

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



“EFECTO DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE LA REGULACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A METICILINA EN *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA”

POR

Q.B.P. AIDA GUADALUPE GARCIA QUIRINO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

NOVIEMBRE, 2015

## **DEDICATORIA**

A MI FAMILIA POR ESTAR SIEMPRE A MI LADO APOYANDOME.

*TODO ES POSIBLE EN LA MEDIDA QUE TÚ CREAS QUE ES POSIBLE*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de este proyecto de investigación.

A la subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por ser parte de mi formación y crecimiento profesional.

A la Dra. Licet Villarreal Treviño, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en este laboratorio, por haber transmitido sus conocimientos a través de todo este tiempo trabajando a su lado.

Al Dr. Juan Francisco Contreras y al laboratorio de Virología, por darme la oportunidad de realizar parte de este trabajo de investigación en sus instalaciones.

A la M.C. Mely Vela Franco, por sus consejos y conocimientos.

A mis padres y hermanos por estar siempre a mi lado impulsándome, dándome consejos y ayudándome cuando más lo necesito.

A mi esposo Carlos Aguirre, por estar siempre junto a mí en las buenas y en las malas.

A mis compañeros de laboratorio, Vane, Lizzy, Karen, Aye, Andrés, César, Claudia, Nora por su apoyo, consejos y tiempo.

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología e Inmunología, así como en el Laboratorio de Virología, pertenecientes a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Licet Villarreal Treviño.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
LUGAR DE TRABAJO.....	III
TABLA DE CONTENIDO.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	3
3. HIPÓTESIS.....	4
4. OBJETIVOS.....	5
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	5
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	5
5. ANTECEDENTES.....	6
5.1 PLANTAS MEDICINALES.....	6
5.2 RESISTENCIA ANTIBIOTICA BACTERIANA.....	12
5.3 Staphylococcus aureus.....	13
5.3.1 Morfología e identificación.....	14
5.3.2 Epidemiología.....	14
5.3.3 Infecciones.....	15
5.3.4 Resistencia antibiótica de S. aureus.....	15
5.4 Regulación genética de la resistencia a meticilina en S. aureus.....	17
6. METODOLOGÍA.....	19
6.1 Cepas bacterianas.....	19
6.2 Plantas Utilizadas.....	20
6.3 Elaboración de extractos.....	21
6.4 Activación de las cepas bacterianas.....	21
6.5 Preparación del inóculo.....	21
6.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas.....	22
6.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida.....	22
6.8 Determinación del efecto de las concentraciones subletales.....	22
6.9 Evaluación del efecto de los extractos de plantas sobre el gen mecA.....	23
6.9.1 Extracción de ADN.....	23

6.9.2 Detección del gen MecA.....	23
6.9.3 Inducción de la expresión del gen MecA.....	25
6.9.4 Detección de la expresión del gen MecA.....	26
7. RESULTADOS.....	28
7.1 Actividad antimicrobiana de los extractos de plantas.....	28
7.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida.....	29
7.3 Determinación del efecto de las concentraciones subletales en SARM.....	30
7.4 Evaluación del efecto de los extractos de plantas sobre el gen de resistencia, MecA.....	31
7.4.1. Extracción del ADN total.....	31
7.4.2 Curva de inducción de RNAm por efecto de la cefoxitina.....	32
7.4.3 Efecto de los extractos de eucalipto y larrea sobre ARN total.....	33
7.4.4 Detección del efecto de los extractos de eucalipto y larrea sobre la expresión del gen de resistencia mecA.....	34
8. DISCUSIÓN.....	35
9. CONCLUSIÓN.....	38
LITERATURA CITADA.....	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura.....	Página
1. Morfología celular de <i>S. aureus</i> .....	13
2. Mecanismo de acción y anatomía de SCCmec.....	17
3. Modelo para la inducción de MecA por MecR1-MecI-MecR2 .....	18
4. Electroforesis de etidio.....	31
5. Identificación de la expresión de mecA por RT-PCR.....	32
6. Efecto sobre el RNA total de los diferentes extractos sobre <i>S. aureus</i> .....	33
7. Identificación de la expresión de mecA por RT-PCR.....	34

## LISTA DE GRAFICAS

Grafica.....	Página
1. Efecto de las concentraciones subletales sobre el crecimiento de SARM.....	30

## LISTA DE TABLAS

Tabla.....	Página
1. Plantas medicinales de la región norte de México .....	9
2. Clasificación de <i>S. aureus</i> .....	13
3. Nombre común y científico de las plantas utilizadas.....	20
4. Oligonucleótidos utilizados para la detección del gen <i>MecA</i> .....	24
5. Mezcla de reacción utilizada para el ensayo de PCR.....	25
6. Oligonucleótidos utilizados para la técnica de RT-PCR.....	26
7. Mezcla de reacción utilizada en el ensayo de RT-PCR.....	27
8. Actividad antimicrobiana de las plantas analizadas.....	28
9. Concentración mínima bactericida.....	29



## RESUMEN

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) es una bacteria patógena que actualmente se encuentra entre los principales agentes causales de infecciones que además de ser difíciles de tratar, pueden derivar en la muerte. La multirresistencia de este patógeno está dada por la producción de Proteínas de Unión a Penicilina (PBP2) codificadas por el gen *meca*. Recientemente se han desarrollado antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones causadas por SARM, sin embargo, estas nuevas drogas antimicrobianas provocan una gran cantidad de efectos secundarios, por esta razón la Organización Mundial de la Salud (OMS) propone el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos que actúen en contra de este patógeno, esto mediante el uso y estudio de plantas con efectos medicinales. Por esta razón nos dimos a la tarea de estudiar el efecto que 10 extractos de plantas medicinales pudieran tener en el crecimiento y la expresión de genes de resistencia a meticilina en SARM. Para la evaluación del efecto de los extractos de plantas sobre el crecimiento de SARM se realizó la técnica de difusión en agar y la microdilución en placa para el cálculo de la concentración mínima bactericida de los extractos que presentaron acción antimicrobiana contra el crecimiento de SARM. Para la evaluación de estos últimos sobre la regulación del gen de resistencia *mecA* se utilizó la técnica de RT-PCR. De los extractos de 10 plantas analizadas, solamente los de Sello de Oro, Larrea, Eucalipto y Schisandra tienen una acción antimicrobiana contra SARM, obteniendo CMB que variaron desde 0.024mg/ml para el Eucalipto, hasta 3.125mg/ml mostrado por la Schisandra. Las CMB más bajas fueron obtenidas por los extractos etanólicos de Eucalipto y Larrea, los cuales a una concentración del 50% de su CMB no muestran un efecto en la regulación del gen de resistencia *meca*

# 1. INTRODUCCIÓN

Por más de 60 años los antimicrobianos han sido utilizados para el tratamiento de diferentes infecciones causadas por microorganismos, sin embargo, en la gran mayoría de los casos donde se recurren al uso de éstos, los microorganismos causantes de estas infecciones han encontrado una manera de evadir o resistir al efecto del antimicrobiano. El resultado de esto se ve reflejado en la reducción de la eficiencia de dichos antimicrobianos, haciendo el tratamiento de estos pacientes, difícil, costoso y hasta imposible. El desarrollo de esta resistencia por parte de estos microorganismos es un fenómeno natural, que se ha visto acelerado por la presión selectiva ejercida por el uso inadecuado de los agentes antimicrobianos tanto en humanos como en animales. La actual falta de nuevos antimicrobianos para reemplazar aquellos que ahora son ineficientes trae una urgencia en la necesidad de proteger la eficacia de los antimicrobianos existentes, así como el desarrollo de nuevas drogas antimicrobianas para combatir microorganismos resistentes.

Una de las bacterias que ha encontrado la forma de evadir la acción de los antimicrobianos utilizados para su tratamiento es *Staphylococcus aureus*, la cual es un habitante natural de la piel y mucosas, pero al mismo tiempo es un importante patógeno para el humano ya que *S. aureus* puede causar infecciones leves en la piel y tejido blando, así como infecciones en hueso y torrente sanguíneo, esta última pudiendo derivar en la muerte del paciente.

El primer antibiótico utilizado para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* fue la penicilina, sin embargo, esta bacteria adquirió resistencia a este antimicrobiano por acción de enzimas betalactamasas. Para evadir la acción de estas enzimas, se desarrollaron antibióticos estables a betalactamasas, como la meticilina, sin embargo, esta bacteria pudo adquirir - un nuevo gen llamado *mecA*, el cual codifica para unas proteínas estructurales de membrana, llamadas Proteínas de Unión a Penicilina, PBP 2a por sus

siglas en inglés, las cuales pueden adquirir el rol estructural de las PBP originales, lo cual provoca que *S. aureus* pueda sobrevivir en presencia de antibióticos estables a la acción de betalactamasas. A esta cepa de *S. aureus* se le llama *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

En la actualidad este patógeno ha pasado de producir infecciones adquiridas intrahospitalariamente, a causar cuadros infectivos adquiridos entre la comunidad.

Recientemente se han desarrollado antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones causadas por SARM, sin embargo, estas nuevas drogas antimicrobianas provocan una gran cantidad de efectos secundarios, por esta razón la Organización Mundial de la Salud, propone el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos contra este patógeno, basándose en el uso y estudio de plantas con efectos medicinales.

Es por esto que nos hemos dado a la tarea de estudiar el efecto que diferentes plantas medicinales pueden tener en el crecimiento de SARM, así como en la expresión del gen *mecA*.

## 2. JUSTIFICACIÓ Y DEFINICIÓ DEL PROBLEMA:

*S. aureus* resistente a meticilina (SARM), es la principal causa de enfermedades nosocomiales y esto ha llevado a esta bacteria a convertirse en un serio problema intrahospitalario. Las infecciones por *S. aureus* son difíciles de tratar debido a la multirresistencia que esta bacteria presenta, ya que es resistente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, así como a muchos otros antibióticos. Debido al incremento en la multirresistencia de *S. aureus*, toda la atención se ha enfocado a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos poniendo un gran interés en la exploración y uso de extractos de plantas como una alternativa al uso de antibióticos tradicionales para el tratamiento de infecciones causadas por SARM.

Por lo descrito anteriormente es importante estudiar la actividad que estos extractos de plantas presentan sobre el crecimiento de SARM, así como el efecto que estos presentan en la regulación de los genes de resistencia antibiótica expresados por este patógeno.

### **3. HIPÓTESIS**

Diferentes extractos de plantas presentan actividad antimicrobiana sobre el crecimiento y modifican la expresión del gen *mecA* de resistencia a meticilina de SARM

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de plantas sobre el crecimiento y la expresión de genes de resistencia a meticilina en SARM.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Seleccionar extractos de plantas que presenten actividad antimicrobiana contra SARM.
- Determinar la concentración mínima bactericida de los extractos que muestren acción antimicrobiana contra SARM.
- Determinar el efecto de las concentraciones subletales sobre el crecimiento de SARM.
- Establecer el efecto de los extractos en la expresión de los genes de resistencia a meticilina en SARM.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Plantas Medicinales

Desde tiempos muy remotos los productos naturales, especialmente aquellos de origen vegetal, han consistido en una importante fuente de agentes terapéuticos (Calixto, 2005).

Los registros más antiguos sobre el uso de remedios de plantas, fueron las tablillas suméricas, que cuentan con una antigüedad de 4000 años, así mismo hace 3500 años, los egipcios escribieron el papiro de Ebers, que contiene una lista de remedios, entre los cuales se encuentran los utilizados para el embalsamamiento de los cuerpos y por último en México se cuenta con El código Badiano ( *Libellus de medicinalibus indorum herbis* ), el cual fue escrito en 1552 en idioma náhuatl por Martín de la Cruz y traducido por Juan Badiano, este documento describe la herbolaria mexicana utilizada durante esa época por los Aztecas.

Hasta nuestros días las plantas como fuente de compuestos medicinales continúan jugando un rol dominante en la manutención de la salud humana. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los extractos de plantas o sus constituyentes activos son usados en la medicina tradicional por un 80% de la población, y un 50% de las drogas clínicas modernas provienen de productos de origen natural (Kirbag *et al.*, 2009).

El estudio de la acción terapéutica de extractos de plantas representa un punto de inicio para el descubrimiento de nuevas drogas antimicrobianas.

En los últimos años, se han llevado a cabo un importante número de estudios en diferentes países para probar la acción que diversos extractos de plantas presentan por compuestos sintetizados en el metabolismo secundario de estas plantas (Nascimento *et al.*, 2000).

En un estudio realizado por Anesini *et al.*, 1993 se probaron 122 plantas tradicionales en Sudamérica, y se observó que 15 inhibían por completo el crecimiento de *S. aureus*.

Otro estudio más detallado fue llevado a cabo por Santos *et al.*, en 1990 donde se probaron 120 especies de plantas, de éstas, 81 extractos obtenidos de 55 plantas diferentes mostraron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y otros 5 extractos mostraron actividad contra *P. aeruginosa*.

En 2006 Molina y colaboradores analizaron un total de 48 plantas del norte de México, las cuales fueron seleccionadas basándose en entrevistas realizadas a sanadores y personas con experiencia en medicina tradicional, dichos extractos fueron probados contra bacterias resistentes como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza* tipo b y *Mycobacterium tuberculosis*, reportando que al menos uno de los extractos analizados inhibían el crecimiento de por lo menos una bacteria, para el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina el extracto metanólico de *Cordia boissieri* fue el que mostró que la CMI más baja, siendo esta de 250 µg/ml,

Rawani *et al.*, 2011 investigaron la potencial actividad antimicrobiana de extractos de *Alternanthera philoxeroides*, *Plumeria obtusa*, *Polyalthia cerasoides* e *Ixora acuminata* contra patógenos humanos, entre los cuales figuraban dos bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*) y dos Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) donde observaron que los extractos acuosos y los extractos a base de cloroformo:metanol (1:1) de *P. cerasoides* mostraron la mayor actividad antimicrobiana, seguida por las flores de *P. obtusa*, las hojas de *A. philoxeroides* y las flores de *I. acuminata*. También establecieron










que los extractos acuosos mostraron menor actividad que la de los extractos a base de cloroformo:metanol (1:1).




Madureira *et al.*, 2012 evaluaron la actividad antimicrobiana de las partes aéreas de dos plantas invasoras del sur de Australia, *Hakea sericeae* y *Hakea salicifolia* contra bacterias grampositivas y gramnegativas, entre las cuales se encontraba *S. aureus* resistente a methicilina obteniendo una concentración mínima inhibitoria de 7.5 y 62  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente para esta bacteria.

En la tabla 1 se muestran el nombre común y científico de varias plantas tradicionales de la región norte de México, así como el uso que se les da en la medicina tradicional.

Tabla 1. Plantas medicinales de la región norte de México

Nombre Común	Nombre científico	Uso medicinal	Fotografía
<b>Gobernadora</b>	<i>Larrea tridentata</i>	Esta planta tiene diversos usos entre los cuales destaca el alivio de la inflamación, además de servir para desinfectar heridas y granos. Estudios han demostrado que los extractos de esta planta tienen actividad antibiótica contra hongos y bacterias	 <p data-bbox="862 747 1133 774"><i>Arbusto de Gobernadora</i></p>
<b>Eucalipto</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Es utilizado como descongestionante y expectorante en infecciones respiratorias del tracto superior o inflamaciones, así como también para varias afecciones musculares y esqueléticas.	 <p data-bbox="818 1209 1024 1236"><i>Hojas de Eucalipto</i></p>
<b>Canela</b>	<i>Cinnamom zeylaicum</i>	Esta planta presenta propiedades antimicrobianas contra bacterias grampositivas y antifúngicos contra <i>Candida albicans</i> y <i>Aspergillus spp</i> , además de actuar como antivirales. (Osuna 2005)	 <p data-bbox="850 1566 1149 1593"><i>Corteza del árbol de canela</i></p>

<p><b>Chaparro amargo</b></p>	<p><i>Castela tortuosa</i></p>	<p>Utilizadas como antidiarreico, amebicida y contra parásitos intestinales. El principal uso en México es contra <i>Salmonella thyphimurum</i>. (Rojas 2009)</p>	 <p><i>Arbusto de Chaparro amargo</i></p>
<p><b>Nogal</b></p>	<p><i>Juglans simple</i></p>	<p>Esta planta se utiliza para tratar llagas y heridas de la piel, así como en casos de infecciones bucales y aftas difíciles de curar, también contra la tos ferina.</p>	 <p><i>Hojas del Nogal</i></p>
<p><b>Salvia</b></p>	<p><i>Salvia divinorum</i></p>	<p>Se aconseja utilizarla como cataplasmas sobre quemaduras, heridas, llagas y úlceras ya que posee cualidades antisépticas y astringentes.</p>	 <p><i>Arbusto de Salvia</i></p>
<p><b>Schisandra</b></p>	<p><i>Schisandra chinensis</i></p>	<p>Tiene efectos antioxidantes y es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas afecciones entre ellas úlceras de la piel, erupciones y sarampión, así como para el tratamiento de la tos.</p>	 <p><i>. Hojas y frutos de schizandra</i></p>

<b>Sello de Oro</b>	<i>Hydrastis canadensis</i>	Se conoce que tiene un efecto antibiótico sobre <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus anthracis</i> y otros patógenos bacterianos.	
<b>Palo de Arco</b>	<i>Handroanthus serratifolius</i>	Se utiliza para el tratamiento de infecciones causadas por virus, hongos, bacterias y parásitos intestinales. Tiene acciones antisépticas, hipoglucemiante, antibacteriano, antimicótico, astringente, antiinflamatorio, antioxidante, antiparasítico e inmunestimulane.	
<b>Sangre de Drago</b>	<i>Jatrhophia dioica</i>	. Es utilizada tradicionalmente para el tratamiento de afecciones dentales como gingivitis y dolor de dientes. El látex obtenido de esta planta es empleado como astringente.	

*Raíces de sello de oro*

*Corteza de Palo de Arco*

*Tallo y hojas del árbol de sangre de drago*

## 5.2 Resistencia antibiótica bacteriana

De acuerdo con la organización mundial de la salud un microorganismo resistente a antibióticos es aquel el cual ha adquirido resistencia a antibióticos utilizados para su tratamiento debido a que originalmente era sensible a ellos, la evolución de dichos microorganismos es un proceso natural el cual se debe a la exposición de éstos a drogas antimicrobianas. (OMS).

El descubrimiento de la penicilina en 1928, fue seguido por el descubrimiento y comercialización de una gran variedad de antibióticos, actualmente se producen 100,000 toneladas de este producto anualmente. Esto ha generado un gran impacto en las bacterias, las cuales han adquirido resistencia a los antibióticos disponibles comercialmente. Uno de los casos más notorios es *S. aureus*, el cual es resistente no solo a la meticilina sino también a los aminoglicósidos, macrólidos, tetraciclinas y lincosamidas (de Lencastre *et al.*, 2007).

En Septiembre de 2013, el Centro Nacional para prevención de Enfermedades (CDC) publicó en su boletín de peligros a la salud por resistencia antibiótica que, al año se reportan 2 millones de infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos, de las cuales 23,000 derivan en la muerte del paciente, además de clasificar en 3 grupos a los microorganismos resistentes a antibióticos; los clasificados como peligros urgentes donde colocan a virus y bacterias que son un peligro inminente en la población, los peligros serios coloca a los microorganismos que están en posibilidad de convertirse en un peligro inminente para la población, debido a la multirresistencia presentada y a la falta de antibióticos para su tratamiento y por último los clasificados como peligros de importancia donde se pueden ver a microorganismos que por primera vez han desarrollado resistencia a los tratamientos utilizados para su control. El CDC clasifica a SARM, como un peligro serio para la salud humana ya se reportaron 80,000 personas infectadas y 11,000 muertes al año.

### 5.3 *Staphylococcus aureus*

#### Clasificación

Los miembros del género *Staphylococcus* (Staphylococci) son cocos Gram positivos, que tienden a agruparse en forma de racimo de uva (Ryan y Ray, 2004).

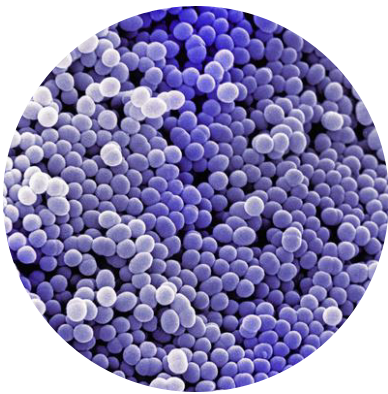


Fig 1 Morfología celular de *S. aureus*

Tabla 2. Clasificación de *S. aureus*

<b>Reino</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Filo:</b>	Firimicutes
<b>Clase</b>	Cocci
<b>Orden:</b>	Bacillales
<b>Familia</b>	Staphylococcaceae
<b>Género:</b>	Staphylococcus
<b>Especie:</b>	<i>S. aureus</i>

### 5.3.1 Morfología e Identificación

Las bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus* son células esféricas que miden alrededor de 1  $\mu$ m de diámetro, se agrupan de forma irregular, no se presentan motilidad y no forman esporas (Brooks et al, 2007).

*S. aureus* es un anaerobio facultativo que crece a una temperatura óptima de 37°C y a un pH óptimo de 7.5.

Las colonias de *S. aureus* son de color blancas, pero generan una coloración dorada con el paso del tiempo. La mayoría de las cepas muestran un halo de  $\beta$ -hemólisis alrededor de la colonia, cuando se encuentra creciendo en agar sangre (Ryan y Ray 2004).

### 5.3.2 Epidemiología

*S. aureus* es un microorganismo tanto comensal como patógeno. Aproximadamente 20% de la población presenta esta bacteria persistentemente en fosas nasales y el 30% de individuos ha sido colonizado intermitentemente a lo largo de su vida.

En un estudio realizado por Von Eiff *et al*, en el 2001, el 2% de los aislados clínicos provenientes de sangre de pacientes con bacteriemia por *S. aureus*, fueron idénticos a los aislados recuperados de sus aspirados nasales.

Esta bacteria puede sobrevivir en aire, fomites y polvo por varios días, es por esto que puede contaminar el medio ambiente, como se ve reflejado en hospitales y puede continuar transmitiéndose por largos periodos de tiempo. Las infecciones producidas por *S. aureus* pueden ser adquiridas de forma endógena o externa (Irving *et al.*, 2006). Esta localización es ideal para la bacteria, ya que puede

invadir al paciente y evadir el sistema inmune, si este se ve afectado ya sea por quemaduras, lesiones o cirugía.

### **5.3.3 Infecciones**

*S. aureus* coloniza piel, tejido blando, hueso, pulmón, corazón y sangre, se pueden presentar infecciones como neumonía, bacteriemia que puede llegar a neumonía secundaria y endocarditis, osteomielitis secundaria y artritis séptica, especialmente en niños y pacientes con antecedentes de artritis reumatoide (Irving *et al.*, 2006).

### **5.3.4 Resistencia antibiótica de *S. aureus***

*S. aureus* fue descubierto en el siglo 19 por Sir Alexander Ogston, en 1881, durante esta época, esta bacteria era causante de infecciones en piel, como forúnculos, síndrome de piel escaldada e impétigo, además de causar neumonías y llegar a la muerte debido a la falta de un tratamiento adecuado para tratar la infección causada por la bacteria.

Durante la mayor parte de ese siglo, esta bacteria permaneció como notable causa de morbilidad y muerte entre los pacientes. Durante la Primera Guerra Mundial, era común detectar neumonía estafilocócica post-influenza entre militares y personal joven, produciendo una rápida progresión hacia la muerte (Chambers, 2001). Las infecciones de piel y tejido blando frecuentemente desencadenaban en sepsis, sin ninguna terapia antibiótica efectiva para controlar su propagación (Binh, 2006). En 1941 la tasa de supervivencia de los pacientes infectados por *S. aureus* era de tan solo el 2% (Chickering *et al.*, 1919).

La introducción de la penicilina G, por Alexander Fleming, fue un suceso revolucionario, ya que la administración de este antibiótico bajó la tasa de mortalidad por infecciones causadas por *S. aureus*. (Lowey, 1998). Sin embargo casi inmediatamente se reportaron casos de resistencia a dicho antibiótico y



al paso de 5 años el 50% de aislados de *S. aureus* expresaban resistencia a la penicilina mediante la producción de la enzima beta-lactamasa. Por esta razón se introdujo la meticilina en 1961, un antibiótico semisintético resistente a la acción de las beta-lactamasas, como tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus* (Francis *et al.*, 2005). No obstante la acción antimicrobiana de este nuevo antibiótico fue de corta duración ya que este mismo año se reportó el primer caso de resistencia a meticilina por *S. aureus* en un hospital del Reino Unido (Francis *et al.*, 2005). En 1990 se observó un 30% de incidencia de SARM nosocomial, un 57% para el año 2000 y actualmente la Organización Mundial de la Salud reporta una tasa de infecciones por *Staphylococcus aureus* intrahospitalaria (HA-SARM) de 80% en el 2013 (Organización Mundial de la Salud, 2013).

El incremento en la prevalencia de SARM dio como resultado el incremento en el uso de la vancomicina, el cual había sido introducido al tratamiento de bacterias grampositivas en 1953, sin embargo en 1997 fueron reportadas en Michigan y Nueva Jersey cepas de *S. aureus* que mostraban susceptibilidad reducida a la vancomicina, conocidas como *Staphylococcus aureus* vancomicina intermedia (VISA), por sus siglas en inglés, en pacientes dializados a los cuales se les había administrado vancomicina por largos periodos de tiempo (Fridkin, 2005).

El primer caso de *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) fue documentado en Michigan en el 2002, en un paciente al cual se le administró vancomicina por casi 6 semanas. (National Nosocomial Infections Surveillance Report, 2004).

Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas terapias antimicrobianas que pueden hacerle frente a la resistencia por parte de este patógeno.

#### 5.4 Regulación genética de la resistencia a meticilina en *S. aureus*

La resistencia a  $\beta$ -lactamasas es causada por la producción de Proteínas de Unión a Penicilinas (PBP) nuevas, las cuales se les designó Proteínas de unión a Penicilina 2a (PBP 2a). Estudios recientes con SARM mostraron un nuevo componente genético clave responsable de la síntesis de PBP's 2a, el gen *mecA*, el cual es parte en un componente celular llamado *SCCmec* (Staphylococcal Chromosome Cassette) el cual no se encuentra normalmente en el genoma de *S. aureus*, éste se encuentra integrado en el extremos 3' del *orfX*, en los cromosomas de las cepas de SARM. El elemento *SCCmec* está compuesto por el gen *mecA*, anteriormente mencionado, así como por sus reguladores y el complejo genético *ccr*, el cual codifica para una recombinasa sitio-específica responsable de la motilidad de *SCCmec*. Esta distribución se encuentra representada en la Fig 3 (Kwoon, 2005). Este elemento genético posiblemente se originó en una especie de *Staphylococcus* coagulasa negativo y fue adquirido por *S. aureus* mediante transferencia genética horizontal (Tsubakishita *et al.*, 2010).

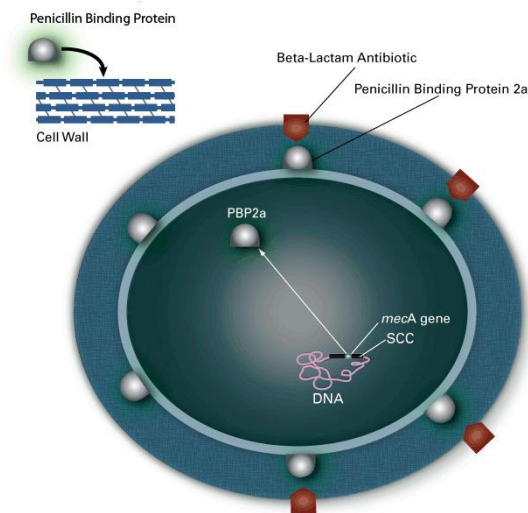


Fig 2 Mecanismo de acción y anatomía de *SCCmec*.

La expresión de este gen está controlada por un sistema de demanda, el cual activa la expresión de *mecA* en presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, mientras que la expresión se “apaga” en ausencia de

estos antimicrobianos. La regulación de este sistema está dada por genes que también son parte del elemento *SCCmec*. En ausencia de  $\beta$ -lactámicos la expresión de *mecA* se mantiene regulada por *mecI*, el cual se une a la región promotora de *mecA* y previene la transcripción genética. Sin embargo, en presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos la bacteria necesita la producción de PBP 2a para poder sobrevivir. En este caso, la expresión de *mecA* es activada por la acción de las proteínas de superficie celular *mecRI*. Cuando *mecRI* detecta la presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos induce a la célula bacteriana a degradar el inhibidor *mecI*, lo que permite la transcripción de *mecA* (Kouyos *et al.*, 2013).

Estudios recientes realizados por Arêde *et al.*, 2012 en Portugal, demuestran que el elemento central de la resistencia a meticilina en *S. aureus*, el gen *mecA*, puede ser regulado por un sistema de tres componentes que consiste en un represor transcripcional, un inductor de sensor y un anti represor, lo cual es un acomodo inusual para el control transcripcional de genes en bacteria. Adicionalmente la inducción de la resistencia causada por este gen incluye una serie de pasos proteolíticos, este corte proteolítico del represor es modulado por el anti-represor, este mecanismo de regulación se puede observar en la figura 3.

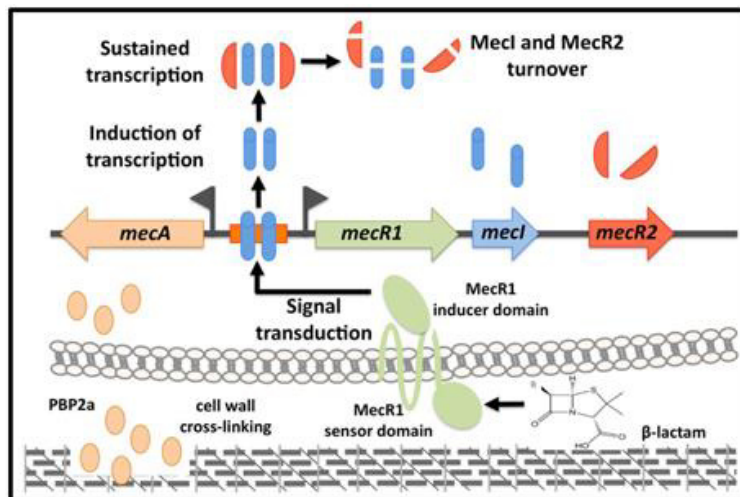


Fig 3. Modelo para la inducción de *mecA* por *mecRI-mecI-mecR2*

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Cepas bacterianas

Las cepas de SARM fueron obtenidas de la colección de cepas bacterianas perteneciente al laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y la cepa de *S. aureus* ATCC 25923, fue proporcionada por la Dra. María Elena Velázquez Meza del INSP de la ciudad de Cuernavaca, Morelos. Las cepas se mantuvieron a través de resiembras periódicas en caldo soya tripticasa a 4°C.

## 6.2 Plantas utilizadas

Las plantas utilizadas se obtuvieron de diferentes mercados de la ciudad de Monterrey, Nuevo León y su área metropolitana en base a antecedentes sobre su uso como planta medicinal. Las plantas utilizadas en este trabajo se mencionan en la tabla 3.

Tabla 3. Nombre común y científico de las plantas analizadas, y la parte de la planta utilizada

<b>Nombre Común</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Parte utilizada</b>
<b>Canela</b>	<i>Cinnamomum verum</i>	corteza de rama
<b>Chaparro amargo</b>	<i>Castela texana</i>	Parte aérea
<b>Eucalipto</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Hojas y tallo
<b>Gobernadora</b>	<i>Larrea tridentata</i>	Hoja y flor
<b>Nogal</b>	<i>Juglans nigra</i>	Hojas
<b>Palo de arco</b>	<i>Taebuia impetiginosa</i>	Raíz
<b>Salvia</b>	<i>Salvia officinalis</i>	Hojas
<b>Sangre de drago</b>	<i>Jatropha dioica</i>	Raíz
<b>Schisandra</b>	<i>Schisandra chinensis</i>	Hojas
<b>Sello de oro</b>	<i>Hydrastis canadiensis</i>	Raíz

### **6.3 Elaboración de Extractos**

Para la elaboración de los extractos se utilizó la técnica de maceración. Para esta técnica se pesaron 20 g de la planta y se trituraron con ayuda de un mortero de porcelana después se agregaron 100 mL de etanol. Lo obtenido se pasó a matraces, los cuales se cubrieron con papel periódico para evitar el paso de la luz y se dejó reposar la mezcla durante 24 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo, el contenido de los matraces fue separado con ayuda de papel filtro de poro abierto. Una vez procesado se pasó a recipientes de vidrio planos y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente. El producto de la desecación fue recolectado en viales ámbar y almacenados a 4°C hasta su uso, procurando que este tiempo se sea mayor a 30 días.

### **6.4 Activación de las cepas**

Las cepas se activaron sembrándolas en caldo soya tripticasa durante 18-24h a 35°C. Posteriormente se inocularon por estría cruzada en placas de Petri con agar soya tripticasa (DIFCO TM) y se incubaron por 24 h a 35 °C.

### **6.5 Preparación del inóculo**

Se trabajó con un inóculo equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mc. Farlan ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). El inóculo se obtuvo inoculando colonias de *S. aureus* en tubos con 3 mL de solución salina estéril al 0.85% hasta alcanzar un rango de absorbancia de 0.8- 1.0 a 625 nm.

## **6.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas.**

Para determinar el efecto de cada uno de los extractos sobre el crecimiento de la bacteria, se llevó a cabo la técnica de difusión en placas con Agar Muller-Hinton. Posteriormente se realizaron pocillos en el agar con tubos Durham en condiciones de esterilidad. En cada uno de los pocillos fueron colocados 100  $\mu$ L de cada extracto a una concentración de 100 mg/mL. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h. Finalmente se midieron los halos de inhibición de crecimiento. Los extractos que presentaron un halo de inhibición mayor a 20 mm se seleccionaron para realizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida (Bauer *et al.*, 1966).

## **6.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida**

En una placa de 96 pocillos estéril se colocaron 150  $\mu$ L de caldo Muller-Hinton en el primer pocillo, posteriormente se agregaron 50  $\mu$ L del extracto a probar en una concentración de 100 mg/mL. Después se agregó un inóculo equivalente al 1% ajustado al 0.5 del estándar de Mc. Farland. Partiendo de esta concentración, se realizaron microdiluciones seriadas. Las microplacas se llevó a incubar a 37°C por 24 h, al finalizar este tiempo se tomaron 100  $\mu$ L del contenido de cada pocillo y se depositaron en placas con agar Muller-Hinton cuadrículadas, las cuales fueron incubadas por 24 h a 37°C. Pasado el periodo de incubación se analizaron las cajas y se determinó la CMB (CLSI, 2013).

## **6.8 Determinación del efecto de concentraciones subletales.**

Para la determinación del efecto de las concentraciones subletales en el crecimiento bacteriano, se empleó el 75, 50 y 25% de la CMB de los extractos de plantas seleccionadas. Estas concentraciones se añadieron a 150  $\mu$ L de caldo Müller-Hinton y el inóculo correspondiente ajustado como se indica en el punto 6.5 y se incubaron a 37°C por 24 h. Posteriormente se realizaron microdiluciones

seriadas de cada una de las concentraciones de la CMB, y se inocularon en agar para cuenta estándar por medio de la técnica de vertido en placa. Se incubó por 24 h a 37°C y finalmente se determinaron las unidades formadoras de colonias presentes en el medio.

## **6.9 Efecto de los extractos de plantas sobre la regulación de la expresión de *mecA***

### **6.9.1 Extracción de ADN**

La extracción del ADN bacteriano se llevó a cabo mediante la técnica de extracción por fenol/cloroformo (Sambrook *et al.*, 2006). A partir de un cultivo nuevo de bacterias en 5 mL de caldo soya tripticasa se tomó 1.5 mL y se colocó en un tubo para microcentrífuga estéril. Después se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. El pellet se resuspendió en 575 µL de buffer TE (Tris-EDTA) pH 8, 30µL de SDS 10% y 3 µL de proteinasa K (20mg/mL). La mezcla se incubó a 37°C por 1 h. Posteriormente se agregó 100µL de NaCl 5M y 80µL de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y se incubó por 10 min a 67 °C, al término de este tiempo de incubación se añadieron 750µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó en las condiciones anteriormente descritas. La fase acuosa se colocó en un tubo limpio para posteriormente añadir 1 mL de isopropanol. Los tubos se incubaron a -20°C durante toda la noche y se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 30 minutos para finalmente resuspender en 50µl de buffer TE a pH 8.

### **6.9.2 Detección del gen *mecA***

La técnica que se utilizó fue la propuesta por Loza en 2006. Se utilizaron oligonucleótidos *mecA* Forward y *mecA* reverse establecidos por Chang y Davis en 2009 (Tabla 4). Las condiciones



establecidas fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15s, 50°C por 10s, y 72°C por 30°C. En la tabla 5 se presenta la mezcla de reacción utilizada.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la detección del gen *mecA*

<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia 5' -&gt; 3'</b>	<b>Tamaño del producto esperado</b>
<i>mecA</i> Forward	CTCAGGTACTGCTAT CCACC	152 pb
<i>mecA</i> reverse	GGAACTTGTTGAGCAGAG G	

Tabla 5. Mezcla de reacción utilizada para realizar la PCR

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Volumen (μL)</b>	<b>Concentración final</b>
Buffer	10x	2.5	1x
dNTPs	10mM	4	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	50mM	3	6 mM
Oligonucleótido Forward	10mM	5	2 μM
Oligonucleótido Reverse	10mM	5	2 μM
Taq	5 U/μl	0.5	2.5 U
Solución Q	-	4.87	-

### 6.9.3 Inducción de la expresión del gen *mecA*

Para la inducción de la expresión de *mecA*, se inocularon tubos con caldo LB con 30 μg de oxacilina, éstos se incubaron por 3 h para posteriormente realizar la extracción de RNA por el método de Trizol.

#### 6.9.4 Determinación de la expresión de *mecA*

Para esta determinación se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) se utilizó el protocolo establecido por Shang y Davis en 2009. Los primers y la mezcla de reacción utilizados se muestran en la tablas 6 y 7. Para este procedimiento se expuso la bacteria a los extractos de larrea y eucalipto a una concentración subletal del 50% de la CMB.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la técnica de RT-PCR

<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia 5' -&gt; 3'</b>	<b>Tamaño del producto esperado</b>
<i>mecA</i> Forward	CTCAGGTACTGCTAT CCACC	152 pb
<i>mecA</i> reverse	GGAACTTGTTGAGCAGAG G	

Tabla 7 Mezcla utilizada en el ensayo de RT-PCR

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentración final</b>
Buffer	10x	2.5	1x
dNTPs	10mM	4	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	50mM	3	6 mM
Oligonucleótido Forward	10mM	5	2 $\mu\text{M}$
Oligonucleótido Reverse	10mM	5	2 $\mu\text{M}$
Taq	5 U/ $\mu\text{l}$	0.5	2.5 U
Solución Q	-	4.87	-

## 7. RESULTADO

### 7.1 Actividad antimicrobiana de los extractos de plantas

Para esta determinación se estudiaron un total de 10 extractos de plantas, de los cuales 5 mostraron la mayor actividad antimicrobiana sobre el crecimiento de SARM, con halos de inhibición iguales o mayores a 20 mm, estos fueron seleccionados para la determinación de las concentraciones mínima inhibitoria y bactericida. Los halos de inhibición obtenidos para cada uno de los extractos se muestran en mm en la tabla 8.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana de las plantas utilizadas en SARM.

Ni= No inhibición

Nombre Común	SARM 53
Canela	17 mm
Chaparro amargo	Ni
Eucalipto	30 mm
Larrea	26 mm
Juglans simple	17 mm
Salvia	18 mm
Schisandra	20 mm
Sello de oro	20 mm
Palo de arco	15 mm
Sangre de drago	Ni

## 7.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

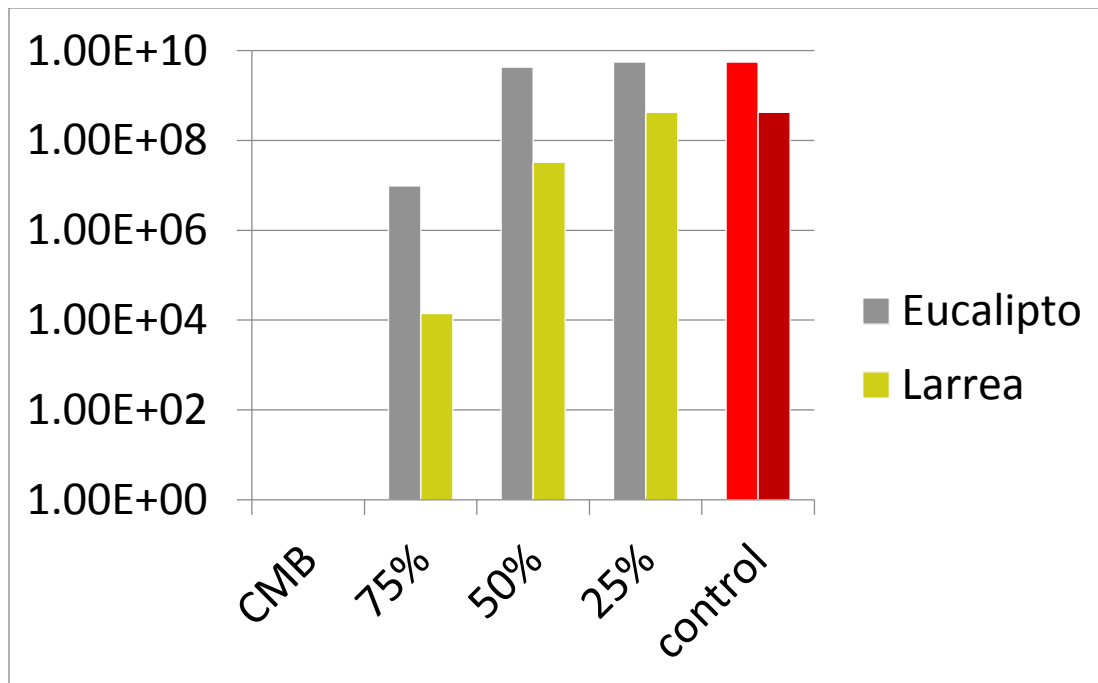
Se determinó la concentración mínima bactericida de extracto requerida para eliminar por completo el crecimiento de SARM (CMB), así como la mínima requerida para inhibir el crecimiento visible de la bacteria (CMI). Las concentraciones más pequeñas fueron mostradas por los extractos de Larrea y Eucalipto, con una CMB de 0.146 mg/mL y 0.024 mg/mL respectivamente, mientras que el extracto de Schisandra mostró una CMB de 3.12 mg/mL, por otro lado, Sello de oro presentó una concentración mínima bactericida por arriba de 25 mg/mL, por lo que decidimos eliminarlo para los estudios siguientes. La CMB para cada uno de los extracto se muestran en la tabla 9. De los 4 extractos estudiados, los extractos de larrea y eucalipto fueron seleccionados para la determinación de las concentraciones subletales, así como para el estudio del efecto que estos tienen sobre la regulación del gen de resistencia *mecA*.

Tabla 9. Concentración mínima bactericida para los 4 extracto analizados

Planta utilizada	SARM 53
Sello de Oro	25 mg/ml
Larrea	0.146 mg/ml
Eucalipto	0.024 mg/ml
Schisandra	3.12 mg/ml

### 7.3 Determinación de las concentraciones subletales

Los extractos de plantas que mostraron el CMB más bajo, se seleccionados para el análisis del efecto de las concentraciones subletales del 75, 50 y 25% del CMB, en el crecimiento bacteriano. La gráfica 1 muestra el crecimiento en UFC/ml para las concentraciones del 75,50 y 25% de la CMB.

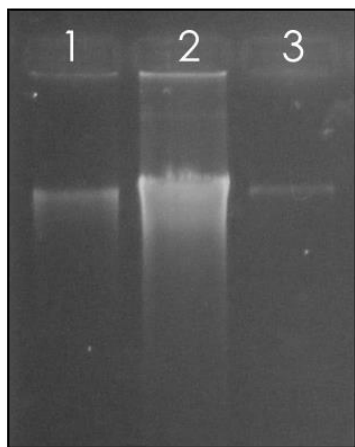


Gráf. 1. Efecto de las concentraciones subletales sobre el crecimiento de SARM

## 7.4 Evaluación del efecto de los extractos de planta sobre el gen de resistencia *mecA*

### 7.4.1. Extracción del ADN total.

Para descartar la genotoxicidad de los extractos sobre el material genético de la bacteria, se realizó una extracción de ADN total utilizando CTAB y posteriormente se elaboró un gel de electroforesis comparando el material genético de la bacteria sin exposición a extractos, contra los expuestos a los extractos de eucalipto y larrea. En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos, los cuales nos indican que no existe daño genotóxico por parte de los extractos al ADN total de *S. aureus*.

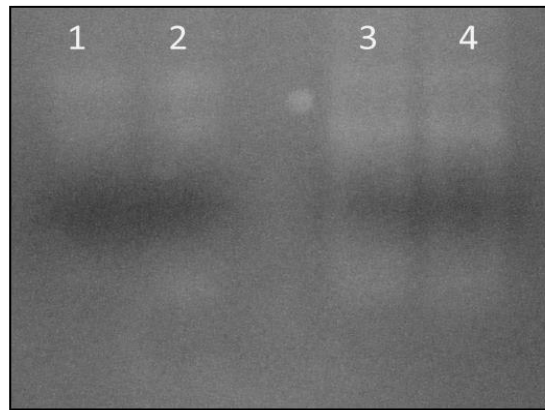


*Fig. 4.* Efecto de los diferentes extractos sobre el DNAtotal de *S. aureus*. Carril 1. Bacteria expuesta a eucalipto. Carril 2. Bacteria expuesta a larrea. Carril 3. Bacteria sin exposición a algún extracto



#### 7.4.2 Curva de inducción de RNAm por efecto de la cefoxitina

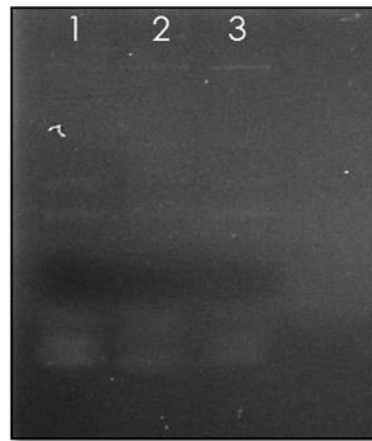
Para corroborar la presencia del gen *mecA* en la cepa bacteriana con la que se trabajó se realizó una curva de inducción del gen *mecA*, en la cual la cepa de *S. aureus* se expuso a cefoxitina 30mg/ml en diferentes tiempos y posteriormente se hizo una extracción de ARN total. En la figura número 5 se muestran los resultados obtenidos en este experimento, podemos observar que existe una mayor obtención de ARN total después de 2 horas de haber expuesto la bacteria al antibiótico, lo cual se ve reflejado en una mayor intensidad en la banda obtenida en el gel de electroforesis.



*Fig. 5.* Curva de inducción de RNA de *S. aureus* por cefoxitina. Carril 1. Bacteria expuesta a cefoxitina 1 hora. Carril 2. Bacteria expuesta a cefoxitina 2 horas. Carril 3. Bacteria expuesta a cefoxitina 3 horas. Carril 4. Bacteria expuesta a cefoxitina 4 horas.

### 7.4.3 Efecto de los extractos de eucalipto y larrea sobre ARN total

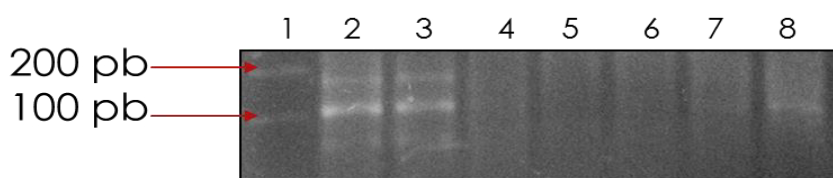
Parar descartar el efecto genotóxico que los extractos pudieran tener sobre el ARN de la bacteria, se realizó un gel de electroforesis para comparar la integridad de este después de haber sido la bacteria expuesta a los extractos contra el ARN de la bacteria en estado normal. Los resultados muestran que no existe ningún daño en la calidad del ARN total de *S. aureus* después de haber sido expuesta a los extractos de eucalipto y larrea, por lo que se procedió a trabajar con este ARN y con él realizar el ensayo de RT-PCR. Los resultados del efecto de los extractos sobre el ARN total se muestran en la figura 6.



*Fig. 6.* Efecto sobre el RNA total de los diferentes extractos sobre *S. aureus*. Carril 1. Bacteria expuesta a eucalipto. Carril 2. Bacteria expuesta a larrea. Carril 3. Bacteria sin exposición a algún extracto

#### 7.4.4. Detección del efecto de los extractos de eucalipto y larrea sobre la expresión del gen de resistencia *mecA*

Para finalizar se realizó la técnica de RT-PCR para determinar el posible efecto que dichos extractos pudieran tener sobre el gen de resistencia *mecA*. Los resultados obtenidos son mostrados en la figura número 7, donde podemos observar que el extracto de eucalipto presenta una expresión disminuida del gen de resistencia, mientras que con el extracto de larrea no se observa la expresión del gen.



*Fig. 7.* Identificación de la expresión de *mecA* por RT-PCR. Carril 1, MBP. Carril 2 y 3. Bacteria expuesta a cefoxitina. Carril 4. Control negativo. Carril 5y 6. Bacteria expuesta a larrea. Carril 7 y 8. Bacteria expuesta a eucalipto

## 8. DISCUSIÓN

Las infecciones causadas por SARM se han incrementado a lo largo de la última década. La habilidad de *S. aureus* de causar enfermedades puede estar dada por la producción de un gran número de enzimas, toxinas y otras sustancias. El creciente incremento de la ocurrencia de *S. aureus* resistente no solo a meticilina si no a un amplio rango de antibióticos han hecho que el tratamiento de dichas infecciones sea cada vez más difícil de tratar (Machado *et al.*, 2003).

Al analizar la actividad antimicrobiana de 10 extractos de plantas en el presente trabajo, 4 mostraron actividad antimicrobiana ante los extractos de plantas a una concentración de 100 mg/ml, el mayor halo de inhibición fue mostrado por el extracto de eucalipto con un diámetro de 30 mm, la actividad antimicrobiana de este extracto así como de aceites esenciales del mismo fue anteriormente descrito por Bachir *et al.*, 2012, donde reporta dicha actividad contra cepas de *E. coli*.

Otro de los extractos que mostró una gran actividad antimicrobiana, con respecto a los demás extractos utilizados, fue el extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*) con un halo de inhibición de 26 mm, Martins en el 2013 reporta que la actividad antimicrobiana de los extractos de esta planta es mayor para una gran variedad de microorganismos grampositivos y gramnegativos, con respecto a otros extractos analizados.

El resto de los extractos que mostró actividad antimicrobiana contra SARM, fueron, Sello de oro con un halo de inhibición del crecimiento de 20 mm, y Schisandra con un halo de 25 mm, la Biblioteca digital de plantas tradicionales de la Universidad Autónoma de México, describe que estas últimas tienen efectos antioxidantes y posiblemente antibacterianos, sin embargo los halos de inhibición

obtenidos en nuestro trabajo muestran que la actividad antimicrobiana de estos extractos es menor a la del eucalipto y larrea.

En la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas, se pudo observar que los extractos de gobernadora y de eucalipto mostraron una mejor actividad antimicrobiana al determinar que con el extracto de la gobernadora se requirió una concentración de 0.146 mg/ml para detener el crecimiento de SARM, y de 0.24 mg/ml para el extracto de eucalipto.

Para el extracto de salvia, se obtuvo una CMB alta de 25,000 mg/ml, contrario a lo reportado por otros autores donde reportan que los extractos de esta planta muestran una gran actividad antimicrobiana, y que se necesitan concentraciones bajas para inhibir el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos.

Los extractos con un mejor efecto antimicrobiano fueron el de la gobernadora y eucalipto ya que con dichos extractos se obtuvieron CMB de 0.146 mg/ y 0.24 mg/ml respectivamente esto se puede atribuir a los compuestos activos encontrados en los extractos de estas plantas, como taninos y flavonoides, los cuales se han relacionado con la actividad antimicrobiana de diversos extractos de plantas. (Elaissi *et al.*, 2012).

Al evaluar el efecto que estos dos extractos pudieran tener en la regulación del gen de resistencia *mecA*, pudimos observar que a una concentración subinhibitoria del 50% de la CMB ambos extractos no muestran un efecto genotóxico en el material genético de la bacteria.

Al evaluar el efecto del extracto de eucalipto sobre el gen *mecA* podemos observar una disminución en la regulación de la expresión de éste, el cual se ve reflejado en un decremento en la intensidad de la banda obtenida a 154 pb, por otro lado con el extracto de larrea no se pudo observar la banda de expresión característica, lo que nos indica un efecto en la regulación del gen de resistencia

*mecA*, sin embargo el nivel de regulación se podría determinar mediante una cuantificación del ARN utilizando RT-PCR. Hasta el momento el mecanismo de acción de los extractos tanto de larrea como de eucalipto no está del todo comprendido, pero se cree que los flavonoides encontrados en los extractos se unen a la pared celular bacteriana, produciendo una ruptura de ésta (Elaissi *et al.*, 2012). Este daño en la pared celular podría interferir con la cadena de respiración celular, lo cual afecta el potencial de membrana indispensable para la captación de varios metabolitos y la producción de macromoléculas, lo que lleva a una disminución en la actividad metabólica de la bacteria, resultando en el bloqueo de alguna ruta metabólica lo cual se ve reflejado en la disminución de la expresión del gen como ocurrió con el extracto de eucalipto y con la inhibición por completo de la expresión de éste en el caso del extracto de larrea, (Dzoyem *et al.*, 2013).

## 9. CONCLUSIÓN

- Los extractos de eucalipto, gobernadora, sello de oro y schisandra tienen actividad antimicrobiana contra SARM.
- Las CMB obtenidas variaron desde 0.024 mg/ml del eucalipto hasta 3.125 mg/ml de schisandra.
- La CMB más baja se obtuvo por parte de los extractos etanólicos de eucalipto y gobernadora.
- Las concentraciones subletales del 25 y 50% de la CMB de los extractos de gobernadora y eucalipto no afectan significativamente el crecimiento de SARM.
- La concentración subletal del 50% de la CMB de los extractos de eucalipto y gobernadora, no dañan la integridad del material genético bacteriano.
- A una concentración del 50% de la CMB del extracto de gobernadora no se observó la expresión del gen *mecA*.

## LITERATURA CITADA

- Adonizio A, Leal S, Asubel F, Mathee K. 2008. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by medicinal plants in *Caenorhabditis elegans* model system. J. enthopharmacol 105, 427-435.
- Adonizio A, Downum K, Bennett B, Mathee K. 2006. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. Journal of enthopharmacology 105: 427-435.
- Arêde P, Milheiriço C, de Lencastre H, Oliveira DC (2012) The Anti-Repressor MecR2 Promotes the Proteolysis of the *mecA* Repressor and Enables Optimal Expression of  $\beta$ -lactam Resistance in MRSA. PLoS Pathog 8(7): e1002816. doi:10.1371/journal.ppat.1002816
- Anesini E, Perez C. 1993. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol. 39, 119-128.
- Appelbaum PC. MRSA—the tip of the iceberg. Clin Microbiol Infect 2006; 12(Suppl 2):3–10.
- Binh A. 2006. Roles of 34 Virulence Genes in the Evoluton of Hospital and community Associated Strains of Methicillin-Resistan *Staphylococcus aureus*. J Inf Dis.; 193: 1945-1503
- Bisset, N. 1994. Herbal Drugs and phytopharmaceuticals. CRC Press, London pp 556.
- Brooks G, Carroll K, Morse S, Mietzner T. (2007). Jawetz, elinick and Adelberg´s Medical Microbiology, 24<sup>th</sup> Edition. The McGraw-Hill Companies, USA.



- Calixto, J.B., 2005. Resenha: Cordia verbenacea. Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica 2, 5–8.
- Chickering H, Park J. 1919. *staphylococcus pneumonia*. JAMA 72:617-626
- Cowan M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev.12(4):564.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2004. National Nosocomial Infections Surveillance Report. Am J Infect Control. 32: 470-85
- De Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. Curr. Opin. Microbiol 2007;10:428–35. [PubMed: 17921044]
- Elaissi A, Rouis Z, Salem N, Mabouk S, Salem Y, Salah K, Aouni M, Farhat F, Rachid C, Harzallah-Skhiri F, Khouja M. 2012. Chemical composition of 8 eucalyptus species essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. BMC complementary and alternative medicine 12:81
- Ellof, J. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. J. ethnopharmacol. 60. 1-6
- Eftefagh K.A., Burns J.T., Junio H.A., Kaatz G.W., Cech N.B., "Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) Extracts Synergistically Enhance the Antibacterial Activity of Berberine via Efflux Pump Inhibition", *Planta Medica* 2010
- ◆ Fridkin S. 2001. Vancomycin-intermediate and Resistant *Staphylococcus aureus*: What the Infectious Disease Specialist Needs to Know. J clin Infect Dis. 32: 108-15.

- Gould S, Fielder M, Kelly A, Naughton P. 2009. Antimicrobial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by cupric sulphate against clinical isolates of *S. aureus* MRSA and PLV positive CA-MSSA. *Complementary and alternative medicine* 1472-6882/23
- Irving W, AlaÁldeen D, Boswell T. (2005). *Medical Microbiology*.
- Jansen A, Cheffer J, Svendsen A. 1987. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. *Aspects of test methods. PlantaMed.* 40, 395-398.
- Jenovs M. 1961. "Celebin"- resistant staphylococci. *BrMed* 1:134.
- Ji-Won L, Young-Ju J, Syng-Ook L, In-Seon L. 2007. Effect of *Salvia miltiorrhiza bunge* on antimicrobial activity and resistant gene regulation against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Microbiol* 45:4 350-357.
- Katayama Y, Ito T, Hiramasa K. 2000. A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chmother* 44: 1549-1555.
- Kouyos R, Klein E, Grenfell B. 2013. Hospital-Community Interactions Foster Coexistence between Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathogens*, 9 (2).
- Lambert H. 2001. Impact of bacterial resistance to antibiotics on therapy. *Br. Med. Bull* 40: 102-106.
- Lowy F. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*; 339:520-32.

- Lyon B, Skurray R. 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. Microbiol Rev 51:88-134
- Machado T, Pinot A, Pinto M, Leal I, Silva M, Amaral A. 2003. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, natural naphthoquinolones and their analogues against MRSA. Int J. Antimicrob. Agents 21:279-284
- Molina G.M, Pérez A, Bécerril P, Salazar R, Said S, Waksman N. 2006. Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. Journal of Ethnopharmacology. 109 (2007) 435-441
- Osuna Torres L. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional Mexicana para estudio etnobotánico, fotoquímico y farmacológico. PUBLICACIONES EDICIONES DE LA UNIV. DE BARCELONA
- Oskay M, Oskay D, Kalyoncu F. 2009. Activity of some plant extracts against Multidrug Resistant Human pathogens. Iranian Journal of pharmaceutical research 8(4):293-300.
- Panlilio A, Culver D, Gyness R. 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals 1975-1991. Infect Control Hosp Epidemiol 13: 582-586.
- Qiu J, Lou H, Du X, Li H, Lou M, Dong J, Chen Z, Deng X. 2010. The effects of subinhibitory concentrations of costus oil on virulence factor production in *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Microbiology 110, 333-340.
- Qiu J, Feng H, Lu J, Xiang H, Wang D, Dong J, Wang J, Wang X, Liu J, Deng X. 2010. Eugenol Reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol 76(17): 5846.

- Rao K, Sreeramulu K, Gunasekar D, Ramesh D. 1993. Two new sesquiterpene lactones from *Ceiba pentandra*. J. Nat. Prod. 56: 2041-2045.
- Ryan K and Ray C. Sherris Medical Microbiology: An introduction to Infectious Diseases. 4<sup>th</sup> Edition.
- Rojas Alba M, Solis V, Abarca A. (2009). Evaluación mediante antibiogramas del efecto bactericida de quina amarilla (*Hintonia latiflora*), estafiate (*Artemisa ludoviciana* ssp.) y Chaparro amargo (*Castela tortuosa*) en una cepa de *Salmonella typhimurium*. TlahiEdu A.C.
- Sambrook j, Russel D. RT-PCR and DNA extraction in : Molecular cloning a lab manual 2001. 3<sup>rd</sup> Edition Cold Spring harbor laboratory, Cold spring Harbor, New York pp: 8.40-8.50.
- Santos P, Oliveira A, Tomassini T. 1995. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. Rev Farm. Bioquím. 31, 35-38.
- Seukep J, Fankam A, Djeussi D, Voukeng I, Tankeo S, Noumdem J, Kuete A, Kuete V. 2013 Antibacterial activities of the methanol extracts of seven Cameroonian dietary plants against bacteria expressing MDR phenotypes. Springerplus 2: 362
- Skinner D, Keeffer C. 1941. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. Arch Intern Med 68: 851-857.
- Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. 2010. Origin and molecular evolution of the determinat of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrobial agents and chemotherapy 54 (10): 4352-9
- Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. N Engl J Med 2001; 344:11–6.

- Weller T. 2000. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be international standard? Hospinfect 44:160-172.