de las ranas; si se eliminan de la ingesta aquellos alimentos como termitas, hormigas o ácaros propios del ecosistema donde viven, ya no se producirán los alcaloides (Daly *et al.*, 2002; Saporito *et al.*, 2004; Darst *et al.*, 2005; Mebs *et al.*, 2010). Por otro lado, los péptidos son producidos principalmente por expresión de genes, aunque hay unos pocos que son el resultado de metabolitos secundarios (Téllez y Castaño, 2010). Además, en la técnica de extracción de péptidos se utiliza agua deionizada a pH neutro, mientras que para la obtención de alcaloides se requiere extraer la piel y ponerla con disolventes orgánicos polares como metanol de 70°, disolventes orgánicos

apolares como el amoníaco, agua acidulada, entre otros (Daly *et al.*, 2002; Mebs *et al.*, 2010).

Continuando con el análisis de los resultados, es importante distinguir que la secreción peptídica de las especies *Agalychnis hulli*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii*, todas pertenecientes a la subfamilia Phyllomedusinae (Pyron y Wiens 2011; Vitt y Caldwell, 2014), inhiben el crecimiento tanto de células de leucemia linfoblástica aguda como de las dos cepas bacterianas (Figuras 4, 6 y 8; Tablas 7, 8, 10 y 16). Los perfiles cromatográficos de estas cuatro especies de ranas son muy similares entre sí, presentando una gran cantidad de moléculas peptídicas, con más de 40 picos de elución obtenidos entre los minutos diez y setenta (Figuras 13, 21, 22 y 23); es decir que estas especies producen péptidos con diferente número de aminoácidos y seguramente con diferentes secuencias de los mismos, lo que resulta en una alta variedad de moléculas con bajo, mediano y alto peso molecular. Este resultado se confirma con la gran cantidad de moléculas peptídicas encontradas en este grupo de ranas por diversos investigadores durante los último 50 años, por ejemplo desde 1966 hasta 2009 se han descrito 227 secuencias de aminoácidos de péptidos y de secuencias de ADNc precursoras de péptidos presentes en la secreción cutánea de varias especies del género *Phyllomedusa* (Azevedo *et al.*, 2011).

Existen cuatro tipos de péptidos, obtenidos de la piel de *Phyllomedusa*, y estos se clasifican según su actividad principal en: antimicrobianos, activos en el sistema nervioso central, activos en la musculatura lisa y los que se desconoce su

función (Azevedo *et al.*, 2011). De estos cuatro grupos, el más diverso corresponde a los péptidos antimicrobianos que actúan como una barrera cutánea de defensa contra las infecciones (Pierre *et al.*, 2000). Los péptidos antimicrobianos de Phyllomedusinae se clasifican en siete diferentes familias según su secuencia y actividad; y estas son: Dermaseptinas, Dermatoxinas, Hyposinas, Phylloseptinas, Phylloxinas, Plasticinas y Péptidos huérfanos (Amiche *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2011).

Entre los péptidos descritos que tienen actividad antimicrobiana y también anticancerígena, que probablemente pueden estar presentes en la secreción cutánea de las especies de la subfamilia Phyllomedusinae evaluadas en este estudio, se encuentran la triptophyllina AcT-3 aislada de *Agalychnis callydras*, compuesta por 63 aminoácidos (Wang *et al.*, 2015) o la Dermaseptina B2 presente en *Phyllomedusa bicolor*, formada por 81 aminoácidos (Zoggel *et al.*, 2012). Además, pueden existir otras moléculas peptídicas que aún no están descritas, ya que cada especie produce un coctel de péptidos propio de su adaptación evolutiva (Vanhoye *et al.*, 2003).

La similitud existente entre los perfiles cromatográficos de *Agalychnis hulli*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii* y la acción citotóxica que tuvieron sobre los tres tipos de células, no se observan con las otras especies de anuros. Esto podría deberse al hecho de que las especies de los géneros *Agalychnis* y *Phyllomedusa* están estrechamente relacionadas, ya que pertenecen a la subfamilia Phyllomedusinae, conocida por tener una gran cantidad de

péptidos bioactivos (Amiche *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2010). Resultó sumamente interesante constatar que *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus* e *H. lanciformis* presentaron cromatogramas similares y un tipo de actividad citotóxica diferente, pese a pertenecer al mismo género. De igual manera, *Leptodactylus mystaceus* y *L. wagneri* tuvieron cromatogramas similares y actividad citotóxica diferente. Por otro lado, *Hypsiboas cinerascens* e *H. geographicus*, en contraste con las especies de *Hypsiboas* nombradas anteriormente, éstas presentaron cromatogramas diferentes y también actividad citotóxica diferente.

En cuanto a la acción citotóxica de las secreciones peptídicas de *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. cinerascens*, *H. geographicus* e *H. lanciformis*, todas de la subfamilia Hyalinae (Pyron y Wiens 2011; Vitt y Caldwell, 2014), éstas tuvieron efecto ya sea sobre *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) (Figura 4, Tablas 7 y 16) o sobre las células de leucemia linfoblástica aguda (Figura 8, Tablas 10 y 16), con excepción de la secreción de *Hypsiboas calcaratus* que tuvo efecto en los dos tipos celulares antes mencionados (Figuras 4 y 8; Tablas 7, 10 y 16). Ninguna de las secreciones de estas especies tuvo efecto sobre *Escherichia coli* (Gram negativa) (Figura 7, Tablas 8 y 16).

Esto tal vez se deba a que los péptidos producidos por estas especies de *Hypsiboas* no tienen afinidad de unión con las bacterias Gram negativas; o simplemente porque no hubo suficiente cantidad de moléculas para comprometer la integridad membranal de estos procariones; es decir que, posiblemente se necesiten dosis más altas de estos péptidos para ocasionar daño. Por otro lado,

también se sabe que este tipo de bacterias, las Gram negativas, tienen una mayor resistencia a los antibióticos si comparamos con las bacterias Gram positivas que son más susceptibles (Téllez y Castaño, 2010); esto puede deberse a la conformación de la pared celular, que en las bacterias Gram negativas está constituida por dos membranas bilipídicas, y cuya protección se debe sobre todo a la capa externa rica en lipoproteínas y polisacáridos que contribuyen con varios mecanismos de resistencia como el cierre de porinas, bombas de expulsión de antimicrobianos, liberación de enzimas modificadoras de los antimicrobianos, entre otros, impidiendo la acción de los antibióticos que actúan a nivel de la pared, como los β -lactámicos (penicilina y cefalosporina) (Tafur *et al.*, 2008), con lo que supondríamos que esta barrera de protección también impediría la acción de ciertos péptidos catiónicos que actúan a nivel de las paredes bacterianas.

En contraste, las bacterias Gram positivas tienen una capa externa gruesa de peptidoglicano que posee un bajo contenido proteico y gran cantidad de lípidos, y por debajo de ésta se sitúa una sola membrana bilipídica, lo que les haría menos resistentes a los antimicrobianos que actúan a nivel de la pared (Téllez y Castaño, 2010). Sin embargo, aunque las bacterias Gram positivas sean menos resistentes, éstas también tienen mecanismos de protección como el aumento en la carga positiva de la membrana lo que causa repulsión de un antibiótico cargado positivamente, el cambio en la fluidez de la membrana, el engrosamiento de la pared celular por aumento del peptidoglicano y la producción de enzimas inhibitoras de antibióticos (Rincón *et al.*, 2014).

Cabe señalar que la resistencia bacteriana es mucho menor con los péptidos antimicrobianos que con los antibióticos convencionales y esto se debe a que los péptidos actúan principalmente a nivel de la membrana, mientras que los antibióticos lo hacen a nivel de la maquinaria interna de las células (Castrillón *et al.*, 2007; Téllez y Castaño, 2010).

Los perfiles cromatográficos de la secreción cutánea de todas las especies de *Hypsiboas* que presentaron actividad antibacteriana y/o anticancerígena son variables entre sí y presentan menos moléculas peptídicas que las especies de la subfamilia Phyllomedusinae (Figuras 13 a 18 y 21 a 23).

Hypsiboas boans, *H. calcaratus* e *H. geographicus*, tuvieron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Figura 4, Tablas 7 y 16) y sus perfiles cromatográficos son similares entre sí a nivel de los picos formados entre los 16 y 25 minutos de elución (Figuras 14, 15 y 17). Sin embargo *Hypsiboas calcaratus*, que también tuvo actividad anticancerígena (Figura 8, Tablas 10 y 16), muestra además tres picos entre los 9 a 10 minutos de elución y un pico separado ampliamente de los demás, formado a los 45,5 minutos de elución, lo que correspondería a un péptido de alto peso molecular (Figura 15). En el caso de *Hypsiboas geographicus*, además de los picos que comparte con las otras dos especies, existen dos grupos de moléculas eluidas a los minutos 35 y 45 respectivamente (Figura 17). Se podría pensar que los picos iniciales, que representan a las moléculas más livianas, corresponden a los péptidos con actividad antimicrobiana y las moléculas más pesadas a los péptidos con

actividad anticancerígena, pero esto no se puede afirmar si no se comprueba independientemente la actividad antimicrobiana y anticancerígena de cada una de las fracciones peptídicas aisladas previamente. Además *Hypsiboas geographicus* presentó péptidos de alto peso molecular, pero la secreción no tuvo actividad anticancerígena (Figura 9). Posiblemente esto se deba a que se necesita más cantidad de esas moléculas o porque compiten en adherencia con las más livianas. Esto nos lleva a pensar en que futuras investigaciones deben realizarse comprobando la actividad de las moléculas por separado o en conjunto (por ejemplo dos o tres moléculas juntas) para ver si existe sinergia o antagonismo entre ellas.

El perfil cromatográfico de *Hypsiboas lanciformis* (Figura 18) es bastante similar a los cromatogramas de *H. boans*, *H. calcaratus* e *H. geographicus* (Figuras 14, 15 y 17), pero esta especie tuvo efecto anticancerígeno y no antimicrobiano (Figuras 5, 7 y 8; Tablas 10 y 16). Este resultado es desconcertante porque no nos permite relacionar el tipo de acción con el tamaño de las moléculas. Es muy posible que existieron fallas metodológicas en la evaluación de la secreción de esta especie, puede ser que la muestra liofilizada no fluyó bien en el HPLC y no se visualizaron todas las moléculas peptídicas, tal vez la secreción no fue correctamente extraída y liofilizada o que simplemente el extracto se degradó. En otros estudios, se evidencia que *Hypsiboas lanciformis* tiene péptidos con actividad antimicrobiana que afectan cepas de origen hospitalario de *Escherichia coli*, pero no de *Staphylococcus aureus* (Groot *et al.*, 2012).

En cuanto a la secreción de *Hypsiboas cinerascens*, ésta tuvo acción anticancerígena (Figura 8, Tablas 10 y 16) y su perfil peptídico es bastante diferente al de las otras especies de *Hypsiboas*, diferenciándose de éstas en que hay más cantidad y variedad de moléculas (aproximadamente 19 picos frente a los 7-12 picos de las otras especies), y que casi no existen picos en los tiempos de retención de 16 a 25 minutos; mientras que sí existen varios picos en los tiempos de elución entre los minutos 30 y 60, lo que significa que hay moléculas de mediano y gran tamaño (Figura 16). Los picos observados en los tiempos de retención de 30 a 45 minutos representan a la mayoría de moléculas del cromatograma y se presume que este grupo de péptidos son los llamados Cinerascetinas. En un trabajo realizado en Brasil por Almeida *et al.* (2015) en el que analizan la composición química de la secreción peptídica de *Hypsiboas cinerascens*, se muestra un perfil cromatográfico bastante parecido al que se obtuvo en esta investigación, y cuando se identificaron los picos de elución obtenidos entre los minutos 30 y 45, se determinó que existen cinco tipos de moléculas (C-01, C-02, C-03, C-04 y C-05) similares químicamente a las Cinerascetinas. Además, estos investigadores comprobaron que la Cinerascetina C-01 tiene actividad antimicrobiana sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

En lo que se refiere a las secreciones de las dos especies de Leptodactylidae, éstas tuvieron solamente actividad antimicrobiana, diferenciándose en que *Leptodactylus mystaceus* tuvo acción sobre *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) (Figuras 4 y 7, Tablas 7 y 16) y *Leptodactylus wagneri* actuó sobre

Escherichia coli (Gram negativa) (Figuras 5 y 6, Tablas 8 y 16). Se encontró que los perfiles cromatográficos son muy similares entre sí, mostrándose entre 12 y 13 picos en los tiempos de elución de 16 a 27 minutos (Figuras 19 y 20). Este patrón también es muy similar al encontrado en algunas especies de *Hypsiboas*, sobre todo con las que tuvieron actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*. La única diferencia que se puede apreciar en los cromatogramas es que la secreción de *Leptodactylus wagneri* parece tener más cantidad de moléculas porque muestra picos más altos (Figuras 19 y 20).

No se encontraron reportes bibliográficos sobre la actividad antibacteriana o anticancerígena de *Leptodactylus mystaceus* y *L. wagneri*; sin embargo, se obtuvieron datos de inhibición del crecimiento bacteriano tanto en cepas Gram negativas como Gram positivas por parte de una familia de péptidos llamada Ocellatinas (Nascimento *et al.*, 2004; Marani *et al.*, 2015). Este grupo de moléculas han sido aisladas de especies sudamericanas tales como *Leptodactylus ocellatus* y *L. pustulatus*; estos péptidos han probado ser efectivos contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Nascimento *et al.*, 2004; Marani *et al.*, 2015).

Las especies *Dendropsophus bifurcus*, *Lithodytes lineatus*, *Osteocephalus planiceps* y *Rhinella marina* no evidenciaron tener actividad antibacteriana o anticancerígena en esta investigación (Figuras 5, 7 y 9; Tabla 16). Sin embargo, se debe continuar con la búsqueda de moléculas con potencial aplicación biomédica en *Osteocephalus planiceps* y *Rhinella marina*, ya que existen algunos

estudios como los de Park *et al.* (1996) y Costa *et al.* (2012) que confirman la presencia de péptidos antimicrobianos en especies relacionadas a éstas.

Por ejemplo, del tejido estomacal del sapo asiático *Bufo bufo gargarizans* se aislaron dos péptidos llamados Buforinas I y II que tienen actividad antibacteriana, antifúngica y anticancerígena (Park *et al.*, 1996); y además de los péptidos, se encontraron reportes bibliográficos de la actividad anticancerígena que presentan la secreciones cutáneas de *Rhinella marina*, producida por esteroides llamados Bufadienolidos que están presentes en las glándulas parótidas (Pinheiro *et al.*, 2013) y de moléculas del plasma sanguíneo de estas ranas, con capacidad antibacteriana (Brown y Shine, 2014).

También existe un estudio realizado con la secreción cutánea de *Osteocephalus taurinus*, en donde se reporta un péptido aniónico con actividad antimicrobiana sobre las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Costa *et al.*, 2012).

Para las especies *Dendropsophus bifurcus* y *Lithodytes lineatus* no se reportan estudios sobre péptidos u otras moléculas antimicrobianas y anticancerígenas.

No hay que descartar la promisoridad de aquellos anuros cuya secreción no tuvo efecto antibacteriano o anticancerígeno, ya que existen diferentes moléculas peptídicas que pueden tener otro tipo de acción biológica; por ejemplo, antifúngica, antivírica, antiparasitaria, antiinflamatoria, analgésica, anticoagulante

o trombolítica. (Gwadz *et al.*, 1989; Rinaldi, 2002; Rollins *et al.*, 2002; Téllez y Castaño, 2010; Kastin, 2013).

Actualmente, está clara la importancia de los péptidos catiónicos en la respuesta inmunitaria innata y existen varios estudios que demuestran sus funciones en muchas especies de organismos, que van desde plantas hasta animales, incluyendo al ser humano. Los péptidos catiónicos se definen como péptidos codificados por un genoma (no sintéticos), que comprenden hasta 50 aminoácidos (algunos autores hablan de 100 aminoácidos), con al menos dos cargas positivas en exceso, dadas por residuos de lisina y arginina, y cerca del 50% de los aminoácidos con características hidrofóbicas. Se han encontrado secuencias de aminoácidos con estas descripciones en proteínas como las defensinas y las catelicidinas, a las cuales se le atribuyen muchos de sus mecanismos de acción (Alfaro, 2005).

Los péptidos antimicrobianos se caracterizan porque además de ser catiónicos son anfipáticos, al tener un extremo hidrofílico o soluble en agua y otro hidrófobo, lo que les ayuda a interactuar con las membranas. Además, tienen forma helicoidal lineal, como las dermaseptinas; siendo esta característica la que da estabilidad a la molécula y gran actividad antimicrobiana (Castrillón *et al.*, 2007; Castañeda *et al.*, 2009; Téllez y Castaño, 2010; Tonarelli y Simonetta, 2013).

Todas las especies de ranas nombradas en esta investigación como promisorias, cuyas secreciones tuvieron acción antibacteriana y/o

anticancerígena, también tuvieron valores altos de hemólisis eritrocitaria, superando el 50% de mortalidad (Figuras 11 y 12; Tabla 11), y esto se reflejó en que los Índices Terapéuticos calculados se catalogaron como peligrosos o mortales (Tablas 13, 14 y 15). Es importante señalar que *Leptodactylus mystaceus* y *L. wagneri* fueron las únicas especies promisorias que produjeron porcentajes de hemólisis menores al 50% (Figura 9, Tabla 11), y su Concentración Hemolítica Media (CH₅₀) calculada por los métodos Probit y Logit resultó mayor a la dosis máxima que se probó en los ensayos *in vitro* (Tabla 12), sin embargo sus Índices Terapéuticos se catalogaron como peligrosos (Tablas 13 y 14). Es decir que ninguna secreción cutánea total, de estas once especies, puede ser usada con fines terapéuticos. Sin embargo, cabe resaltar que se deben aislar las moléculas que se visualizan en los distintos picos de elución de los cromatogramas y se deben probar por separado las actividades antibacterianas, anticancerígenas y hemolíticas, porque es posible que una o varias moléculas peptídicas que tienen efecto antimicrobiano o anticancerígeno no tengan efecto hemolítico, y que la hemólisis sea producida por otro péptido con distinta secuencia de aminoácidos.

Al contrario, si se comprueba que alguna de las moléculas aisladas tiene actividad antibacteriana, anticancerígena y también hemolítica, no debe desalentarnos porque existen péptidos con estas características citotóxicas a los que se les modifica la secuencia de aminoácidos, cambiando la parte terminal hidrófoba por una hidrófila, lo que distorsiona la estructura de hélice alfa del péptido y su anfipaticidad, pero mantiene su hidrofobicidad, de tal manera que se

minimiza su efecto hemolítico en células eucariotas y se mantiene la acción antimicrobiana en las procariotas; por ejemplo las moléculas peptídicas anfipáticas de estructura hélice alfa que tienen un residuo de Prolina en la parte no polar, ocasionan un 80% de hemólisis a 50 μM , y cuando se le substituye por un residuo de Lisina desaparece el efecto hemolítico (Hodges *et al.*, 2012).

Un ejemplo de interacción entre péptidos para provocar el efecto citotóxico deseado, se describe en el estudio de Giacometti *et al.* (2005), donde se determinó que un asilado hospitalario multirresistente de *Staphylococcus aureus* fue sensible a la acción conjunta de los péptidos temporina A y citropina 1.1.

Siempre será recomendable realizar las pruebas hemolíticas cuando se explora la actividad citotóxica de un nuevo compuesto, extracto o molécula sintetizada químicamente. Este tipo de pruebas con células sanas son complementarias a los ensayos antimicrobianos, anticancerígenos o cualquier otro que involucre un estudio de dosis-respuesta, justamente para conocer las dosis de un compuesto citotóxico que tiene mayor potencial de matar patógenos o células malignas y no provocar efectos adversos en la salud humana o animal.

Los métodos de regresión LOGIT y PROBIT, utilizados para calcular la Dosis Letal Media (DL_{50}) y La Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}), son un tipo particular de regresión lineal que se construye a partir de datos dicotómicos de dosis-respuesta, que inicialmente forman una curva sigmoidea, y donde la variable dependiente es binaria (vivo-muerto). El objetivo de estas dos pruebas es conocer la relación que existe entre una variable independiente (dosis de

secreción cutánea) y una variable dependiente (mortalidad celular) a un tiempo de exposición determinado (24 horas). Por otro lado, LOGIT y PROBIT son utilizados para calcular la Dosis Letal Media (DL_{50}) o Dosis Efectiva Media (DE_{50}) en estudios de toxicidad y pueden utilizarse para estimar los efectos de una o más variables independientes (diferentes dosis) sobre una variable dependiente dicotómica (como vivo o muerto). Estos métodos se usan ampliamente para el análisis de dosis-respuesta y también puede estimar modelos de regresión logística (Hodgson, 2004; SPSS, 2009, Jørgensen, 2010).

Las pruebas PROBIT y LOGIT, se basan en el cálculo de los datos Probit y Logit empíricos (eje Y) y se los confrontaron con los datos Log10 de las dosis (eje x). Se realiza un gráfico con estos valores y se traza una línea horizontal desde el dato Probit o Logit 0.5 que corresponde el 50% de la respuesta, hasta que intersecte la curva formada e inmediatamente se traza una línea hacia el eje x, donde coincide con un valor que se llama m , el cual se transforma con antilogaritmo y se obtiene el valor de la Dosis Letal Media (DL_{50}) y de la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) en $\mu\text{g/ml}$.

Las pruebas LOGIT y PROBIT son comparables cualitativamente, por lo que el resultado obtenido con cualquiera de los dos métodos es útil matemáticamente hablando (Gujarati, 2003). La principal diferencia entre estos dos métodos es que Logit usa una función de distribución logística de los datos y Probit se basa en una distribución normal tipificada de los datos; lo que se traduce en la rapidez con que las curvas de distribución se aproximan a los valores

extremos, de manera que la función logística es más achatada que la normal al alcanzar, esta última, más rápidamente los valores extremos (0 y 1). También se puede decir que la forma del gráfico de distribución realizado con LOGIT tendrá colas ligeramente más planas, mientras que con PROBIT la curva normal se acerca a los ejes más rápidamente (Long, 1997; Gujarati, 2003).

En las pruebas de toxicidad aguda de corto plazo, la tasa de mortalidad del control de crecimiento teóricamente debe ser cero, sin embargo se acepta que existe entre un 5 y 10% de mortalidad debido a factores propios de la manipulación de la experimentación y no de la respuesta a un efecto citotóxico, por lo que se pueden obtener valores de Dosis Letal Media (DL_{50}) y Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) erróneos. Ante esto, se debe calcular un factor de corrección utilizando la siguiente fórmula, sugerida en González (2005):

$$PMC = (PME - PMM / 100 - PMM)$$

Dónde:

PMC = Porcentaje de mortalidad corregida

PME = Porcentaje de mortalidad del ensayo

PMM = Porcentaje de mortalidad por manipulación (entre 5 y 10%)

La corrección de la tasa de mortalidad no se aplicó en este estudio porque cada ensayo tuvo sus propios controles de inhibición y crecimiento, los mismos que estuvieron sujetos a esta variable al momento de la lectura en el lector de Elis.

Por otro lado, se sabe que los péptidos antimicrobianos son codificados genéticamente, que forman parte de los componentes de la respuesta inmune innata y son evolutivamente conservados en bacterias, plantas y animales (Téllez y Castaño, 2010; Tonarelli y Simonetta, 2013). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo permiten hablar sobre los servicios ecosistémicos que proveen cualquiera de los ecosistemas de la Amazonia, donde se distribuyen estas especies promisorias de anuros.

El beneficio económico que se puede obtener por la venta de un fármaco elaborado con péptidos de anuros puede ser rentable si tomamos en cuenta que el Valor de Uso Directo calculado en este trabajo para un tratamiento de quimioterapia en niños ecuatorianos que sufren leucemia linfoblástica aguda alcanza \$1'104.562 USD cada año. En el caso de esta valoración económica, se puede ver que los costos de los medicamentos son elevados y que los ingresos monetarios que potencialmente se pueden percibir por la venta de un nuevo fármaco, derivado de los péptidos de anuros, son muy atractivos. Por otro lado, también se puede pensar que un Estado ahorraría significativamente el presupuesto designado para el subsidio de los tratamientos anticancerígenos. Sin embargo, pensando no solamente en percibir dinero, el valor de ofrecer a los pacientes con cáncer una opción que les permita tener esperanza de curación o que les minimice los efectos secundarios, causados por los medicamentos tradicionales, es mucho mayor y difícilmente cuantificable.

El potencial uso que puede darse a las moléculas peptídicas provenientes de la piel de los anuros es diverso y puede abarcar diferentes líneas de investigación como la biomédica, veterinaria, estética, nutricional, etc.; por lo tanto, no hay que olvidar que el descubrimiento de una molécula de utilidad recorre un camino largo, pasando diferentes niveles de investigación y desarrollo: desde las pruebas *in vitro*, la experimentación *in vivo* en bioterios y luego a la fase de pruebas pre-clínicas y clínicas, hasta que se logra conseguir la aprobación sanitaria para su comercialización. Entonces, se debe tomar en cuenta que las ganancias derivadas de la venta de una molécula no siempre son muy altas, ya que una patente dura 20 años; toma entre dos y diez años el descubrimiento de la molécula, cinco años quedan protegidos los datos de la investigación desde la aprobación sanitaria, que es el tiempo en el que se puede comercializar la molécula con exclusividad, y después de este tiempo, los datos de prueba se vuelven públicos y pueden ingresar al mercado los medicamentos genéricos (Developement Bussines Group, 2010).

La estimación económica de los bienes y servicios ambientales que ofrece la naturaleza es una estrategia válida que se utiliza para reconocer la importancia que tiene la biodiversidad para el ser humano, y sirve para promocionar la conservación de las especies y sus ecosistemas. El método que se emplea para estimar el beneficio económico que genera la biodiversidad, implica calcular diferentes aspectos relacionados con el uso y conservación de un ecosistema (León *et al.*, 2012; WWF, 2014). La fórmula que comúnmente se utiliza es la siguiente:

$$VET = VUD + VI + VO + VL + VE$$

Donde:

VET = valor económico total (suma de todos los valores)

VUD = valor de uso directo (beneficio de uso real)

VI = valor de uso indirecto (beneficio derivado de las funciones del ecosistema)

VO = valor de opción (costo por proteger un bien para usarlo en el futuro)

VL = valor de legado (beneficio que se entrega por un conocimiento ancestral)

VE = valor de existencia (valor intrínseco de la naturaleza)

En cuanto a la metodología usada para el cálculo del VUD, la dosis consignada para cada medicamento en el protocolo respectivo se multiplicó por $0.8 \text{ m}^2\text{SC}$ (SC= superficie corporal) para obtener una dosis corregida. Este dato se obtuvo utilizando el peso corporal ideal de un niño de 20 kg en el percentil 50, al que le corresponde una talla de 115 cm (tomando como referencia las curvas de crecimiento de peso y talla de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (Jasso *et al.*, 2012).

Finalmente, este estudio ha permitido incrementar el Banco de Secreciones Cutáneas que reposa en el Laboratorio de Investigaciones de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) de la PUCE, no solamente con los extractos liofilizados de las especies evaluadas en esta investigación sino que también se hicieron extracciones de otras especies colectadas durante la ejecución de este trabajo, pero no escogidas para el mismo. Es importante mantener y aumentar

este banco de secreciones para que el LICBA continúe con este tipo de investigaciones y para que aquellas secreciones promisorias puedan en algún momento ser sometidas a espectrometría de masas para obtener las secuencias de aminoácidos de los péptidos directamente involucrados en la actividad antimicrobiana y anticancerígena.

9. CONCLUSIONES

1. Con los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que las secreciones peptídicas cutáneas, de los anuros amazónicos, podrían formar parte de los servicios ecosistémicos de tipo provisión.
2. La secreción peptídica de la mayoría de anuros evaluados (once especies de un total de 15), tienen actividad antimicrobiana y/o anticancerígena, y por lo tanto son promisorias.
3. Se concluye que las especies promisorias, cuya secreción peptídica tiene potencial aplicación biomédica son *Agalychnis hulli*, *Hypsiboas boans*, *H. calcaratus*, *H. cinerascens*, *H. geographicus*, *H. lanciformis*, *Leptodactylus mystaceus*, *L. wagneri*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii*.
4. También se concluye que cada una de las especies promisorias aportan diferentes servicios ecosistémicos de tipo provisión, porque los cromatogramas de sus secreciones indican la existencia de diferentes moléculas peptídicas, entre sí.
5. Las especies de anuros de la subfamilia Phyllomedusinae: *Agalychnis hulli*, *Phyllomedusa tarsius*, *P. tomopterna* y *P. vaillantii*, proveen más servicios ecosistémicos que las otras especies, porque poseen mayor variedad de moléculas peptídicas y porque sus secreciones tienen acción tanto

antimicrobiana sobre las dos cepas bacterianas, como anticancerígena sobre las células de leucemia linfoblástica aguda.

6. Los servicios ecosistémicos que proveen las especies de Hylinae: *Hypsiboas boans* e *H. geographicus* son las moléculas peptídicas que tienen actividad antimicrobiana sobre la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*.
7. Los servicios ecosistémicos que provee la especie de Hylinae: *Hypsiboas cinerascens* son las moléculas peptídicas que tienen actividad anticancerígena sobre las células de leucemia linfoblástica aguda.
8. Los servicios ecosistémicos que provee la especie de Hylinae: *Hypsiboas calcaratus* son las moléculas peptídicas que tienen actividad antimicrobiana sobre la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, y también las moléculas peptídicas que tienen actividad anticancerígena sobre las células de leucemia linfoblástica aguda.
9. Los servicios ecosistémicos que proveen las especies de Leptodactylidae son las moléculas peptídicas de *Leptodactylus mystaceus* que tienen actividad antimicrobiana sobre la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, y las moléculas peptídicas de *Leptodactylus wagneri* que tienen actividad antimicrobiana sobre la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*.

10. Bajo las condiciones experimentales de esta investigación, la secreción cutánea de los anuros *Dendropsophus bifurcus*, *Lithodytes lineatus*, *Osteocephalus planiceps* y *Rhinella marina* no tuvieron actividad anticancerígena y/o antibacteriana.
11. La secreción peptídica cutánea “cruda” de todas las especies promisorias no se pueden usar como un agente quimioterapéutico para tratar infecciones bacterianas o neoplasias porque tienen Índices Terapéuticos catalogados como peligrosos o mortales para la salud humana; sin embargo, no se descarta su promisoridad porque aún se desconoce la acción de las moléculas peptídicas por separado.
12. La producción de uno o más fármacos antimicrobianos o anticancerígenos, derivados de las moléculas peptídicas contenidas en la secreción cutánea de los anuros, puede generar importantes ingresos económicos, a la vez que podrían solucionar los problemas de resistencia que enfrentan actualmente los antibióticos en el tratamiento de bacterias multirresistentes y por otro lado disminuir los efectos colaterales producidos por los tratamientos de quimioterapia convencionales.
13. Finalmente, se concluye que los resultados obtenidos en esta investigación son suficientemente importantes para visibilizar a los anuros y posicionarlos como proveedores de servicios ecosistémicos con potencial aplicación en el campo de la salud humana.

10. RECOMENDACIONES

Debido a la existencia de anuros promisorios, cuyas secreciones cutáneas contienen moléculas peptídicas con actividad antibacteriana y anticancerígena, es necesario emprender acciones de protección y conservación de los ecosistemas amazónicos, para que la diversidad de este grupo vertebrado no disminuya y consecuentemente no desaparezcan las moléculas que en un futuro nos pueden servir.

Se debe continuar con la identificación de secreciones peptídicas antimicrobianas y anticancerígenas de anuros amazónicos y de otras regiones naturales del Ecuador para incrementar el conocimiento de los servicios ecosistémicos de tipo provisión que este grupo vertebrado ofrece; y de este modo, se podrá fomentar la protección de más ecosistemas.

Un aspecto importante que se debe realizar para consolidar los esfuerzos de conservación de los ecosistemas amazónicos, es el de difundir mediáticamente el valor de mercado de los servicios ambientales que proporcionan los bosques y la vida silvestre, para que la gente recuerde todo lo que se puede perder a través de la deforestación y la degradación de los ecosistemas. Es común que las empresas y los gobiernos piensen que los servicios ecosistémicos son de acceso libre y sin límites; por lo que se deben crear mercados formales para que exista

un intercambio económico tradicional con los productos derivados de la biodiversidad que aún son intangibles

El siguiente paso que se debe dar en esta investigación es la comprobación de la actividad antibacteriana y anticancerígena de las fracciones peptídicas de aquellas especies que presentaron bioactividad con la secreción cutánea “total”, ensayando con cada fracción por separado y usando dos o más fracciones juntas, con la finalidad de determinar si existen una o varias moléculas involucradas en la actividad antimicrobiana y/o anticancerígena; inclusive, se podrá saber si existe sinergia o antagonismo entre las diferentes moléculas peptídicas.

Las fracciones, con las que corresponde trabajar en el futuro, deben ser conseguidas en el HPLC bajo las mismas condiciones en que se elaboraron los cromatogramas: es decir, utilizando la misma fase fija (columna semipreparativa C18 para péptidos) y las mismas fases móviles (ácidos acetonitrilo y trifloracético). La diferencia sería que se aumenta un paso más, y corresponde a la recolección de las fracciones eluídas en tubos de vidrio. El equipo recoge en cada tubo hasta dos mililitros por fracción; por lo tanto, para asegurarnos de que se obtendrán suficientes moléculas peptídicas por cada fracción, antes de la liofilización, se deberían hacer varios corrimientos para reunir al menos 10 ml de cada tiempo de elución.

En lo que se refiere a la experimentación *in vitro*, se deben seguir realizando más pruebas para estandarizar los protocolos empleados y aumentar la confiabilidad de los resultados.

Uno de los inconvenientes que se presentó durante la ejecución de esta investigación fue la obtención de células neoplásicas para realizar las pruebas anticancerígenas. Esta situación se podría solventar si se promueve la creación de un laboratorio de cultivo de líneas celulares, cuya tarea específica sea la de proveer diferentes tipos de células para diferentes tipos de investigación.

En el caso de las extracciones y liofilizaciones de secreción cutánea, se tuvo dificultades en conseguir suficiente muestra de las especies de tamaño pequeño para realizar los ensayos; inclusive, en algunas ocasiones la secreción liofilizada de los individuos de gran tamaño, aparentemente se degradaba y no funcionaba como se esperaba. Por esta razón, hay que buscar un mecanismo de purificación de secreciones que no las degrade y nos permita conservarla por largos períodos de tiempo.

Finalmente, se espera que este manuscrito sirva como una guía de referencia para futuras investigaciones de péptidos de anfibios o de otros organismos.

11. LITERATURA CITADA

- Alfaro, C. 2005. Importancia de los péptidos catiónicos en la respuesta immune innata. *Revista Médica del Hospital del Niño Dr. Carlos Sáenz Herrera* 40 (2): 53-58.
- American Type Culture Collection (ATCC). 2013(a). MTT Cell Proliferation Assay. <<http://www.atcc.org/Products/All/30-1010K.aspx#1951A0C0D8F242D5809BB72C0AAB19A5>>, acceso: 24 de julio, 2013.
- American Type Culture Collection (ATCC). 2014. Product Sheet RS4;11 (ATCC® CRL1873™) <<http://www.atcc.org/Products/All/CRL-1873.aspx#documentation>>, acceso: 10 de noviembre, 2014.
- Amiche, M., Ladram, A., Nicolas, P. 2008. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. *Peptides* 29: 2074-2082.
- Arias, T. 1999. *Glosario de Medicamentos: Desarrollo, Evaluación y Uso*. Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C. U.S.A. 333 pp.
- Azevedo, L., Almeida, A., Ciancaglini, P., Guerino, R. 2011. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino Acids* 40:29-49.
- Bakkali, M. 2013. Could DNA uptake be a side effect of bacterial adhesion and twitching motility? *Archives of Microbiology* 195:279-289.

- Bass, M., Finer, M., Jenkins, C., Kreft, H., Cisneros-Heredi, D. 2010. Global Conservation Significance of Ecuador's Yasuní National Park. PLoS ONE 5(1): e8767. doi:10.1371/journal.pone.0008767.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherrins, G., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology 45: 493-496.
- Bishop, J, Bertrand, N., Evison, W., Gilbert, S., Grigg, A., Hwang, L., Kallesoe, M., Vakrou, A., Van der Lugt, C., Vorhies, F. 2010. TEEB: Informe sobre la economía de los ecosistemas y la biodiversidad para las empresas. Resumen ejecutivo. Progress Press. Malta.
- Brown, G., Shine, R. 2014. Immune response varies with rate of dispersal in invasive cane toads (*Rhinella marina*). PLoS ONE 9(6): e99734. doi:10.1371/journal.pone.0099734.
- Caicedo, A. 2007. Análisis de las secreciones peptídicas de anfibios ecuatorianos con pruebas de susceptibilidad en bacterias patógenas. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Castañeda, J., Ortega, J., Venegas, A., Aquino, A., Serafín, J., Estrada, S., Estrada, I. 2009. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas 18(1): 16-29.
- Castrillón, L., Palma, A., Padilla, C. 2007. Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. Dermatología Revista Mexicana 51:57-67.
- Centro Jambatu. 2011–2015. Anfibios de Ecuador. Base de datos electrónica disponible en <http://www.anfibioswebecuador.ec/anfibiosecuador.aspx>. Fundación Otonga. Quito, Ecuador. Acceso: 11 de noviembre de 2015.

- Chan, D., Prenner, E., Vogel, E. 2006. Tryptophan and arginine rich antimicrobial peptides. Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 1184-1202.
- Chu H-L., Yip B-S., Chen K-H., Yu H-Y., Chih Y-H., Cheng H-T. 2015. Novel Antimicrobial Peptides with High Anticancer Activity and Selectivity. *PLoS ONE* 10(5): e0126390. doi:10.1371/journal.pone.0126390
- Chuang, P. 2012. Evaluación de la actividad anticancerígena del extracto peptídico crudo de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae) en leucemias. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Collins, J., Storfer, A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions*. 9: 89-98.
- Costa, T., Almeida, R., Melo, J., Koolen, H., da Silva, F., Leite, J., Prates, M., Bloch, C., Pinto, A. 2012. Isolation and amino acid sequencing by MALDI-TOF-MS/MS of a novel antimicrobial anionic peptide from the skin secretion of *Osteocephalus taurinus* (Anura, Hylidae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23 (12): 2133-2136.
- Cruz, A., Rodríguez, N., Rodríguez, C. 2010. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica* 13 (2): 117-124.

- Daly, J., Kaneko, T., Wilham, J., Garrafo, M., Spande, T., Espinosa, A., Donnelly, M. 2002. Bioactive Alkaloids of Frog Skin: Combinatorial bioprospecting reveals that Pumiliotoxins have an arthropod source. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(22): 13996-14001.
- Darst, C., Menéndez, P., Coloma, L., Cannatella, D. 2005. Evolution of dietary specialization and chemical defense in poison frogs (Dendrobatidae): A comparative analysis. *The American Naturalist* 165(1): 56-69.
- Dennison, S. Whittaker, M., Harris, F., Phoenix, D. 2006. Anticancer α -helical peptides and structure / function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. *Current Protein and Peptide Science* 7(6): 487-499.
- Development Bussines Group. 2010. Curso de visita médica profesional: Riesgo en el desarrollo de un nuevo medicamento. Development Bussines Group S. A.
- Doyle, J., Brinkworth, C., Wegener, K., Carver, J., Llewellyn, L., Olver, I., Bowie, J., Wabnitz, P., Tyler, M. 2003. nNOS inhibition, antimicrobial and anticancer activity of the amphibian skin peptide, citropin 1.1 and synthetic modifications. *European Journal of Biochemistry* 270: 1141-1153.
- Duellman, W., Trueb, L. 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, USA. 670 pp.
- Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J., González Baron, M. 2003. Classification of anticancer drugs - a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treatment Reviews* 29: 515-523.
- Farias, U., Maldonado, P. 2010. Bienes y servicios ecosistémicos en la Reserva de Biosfera Yasuní (RBY). En: UNESCO. Reservas de la Biósfera - Su

contribución a la provisión de servicios de los ecosistemas. Experiencias exitosas en Iberoamérica. Editorial Valente Ltda. Chile.

Foden, W., Butchart, S., Stuart, S., Vié, J-C., Akçakaya, H., Angulo, A., DeVantier, L., Gutsche, A., Turak, E., Cao, L., Donner, S., Katariya, V., Bernard, R., Holland, R., Hughes, A., O`Hanlon, S., Gamett, S., Şekercioğlu, C., Mace, G. 2013. Identifying the world's most climate change vulnerable species: A systematic trait-based assessment of all birds, amphibians and corals. PLoS ONE 8(6): e65427. doi:10.1371/journal.pone.0065427.

GAD Parroquia García Moreno. 2015. Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Parroquia García Moreno 2014-2019.

Gascon, C., Collins, J., Moore, R., Church, D., McKay, J., Mendelson, J. 2007. Amphibian Conservation Action Plan. III (eds.). IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 64pp.

Gavilán, L. Grau, J., Oberhuber, T. 2011. Valoración económica de la biodiversidad - Oportunidades y riesgos. Ecologistas en Acción. Madrid. España. 28 pp.

Giacometti, A., Cirioni, O., Kamysz, W., Silvestri, C., Licci, A., Riva, A., Lukasiak, J., Scalise, G. 2005. In vitro activity of amphibian peptides alone and in combination with antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens isolated from surgical wound infection. Peptides 26: 2111-2116.

Grant, J., Land, B. 2002. Transcutaneous amphibian stimulator (TAS): A device for the collection of amphibian skin secretions. Herpetological Review 33(1): 38-41.

- González, J. 2005. *Ecología Aplicada: Diseño y Análisis Estadístico*. Fundación Universidad de Bogotá, Bogotá, Colombia. 331 pp.
- Grenard, S. 2008. *Frogs and Toads, Your Happy Healthy Pet*. 2nd Edition. Wiley Publishing, Inc. United States of America. 128 pp.
- Groot, H., Muñoz, C., Moscoso, J., Riveros, G., Salazar, V., Kaston, F., Mitrani, E. 2012. Skin micro-organs from several frog species secrete a repertoire of powerful antimicrobials in culture. *The Journal of Antibiotics* 65: 461-467.
- Guerrero, M., Franco, R., Guízar, G., Cervantes, G. 2005. Estandarización de la técnica para la obtención de células mesenquimatosas de médula ósea de rata para su aplicación en el manejo de lesiones medulares. *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación* 17: 84-90.
- Gujarati, D. 2003. *Basic Econometrics*. McGraw Hill. New York, U.S.A. 1002 pp.
- Gwadz, R., Kaslow, D., Lee, Y., Maloy, W., Zasloff, M., Miller, L. 1989. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Infection and Immunity* 57(9): 2628-2633.
- Hancock, R., Chapple, D. 1999. Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(6): 1317-1323.
- Hancock, R., Scott, M. 2000. The role of Antimicrobial Peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Science* 97(16): 8856-8861.
- Hodges, R., Jiang, Z., Whitehurst, J., Mant, C. 2011. Development of Antimicrobial Peptides as Therapeutic Agents. En: *Development of Therapeutic Agents Handbook*. Editado por Shayne Cox Gad. John Wiley & Sons Inc. Hoboken, New Jersey. 680 pp.

- Hodgson, E. 2004. *A Textbook of Modern Toxicology*. Third Edition. John Wiley & Sons. Inc. New Jersey, U.S.A. 557 pp.
- Hoskin, D., Ramamoorthy, A. 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778: 357-375.
- Hui, L., Leung, K., Chen, H. 2002. The combined effects of antibacterial peptide cecropine A and anti-cancer agents on leukemia cells. *Anticancer Research* 22: 2811-2816.
- Jasso, L., Dorantes, E., Rodríguez, E., Pasillas, E., Muñoz, O. 2012. Estudio de caso: estimación de los costos de la quimioterapia aplicando el protocolo completo en niños con leucemia linfoblástica aguda o con linfoma de Hodgkin. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* vol.69 no.1 México.
- Jørgensen, S. 2010. *Ecotoxicology*. Elsevier B. V. Amsterdam, The Netherlands. Printed in Italy. 389 pp.
- Kandus, P., Quintana, R., Minotti, P., Oddi, J., Baigún, C., Trilla, G., Ceballos, D. 2010. Ecosistemas de humedal y una perspectiva hidrogeomórfica como marco para la valoración ecológica de sus bienes y servicios. En: Laterra, P., Jobbagy, E., Paruelo, J. *Valoración de servicios ecosistémicos: Conceptos, herramientas y aplicaciones para el ordenamiento territorial*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.
- Kastin, A. 2013. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Academic Press Elsevier. San Diego, U.S.A. 1640 pp.
- Kerr, D., Middleton, M. 2006. Cancer: Identifying and overcoming resistance to treatment. *Current Opinion in Pharmacology* 6(4): 321-322.

- Killen, T., Solórzano, L. 2008. Conservation strategies to mitigate impacts from climate change in Amazonia. *Philosophical Transactions: Biological Sciences (Climate Change and the Fate of the Amazon)*. Vol. 363, N° 1498, pp. 1881-1888.
- Kuo, M. 2009. Redox Regulation of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal* 11(1): 99-133.
- León, E., González, M., Gallo, M. 2012. Estudio sobre los valores ambientales, económicos y sociales de la biodiversidad, los ecosistemas y los servicios que estos proveen en el área natural La Montañona. Fundación PRISMA, Programa Salvadoreño de Investigación sobre Desarrollo y Medio Ambiente. El Salvador. 62 pp.
- Lomonte, B. 2009. Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica. Universidad de Costa Rica.
- Long, S. 1997. Regression Models for Categorical and Limited Dependent Variables. Sage Publications Inc. California, U.S.A. 282 pp.
- Lonza. 2011. Product documents: Lymphocyte Separation <http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_Lymphocyte_Separation_Medium.pdf>, acceso: 10 de noviembre, 2014.
- Lu, Y., Ma, Y., Wang, X., Liang, J., Zhang, Ch., Zhang, K., Lin, G., Lai, R. 2008. The First Antimicrobial Peptide from sea amphibian. *Molecular Immunology* 45: 678-681.

- Mangoni, M., Fiocco, D., Mignogna, D., Simmaco, M. 2003. Peptides 24: 1771-1777.
- Marani, M., Dourado, F., Quelemes, P., de Araujo, A., Perfeito, M., Barbosa, E., Vêras, L., Coelho, A., Andrade, E., Eaton, P., Longo, J., Azevedo, R., Delerue, C., Leite, J. 2015. Characterization and biological activities of Ocellatin peptides from the skin secretion of the frog *Leptodactylus pustulatus*. *Journal of Natural Products* 78(7): 1495-1504.
- Martínez, M., Badell, J., González, N. 1996. Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de *Aloe vera* (Sábila). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1(3): 18-20.
- Mebis, D., Jansen, M., Kohler, G., Pogoda, W., Kauert, G. 2010. Myrmecophagy and alkaloid sequestration in amphibians: a Study on *Ameerega picta* (Dendrobatidae) and *Elaschitocleis* sp. (Microhylidae) frogs. *Salamandra* 46(1):11-15.
- Millennium Ecosystem Assessment. 2005a. Living Beyond Our Means Natural Assets And Human Well-Being. Comunicado de la Junta del Comité de Evaluación de los Ecosistemas del Milenio. World Resources Institute. Island Press. Washington D.C.
- Millennium Ecosystem Assessment. 2005b. Ecosystems and Human Well-being: Opportunities and Challenges for Business and Industry. World Resources Institute. Island Press. Washington D.C.
- Millennium Ecosystem Assessment. 2005c. Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. World Resources Institute. Island Press. Washington D.C.

- Millennium Ecosystem Assessment. 2005d. Overview of the Millennium Ecosystem Assessment <<http://www.unep.org/maweb/es/About.aspx#>>, acceso 09 de julio, 2013.
- Millennium Ecosystem Assessment. 2005e. Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends, Vol 1. Island Press. Washington D.C.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2013 Propuesta Metodológica para análisis de Vulnerabilidad al Cambio Climático de la Cuenca del Pastaza. Subsecretaría de Cambio Climático. Dirección Nacional de Adaptación al Cambio Climático. Proyecto GACC (Gestión de Adaptación al Cambio Climático para Disminuir la Vulnerabilidad Social Económica y Ambiental del Ecuador). Quito, Ecuador.
- Ministerio del Medio Ambiente de Suecia. 2013. Haciendo Visibles los Valores de los Servicios Ecosistémicos: Propuesta para mejorar el bienestar mediante la biodiversidad y servicios ecosistémicos. Resumen de SOU 2013:68. Estocolmo. Suecia.
- Nascimento, A., Fontes, W., Sebben, A., Castro, M. 2004. Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). Protein Journal 23(8): 501-508.
- Park, Ch., Kim, M., Kim, S. 1996. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. Biochemical and Biophysical Research Communications 218: 408-413.

- Pierre, T., Seon, A., Amiche, M., Nicolas, P. 2000. Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors. *European Journal of Biochemistry* 267(2): 370–378.
- Pinheiro, P., Barbosa, D., Wender, B., Marques, B., de Conceicao, K., da Costa, J., de Jesus, D., Sinhoin, A., Pessoa, C., Vierira, G. 2013. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. *Toxicon* 72: 43-51.
- Portela, R., Rademacher, I. 2001. A dynamic model of patterns of deforestation and their effect on the ability of the Brazilian Amazonia to provide ecosystem services. *Ecological Modelling* 143: 115-146.
- Proaño, C. 2004. Ocurrencia de compuestos antimicrobianos en la piel de 21 especies de anfibios (Anura: Hylidae, Dendrobatidae, Ranidae) y purificación parcial de 5 péptidos antimicrobiales de *Agalychnis litodryas* (Hylidae). Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Programa de Cooperación Hispano Peruano - Proyecto Araucaria XXI Nauta, Ministerio del Ambiente - Enlace Regional Loreto, Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo - Oficina Técnica de Cooperación. 2009. AMAZONÍA: GUÍA ILUSTRADA DE FLORA Y FAUNA. Serigráfica Industrial S.A. LIMA, PERÚ. 459 pp.
- Pyron, A., Wiens, J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2,800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61(2): 543 583.

- Ramírez, M. 2012. Detección de fracciones peptídicas extraídas de secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae). Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Rinaldi, A. 2002. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. *Current Opinion on Chemical Biology* 6(6): 799-804.
- Rincón, S., Panesso, D., Díaz, L., Carvajal, L., Reyes, J., Munita, J., Arias, C. 2014. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. *Biomédica* 34(1): 191-208.
- Rivas, J. 2015. Análisis preliminar de los servicios ecosistémicos de la cuenca media del río Pastaza, Ecuador. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Robyt, J., White, B. 1987. *Biochemical Techniques: Theory and Practice*. Waveland Press, Illinois, USA. 407 pp.
- Rollins, L., Reinert, L., Miera, V., Conlon, M. 2002. Antimicrobial peptide defenses of the Tarahumara frog, *Rana tarahumarae*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297: 361-367.
- Ron, S. R., Guayasamín, J. M., Yáñez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. A. y Nicolalde, D. A. Versión 2016.0 Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- <<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios> >, acceso 05 de abril de 2016.
- Rozek, T., Bowie, J., Wallace, J., Tyler, M. 2000a. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. Part 2. Sequence determination using electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications. Mass Spectrometry* 14: 2002-2011.

- Rozek, T., Wegener, K., Bowie, J., Olver, I., Carver, J., Wallace, J, Tyler, M. 2000b. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. The solution structure of aurein 1.2. *European Journal of Biochemistry* 267: 5330-5341.
- Saporito, R., Garrafo, H., Donnelly, M., Edwards, A., Longino, J., Daly, J. 2004. Formicinae Ants: An Arthropod Source for the Pumiliotoxina Alkaloids of Dendrobatid Poison Frogs. *The National Academy of Sciences* 101(21): 8045-8050.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D. 1998. Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin: What do they tell us? En: *Peptide Science*. Volume 47, Issue 6, pp. 435-450.
- Smith, I., Hutcheon, A., Heys, S. 2000. Current and potential chemotherapeutic agents used for induction chemotherapy in the treatment of breast cancer. *Current Pharmaceutical Design* 6(3): 327-343.
- SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.
- Stuart, S., Chanson, J., Cox, N., Young, B., Rodrigues, A., Fischman, D., Waller, R. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*. www.sciencexpress.org. Page1/10.1126/science.1103538.
- Tafur, J., Torres, J., Villegas, M. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología* 12(3): 217-226.
- Tejada, G., Ovando, A., Larrea, D. 2013. Funciones y servicios ecosistémicos en la Amazonía y sus motores de cambio. *Amazalert*. Factsheet. 6.

- Téllez, G., Castaño, J. 2010. Péptidos antimicrobianos. *Infectio* 14(1): 55-67.
- Thermo Fisher Scientific. 2002. Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit: Experimental Protocol.
<https://www.thermofisher.com/ec/en/home/references/protocols/cell-culture/mtt-assay-protocol/vybrant-mtt-cell-proliferation-assay-kit.html>, acceso 10 de noviembre, 2014.
- Tonarelli, G., Simonetta, A. 2013. Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos. *Revista FABICIB* 17: 137-177.
- UICN. 2015.
<http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/our_work/amphibians/>, acceso 24 de junio, 2013.
- Valencia, A., Cortés, A., Ruiz, C. 2012. Servicios ecosistémicos brindados por los anfibios y reptiles del Neotrópico: una visión general. Reflexiones sobre el capital natural de Colombia No. 2 Ed. Conservación Internacional Colombia ISBN: 978-958-57691-0-6. v. 0. 26 pp.
- van Zoggel, H., Carpentier, G., Santos, C., Hamma, Y., Courty, J., Amiche, M., Delbé, J. 2012. Antitumor and Angiostatic Activities of the Antimicrobial Peptide Dermaseptin B2. *PloS ONE* 7(9): e4 4351 doi:10.1371/journal.pone.0044351.
- Vanhoye, D., Bruston, F., Nicolas, P., Amiche, M. 2003. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *European Journal of Biochemistry* 270: 2068-2081.

- Vargas, A. 2012. Pruebas antimicrobianas de secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae) en cinco especies de levaduras patógenas del género *Candida*. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Vitt, L., Caldwell, J. 2014. Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Academic Press. San Diego. 757 pp.
- Wang, R., Zhou, Y., Chen, T., Zhou, M., Wang, L., Shaw, C. 2015. Identification and Functional Analysis of a Novel Tryptophyllin Peptide from the Skin of the Red-eye Leaf Frog, *Agalychnis callidryas*. International Journal of Biological Sciences 11(2): 209-219.
- Wegener, K., Wabnitz, P., Carver, J., Bowie, J., Chia, B., Wallace, J., Michael, J. 1999. Host defence peptides from the skin glands of the Australian Blue Mountains tree-frog *Litoria citropa* – Solution structure of the antibacterial peptide citropina 1.1. European Journal of Biochemistry 265: 627-637.
- Wiegand, I., Hilper, K., Hancock, R. 2008. Agar and broth dilutions methods to determine the minimal inhibitor concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature protocols 3(2): 163-175.
- WWF. 2009. !Amazonia Viva! Una década de descubrimientos: 1999-2009. <http://awsassets.panda.org/downloads/amazonalive_web2_1.pdf>, acceso 06 de abril, 2016.
- WWF. 2014. Guía práctica para la valoración de los servicios ecosistémicos en Madre de Dios. Lima, Perú. 61 pp.
- www.celeromics.com. 2014. Technical note – Neubauer chamber cell counting. Conteo Celular con Hematocitómetro: Uso Elemental del Hematocitómetro. En:

<http://celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>,
consulta: 17 de marzo de 2014.

Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:
389-395.

FIGURAS

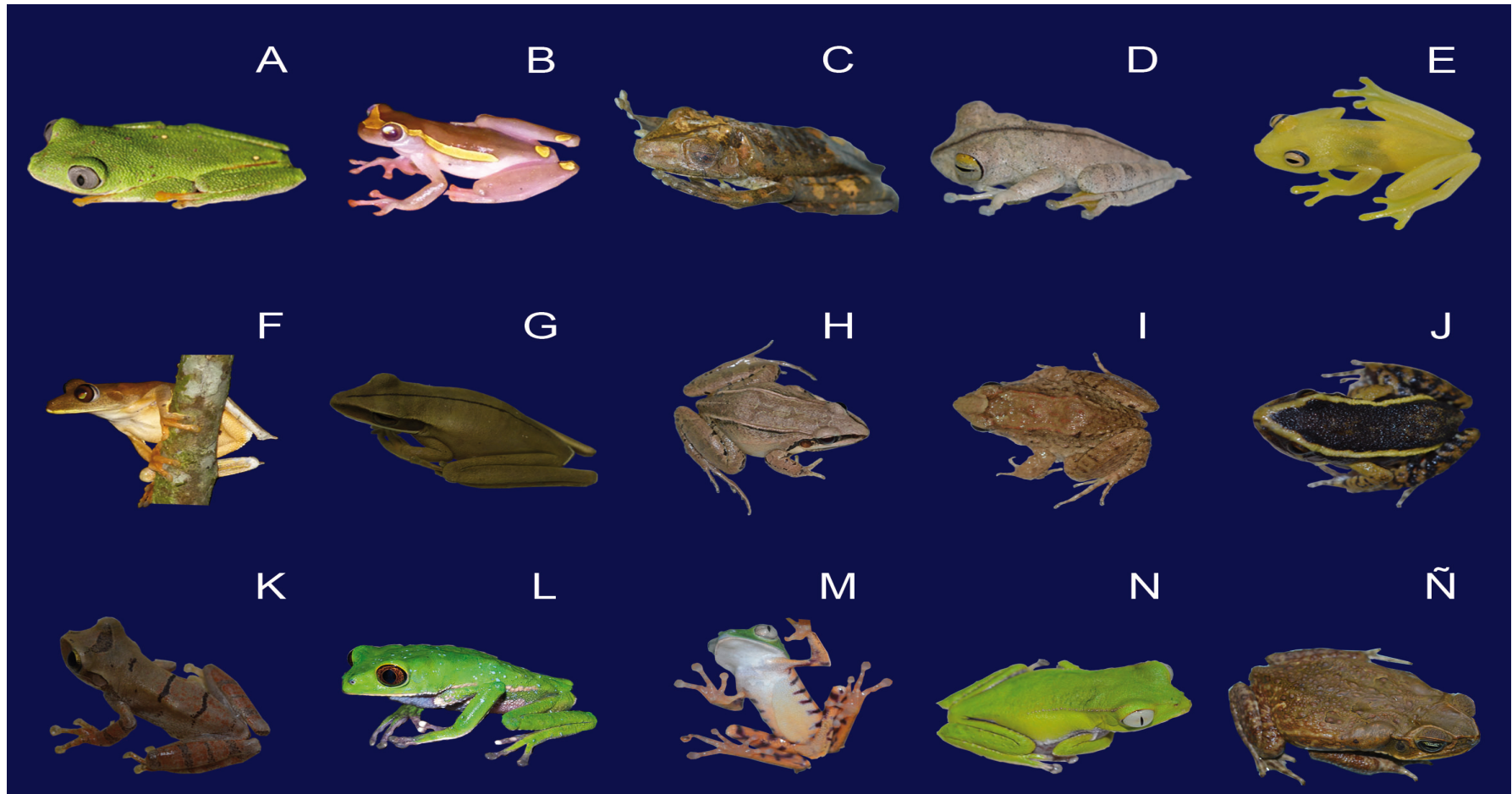


Figura 1. Especies de anuros amazónicos a las que se les extrajo la secreción cutánea para realizar las pruebas antibacterianas, anticancerígenas y hemolíticas. **A**, *Agalychnis hulli*; **B**, *Dendropsophus bifurcus*; **C**, *Hypsiboas boans*; **D**, *Hypsiboas calcaratus*; **E**, *Hypsiboas geographicus*; **F**, *Hypsiboas lanciformis*; **G**, *Hypsiboas cinerascens*; **H**, *Lithodytes lineatus*; **I**, *Leptodactylus mystaceus*; **J**, *Leptodactylus wagneri*; **K**, *Osteocephalus planiceps*; **L**, *Phyllomedusa tarsius*; **M**, *Phyllomedusa tomopterna*; **N**, *Phyllomedusa vaillantii*; **Ñ**, *Rhinella marina*.

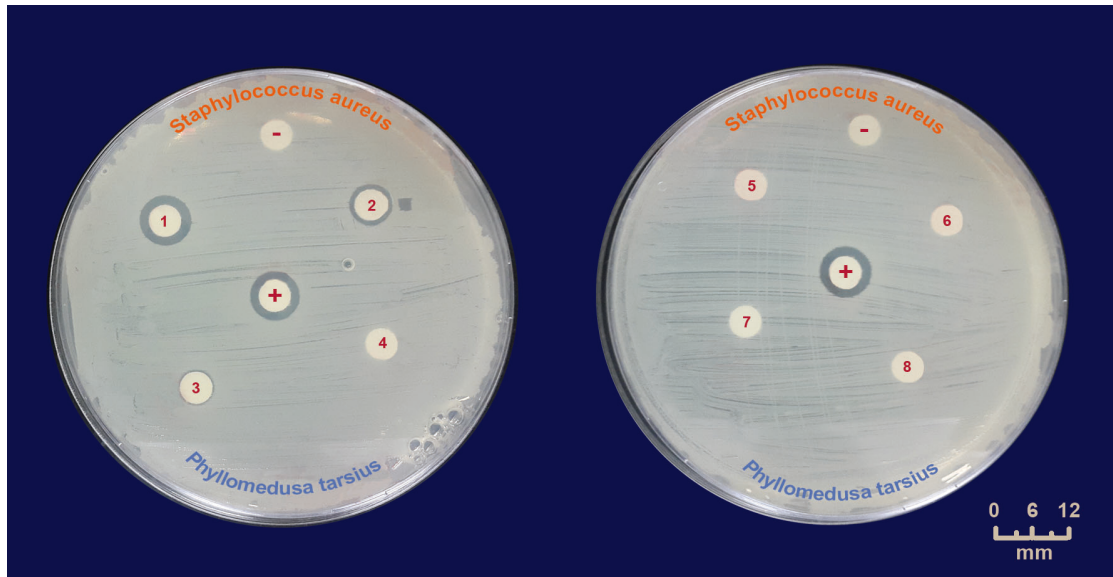


Figura 2. Resultado de la prueba antibacteriana realizada por el método de difusión en disco con *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y la secreción cutánea de *Phyllomedusa tarsius*. Dosis de secreción cutánea: 1) 4000 $\mu\text{g/ml}$; 2) 2000 $\mu\text{g/ml}$; 3) 1000 $\mu\text{g/ml}$; 4) 500 $\mu\text{g/ml}$; 5) 250 $\mu\text{g/ml}$; 6) 125 $\mu\text{g/ml}$; 7) 62,5 $\mu\text{g/ml}$; 8) 31,25 $\mu\text{g/ml}$. Control positivo (+) 4000 $\mu\text{g/ml}$ de secreción de *Agalychnis spurrelli*; control negativo (-) disolvente de secreción: albúmina de suero bovino 0,2% con ácido acético glacial 0,01%.

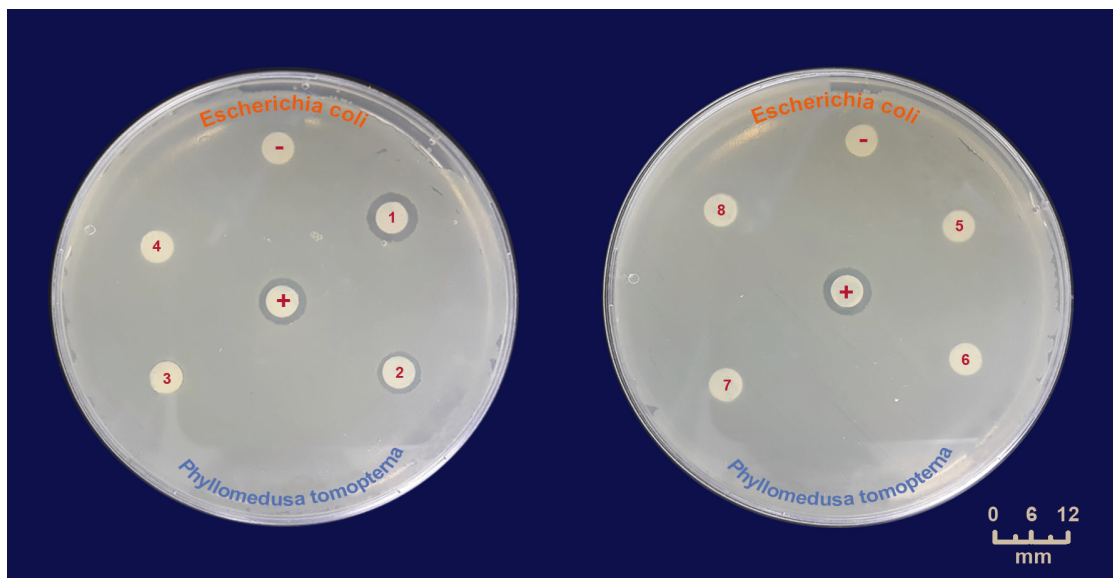


Figura 3. Resultado de la prueba antibacteriana realizada por el método de difusión en disco en *Escherichia coli* ATCC 25922 con la secreción cutánea de *Phyllomedusa tomopterna*. Dosis de secreción cutánea: 1) 4000 $\mu\text{g/ml}$; 2) 2000 $\mu\text{g/ml}$; 3) 1000 $\mu\text{g/ml}$; 4) 500 $\mu\text{g/ml}$; 5) 250 $\mu\text{g/ml}$; 6) 125 $\mu\text{g/ml}$; 7) 62,5 $\mu\text{g/ml}$; 8) 31,25 $\mu\text{g/ml}$. Control positivo (+) 4000 $\mu\text{g/ml}$ de secreción de *Agalychnis spurrelli*; control negativo (-) disolvente de secreción: albúmina de suero bovino 0,2% con ácido acético glacial 0,01%.

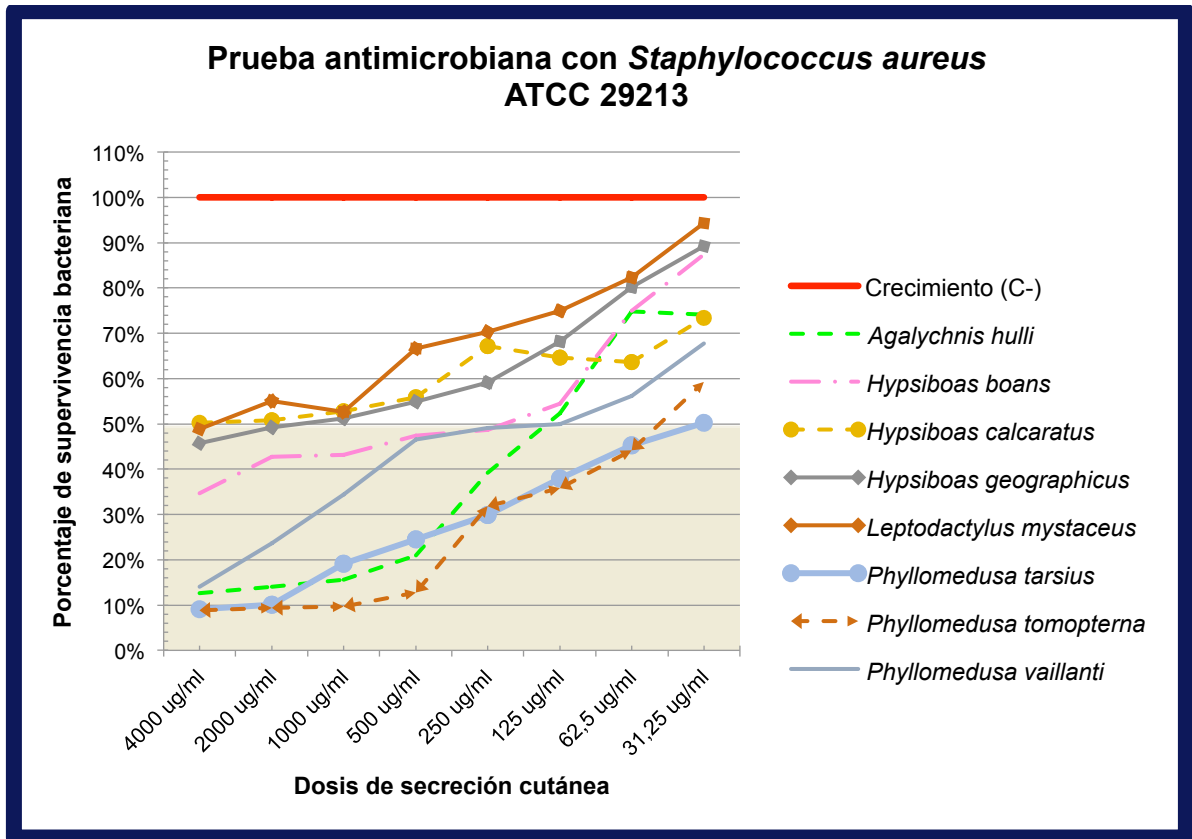


Figura 4. Porcentaje de supervivencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) frente a distintas dosis de secreción cutánea, de anuros amazónicos, que inhibieron al menos el 50% de bacterias.

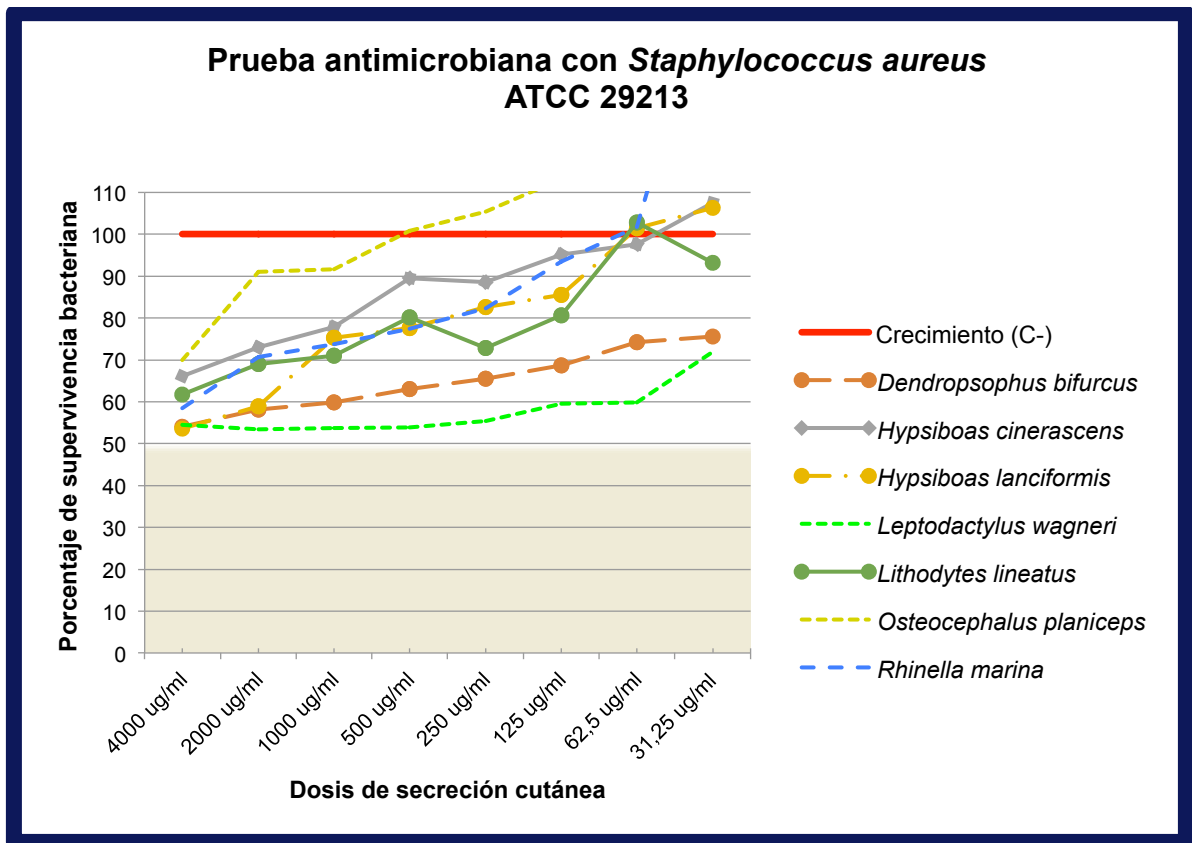


Figura 5. Porcentaje de supervivencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) frente a distintas dosis de secreción cutánea, de anuros amazónicos, con las que más de la mitad de las bacterias sobrevivieron.

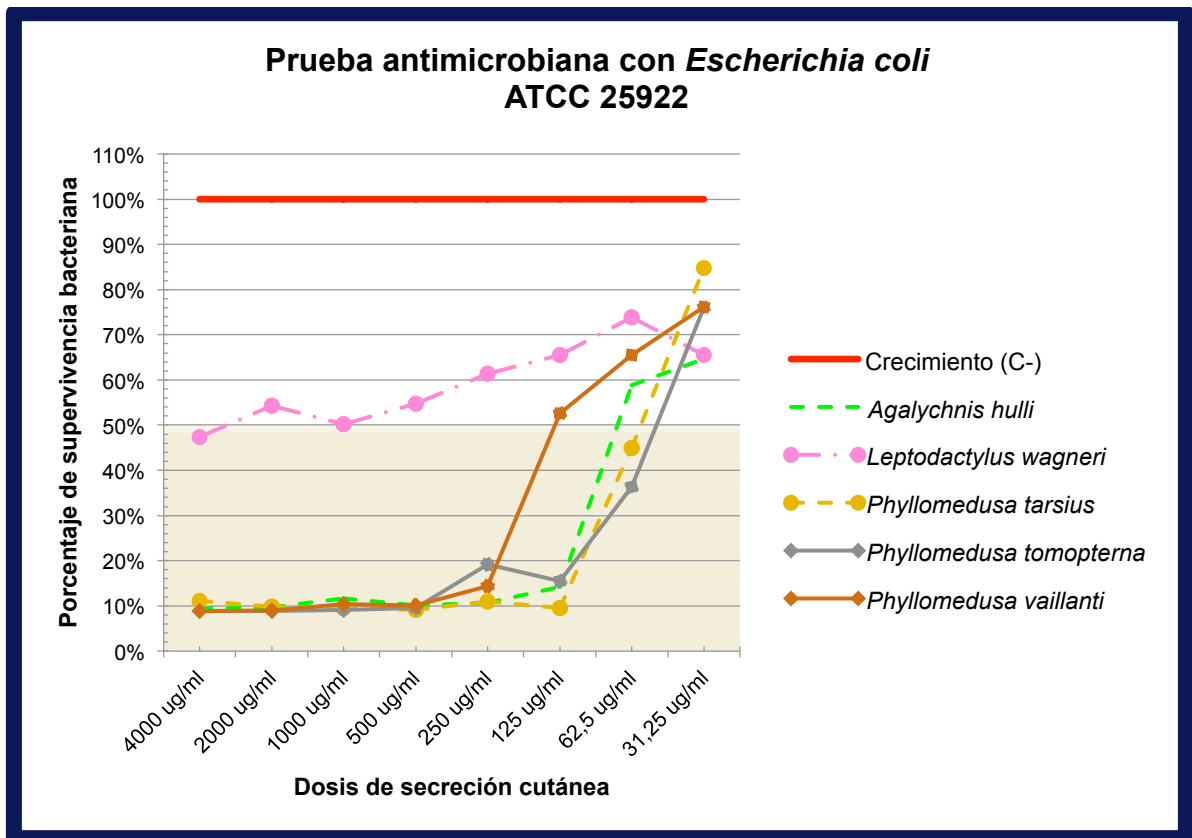


Figura 6. Porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* (ATCC 25922) frente a distintas dosis de secreción cutánea, de anuros amazónicos, que inhibieron al menos el 50% de bacterias.

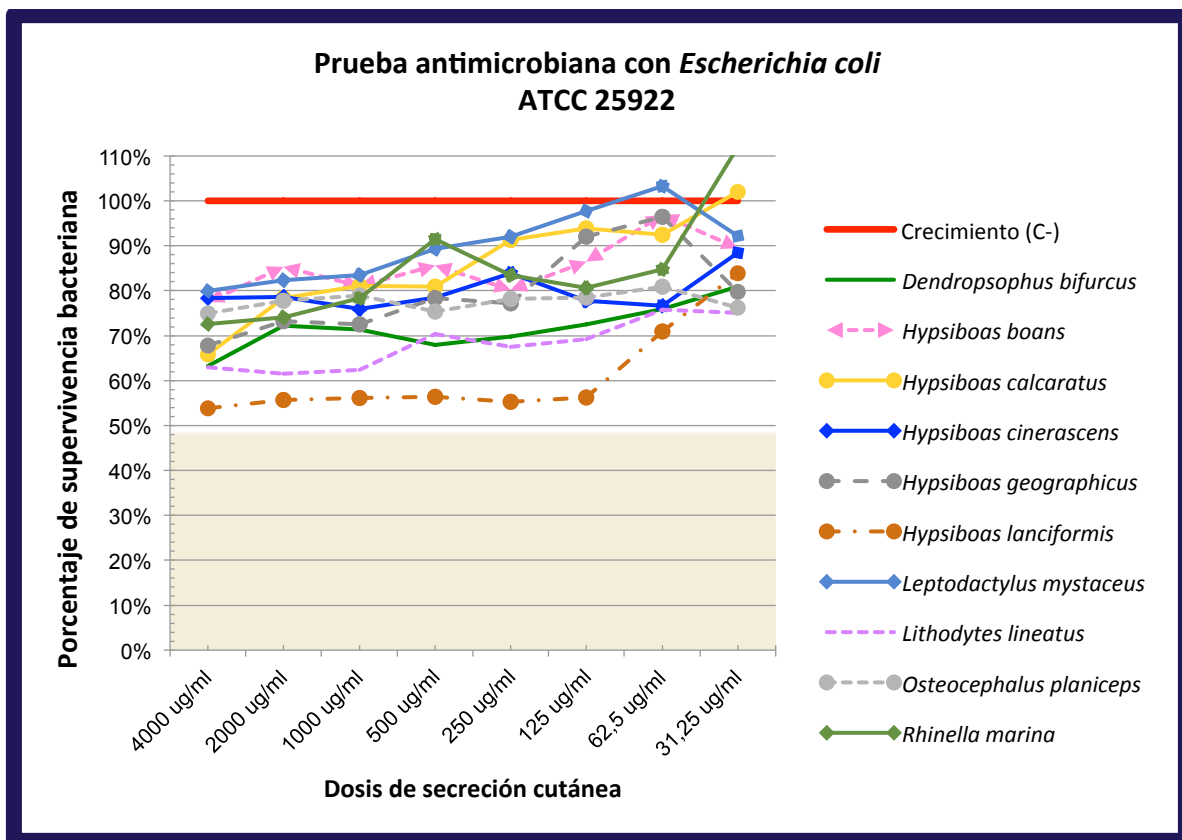


Figura 7. Porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* (ATCC 25922) frente a distintas dosis de secreción cutánea, de anuros amazónicos, con las que más de la mitad de las bacterias sobrevivieron.

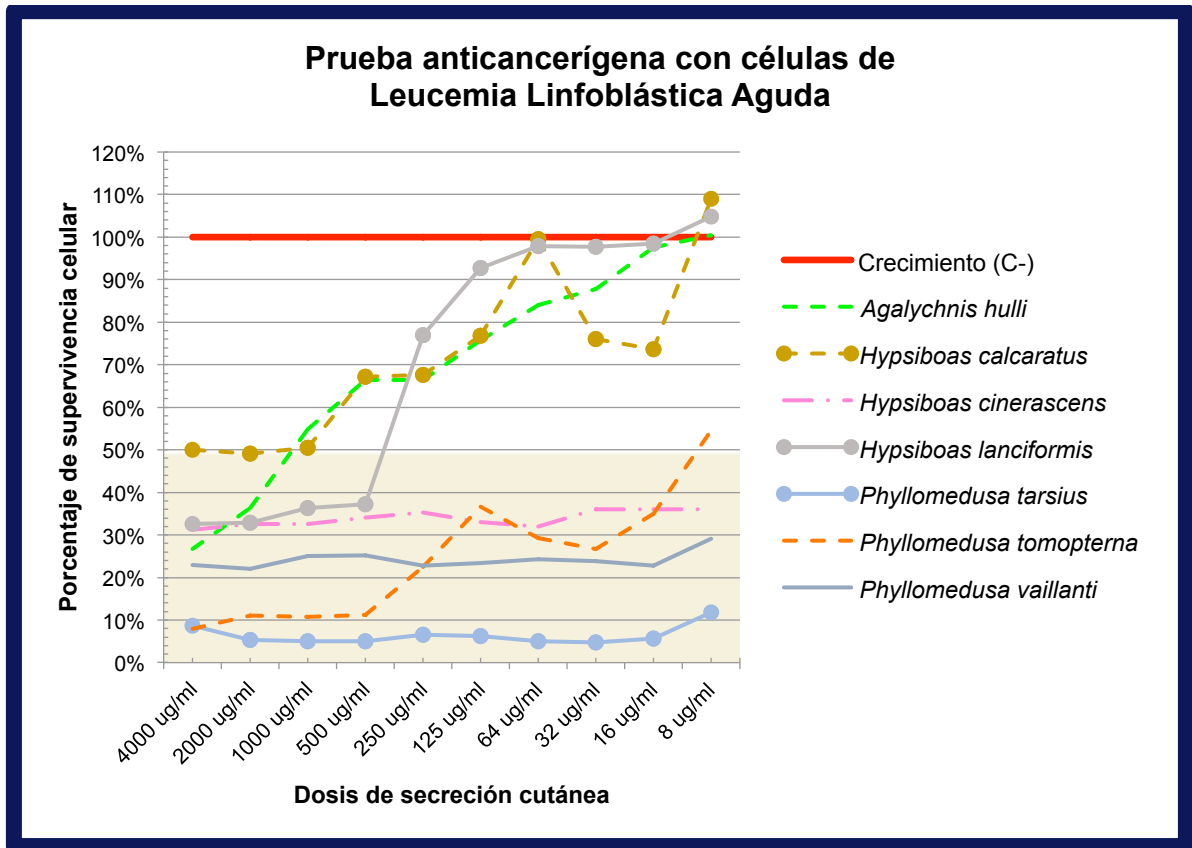


Figura 8. Porcentaje de supervivencia de células de leucemia linfoblástica aguda frente a distintas dosis de secreción cutánea de las especies de anuros amazónicos que SÍ tuvieron actividad anticancerígena.

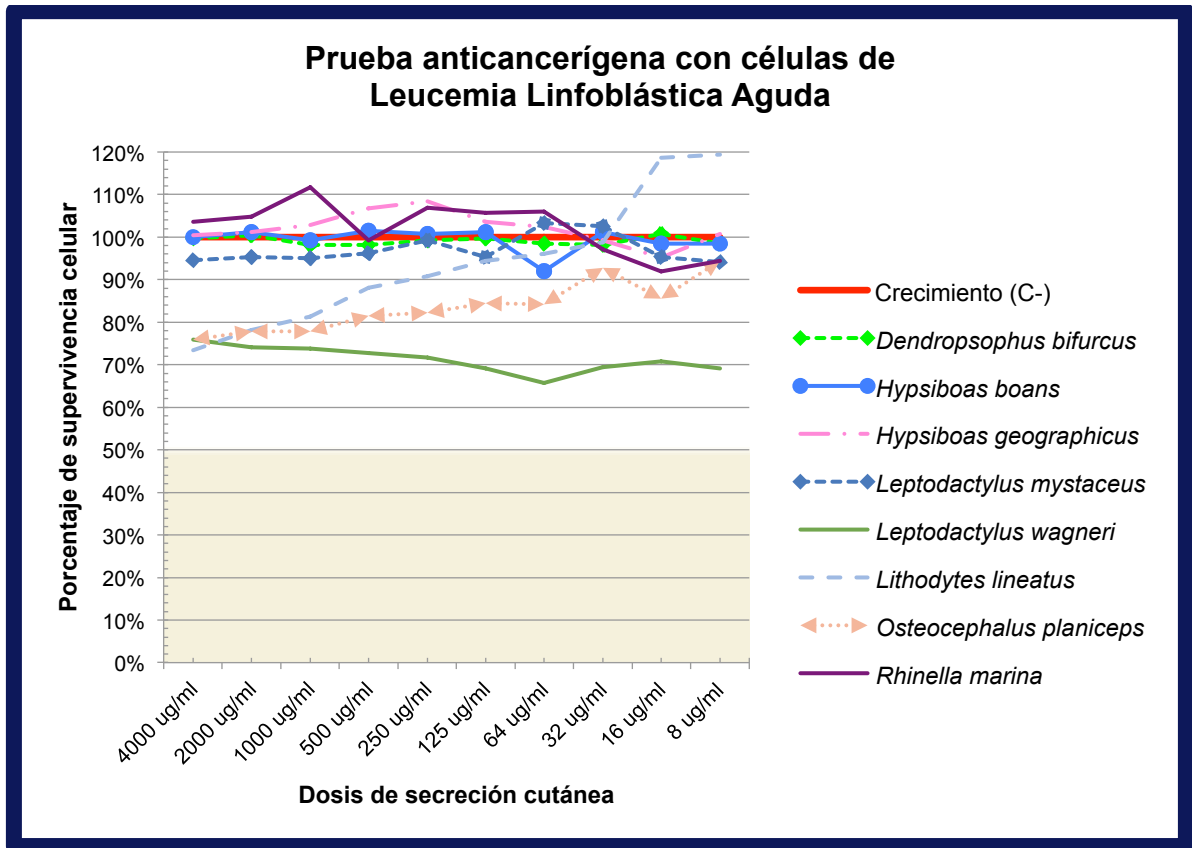


Figura 9. Porcentaje de supervivencia de células de leucemia linfoblástica aguda frente a distintas dosis de secreción cutánea de las especies de anuros amazónicos que **NO** tuvieron actividad anticancerígena.

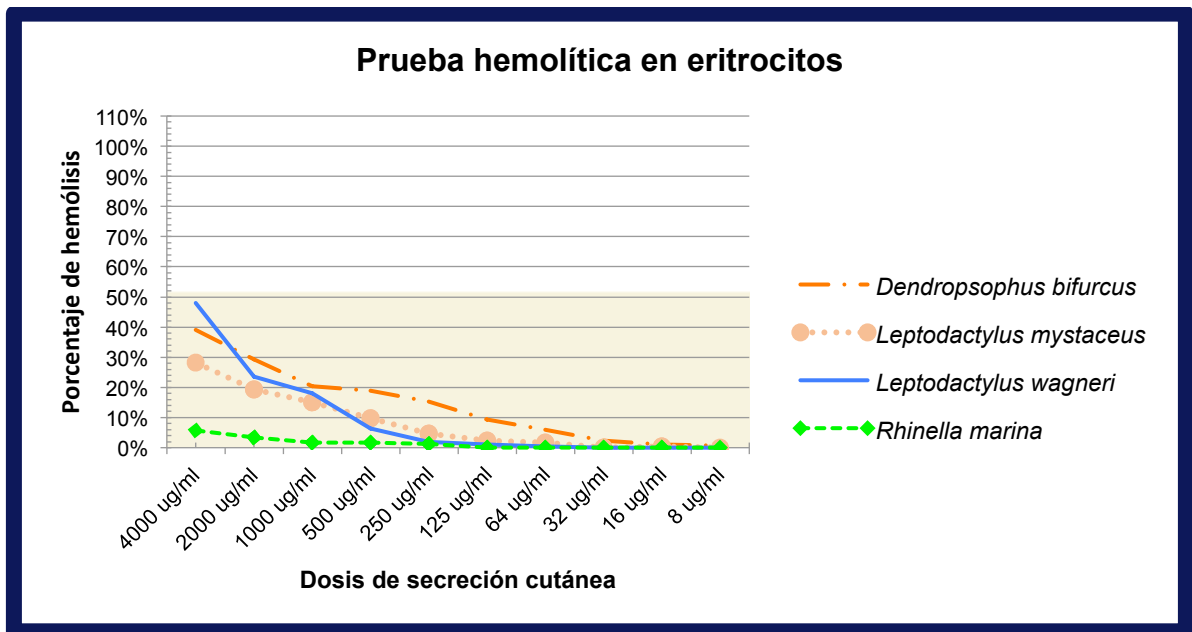


Figura 10. Porcentaje de hemólisis de eritrocitos frente a distintas dosis de secreción cutánea de las especies de anuros amazónicos que producen baja actividad hemolítica.

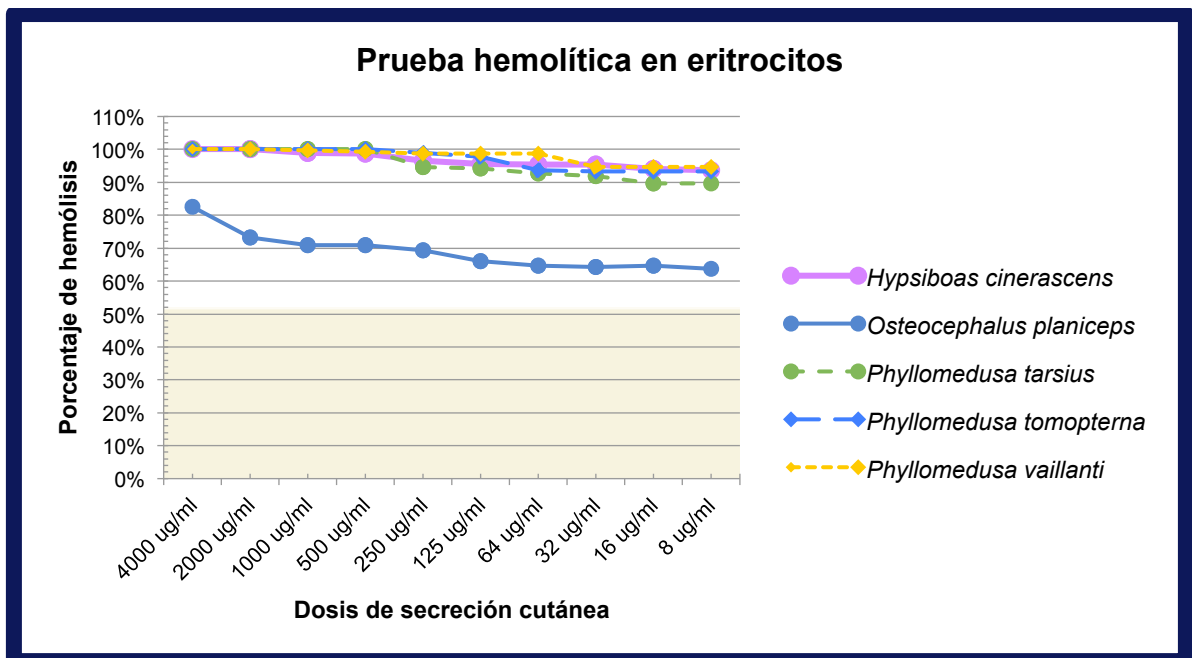


Figura 11. Porcentaje de hemólisis de eritrocitos frente a distintas dosis de secreción cutánea de las especies de anuros amazónicos que producen alta actividad hemolítica.

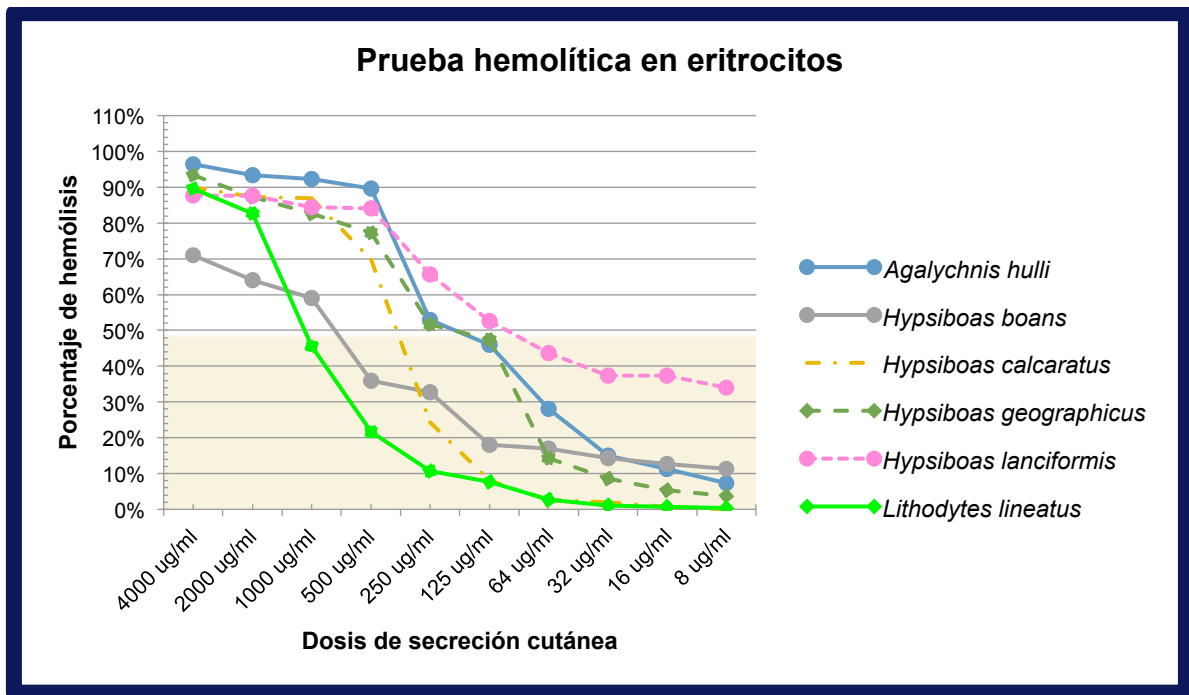


Figura 12. Porcentaje de hemólisis de eritrocitos frente a distintas dosis de secreción cutánea de las especies de anuros amazónicos que producen baja y alta actividad hemolítica.

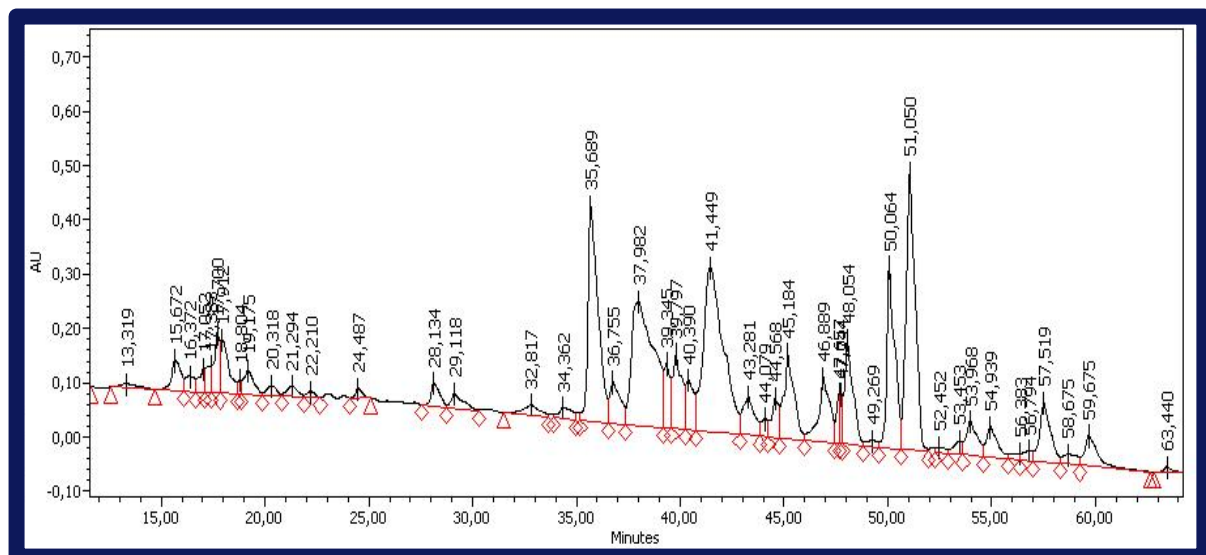


Figura 13. Perfil cromatográfico de *Agalychnis hulli*. AU) unidades de absorbancia; Minutes) tiempo de elución.

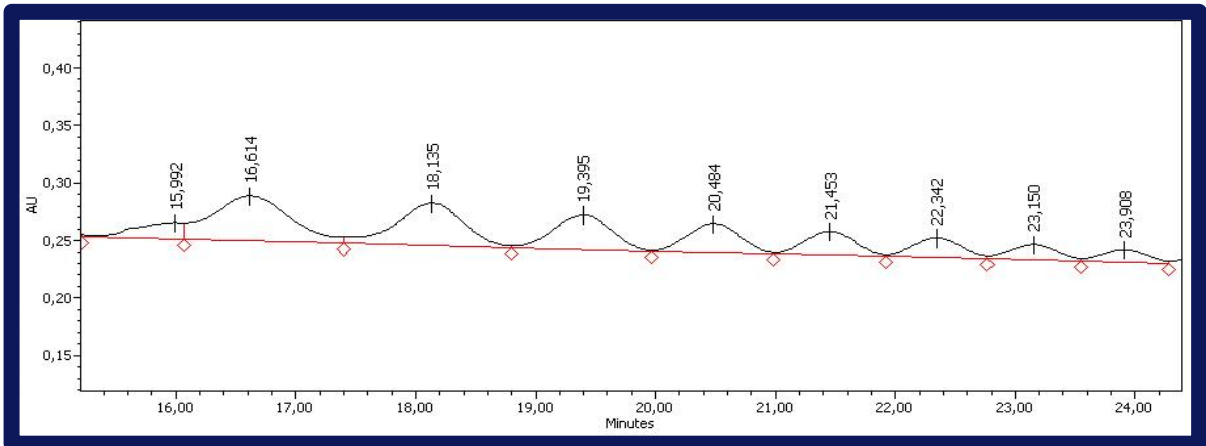


Figura 14. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas boans*. AU) unidades de absorbancia; Minutes) tiempo de elución.

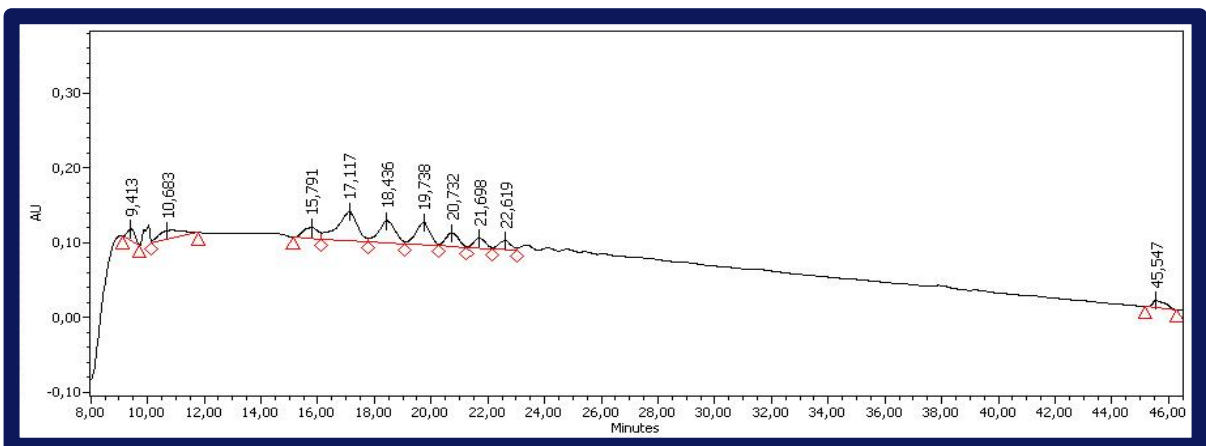


Figura 15. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas calcaratus*. AU) unidades de absorbancia; Minutes) tiempo de elución.

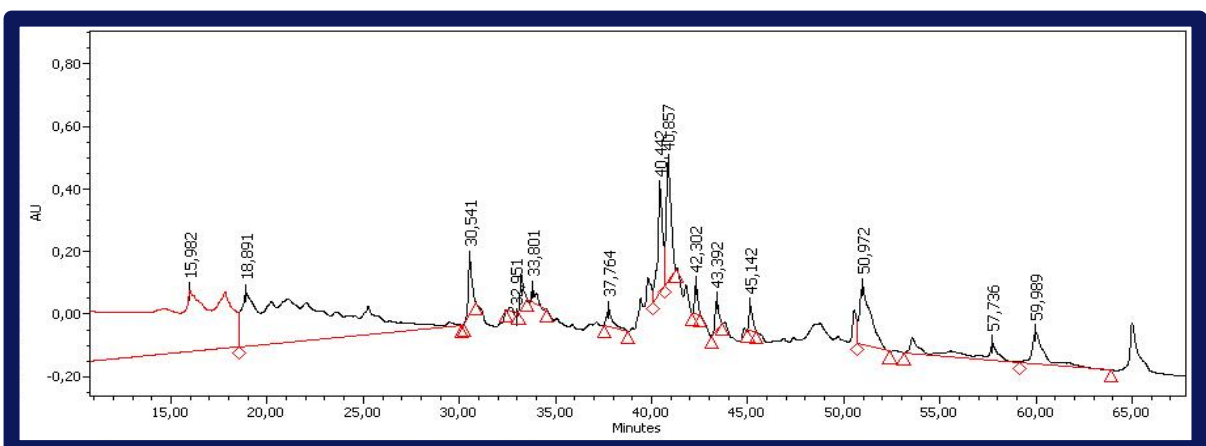


Figura 16. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas cinerascens*. AU) unidades de absorbancia; Minutes) tiempo de elución.

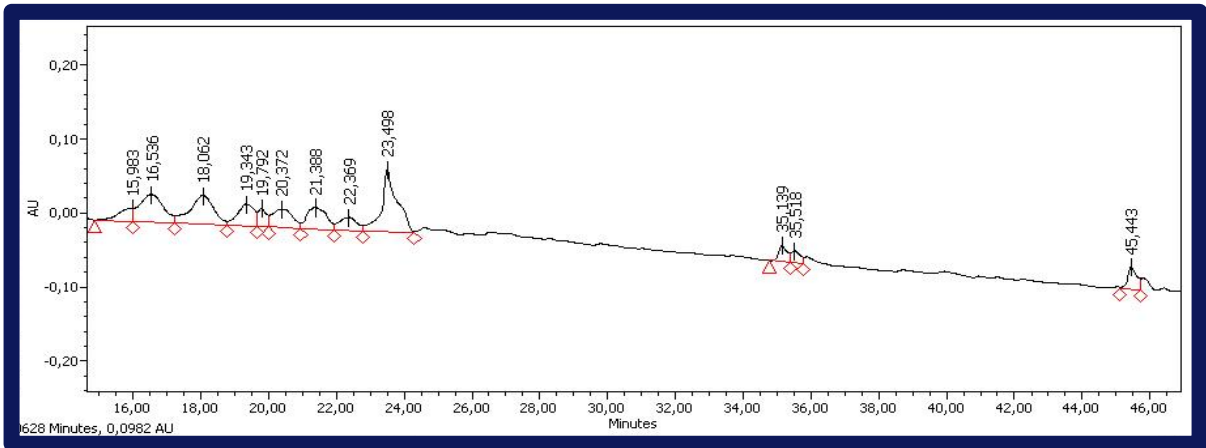


Figura 17. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas geographicus*. AU) unidades de absorbancia; Minutes) tiempo de elución.

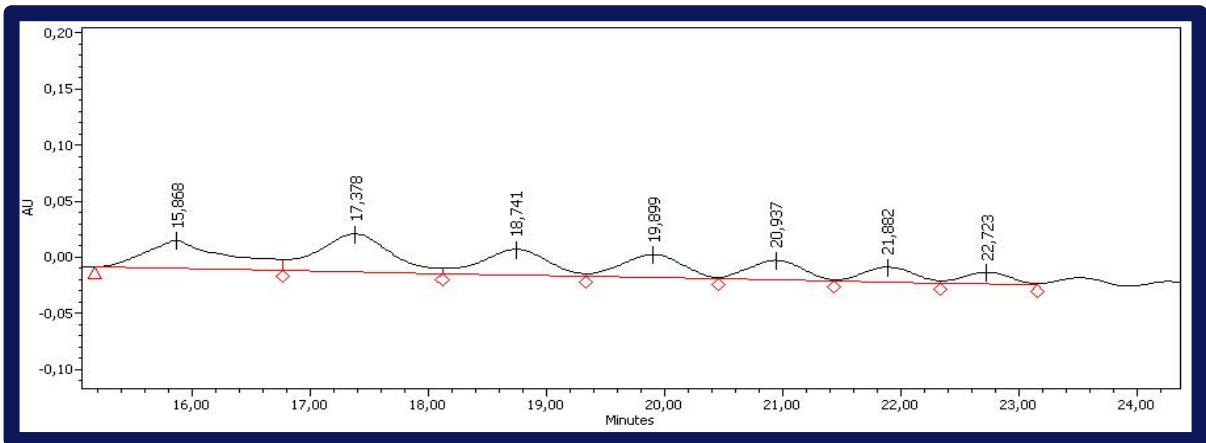


Figura 18. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas lanciformis*. AU) unidades de absorbancia; Minutes) tiempo de elución.

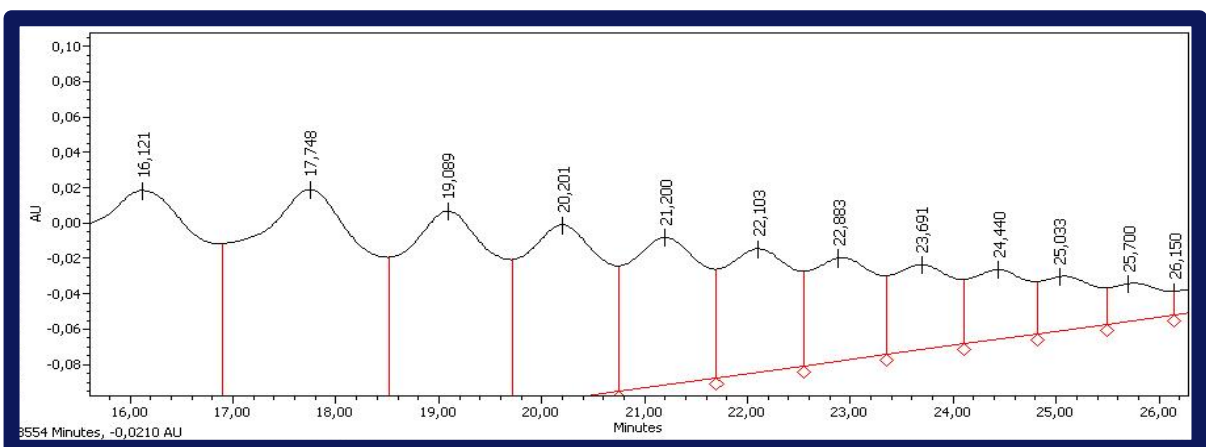


Figura 19. Perfil cromatográfico de *Leptodactylus mystaceus*. AU) unidades de absorbancia; Minutes) tiempo de elución.

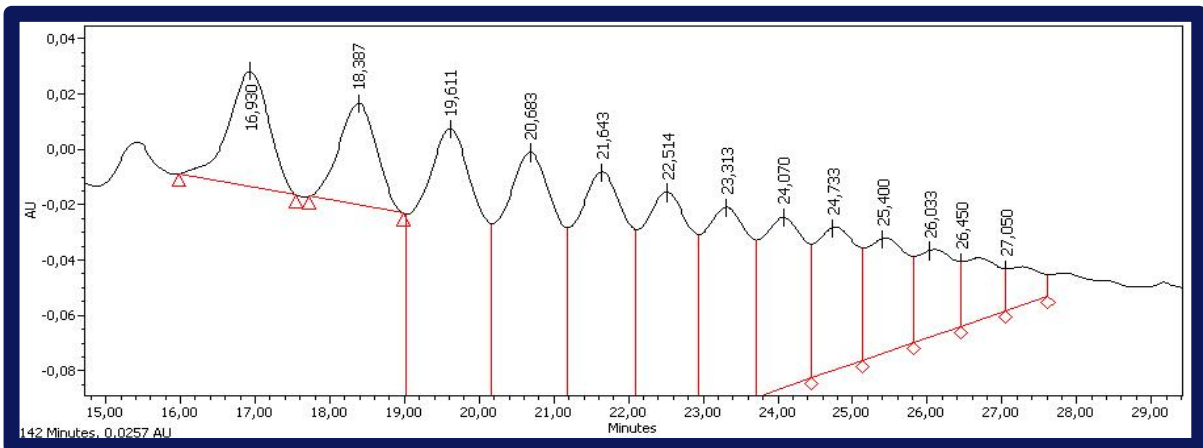


Figura 20. Perfil cromatográfico de *Leptodactylus wagneri*. AU) unidades de absorbancia; Minutes) tiempo de elución.

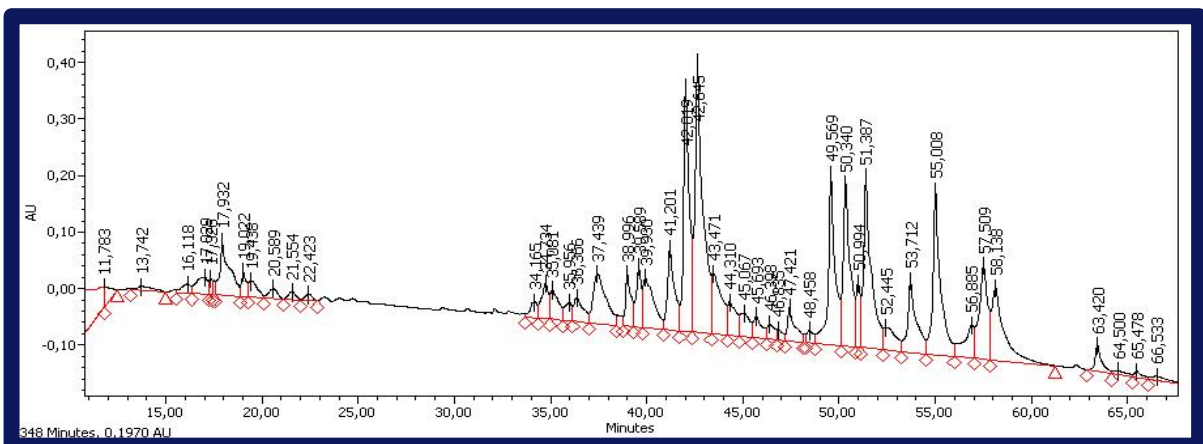


Figura 21. Perfil cromatográfico de *Phyllomedusa tarsius*. AU) unidades de absorbancia; Minutes) tiempo de elución.

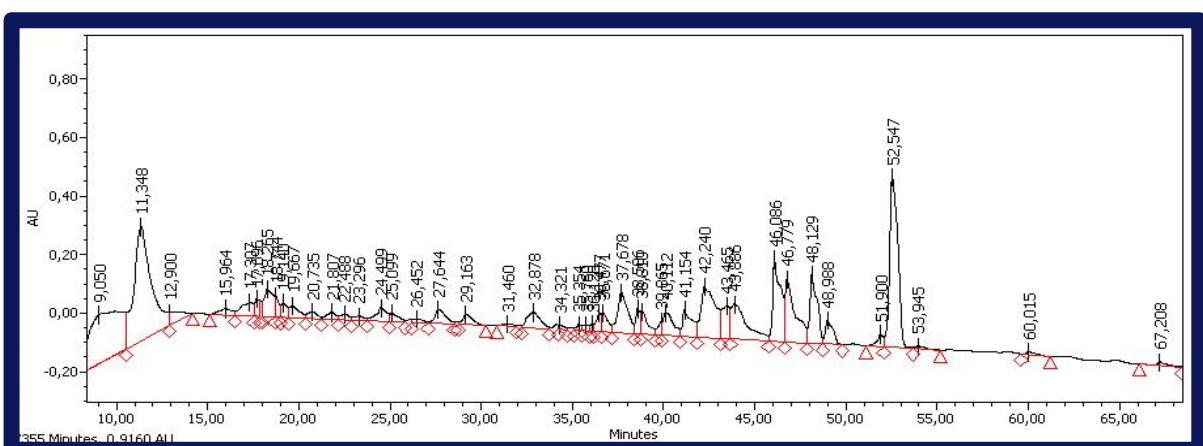


Figura 22. Perfil cromatográfico de *Phyllomedusa tomopterna*. AU) unidades de absorbancia; Minutes) tiempo de elución.

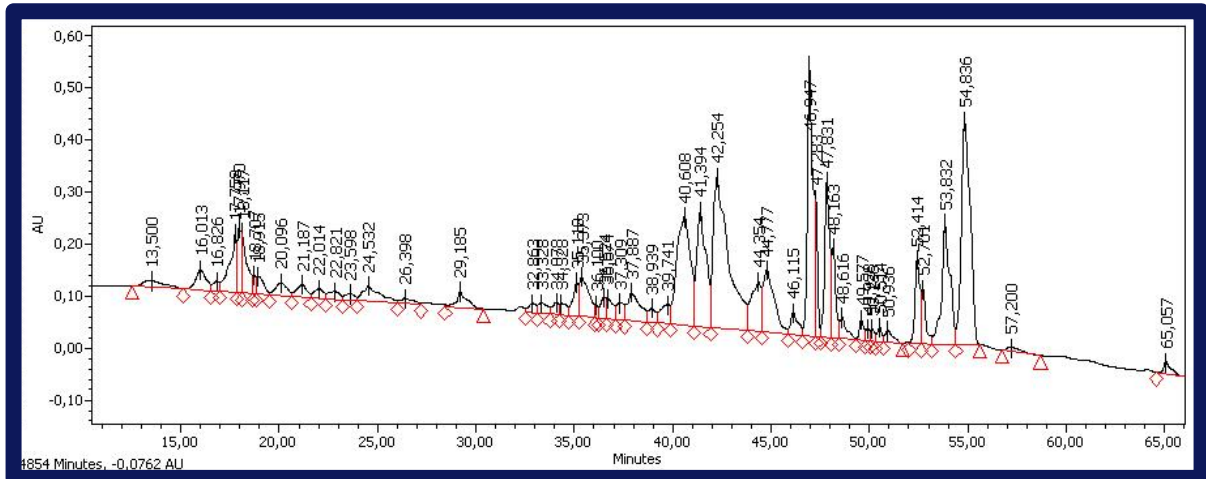


Figura 23. Perfil cromatográfico de *Phyllomedusa vaillantii*. AU) unidades de absorbancia; Minutes) tiempo de elución.

TABLAS

Tabla 1. Lista de especies de anuros amazónicos colectados en las localidades de Arajuno, Kurintza, Oglán, Pomona y Zanzarajuno de la provincia de Pastaza, Ecuador.

Especie de anuro	Familia	Localidad	Coordenadas (decimales)		Altitud	Serie de Campo
			Latitud	Longitud		
<i>Agalychnis hulli</i>	Hylidae	Oglán	-1,32359	-77,69106	593 m	SC 44467
<i>Agalychnis hulli</i>	Hylidae	Oglán	-1,32359	-77,69106	593 m	SC 44473
<i>Agalychnis hulli</i>	Hylidae	Oglán	-1,32359	-77,69106	593 m	SC 44474
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	Hylidae	Zanzarajuno	-1,35293	-77,86667	948 m	SC 27040
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	Hylidae	Pomona	-1,650928	-77,921375	799 m	SC 26641
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	Hylidae	Pomona	-1,650928	-77,921375	799 m	SC 26642
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	Hylidae	Oglán	-1,32388	-77,68941	606 m	SC 42982
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	Hylidae	Oglán	-1,32388	-77,68941	606 m	SC 44454
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	Hylidae	Kurintza	-1,505694	-77,510926	357 m	SC 44510
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	Hylidae	Kurintza	-1,505694	-77,510926	357 m	SC 44511
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	Hylidae	Kurintza	-1,505694	-77,510926	357 m	SC 44512
<i>Hypsiboas boans</i>	Hylidae	Oglán	-1,32396	-77,68847	578 m	SC 44502
<i>Hypsiboas boans</i>	Hylidae	Oglán	-1,32396	-77,68847	578 m	SC 44503
<i>Hypsiboas boans</i>	Hylidae	Oglán	-1,32396	-77,68847	578 m	SC 44507
<i>Hypsiboas boans</i>	Hylidae	Kurintza	-1,505694	-77,510926	357 m	SC 44530
<i>Hypsiboas boans</i>	Hylidae	Kurintza	-1,505694	-77,510926	357 m	SC 44533
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	Hylidae	Pomona	-1,650928	-77,921375	799 m	SC 26650
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Hylidae	Zanzarajuno	-1,351322	-77,86664	957 m	SC 27048
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Hylidae	Zanzarajuno	-1,351322	-77,86664	957 m	SC 27049
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Hylidae	Zanzarajuno	-1,351322	-77,86664	957 m	SC 26656
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Hylidae	Zanzarajuno	-1,351322	-77,86664	957 m	SC 26633
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Hylidae	Zanzarajuno	-1,351322	-77,86664	957 m	SC 26634
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Hylidae	Zanzarajuno	-1,35511	-77,86589	975 m	SC 27050
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Hylidae	Zanzarajuno	-1,35675	-77,86255	946 m	SC 27068
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Hylidae	Zanzarajuno	-1,35293	-77,86667	948 m	SC 27032

Tabla 1. Lista de especies de anuros amazónicos colectados en las localidades de Arajuno, Kurintza, Oglán, Pomona y Zanzarajuno de la provincia de Pastaza, Ecuador (**continuación...**).

<i>Hypsiboas geographicus</i>	Hylidae	Zanzarajuno	-1,35659	-77,86216	930 m	SC 27071
<i>Hypsiboas geographicus</i>	Hylidae	Zanzarajuno	-1,37192	-77,85172	936 m	SC 27001
<i>Hypsiboas geographicus</i>	Hylidae	Pomona	-1,650928	-77,921375	799 m	SC 26648
<i>Hypsiboas geographicus</i>	Hylidae	Oglán	-1,32388	-77,68941	606 m	SC 44458
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	Hylidae	Oglán	-1,32388	-77,68941	606 m	SC 42981
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	Hylidae	Oglán	-1,32359	-77,69106	599 m	SC 44487
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	Hylidae	Oglán	-1,3222	-77,78539	589 m	SC 44506
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	Hylidae	Kurintza	-1,505694	-77,510926	357 m	SC 44531
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	Hylidae	Kurintza	-1,505694	-77,510926	357 m	SC 44532
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Leptodactylidae	Arajuno	-1,2338495	-77,6848411	515 m	SC 44442
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Leptodactylidae	Arajuno	-1,2338495	-77,6848411	515 m	SC 44446
<i>Leptodactylus wagneri</i>	Leptodactylidae	Zanzarajuno	-1,37192	-77,85172	936 m	SC 27006
<i>Leptodactylus wagneri</i>	Leptodactylidae	Zanzarajuno	-1,37125	-77,8669	947 m	SC 27020
<i>Leptodactylus wagneri</i>	Leptodactylidae	Zanzarajuno	-1,351322	-77,8664	957 m	SC 26646
<i>Leptodactylus wagneri</i>	Leptodactylidae	Oglán	-1,32388	-77,68941	606 m	SC 42971
<i>Leptodactylus wagneri</i>	Leptodactylidae	Arajuno	-1,2338495	-77,6848411	515 m	SC 44445
<i>Leptodactylus wagneri</i>	Leptodactylidae	Arajuno	-1,2338495	-77,6848411	515 m	SC 44447
<i>Lithodytes lineatus</i>	Leptodactylidae	Arajuno	-1,2338495	-77,6848411	515 m	SC 44443
<i>Osteocephalus planiceps</i>	Hylidae	Oglán	-1,32308	-77,68694	592 m	SC 44505
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	Hylidae	Oglán	-1,32388	-77,68941	606 m	SC 42973
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	Hylidae	Oglán	-1,32359	-77,69106	593 m	SC 44471
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	Hylidae	Oglán	-1,32359	-77,69106	593 m	SC 44472
<i>Phyllomedusa tomopoterna</i>	Hylidae	Oglán	-1,32388	-77,68941	606 m	SC 42974
<i>Phyllomedusa tomopoterna</i>	Hylidae	Oglán	-1,32388	-77,68941	606 m	SC 42975
<i>Phyllomedusa tomopoterna</i>	Hylidae	Oglán	-1,32359	-77,69074	590 m	SC 44464
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	Hylidae	Pomona	-1,650928	-77,921375	799 m	SC 26632
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	Hylidae	Oglán	-1,325064	-77,709732	900 m	SC 42952
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	Hylidae	Oglán	-1,32388	-77,68941	606 m	SC 42983

Tabla 1. Lista de especies de anuros amazónicos colectados en las localidades de Arajuno, Kurintza, Oglán, Pomona y Zanjarajuno de la provincia de Pastaza, Ecuador (**continuación**).

<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	Hylidae	Oglán	-1,32388	-77,68941	606 m	SC 44459
<i>Rhinella marina</i>	Bufoidea	Oglán	-1,32388	-77,68941	606 m	SC 44453
<i>Rhinella marina</i>	Bufoidea	Arajuno	-1,2338495	-77,6848411	515 m	SC 44448

Tabla 2. Prueba de susceptibilidad por difusión en disco de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213) y *Escherichia coli* (ATCC® 25922) frente a la dosis de 4000 µg/ml de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

Especie de anuro	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram positiva)					<i>Escherichia coli</i> (Gram negativa)				
	Diámetro del halo de inhibición (mm)				Porcentaje del Efecto Inhibitorio Relativo	Diámetro del halo de inhibición (mm)				Porcentaje del Efecto Inhibitorio Relativo
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio		Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	
<i>Agalychnis hulli</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>Hypsiboas boans</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>Hypsiboas geographicus</i>	7,0	0,0	0,0	2,3	26	0,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	0,0	0,0	7,0	2,3	26	0,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>Leptadactylus wagneri</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>Lithodytes lineatus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>Osteocephalus planiceps</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	9,0	9,0	9,0	9,0	100	8,0	8,0	7,5	7,8	90
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	8,0	7,5	9,0	8,2	91	10,0	9,0	9,0	9,3	108
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	7,0	7,5	7,5	7,3	81	7,0	7,0	7,5	7,2	83
<i>Rhinella marina</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
Control + (inhibición)	8,0	9,0	10,0	9,0	100	9,0	9,0	8,0	8,7	100
Control – (crecimiento)	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0

Tabla 3. Porcentaje del Efecto Inhibitorio Relativo y Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213) frente a la dosis de 4000 µg/ml de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

Susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> a la secreción cutánea de anuros (Dosis 4000 µg/ml)			
Especie de anuro	Sensible (≥ 95%)	Intermedio (5-95%)	Resistente (≤ 5%)
<i>Agalychnis hulli</i>	0
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	0
<i>Hypsiboas boans</i>	0
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	0
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	0
<i>Hypsiboas geographicus</i>	...	26	...
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	...	26	...
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	0
<i>Leptodactylus wagneri</i>	0
<i>Lithodytes lineatus</i>	0
<i>Osteocephalus planiceps</i>	0
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	100
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	...	91	...
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	...	81	...
<i>Rhinella marina</i>	0

Tabla 4. Porcentaje del Efecto Inhibitorio Relativo y Susceptibilidad de *Escherichia coli* (ATCC® 25922) frente a la dosis de 4000 µg/ml de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

Susceptibilidad de <i>Escherichia coli</i> a la secreción cutánea de anuros (Dosis 4000 µg/ml)			
Especie de anuro	Sensible (≥ 95%)	Intermedio (5-95%)	Resistente (≤ 5%)
<i>Agalychnis hulli</i>	0
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	0
<i>Hypsiboas boans</i>	0
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	0
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	0
<i>Hypsiboas geographicus</i>	0
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	0
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	0
<i>Leptodactylus wagneri</i>	0
<i>Lithodytes lineatus</i>	0
<i>Osteocephalus planiceps</i>	0
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	...	90	...
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	108
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	...	83	...
<i>Rhinella marina</i>	0

Tabla 5. Porcentajes de viabilidad obtenidos de los ensayos antibacterianos realizados por el método de microdilución en caldo con *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) frente a diferentes dosis de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i> (PROMEDIO DE LAS 3 REPETICIONES)										
Especie de anuro	Controles		Dosis de secreción cutánea (µg/ml)							
	4000 µg/ml <i>A. spurrelli</i> (c+)	Crecimiento en BSA/AGG (c-)	4000	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25
<i>Agalychnis hulli</i>	12	100	13	14	16	21	39	52	75	74
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	8	100	54	58	60	63	65	69	74	76
<i>Hypsiboas boans</i>	8	100	35	43	43	47	49	54	75	87
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	11	100	50	51	53	56	67	65	64	73
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	12	100	66	73	78	90	89	95	98	108
<i>Hypsiboas geographicus</i>	9	100	46	49	51	55	59	68	80	89
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	10	100	53	59	75	78	83	86	101	106
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	10	100	49	55	53	67	70	75	82	94
<i>Leptodactylus wagneri</i>	11	100	54	53	54	54	55	60	60	72
<i>Lithodytes lineatus</i>	16	100	62	69	71	80	73	81	103	93
<i>Osteocephalus planiceps</i>	12	100	70	91	92	101	105	113	115	112
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	10	100	9	10	19	24	30	38	45	50
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	9	100	9	9	10	13	32	36	44	59
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	11	100	14	24	34	47	49	50	56	68
<i>Rhinella marina</i>	12	100	58	71	74	77	82	94	102	164

Tabla 6. Porcentajes de viabilidad obtenidos de los ensayos antibacterianos realizados por el método de microdilución en caldo con *Escherichia coli* (ATCC 25922) frente a diferentes dosis de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DE <i>Escherichia coli</i> (PROMEDIO DE LAS 3 REPETICIONES)										
Especie de anuro	Controles		Dosis de secreción cutánea (µg/ml)							
	4000 µg/ml <i>A. spurrelli</i> (c+)	Crecimiento en BSA/AGG (c-)	4000	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25
<i>Agalychnis hulli</i>	10	100	9	10	12	10	11	14	59	65
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	11	100	63	72	71	68	70	73	76	81
<i>Hypsiboas boans</i>	9	100	78	85	81	86	80	86	97	89
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	10	100	66	78	81	81	91	94	92	102
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	11	100	78	79	76	78	84	78	77	88
<i>Hypsiboas geographicus</i>	9	100	68	73	72	78	77	92	96	80
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	10	100	54	56	56	56	55	56	71	84
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	10	100	80	82	83	89	92	98	103	92
<i>Leptodactylus wagneri</i>	10	100	47	54	50	55	61	66	74	65
<i>Lithodytes lineatus</i>	10	100	63	62	62	70	67	69	76	75
<i>Osteocephalus planiceps</i>	10	100	75	78	79	75	78	78	81	76
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	10	100	11	10	10	9	11	10	45	85
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	10	100	9	9	9	10	19	15	36	76
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	10	100	9	9	10	10	14	53	66	76
<i>Rhinella marina</i>	10	100	73	74	78	91	84	81	85	112

Tabla 7. Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) de las secreciones cutáneas, de anuros amazónicos, que tuvieron un efecto antibacteriano mayor al 50% en *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) en <i>Staphylococcus aureus</i>		
Especie de anuro	Método Logit (µg/ml)	Método Probit (µg/ml)
<i>Agalychnis hulli</i>	148,28	150,11
<i>Hypsiboas boans</i>	587,85	577,53
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	2709,90	2731,53
<i>Hypsiboas geographicus</i>	1348,43	1361,23
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	2076,01	2182,71
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	42,65	40,32
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	45,91	44,60
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	167,14	168,43

Tabla 8. Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) de las secreciones cutáneas, de anuros amazónicos, que tuvieron un efecto antibacteriano mayor al 50% en *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) en <i>Escherichia coli</i>		
Especie de anuro	Método Logit (µg/ml)	Método Probit (µg/ml)
<i>Agalychnis hulli</i>	28,88	29,52
<i>Leptodactylus wagneri</i>	2339,75	2349,72
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	35,70	35,56
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	32,87	32,20
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	88,98	91,44

Tabla 9. Porcentaje de supervivencia de células de leucemia linfoblástica aguda, proveniente de médula ósea, sometidas a diez dosis diferentes de secreción cutánea de 15 especies de anuros amazónicos.

PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (PROMEDIO DE LAS 3 REPETICIONES)												
Especie de anuro	Controles		Dosis de secreción cutánea (µg /ml)									
	4000 µg/ml <i>A. spurrelli</i> (c+)	Crecimiento RPMI 1640 (c-)	4000	2000	1000	500	250	125	64	32	16	8
<i>Agalychnis hulli</i>	89	100	27	36	55	67	67	76	84	88	98	100
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	42	100	100	100	98	98	99	100	98	98	101	98
<i>Hypsiboas boans</i>	63	100	100	101	99	102	101	101	92	101	98	98
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	33	100	31	33	33	34	35	33	32	36	36	36
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	77	100	50	49	50	67	68	77	100	76	74	109
<i>Hypsiboas geographicus</i>	64	100	100	101	103	107	108	104	102	99	95	101
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	13	100	33	33	36	37	77	93	98	98	99	105
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	57	100	95	95	95	96	99	95	103	103	95	94
<i>Leptodactylus wagneri</i>	32	100	76	74	74	73	72	69	66	69	71	69
<i>Lithodytes lineatus</i>	46	100	73	78	81	88	91	94	96	99	119	119
<i>Osteocephalus planiceps</i>	39	100	76	78	78	82	82	84	84	93	85	94
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	17	100	9	5	5	5	6	6	5	5	6	12
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	11	100	8	11	11	11	22	37	29	27	35	55
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	80	100	23	22	25	25	23	23	24	24	23	29
<i>Rhinella marina</i>	67	100	104	105	112	99	107	106	106	97	92	94

Tabla 10. Dosis Letal Media (DL₅₀) de las secreciones cutáneas, de anuros amazónicos, que presentaron efecto anticancerígeno positivo contra células de leucemia linfoblástica aguda.

Dosis Letal Media (DL₅₀) de las secreciones cutáneas de anuros con actividad anticancerígena		
Especie de anuro	Método Logit (µg/ml)	Método Probit (µg/ml)
<i>Agalychnis hulli</i>	930,28	936,40
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	930,28	936,40
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	0,00 *	0,00 *
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	954,64	914,48
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	0,00 *	0,00 *
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	6,32	5,60
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	0,00 *	0,00 *

* Los valores de cero se consideran como concentración menor a ocho µg/ml.

Tabla 11. Porcentaje de hemólisis de eritrocitos frente a diez dosis diferentes de secreción cutánea, de 15 especies de anuros amazónicos.

Especie de anuro	Controles		Porcentaje de hemólisis a diferentes dosis de secreción cutánea ($\mu\text{g/ml}$)									
	Hemólisis (agua milliQ)	Crecimiento (PBS)	4000	2000	1000	500	250	125	64	32	16	8
	C+	C-										
<i>Agalychnis hulli</i>	98	2	96	93	92	90	53	46	28	15	11	7
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	99	4	39	29	20	19	15	9	6	2	1	1
<i>Hypsiboas boans</i>	99	1	71	64	59	36	33	18	17	14	13	11
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	98	2	90	87	87	70	24	8	3	2	1	0
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	100	2	100	100	99	99	97	96	95	95	94	94
<i>Hypsiboas geographicus</i>	100	2	93	87	83	77	52	47	14	9	5	4
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	99	2	88	88	84	84	66	53	44	37	37	34
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	99	2	28	19	15	10	5	2	2	0	0	0
<i>Leptodactylus wagneri</i>	99	2	48	24	18	6	2	1	0	0	0	0
<i>Lithodytes lineatus</i>	100	3	90	83	46	22	11	8	3	1	1	0
<i>Osteocephalus planiceps</i>	99	3	83	73	71	71	69	66	65	64	65	64
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	99	2	100	100	100	100	95	94	93	92	90	90
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	98	2	100	100	100	100	99	98	94	93	93	93
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	99	2	100	100	100	99	99	99	99	95	95	95
<i>Rhinella marina</i>	99	3	6	3	2	2	1	0	0	0	0	0

Tabla 12. Concentración Hemolítica Media (CH₅₀) de las secreciones cutáneas de 15 especies de anuros amazónicos.

Especie de anuro	CH ₅₀ Hemólisis	
	Método Logit (µg/ml)	Método Probit (µg/ml)
<i>Agalychnis hulli</i>	129,76	133,72
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	4872,43	7420,13
<i>Hypsiboas boans</i>	898,88	889,70
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	507,16	474,62
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	0,01	0,00
<i>Hypsiboas geographicus</i>	239,05	232,06
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	54,57	55,79
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	9074,84	16611,66
<i>Leptodactylus wagneri</i>	4020,43	5028,71
<i>Lithodytes lineatus</i>	933,49	931,46
<i>Osteocephalus planiceps</i>	0,28	0,22
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	0,00	0,00
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	0,14	0,03
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	0,11	0,01
<i>Rhinella marina</i>	1091110,19	6555551,48

Tabla 13. Índice Terapéutico (IT) calculado en base a la Concentración Hemolítica Media (CH₅₀), obtenida de las pruebas de hemólisis eritrocitaria, y a la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) de los ensayos antibacterianos realizados en *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) por el método de microdilución en caldo.

ÍNDICE TERAPÉUTICO DE LAS SECRECIONES ANTIBACTERIANAS EN <i>Staphylococcus aureus</i>									
Especie de anuro	CH ₅₀ (µg/ml)		CI ₅₀ <i>S. Aureus</i> (µg/ml)		ÍNDICE TERAPÉUTICO (IT = CH ₅₀ / CI ₅₀)		Nivel de seguridad		
	Logit	Probit	Logit	Probit	Logit	Probit	Seguro ≥ 10	Peligroso < 10 y > 1	Mortal ≤ 1
<i>Agalychnis hulli</i>	130	134	148	150	0,9	0,9			x
<i>Hypsiboas boans</i>	899	890	588	578	1,5	1,5		x	
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	507	475	2710	2732	0,2	0,2			x
<i>Hypsiboas geographicus</i>	239	232	1348	1361	0,2	0,2			x
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	9075	16612	2076	2183	4,4	7,6		x	
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	0	0	43	40	0,0	0,0			x
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	0	0	46	45	0,0	0,0			x
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	0	0	167	168	0,0	0,0			x

Tabla 14. Índice Terapéutico (IT) calculado en base a la Concentración Hemolítica Media (CH₅₀), obtenida de las pruebas de hemólisis eritrocitaria, y a la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) de los ensayos antibacterianos realizados en *Escherichia coli* (ATCC 25922) por el método de microdilución en caldo.

Especie de anuro	CH ₅₀ (µg/ml)		CI ₅₀ <i>E. coli</i> (µg/ml)		ÍNDICE TERAPÉUTICO (CH ₅₀ / CI ₅₀)		Nivel de seguridad		
	Logit	Probit	Logit	Probit	Logit	Probit	Seguro ≥ 10	Peligroso < 10 y > 1	Mortal ≤ 1
<i>Agalychnis hulli</i>	130	134	29	30	4,5	4,5		x	
<i>Leptodactylus wagneri</i>	4020	5029	2340	2350	1,7	2,1		x	
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	0	0	36	36	0,0	0,0			x
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	0	0	33	32	0,0	0,0			x
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	0	0	89	91	0,0	0,0			x

Tabla 15. Índice Terapéutico (IT) calculado en base a la Concentración Hemolítica Media (CH₅₀), obtenida de las pruebas de hemólisis eritrocitaria, y a la Dosis Letal Media (DL₅₀) de los ensayos anticancerígenos realizados con células de leucemia linfoblástica aguda.

ÍNDICE TERAPÉUTICO DE LA SECRECIONES ANTICANCERÍGENAS									
Especie de anuro	CH ₅₀ (µg/ml)		DL ₅₀ (µg/ml)		ÍNDICE TERAPÉUTICO (CH ₅₀ / CI ₅₀)		Nivel de seguridad		
	Logit	Probit	Logit	Probit	Logit	Probit	Seguro ≥ 10	Peligroso < 10 y > 1	Mortal ≤ 1
<i>Agalychnis hulli</i>	130	134	930	936	0,1	0,1			x
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	507	475	930	936	0,5	0,5			x
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	0	0	0	0			x
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	55	56	955	914	0,1	0,1			x
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	0	0	0	0			x
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	0	0	6	6	0,0	0,0			x
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	0	0	0	0			x

Tabla 16. Especies promisorias de anuros amazónicos, que tuvieron actividad antibacteriana y anticancerígena positiva y que mostraron perfiles cromatográficos diferentes.

LISTA DE ANUROS PROMISORIOS			
Especie de anuro	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA		ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
<i>Agalychnis hulli</i>	X	X	X
<i>Hypsiboas boans</i>	X		
<i>Hypsiboas calcaratus</i>	X		X
<i>Hypsiboas cinerascens</i>			X
<i>Hypsiboas geographicus</i>	X		
<i>Hypsiboas lanciformis</i>			X
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	X		
<i>Leptodactylus wagneri</i>		X	
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	X	X	X
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	X	X	X
<i>Phyllomedusa vaillantii</i>	X	X	X

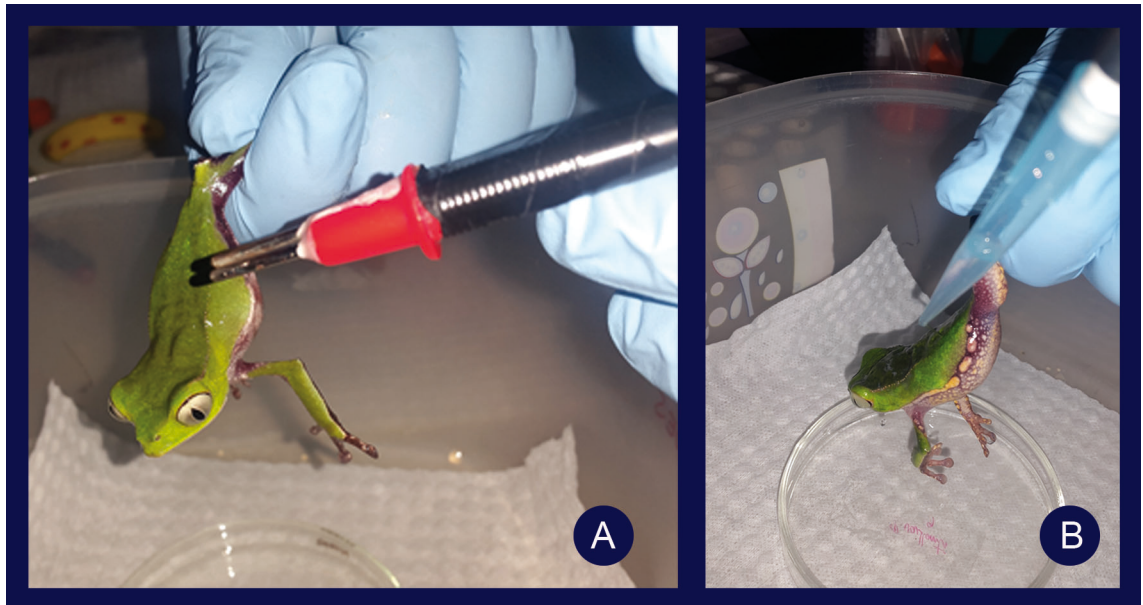
Tabla 17. Cálculo de los costos generados por un tratamiento extenso de quimioterapia de Leucemia Linfoblástica Aguda en un niño que pesa 20 kg y mide 1,15 m de altura.

ETAPA	MEDICAMENTO	FUNCIÓN	COSTO UNITARIO	PRESENTACIÓN	COSTO POR mg o UI	DOSIS POR NORMA (mg o UI/m ² SC/día)	DOSIS CORREGIDA (a 0.8 mg o UI/m ² SC/día)	NÚMERO DE DOSIS	DOSIS TOTAL (Número de dosis x dosis corregida)	COSTO DEL TRATAMIENTO EN DÓLARES (Dosis total x Costo por mg o UI)
INDUCCIÓN	Dexametasona	antiinflamatorio y analgésico	1,25	8 mg	0,156	6	4,8	28	134,4	21
	Vincristina	anticancerígeno	9,38	1mg	9,38	4	3,2	28	89,6	840,45
	Daunorubicina	anticancerígeno	19,63	2 mg	9,815	30	24	2	48	471,12
	L-asparaginasa	anticancerígeno	77,14	10.000 UI	0,007714	10.000	8.000	9	72.000	555,41
	Ondansetron	antiemético	3,23	8 mg	0,404	4	3,2	3	9,6	3,88
	Ranitidina	antiácido-antirreflujo	0,49	50 mg	0,0098	2	1,6	56	89,6	0,88
	Cotrimoxasol	antibiótico	0,19	480 mg	0,000396	150	120	12	1440	0,57
	Citarabina	anticancerígeno	13,25	100 mg	0,1325	300	240	3	720	95,4
	Etoposido (vp-16)	anticancerígeno	15,22	100 mg	0,1522	300	240	3	720	109,58
SUBTOTAL									2.098,29	
CONSOLIDACIÓN	Metotrexato	anticancerígeno	3,34	50 mg	0,0668	200	160	3	480	32,06
	Folinato cálcico	antídoto para sobredosis de metotrexato	3,09	50 mg	0,062	15	12	5	60	3,72
	Ondansetron	antiemético	3,23	8 mg	0,404	4	3,2	4	12,8	5,17
	Cotrimoxasol	antibiótico	0,19	480 mg	0,000396	150	120	12	1.440	0,57
SUBTOTAL									41,52	

Tabla 17. Cálculo de los costos generados por un tratamiento extenso de quimioterapia de Leucemia Linfoblástica Aguda en un niño que pesa 20 kg y mide 1,15 m de altura (**continuación**).

MANTENIMIENTO (riesgo estándar)	Vincristina	anticancerígeno	9,38	1mg	9,38	2	1,6	27	43,2	405,22
	Dexametasona	antiinflamatorio y analgésico	1,25	8 mg	0,156	6	4,8	210	1.008	157,5
	6-mercaptopurina	anticancerígeno	0,94	50 mg	0,0188	75	60	546	32.760	615,89
	Metotrexato	anticancerígeno	3,34	50 mg	0,0668	50	40	75	3.000	200,40
	Folinato cálcico	antídoto para sobredosis de metotrexato	3,09	50 mg	0,062	15	12	40	480	29,76
	Daunorubicina	anticancerígeno	19,63	2 mg	9,815	30	24	2	48	471,12
	L-asparaginasa	anticancerígeno	77,14	10.000 UI	0,007714	10.000	8.000	9	72.000	555,41
	Etoposido (vp-16)	anticancerígeno	15,22	100 mg	0,1522	300	240	3	720	109,58
	Citarabina	anticancerígeno	13,25	100 mg	0,1325	300	240	3	720	95,4
	Cotrimoxazol	antibiótico	0,19	480 mg	0,000396	150	120	360	43.200	17,12
SUBTOTAL									2.657,40	
TERAPIA PROFILÁCTICA AL SNC (vía intratecal)	Metotrexato	anticancerígeno	3,34	50 mg	0,0668	12	9,6	12	115,2	7,70
	Citarabina	anticancerígeno	13,25	100 mg	0,1325	30	24	12	288	38,16
	Dexametasona	antiinflamatorio y analgésico	1,25	8 mg	0,156	1	0,8	12	9,6	1,5
SUBTOTAL									47,36	
TOTAL									4844,57	

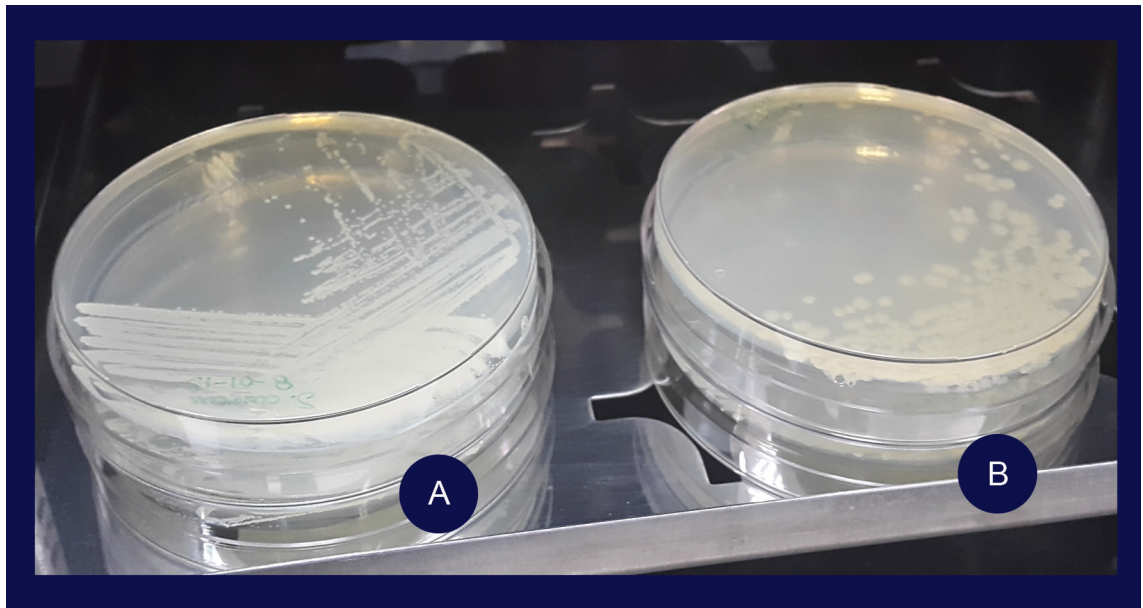
ANEXOS



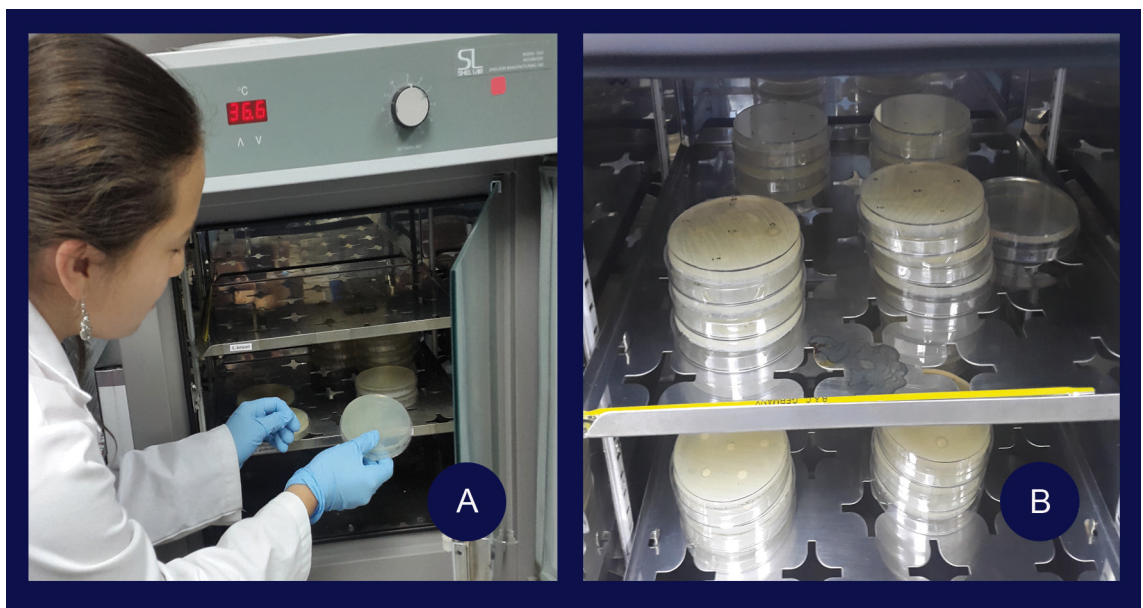
Anexo 1. Técnica de extracción de secreciones cutáneas de anuros. **A**, choques eléctricos con estimulador transcutáneo de anfibios; **B**, recolección de secreción cutánea con agua ultrapura deionizada.



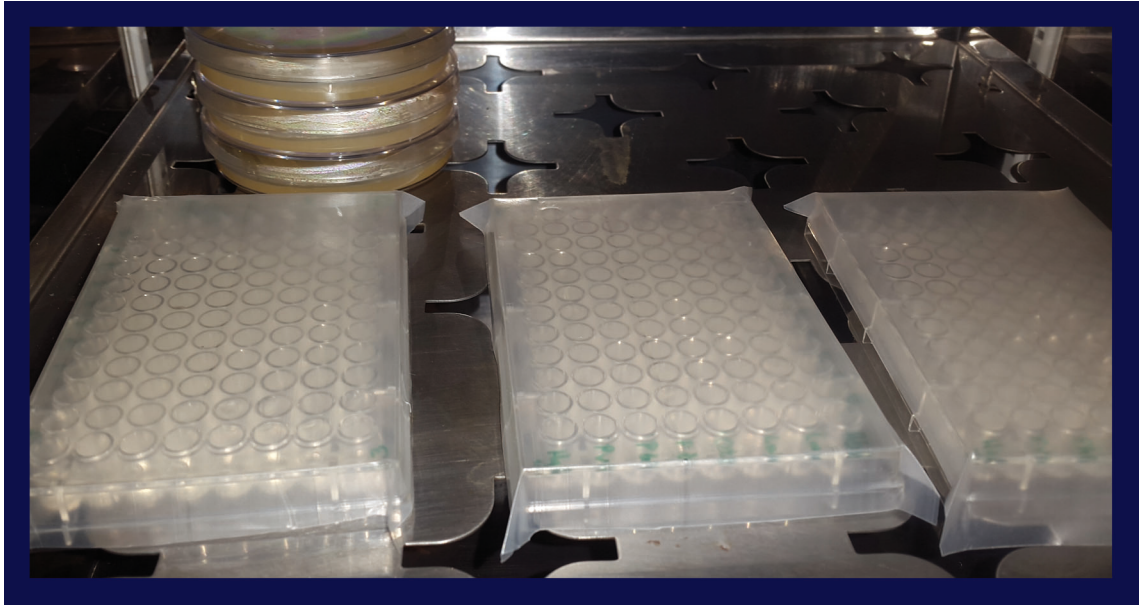
Anexo 2. Liofilización de secreciones cutáneas de anuros. **A**, Equipo liofilizador donde se lleva a cabo desecado al vacío a bajas temperaturas; **B**, extracto cutáneo liofilizado.



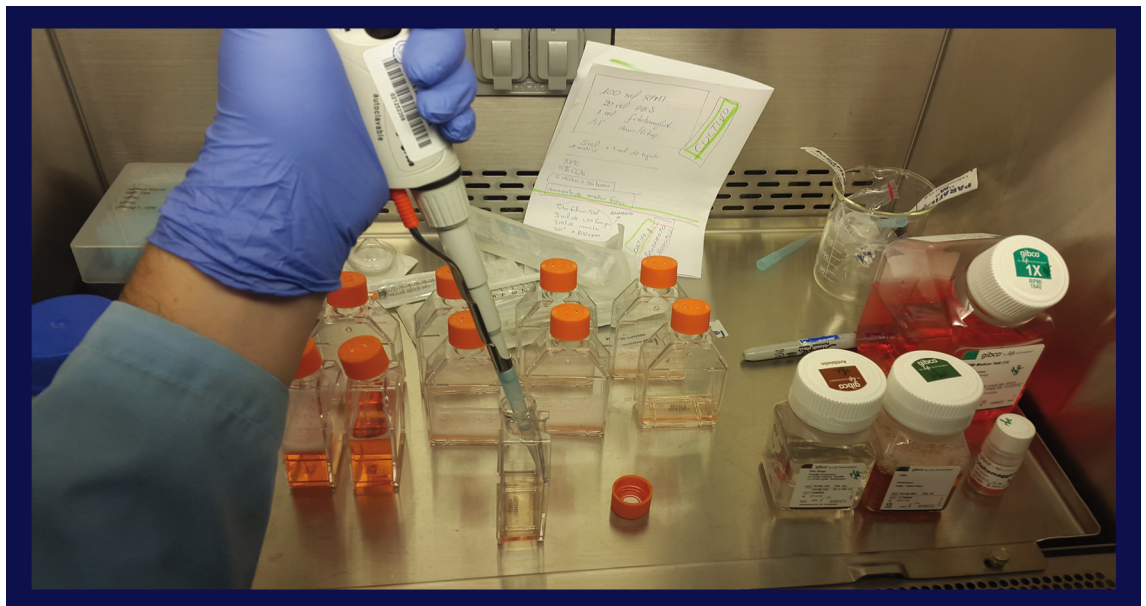
Anexo 3. Cepas ATCC® con las que se realizaron los ensayos antibacterianos. A, *Staphylococcus aureus* 29213 (Gram positiva); B, *Escherichia coli* 25922 (Gram negativa).



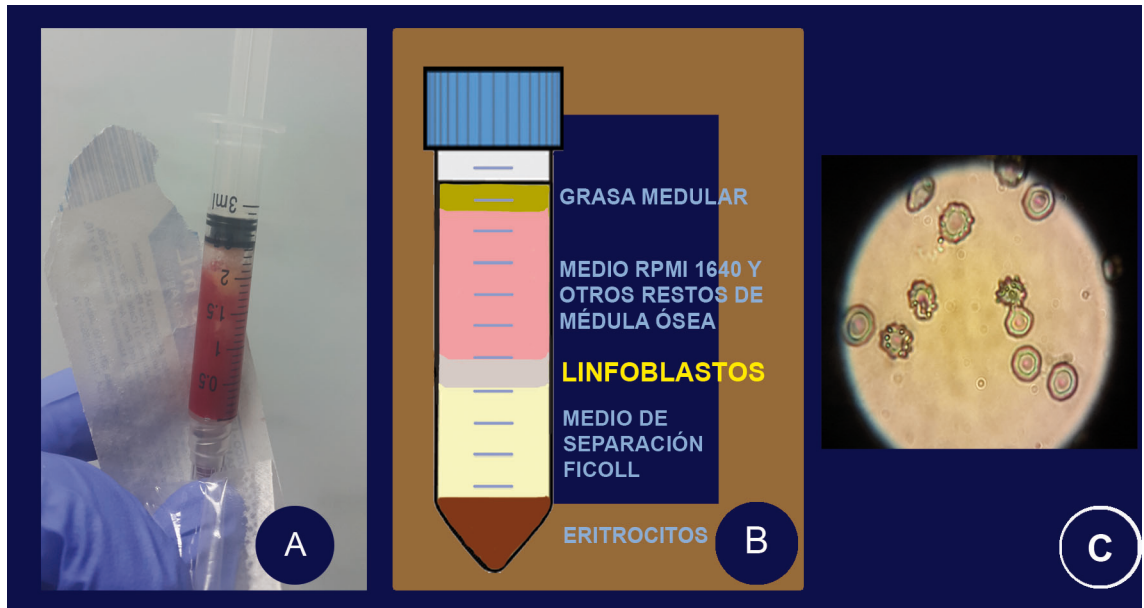
Anexo 4. Prueba antibacteriana realizada por el método de difusión en disco en cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* (29213) y *Escherichia coli* (25922). A, Colocación en la incubadora de las cajas Petri con los discos de difusión impregnados con diferentes dosis de secreción cutánea de anuros; B, 24 horas después de la incubación para verificar formación de halos de inhibición.



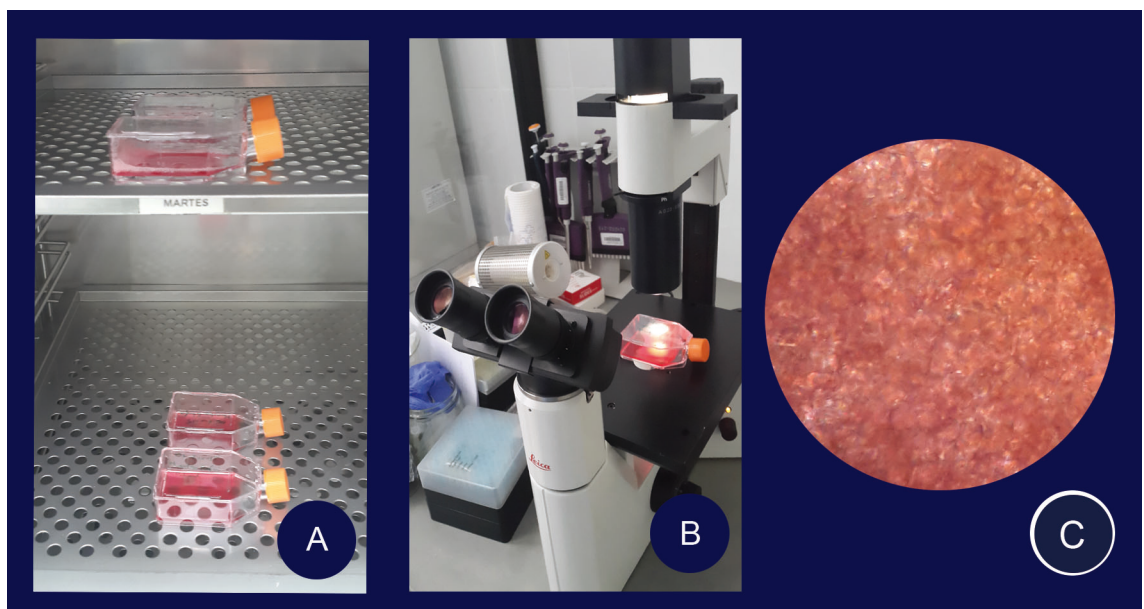
Anexo 5. Prueba antibacteriana realizada por el método de microdilución en caldo. Incubación de las placas de microtitulación en las que se realizaron las pruebas de susceptibilidad.



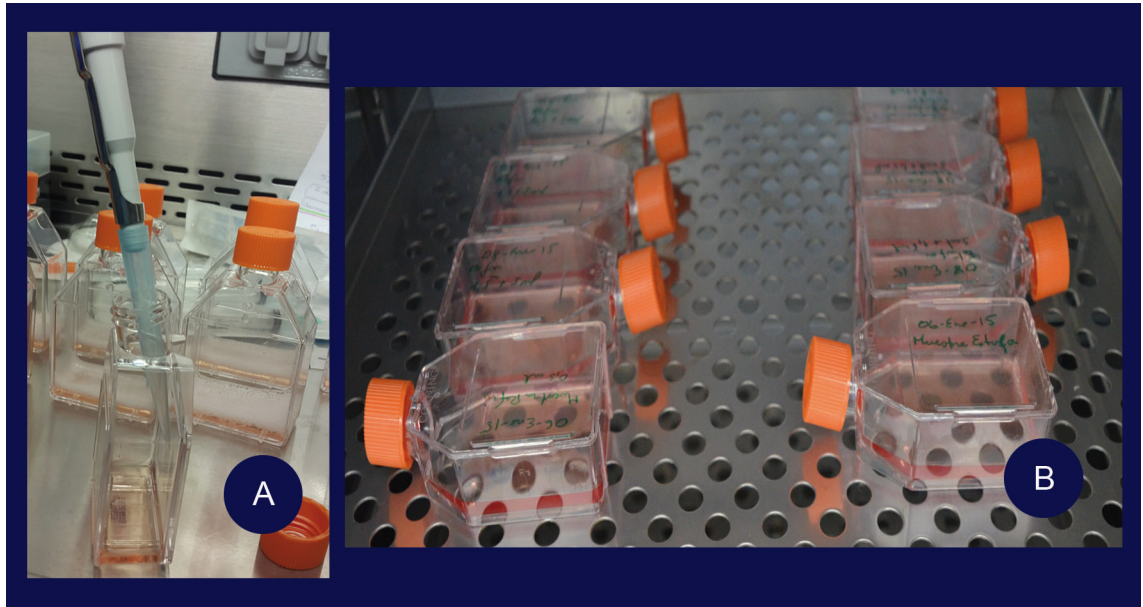
Anexo 6. Preparación de medio de cultivo celular RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino al 10%, y dispensación en frascos de cultivo.



Anexo 7. Células humanas de leucemia linfoblástica aguda proveniente de médula ósea. A, médula ósea; B, separación de linfoblastos por gradiente Ficoll-Hypaque; C, linfoblastos.

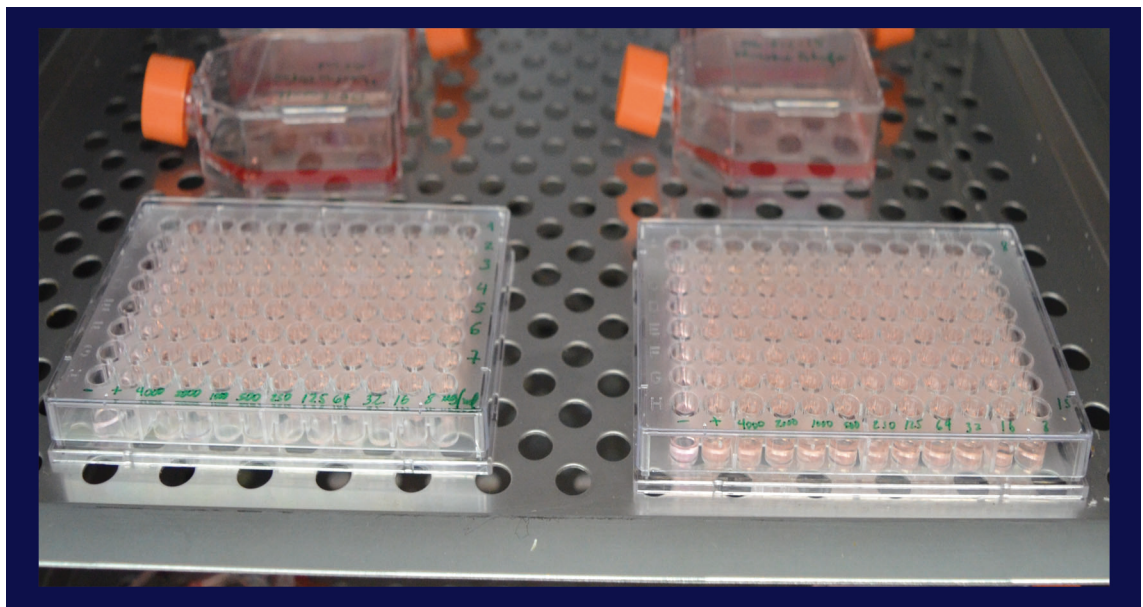


Anexo 8. Cultivo de células de leucemia linfoblástica aguda y control de contaminación por hongos. A, frascos de cultivo en incubación, conteniendo linfoblastos; B y C, verificación del óptimo crecimiento y sin contaminación de las células de leucemia linfoblástica aguda.



Anexo 9. Subcultivo de células de leucemia linfoblástica aguda.

A, preparación de frascos de cultivo con 5ml de medio, para subcultivar 1×10^5 células/ml.; **B**, incubación de frascos de cultivo con células de leucemia linfoblástica aguda hasta que alcancen una densidad de 1×10^6 células/ml.



Anexo 10. Pruebas anticancerígenas realizadas en placas de microtitulación. Diferentes dosis de secreción cutánea de anuros son incubadas con células de leucemia linfoblástica aguda.



Anexo 11. Obtención de muestras de sangre para realizar las pruebas hemolíticas. A, Voluntarios a los que se les extrajo sangre venosa; B, Tubo BD Vacutainer con muestra de sangre y anticoagulante EDTA.