

Determinación de sustancias antibacterianas en la secreción de piel de *Bufo marinus*

Shirley Medina* y Eduardo Espinoza¹

Laboratorio de Microalgas, ¹Laboratorio de Bioquímica
Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, La Universidad del Zulia,
Maracaibo, Venezuela

Recibido: 09-02-95 Aceptado: 21-11-95

Resumen

En el presente trabajo se determinó mediante la prueba de susceptibilidad por macrodilución en caldo y la prueba de susceptibilidad de difusión en disco (Método de Kirby-Bauer) la presencia de sustancias antibacterianas en la secreción de piel de *Bufo marinus*, evaluando esta actividad sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, con un pool liofilizado de las secreciones de piel de los anfibios de ambos por separado, a partir de 51 especímenes. Los resultados obtenidos indican la presencia de sustancias con actividad antibacteriana en la secreción de piel de hembras *Bufo marinus* expresada por inhibición del crecimiento de bacterias Gram- (*E. coli*) y Gram + (*S. aureus*), evidenciándose mayor sensibilidad en *E. coli*, observándose en ambos casos una diferencia significativa ($p < 0,01$). No se encontró actividad antibacteriana en la secreción de piel de los machos *Bufo marinus*.

Palabras claves: Actividad antibacteriana; *Bufo marinus*; secreción de piel.

Determination of antibacterial substances in the skin secretion of *Bufo marinus*

Abstract

In the present work, the antibacterial activity of the substances in the skin secretion of *Bufo marinus* was determined in a susceptibility test using macrodilution in broth and disc diffusion test (Kirby-Bauer Method). This activity was evaluated on *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 with lyophilized skin secretions of both sexes from 51 specimens. The antibacterial activity assay of the skin secretions from *B. marinus* female caused growth inhibition of Gram - (*E. coli*) and Gram + (*S. aureus*) with major significant difference ($p < 0.01$). No antibacterial activity was found in the skin secretions of *B. marinus* males.

Key words: Antibacterial activity; *Bufo marinus*; skin secretion.

Introducción

La constante búsqueda de medicamentos capaces de controlar y erradicar

infecciones microbianas, ha sido uno de los intereses primordiales para los investigadores desde finales del siglo pasado.

* Autor para la correspondencia: e-mail: smedina@solidos.ciens.luz.ve.

La demostración de la utilidad clínica de antibióticos tales como la penicilina y la estreptomina estimuló a la industria farmacéutica, que ensayó miles de microorganismos en busca de nuevos antibióticos. Este esfuerzo dio como resultado el descubrimiento de una gran variedad de antibióticos y actualmente se describen más de 4.500 compuestos. Sin embargo, quizás un 0,3% de los numerosos antibióticos hasta hoy descubiertos se emplean en Medicina y Agricultura (1).

Por otra parte, considerando las estructuras moleculares de otro tipo, en la literatura se han descrito numerosos polipéptidos catiónicos con poder antimicrobiano aislado a partir de tejidos de varios invertebrados y vertebrados (2,3).

Erspamer (4), fue el pionero en los estudios de la secreción de piel de anfibios, analizando aproximadamente 500 especies en los 5 continentes. Estas investigaciones permitieron establecer la actividad biológica presente en la secreción de piel de los anfibios y su importancia como una extraordinaria fuente de péptidos con un variado espectro de bioactividad sobre la contracción uterina, la alteración de la presión sanguínea (5), la contracción de la vesícula biliar y la más importante en nuestro caso, la inhibición del crecimiento de algunas bacterias.

La presencia de sustancias antimicrobianas en la secreción de piel de anfibios ha sido documentada en la literatura en diversas especies, tales como *Bufo viridis*, *Bombina variegata*, *Salamandra maculosa*, *Rana ridibunda*, *Leptodactylus pentadactylus* y *Xenopus laevis* (6-13).

La terapia antibiótica indiscriminada para combatir infecciones, ha provocado el desarrollo de organismos resistentes a dichos fármacos, por lo cual se torna necesario el aislamiento de nuevos agentes antibacterianos efectivos contra microorganismos.

El descubrimiento de nuevos agentes antibióticos en los últimos años, ha sido relevante. Aquellas sustancias que han evidenciado una actividad antibiótica potencial, para justificar su caracterización, son las que se han utilizado en estudios in-vitro posteriores. Es importante señalar que algunos antibióticos aislados tendrán una aplicación terapéutica amplia. Los mismos deberán exhibir características particulares de especificidad, biodisponibilidad, toxicidad, entre otros. Varios antibacterianos que no cumplen con la mayoría de las características antes mencionadas se encuentran todavía en uso clínico, debido a que no se dispone de alternativas adecuadas, es por ello, que se hace necesaria la búsqueda de nuevos antibacterianos que brinden a la medicina de mejores alternativas terapéuticas (14).

El objetivo fundamental de este trabajo fue determinar la presencia de sustancias antibacterianas en la secreción de piel de *Bufo marinus* y establecer su actividad sobre cepas ATCC recomendadas para la evaluación de sustancias antibacterianas por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS*.

Materiales y Métodos

Obtención de la secreción de piel de *Bufo marinus*

La secreción de piel de *Bufo marinus* se obtuvo a partir de 51 especímenes, de ambos sexos. Los especímenes fueron lavados con agua destilada para retirar los restos de piel, orina y heces que pudieran estar adheridos a su piel. Se inyectó a cada espécimen con adrenalina 5,5 mM (0,4 mL subcutáneamente). Inmediatamente se colocó cada uno de los sapos en frascos individuales. Luego de 30 min se frotó vigorosamente la parte ventral de cada uno de los especímenes hasta que su piel se tornó rubicunda, reflejo de la congestión local. El enrojeci-

miento estuvo acompañado de una secreción viscosa sobre la parte ventral del espécimen. Los especímenes fueron colocados en frascos individuales, donde fue recolectada la secreción de la superficie ventral en un buffer (50mM de cloruro de sodio y 25 mM de acetato de amonio a pH 7) con la ayuda de un hisopo estéril.

Posteriormente se identificó el sexo de cada espécimen, luego de la disección de la región urogenital. Se cuantificó el volumen total de las secreciones obtenidas por cada sapo y se preparó un pool de este material de acuerdo al sexo. Luego fue centrifugado, liofilizado y almacenado a -4°C .

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se estandarizaron los inóculos de las cepas ATCC (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), utilizando el método de placa vertida y comparación con el estándar de McFarland 0,5.

Luego se evaluó la actividad antibacteriana de la secreción de piel para ambos sexos sobre *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, mediante la prueba de susceptibilidad por macrodilución en caldo y la prueba de susceptibilidad de difusión en disco (Método de Kirby-Bauer), con el propósito de obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y los Halos de Inhibición Totales (HIT) (15-18).

En la prueba de susceptibilidad por macrodilución en caldo se utilizó una batería de 10 tubos de caldo de tripticasa de soya, a cada uno se les agregó una alícuota estandarizada de secreción de piel, diluida sucesivamente de 0,4 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un control sin adición de la secreción de piel. El procedimiento antes descrito se llevó a cabo con la secreción de piel de machos y hembras por separado.

En la prueba de susceptibilidad de difusión en disco (Método de Kirby-Bauer), se prepararon soluciones con las mismas concentraciones empleadas en la prueba de susceptibilidad por macrodilución antes descrita. Los discos de papel filtro estéril Watman # 1 (6,0 mm de diámetro), fueron impregnados con las diferentes concentraciones siguiendo la técnica de Vincent J. *et al.* (19) y posteriormente esterilizados y secados.

El análisis estadístico de los resultados de las pruebas antibacterianas fueron efectuados empleando el paquete estadístico S.A.S. (20).

Resultados

La excitación inducida en los anfibios por la inyección de adrenalina, permitió la obtención de un volumen promedio de secreción de piel igual a 1,5 mL y 1,9 mL, en machos y hembras, respectivamente. El pool de alícuotas obtenido por cada sexo, una vez liofilizados contenían 1,2 g de secreción cruda en machos y 1,8 g en hembras.

Al ensayar la actividad antibacteriana con ambos métodos, la secreción de piel proveniente de las hembras *Bufo marinus* evidenció un marcado efecto inhibitorio sobre *E. coli* y *S. aureus* a una CMI correspondientes a 30 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados de la prueba de susceptibilidad de difusión en discos permitieron obtener HIT de 15-29 mm y de 24-46 mm, en *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente (Tabla 1, Figuras 1 y 2).

Con respecto a *P. aeruginosa* no se observó efecto inhibitorio a las mismas concentraciones en muestras de ambos sexos. Los ensayos realizados con la secreción de piel proveniente de los machos *Bufo marinus* no evidenciaron efectos inhibitorios sobre las cepas ATCC anteriormente mencionadas a las concentraciones ensayadas.

Tabla 1
Valores obtenidos al ensayar las pruebas de susceptibilidad antibacteriana sobre las cepas ATCC con el extracto de las secreciones de piel de los especímenes hembras de *Bufo marinus*

	Cepas ATCC														
	<i>Escherichia coli</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
	ATCC 25922					ATCC 25923					ATCC 27853				
Concentraciones (mg/mL)	30	40	50	100	200	30	40	50	100	200	30	40	50	100	200
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	30					40									
Promedio de los Halos de Inhibición Total (HIT) (mm)	15	19	22	25	29	-	24	31	37	46	-	-	-	-	-



Figura 1. Halo de inhibición provocado por la concentración mínima inhibitoria (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$.) de la secreción de piel de las hembras *Bufo marinus* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 mediante la prueba de susceptibilidad de difusión en disco (Método de Kirby-Bauer).



Figura 2. Halo de inhibición provocado por la concentración mínima inhibitoria ($40 \mu\text{g}/\text{mL}$) de la secreción de piel de las hembras *Bufo marinus* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mediante la prueba de susceptibilidad de difusión en disco (Método de Kirby-Bauer).

Tabla 2

Análisis de varianza del efecto de diversas concentraciones de la secreción de piel de las hembras *Bufo marinus* sobre *S. aureus* ATCC 25923

Variable Dependiente: HI	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Coficiente F	Pr > F
Regresión	3	1928,714	640,238	640,24	0,0001
Error	24	24,000	1,000		
Total	27	1944,714			
	R^2	C.V.			
	0,987	2,922			

Test de Rango Múltiple de Duncan
 $\alpha = 0,05$

Grupos Duncan	Media	N	^C
A	46,143	7	174
B	36,571	7	87
C	30,571	7	44
D	23,571	7	35

Medias con letras iguales no son significativamente diferentes.

^C: Concentraciones

Al efectuar el análisis de varianza y el test de Duncan en los resultados obtenidos con las cepas inhibidas por la secreción de piel proveniente de las hembras *Bufo marinus* se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0,01$) entre los efectos inhibitorios medios de la secreción de piel proveniente de las hembras a diferentes concentraciones (Tablas 2 y 3).

Tabla 3
Análisis de varianza del efecto de diversas concentraciones de la secreción de piel de las hembras *Bufo marinus* sobre *E. coli* ATCC 25922

Variable Dependiente: HI	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Coefficiente F	Pr > F
Regresión	4	790,457	197,614	518,74	0,0001
Error	30	11,428	0,380		
Total	34	801,885			
	R ²	C.V.			
	0,985	2,849			

Discusión

El análisis de los resultados obtenidos en ambas pruebas de susceptibilidad indican la presencia de sustancias antibacterianas en la secreción de piel de las hembras *Bufo marinus*, al provocar la aparición de una respuesta antibacteriana de las bacterias Gram - (*E. coli*) y Gram + (*S. aureus*), evidenciándose mayor sensibilidad en la primera. Efectos inhibitorios similares han sido reportados en la piel y sus secreciones, obtenidas de otros anfibios, tales como *Bufo viridis*, *Bombina variegata*, *Salamandra maculosa*, *Rana ridibunda* y *Xenopus laevis* (6-13). Los resultados obtenidos en todos los estudios antes mencionados, nos indican que la mayoría de las secreciones de piel de los anfibios contienen sustancias que inhiben el crecimiento de algunas bacterias Gram-, Gram+ y otros son tóxicos para hongos, levaduras y protozoarios. Por consiguiente, es relevante el estudio de las secreciones de piel de los anfibios como nuevas fuentes de antimicrobianos que brinden a la medicina mejores alternativas para atacar las infecciones causadas por estos microorganismos.

Test de Rango Múltiple de Duncan $\alpha = 0,05$

Grupos Duncan	Media	N	^C
A	28,571	7	174
B	24,714	7	87
C	21,571	7	44
D	18,571	7	35
E	14,857	7	26

Conclusión

Los resultados apuntan hacia la posibilidad de que la secreción de piel de las hembras *Bufo marinus* pudieran contener alguna sustancia, que inhibe el crecimiento de algunas bacterias Gram - y Gram + como *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, recomendadas como cepas de referencia estandarizadas para las pruebas de susceptibilidad por el NCCLS, reportándose así una CMI y unos HIT confiables.

Agradecimiento

Se agradece a T. Koshy Koshy el asesoramiento otorgado en el curso de esta investigación.

Referencias Bibliográficas

1. BROCK T., MADIGAN M.: **Biology of microorganisms**. Cap.9. 5 edición. Prentice Hall Englewood Cliffs. Nueva York (USA), 1988, pp. 315-356.
2. BEVINS C., ZASLOFF M.: Peptides from frog skin. **Annual Rev Biochem** 59:395-414, 1990.
3. ROSEGHINI M., FALCONIERI G., SEVERINI C.: Biogenic amines and active peptides in the skin of fifty-two american amphibian species other than bufonids. **Comp Biochem Physiol** 91:281-286, 1988.
4. ERSPAMER V.: Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin. **J Comp Biochem Physiol** 85C:327-350, 1991.
5. ABEL J., MACHT D.: Two crystalline pharmacological agents obtained from the tropical toad, *Bufo marinus*. **J Pharmacol Exp Ther** 3:319-378, 1914.
6. PREUSSER H., HABERMEHL G., SABLOFSKI M., SCHMALL-HAURY D.: Antimicrobial activity of alkaloids from amphibian venoms and effects on the ultrastructure of yeast cells. **Toxicon** 13:285-289, 1975.
7. CROCE G., GIGLIOLI N., BOLOGNANI L.: Antimicrobial activity in the skin secretion of *Bombina variegata* p.. **Toxicon** 11:99-100, 1973.
8. CEVIKBAS A.: Antimicrobial activity in the skin secretion of the frog *Rana ridibunda*. **Toxicon** 16:195-197, 1969.
9. CSORDAS A., MILCH H.: Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L. **Toxicon** 7:103-108, 1969.
10. BERKOWITZ B., BEVINS C., ZASLOFF M.: Magainins: a new family of membrane-active host defense peptides. **Biochemical Pharmacology** 39:625-629, 1990.
11. BESALLE R., KAPITKOVSKY A., GOREA A., SHALIT I., FRIDKIN M.: All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. **FEBS LETTERS** 274:151-155, 1990.
12. ZASLOFF M.: Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 85:910-913, 1988.
13. CHEN H-C., MORELL J., HUANG C.: Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. **FEBS LETTERS**. 236:462-466, 1988.
14. CAMPBELL H.: The search for new antibiotics. **British Medical Bulletin** 16:82-85, 1960.
15. GIOVANNINI M., POULTER L., BRADFORD G., WILLIAMS D.: Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* pro-hormona. **Biochem J.** 243:113-120, 1987.
16. BAUER A., KIRBY W., SHERRIS J., TURCK M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology** 36:493-496, 1965.
17. GHERNA R., PIENTA P.: **American Type Culture Collection (ATCC)**. Catalogue of Bacteria & Bacteriophages. 18th Edition. Maryland (U.S.A.), 1992, pp. 134, 248, 298.
18. KONEMAN E., ALLEN S., DOWELL V., JANDA W., SOMMERS M., WINN W.: **Diagnóstico Microbiológico**. Tema 12. 3ra Edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires (Argentina), 1992, pp. 564-620.

19. VINCENT J., VINCENT H.: Filter paper disk modification of the Oxford cup penicillin determination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 55:162-164, 1944.
20. MILTON J., TSOKOS J.: *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud*. 1ra. Edición Interamericana McGraw-Hill. Madrid (España), 1987, pp. 351-388.