



Efecto bactericida de extractos de hojas de aguacate criollo (*Persea americana* var. *Drymifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Ernesto A. López-Correa | Irving Piñón-Trinidad | Miguel A. García-Moreno
| Adriana Gutiérrez-Diez | Víctor E. Aguirre-Arzola

Facultad de Agronomía | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

correo-e: veaguirre@gmail.com

Resumen

México es el centro de origen de muchas especies vegetales entre las que se encuentra el aguacate. Sin embargo, numerosos cultivares localizados en el centro de origen son únicos en el país y se subutilizan debido a numerosos factores, lo cual pone en riesgo la continuidad de la especie. Por tal motivo, para dar un uso alternativo a ese recurso vegetal, se evaluaron los extractos de hojas de 18 cultivares de aguacate de la raza mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* contra tres cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, para medir su efecto como bactericida y sobre la inhibición del *Quorum sensing*. Los 18 cultivares tuvieron efecto bactericida, de los cuales el cultivar «María Elena» presentó mayor halo de inhibición y provocó una disminución en los niveles de expresión del operón Agr en la fase estacionaria. En este trabajo se evalúa por primera vez uno de los efectos de hojas de aguacate mexicano contra una cepa multiresistente a fármacos como *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, bactericida, aguacate mexicano.

Introducción

México es el centro de origen de muchas especies vegetales como maíz, cacao, papaya, jitomate, vainilla, entre otros. Dentro de esas especies se encuentra el aguacate (*Persea americana*). En el país se cultivan variedades criollas en huertos comerciales y en traspatios, o bien se encuentran de forma silvestre. El estado de Nuevo León forma parte del centro de origen de la raza mexicana de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*).

La región es una zona montañosa que se encuentra entre Tamaulipas y Nuevo León. Los habitantes de las poblaciones cercanas utilizan de forma tradicional las hojas de los árboles de aguacate «criollo» como remedio etnobotánico contra la diarrea, la amibiasis y las enfermedades helmínticas (Acosta Díaz *et al.*, 2013). Un posible uso alternativo es el empleo de extractos de hojas del aguacate mexicano criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) como agente bactericida contra patógenos de creciente importancia.

Staphylococcus aureus ha demostrado una rápida evolución para adaptarse a los antibióticos, estas especies poseen mecanismos de resistencia a los beta lactámicos codificados en un casete cromosomal,

compuesto en general por los genes *mecA*, *mecRI*, *mecI*; sin embargo cada año se reportan variantes de este operón, lo cual demuestra la capacidad de la bacteria para resistir a nuevos fármacos (David y Daum, 2010).

Otro factor involucrado en el fenómeno de resistencia en *S. aureus* es el *Quórum sensing*. Este microorganismo desarrolla una estrategia bifásica para generar su patogenicidad. En concentraciones celulares altas, la síntesis de varios factores proteicos se reprime y comienza a secretar factores de virulencia modulados por el operón *Agr*. Dicho operón está compuesto por *AgrD*, que sintetiza el autoinductor peptídico (AIP), *AgrC* que sintetiza la histidín-quinasa encargada de transmitir la señal desde la membrana plasmática hasta la molécula reguladora de la respuesta transcripcional. *AgrA* sintetiza la molécula reguladora de la respuesta transcripcional y *AgrB* la proteína exportadora (excretora) que modifica el anillo de tiolactona del autoinductor peptídico (Roux *et al.*, 2014).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto sobre el *Quorum sensing* y el efecto bactericida de los extractos etanólicos de hojas de 18 cultivares de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) del sur del estado de

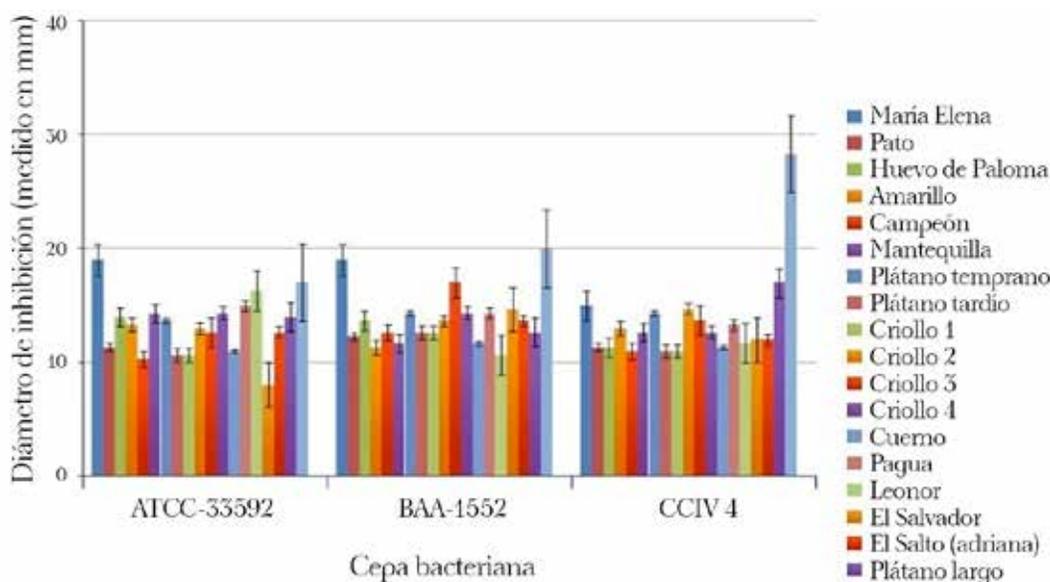


Figura 1. Diámetro de inhibición de los diferentes extractos contra tres cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (análisis de medias de Tukey, $p=0.05$).

Nuevo León sobre tres cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Metodología

Obtención de los extractos

Fueron utilizadas hojas verdes de las variedades nativas del sur del estado de Nuevo León de los municipios de Zaragoza y Aramberri. Las colectas fueron realizadas en verano. El nombre de los cultivares se basó en la denominación otorgada por los pobladores del sitio. Los cultivares evaluados fueron María Elena, Pato, Huevo de Paloma, Amarillo, Campeón, Mantequilla, Plátano temprano, Plátano tardío, Criollo 1, Criollo 2, Criollo 3, Criollo 4, Cuerno, Pagua, Leonor, el Salvador, el Salto y Plátano largo. Las hojas frescas de cada cultivar fueron secadas y tratadas con etanol al 70% por el método Soxhlet y el solvente fue evaporado con un evaporador rotatorio. Los extractos fueron esterilizados por filtración, almacenados a 4 °C y protegidos de la luz hasta su uso.

Efecto bactericida

Para este trabajo fueron usadas tres cepas de *S. aureus* resistente a meticilina: ATCC 33592, ATCC BAA-1556 y una cepa aislada de ganado bovino con mastitis (CCIV-4), todas con resistencia a meticilina. Las cepas crecieron en caldo de soya tripticacina por 18 h y se ajustó la concentración del microorganismo a 1 MacFarland, posteriormente fue inoculado en placas de agar Müller-Hinton. En cada placa se colocaron sensidiscos con 30 µl del extracto. Las placas fueron incubadas durante 24 h y posteriormente fue medido el diámetro de la zona de inhibición (Bauer *et al.*, 1966). La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida fueron determinadas por el método de microplaca de acuerdo con lo reportado por Eloff (1998).

Medición de la expresión del gen *AgrA*

Los niveles de expresión del gen *AgrA* perteneciente al operón de *Quorum sensing* de la bacteria fueron medidos con Sybr Green en un termociclador LightCycler 480 mediante cuantificación relativa, usando el RNA 16S como referencia, los primers usados fueron los siguientes: rt-*agrA*-f (AAAGTTGCAGCGATGGATTT), rt-*agrA*-r (ATGGGCAATGAGTCTGTGAG), que flanquean una región de 150 pb del gen *AgrA* y los primers rt-16S-f (CGTGGAGGGTCATTGGA) y rt-16S-r CGTTTACGGCGTGACTA) que flanquean una región de 150 pb del gen del 16S RNA (Zhao *et al.*, 2010). Las condiciones fueron 1 min a 90 °C, seguido por 40 ciclos 10 s a 90 °C, 10 s a 55 °C, 10 s a 72 °C y una curva de asociación (melting) desde 50 °C hasta 90 °C. El resultado se expresa mediante el cociente del CT del gen *AgrA* dividido entre el CT del gen 16S (Pfaffl, 2004).

Resultados y discusión

Se obtuvieron 18 muestras provenientes de cultivares diferentes, de ellas destacan los cultivares el Salto (ya que es un árbol silvestre) y María Elena (debido a que son hojas muy aromáticas). Los resultados de los halos de inhibición de los extractos por triplicado de cada uno muestran que en las tres cepas de MRSA probadas no existe diferencia significativa entre el efecto del control de kanamicina con respecto a la variedad María Elena ($p=0.004$) (figura 1). Los análisis de la expresión muestran que el extracto es capaz de minimizar la señalización por *Quorum sensing*, disminuyendo la expresión del gen *AgrA* (figura 2).

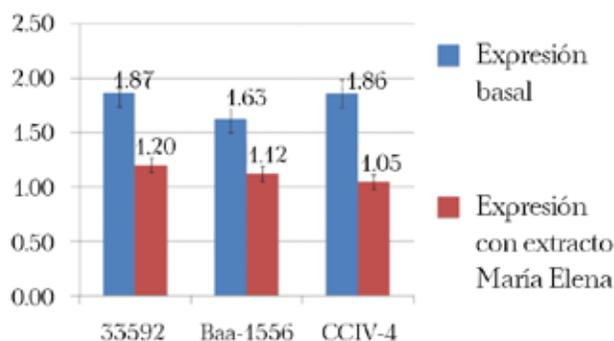


Figura 2. Análisis de la expresión del gen *AgrA* de las cepas de *S. aureus* resistente a meticilina. Las barras expresan el índice de CT *Agr*/16S. Azul: cepa sin extracto; rojo: cepa estresada con el extracto (ANOVA $p=0.05$).

Conclusiones

El análisis de los extractos con compuestos bioactivos contra cepas bacterianas resistentes a los fármacos representa una oportunidad de encontrar nuevos antibióticos en la naturaleza. En el presente trabajo, se muestra que los cultivares nativos de aguacate del sur de Nuevo León (*Persea americana* var. *drymifolia*) tienen un efecto relevante *in vitro* contra una bacteria de gran importancia agroalimentaria y de salud, con un efecto bactericida. Además, el extracto reprime significativamente la expresión del gen *Agr*. Existe evidencia de que el operón *Agr* regula la actividad de múltiples operones como *Sae*, *IcaR*, *Sar*, los cuales se conectan con la producción de toxinas, así como con la expresión de genes de adhesión. Sin embargo, también se ha observado que la baja expresión del operón *Agr* tiene un papel trascendental en la reducción de la resistencia a vancomicina en MRSA con resistencia heterogénea a vancomicina (Agah *et al.*, 2014). Lo anterior brinda la oportunidad de buscar compuestos específicos que inhiban el *Quorum sensing* de la bacteria. En este trabajo se reporta el efecto anti-*Quorum Sensing* (*Quorum quenching*) y el efecto bactericida de los extractos de *Persea americana* var. *drymifolia*.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con proyecto PAICYT clave CA-4041-11.

Referencias

- Acosta Díaz, E., Almeyda, H., Hernández, L. (2013). Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: región norte. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4:531-542.
- Agah, S., Poulos, S., Banchs, C., Faham, S. (2014). Structural characterization of MepB from *Staphylococcus aureus* reveals homology to endonucleases. *Protein Science*, 23(5):594-602.
- Bauer, A.W., Kirby W., M.M., Sherris J., C.T., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4):493.
- David, M., Daum, R. (2010). Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 23:646-687.
- Eloff, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta médica*, 64(8):711-713.
- Pfaffl, M.W. (2004). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9):e45.
- Roux, A., Todd, D.A., Velázquez, J.V., Cech, N.B., Sonenshein, A.L. (2014). CodY-Mediated Regulation of the *Staphylococcus aureus* Agr System Integrates Nutritional and Population Density Signals. *Journal of bacteriology*, 196(6):1184-1196.
- Zhao, L., Xue, T., Shang, F., Sun, H., Sun, B. (2010). *Staphylococcus aureus* AI-2 quorum sensing associates with the KdpDE two-component system to regulate capsular polysaccharide synthesis and virulence. *Infection and immunity*, 78(8):3506-3515.