

EFFECTO DE POLIFENOLES TOTALES DE HOJAS DE *Persea americana* var. *drymifolia* SOBRE CEPA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA

M.A. García-Moreno¹, M.A. De La Garza-Ramos², C.G.C. Martínez-Ávila¹, A. Gutiérrez-Díez¹, V.E. Aguirre-Arzola^{1*}

¹. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.

². Facultad de Odontología. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.

*Autor de correspondencia, veaguirre@gmail.com

Resumen

Durante décadas, las plantas de uso medicinal han sido fuente importante de compuestos bactericidas. En la medicina tradicional mexicana, las hojas de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*), se han utilizado para tratar diversos padecimientos que involucran infecciones bacterianas, siendo posible, que contengan compuestos con efectos antioxidantes, bactericidas y APQ (anti-percepción del *quórum*), que ayudan a combatir las infecciones de cepas resistentes. En plantas medicinales se han documentado moléculas con efecto APQ. En esta investigación, se determinó el efecto de los polifenoles totales de las hojas de 5 genotipos de *drymifolia*, así como su actividad APQ sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM). *S. aureus* está considerada dentro de los seis grupos bacterianos con mayores reportes de aparición de resistencia a nivel mundial, con impacto negativo en la salud humana y producción animal. Los polifenoles se obtuvieron y purificaron por extracción asistida por sonicación y columnas de Amberlita, respectivamente. Se realizó su análisis funcional y evaluaron contra cepas de SARM para determinar su efecto APQ sobre el sistema Agr. Los resultados obtenidos muestran que los polifenoles exhiben fuerte actividad bactericida. Los polifenoles del genotipo ‘María Elena’ presentaron el mayor efecto, exhibiendo una CMI de $116 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y un CMB de $133 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra la cepa SARM $\mu 3$, e inhibiendo los niveles de expresión del operón *agr* con respecto al gen constitutivo de rDNA 16S. Los polifenoles mostraron buena actividad antioxidante, identificándose además la presencia de flavonoides y saponinas. Estos resultados permiten concluir que los polifenoles extraídos de las hojas de *drymifolia*, exhiben actividad bactericida, e inhiben la expresión de genes asociados a la percepción de *quórum* de cepas de SARM; además de que presentan una buena actividad antioxidante, lo que en conjunto puede ayudar a contrarrestar las infecciones con cepas resistentes de manera más eficiente.

Palabras clave: aguacate raza mexicana, *quórum sensing*, SARM, bactericida.

Introducción

La medicina tradicional es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el tratamiento que emplea plantas medicinales, es aceptada por la comunidad debido a su bajo costo, lo importante de este tipo de tratamientos, es garantizar tanto la inocuidad como la calidad de los productos (OMS, 2006). La práctica de la medicina tradicional prevalece con el paso del tiempo por medio de la transmisión oral del conocimiento (Flores, 2008). La fitomedicina se ha vuelto un aliado para distintas naciones en el sistema integral de asistencia médica, esto se debe a que las plantas son un importante reservorio de compuestos químicos utilizados para la elaboración de medicamentos (Edeoga *et al.*, 2005).

Las plantas poseen la capacidad de sintetizar metabolitos primarios y secundarios, donde los metabolitos secundarios no influyen en procesos como fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos. Estos metabolitos secundarios se dividen en cuatro grupos principales: terpenos, compuestos fenólicos, alcaloides y glucósidos (Kozikowski *et al.*, 2003). La función de estos compuestos es muy variada, desde actividad antifúngica, antiviral, insecticida, anticancerígena, antioxidante hasta antimicrobiana, entre las cuales esta última es la más destacada (Burt, 2004; Kordali *et al.*, 2005; Sylvestre *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2009).

En México, las plantas medicinales se utilizan como recurso terapéutico recurrente debido a que los servicios médicos en zonas suburbanas y rurales son escasos o inexistentes. En regiones del estado de Nuevo León, los habitantes utilizan las hojas de aguacate “criollo” (*P. americana* var. *drymifolia*) contra infecciones estomacales, amibiasis y parásitos intestinales.

La resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos patógenos, es un problema de salud en la actualidad, esto deriva en mortandad de personas con sistema inmunológico

comprometido, como es el caso de los recién nacidos y pacientes en cuidados intensivos. Las bacterias se adaptan o generan resistencia a una velocidad alarmante frente a medicamentos comunes, así mismo, el incremento de problemas zoonóticos con patógenos multirresistentes como resultado del contacto hombre-animal, y la creación lenta y decadente de nuevas moléculas en las últimas décadas, provocan ineficacia de los tratamientos antibióticos (Soto, 2003; Domingo y López, 2003; San Martín *et al.*, 2005). Además, muchos de los tratamientos con antibióticos de origen sintético producen efectos secundarios en los pacientes, por lo que, el uso de moléculas procedentes de plantas medicinales posiblemente disminuya la aparición de estos efectos, considerando su origen natural (Akinpelu *et al.*, 2014).

Staphylococcus aureus tiene comúnmente un comportamiento inocuo en su hospedante, pero puede pasar a un estado patógeno. El hábitat donde se desarrolla incluye las mucosas nasales y superficies como la piel, esto permite que en un descenso del sistema inmunitario, invada tejidos dañados por heridas (Cervantes *et al.*, 2015). La cepa más patógena y virulenta a nivel mundial es *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), esta cepa puede causar infecciones de diferentes intensidades, debido a su capacidad de inhabilitar fármacos derivados de la penicilina y del grupo de los β -láctamicos (Cervantes *et al.*, 2014 a, b; Cervantes *et al.*, 2015). El mecanismo principal de la bacteria para causar una infección exitosa es el sistema de *Quórum sensing* (QS), lo que le permite controlar sus factores de virulencia y demás procesos celulares (Cervantes *et al.*, 2015).

En investigaciones donde se han analizado los compuestos bioactivos de las hojas de *P. americana* var. *drymifolia*, se han encontrado terpenoides y fenilpropanoides con actividad contra patógenos y herbívoros (Rincón y Espinosa, 2008). Hurtado *et al.* (2011) detectaron compuestos bioactivos del grupo de los polifenoles con una alta actividad bactericida, entre los cuales se identificaron ácidos fenólicos, flavonoides y otros derivados de flavonoides (Rincón-Hernández y Espinosa-García, 2008). Productos derivados del aguacate, poseen efectos medicinales contra parásitos, bacterias y además efectos antioxidantes y anticancerígenos. (Abe *et al.*, 2005; Dike *et al.*, 2012; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2013; Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011; D'Ambrosio *et al.*, 2011). García-Moreno *et al.* (2017) reportaron la inhibición de la expresión del gen *agrA* en cuatro cepas de *S. aureus*, dicho gen está relacionado con la expresión de factores de virulencia (O'Rourke *et al.*, 2014).

Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron a) evaluar el efecto antibacteriano de extractos polifenólicos foliares de cinco genotipos de *P. americana* var. *drymifolia* contra una cepa de MRSA y b) analizar la expresión génica inducida por los extractos polifenólicos en MRSA mediante microarreglos.

Materiales y Métodos

Muestras foliares de aguacate raza Mexicana fueron tomadas de una huerta de traspatio ubicada en el municipio de Aramberri, Nuevo León, México. Los genotipos utilizados fueron: 'Plátano', 'Cuerno', 'Plátano Temprano', 'Criollo Baldemar' y 'María Elena'. Cada muestra consistió en 10 hojas maduras sanas seleccionadas al azar por árbol por genotipo.

Para la obtención de los polifenoles, las hojas fueron desinfectadas y secadas a 50 °C durante 24 horas. Los restos vegetales fueron re suspendidos en agua estéril. Los polifenoles fueron extraídos mediante un tratamiento de sonicación a 20 Hz seguido de una purificación en cromatografía por columna de Amberlita XAD-16 con etanol como fase móvil. Los polifenoles fueron concentrados por rotavapor a 60 °C y re suspendidos en etanol.

El material bacteriano utilizado fue una cepa ATCC Rosenbach de *S. aureus* resistente a meticilina y con resistencia media a vancomicina 'MRSA cepa $\mu 3$ ' (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC®700698™). La sensibilidad de 'MRSA cepa $\mu 3$ ' a los extractos polifenólicos de cada

genotipo fue determinada mediante antibiogramas de Kirby-Bauer utilizando la metodología de Bellis (2013). Para los antibiogramas se utilizaron cajas Petri con agar Muller Hinton, así como discos de papel filtro Whatman No. 1 impregnados con los extractos polifenólicos a tres concentraciones ($0.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.015 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). El inóculo consistió en una solución bacteriana ajustada a una turbidez de 0.5 Mc-Farland con solución salina al 0.9 %, utilizando como referencia una curva de solución de BaCl_2 . El testigo negativo consistió en etanol al 70 %. Las placas Petri fueron incubadas por 24 horas a 37°C .

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se utilizaron tubos de 2 mL con caldo soya tripticasa más diferentes concentraciones de la solución de polifenoles ($50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $300 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), el volumen final se ajustó a 1 mL. Para realizar la inoculación se agregaron $100 \text{ }\mu\text{L}$ de la solución bacteriana en cada uno de los tubos. El control consistió en tubos sin el inóculo. Las muestras se incubaron por 24 horas en agitación a 37°C y 120 rpm.

Para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB), se tomaron $10 \text{ }\mu\text{L}$ del primer tubo que presentó crecimiento bacteriano así como el tubo de la concentración que no presentó crecimiento bacteriano, estas cantidades se depositaron en cajas Petri, donde se vertió agar Muller-Hinton, las cajas se incubaron a 37°C por 24 horas. La CMI fue determinada como la concentración del extracto que permitió sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo. La CMB fue definida como la concentración que no presentó crecimiento bacteriano (De Bellis, 2013). El genotipo que presentó mayor capacidad bactericida, fue utilizado para la inducción bacteriana y ensayo con microarreglos.

Para la inducción de la cepa MRSA $\mu 3$, se utilizaron dos matraces con 50 mL de caldo soya tripticasa inoculados con la bacteria e incubados a 37°C en agitación constante por cinco días. Posteriormente a un matraz se le agregó el extracto de polifenoles del genotipo con mayor capacidad bactericida, hasta concentración de $0.16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en el matraz restante se le agregó 1 mL de etanol al 70 % como control. Los matraces se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora. El contenido de los matraces se pasó a tubos para centrifugarse a 1000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante fue descartado.

Para la generación de los microarreglos, se realizó la extracción de RNA bacteriano con el estuche comercial FastRNA®Pro Green Kit (MP Biomedicals, Ohio). La síntesis de cDNA se realizó con el estuche comercial Kit ImProm II Reverse Transcription System (Promega, Wisconsin). La generación de los microarreglos fue realizada en la Unidad de Microarreglos de ADN (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

Para el análisis de los datos de los ensayos de los anntobigramas, se realizó un análisis de varianza y comparación de medias por el estadístico Tukey. El análisis se realizó por medio del paquete estadístico InfoStat v2015.

Para medir los distintos cambios obtenidos a partir de los resultados del microarreglo, fue utilizado el estadístico Z, el cual midió la diferencia en unidades de desviación estándar de la intensidad de señal calculado para cada individuo con relación a la de sus colindantes. El software de GenAriase identifica los genes expresados diferencialmente mediante el cálculo de un puntaje Z dependiente de la intensidad.

Resultados

El cultivar María Elena, presentó la mayor actividad antimicrobiana en el ensayo de Kirby-Bauer, en comparación a los otros genotipos, el halo de inhibición formado presentó un diámetro promedio de $0.993 \pm 0.3 \text{ cm}$. En la Figura 1, puede observarse los diámetros de inhibición de los polifenoles de los genotipos. Con el análisis de comparación de medias se determinó que el genotipo María

Elena posee mayor actividad antimicrobiana en comparación otros genotipos de aguacate evaluados (Cuadro 1).

En la determinación de la CMI y el CMB, se utilizaron los polifenoles del genotipo ‘María Elena’, al presentar la mayor inhibición en el ensayo de antibiograma, con resultados de 100-200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. En el Cuadro 2, se observan parte de los genes identificados del análisis de microarreglos de MRSA cepa $\mu 3$, inducido con los polifenoles del genotipo mencionado. Los genes sobre expresados obtuvieron un puntaje z de +2 o mayor, mientras que los genes sub expresados, presentan un puntaje z de -2 o menor.

Utilizando la base de datos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2016) y Aureowiki, fueron localizados los nombres de los genes y su clasificación en los grupos de procesos celulares, con base a la función que desarrollan en la bacteria.

Discusión

Varios autores han reportado la actividad bacteriana de extractos de distintas partes del árbol de *P. americana*. Akipenlu *et al.*, (2014), reportan el uso de extracto crudo de corteza del tallo y la fracción butanólica en una concentración de 25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, contra *Bacillus cereus*, logrando halos de inhibición de 10 mm y 26 mm, respectivamente. La CMI determinada fue de 0.78 and 5.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.; para la CMB el rango fue de 3.12 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ –12.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 1.25–10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Rodríguez-Carpena *et al.* (2011), utilizaron acetona para obtener extractos a partir de pulpa, cáscara y semilla de variedades de aguacate comercial, como ‘Hass’ y ‘Fuerte’, realizaron pruebas de sensibilidad de estos extractos frente a *S. aureus*, en donde el extracto de pulpa de la variedad ‘Fuerte’ obtuvo mejor resultado con una zona de inhibición de 8.93 mm de diámetro con una concentración de extracto de 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Pesewu *et al.* (2008) inhibieron MRSA aislado de una úlcera, a través de extractos de *P. americana* obtenidos con cloroformo y reconstituidos en etanol al 80 %. El árbol de aguacate era proveniente de Ghana, donde es considerado como planta medicinal. Con una concentración de extracto de 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, presentó una zona de inhibición de 24 mm, además, para este extracto se obtuvo una CMI de 6.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una CMB de 25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ortega *et al.* (2011), obtuvieron una zona de inhibición de 3.77+ 0.49 mm de diámetro, al utilizar éter etílico para extractos de semilla de la variedad comercial de ‘Hass’ contra *S. aureus*.

Existen diferencias claras entre los resultados revisados y lo obtenido en esta investigación, que pueden variar dependiendo de la parte del árbol de la que se obtienen los extractos, hasta el método y tipo de solvente para la extracción de los compuestos bioactivos. Siendo así, el extracto desarrollado por Pesewu *et al.* (2008), el que se asemeja a los resultados obtenidos en este trabajo, sin embargo los extractos de hojas de aguacate de la variedad *drymifolia*, poseen una actividad antimicrobiana mayor.

Además de la actividad bacteriana se observó modulación génica en la cepa de MRSA $\mu 3$, afectando en una sub expresión y sobre expresión de diversos grupos de genes. Este efecto se puede deber a los tipos de compuestos que están presentes en las hojas de aguacate raza mexicana. Castro-López *et al.* (2019), analizaron los compuestos bioactivos de hojas de aguacate variedad *drymifolia* de 7 genotipos, donde encontraron moléculas pertenecientes al grupo de ácidos fenólicos y flavonoides, resaltando la importancia de estos compuestos para el desarrollo de nuevos tratamientos farmacéuticos. Akinpelu *et al.* (2014), reportan la presencia de compuestos orgánicos en extractos y la fracción butanólica de *P. americana* como alcaloides, taninos, saponinas y azúcares reductores. La presencia de estos compuestos, en los extractos obtenidos, son conocidos por ser biológicamente activos y contribuir a las actividades antimicrobianas y antioxidantes (Wojdyło *et al.*, 2013; Legua *et al.*, 2013.; Sharma *et al.*, 2011). García-Moreno *et al.* (2017)

realizaron el análisis fitoquímico de extractos etanólicos de hojas de aguacate de la variedad *drymifolia*, donde se detectaron flavonoides totales correspondientes al 54 % de los polifenoles totales del extracto. La presencia de estos compuestos en las plantas medicinales permite inhibir la comunicación bacteriana (anti- *quórum sensing*) contribuyendo a evitar infecciones por parte de patógenos y en la disrupción de mecanismos y procesos asociados a la célula (Aliyu *et al.*, 2016; Sheng *et al.*, 2015). Dentro de las funciones celulares moduladas, se destacan genes asociados a la virulencia y patogenicidad de la bacteria, a la formación de biopelículas, bombas de flujo, síntesis de proteínas, estabilidad de la membrana y polisacáridos de la membrana.

Dos componentes esenciales en la patogenicidad de *S. aureus*, son el gen *Kpdc* y el operón *agr*. El primer gen codifica una proteína integral de la membrana, sensor y bomba de flujo de iones K^+ , esto resulta en un desequilibrio de la membrana por la falta de detección de estos iones, además, también un efector independiente en la expresión de genes de virulencia, al interactuar con el segundo gen (Xue *et al.*, 2011). El operón está conformado por cuatro componentes (*agrA*, *agrB*, *agrC* y *agrD*), que forman un sistema regulador bifásico del *quórum sensing* de *S. aureus*, estos componentes se encuentran de igual manera sub-expresados. Esta interrupción de señal inhibe la comunicación con las demás bacterias circundantes. El gen *RNAIII* está asociado con el operón *agr*, encargado el despliegue de factores de virulencia como las enterotoxinas, relacionadas a los procesos de infección; al estar en condición de sub-expresión, por no presentarse el efector *AgrA* que lo activa, se evita el despliegue de genes de virulencia (Chevalier *et al.*, 2010).

Los flavonoides y los polifenoles poseen distintos mecanismos de acción que afectan las funciones bacterianas, como el transporte de proteínas en membrana, desestabilidad a la membrana, provocando una mayor permeabilidad (Lamb y Cushnie, 2005). También en esta condición se encuentran los genes *capO* y *capD*, que codifican para el polisacárido incorporado a la membrana bacteriana, esto están asociados a la colonización del patógeno (Xue *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2014), esto beneficia anulando la implantación de la bacteria a superficies del hospedero. Las bombas de flujo *norA* y *norB*, son parte de los factores de resistencia en MRSA (Piddok, 2006), en el análisis de microarreglos, como anteriormente se mencionó, están en una condición de sub expresión, con lo cual, esto podría indicar, una vía de “sensibilización” a los antibióticos por parte de los compuestos contenidos en los extractos de hojas de aguacate mexicano.

Los componentes fitoquímicos de la variedad *drymifolia*, provocaron la sobre expresión de componentes celulares en respuesta a la desestabilidad homeostática de MRSA cepa $\mu 3$. Dentro de este grupo, el gen para la proteína ChB (QuitinosaB), tiene la función de modular la superficie de membrana así, como la formación de biofilm (Chung *et al.*, 2014). Esto resulta en respuesta a la exposición de los polifenoles, donde la bacteria intenta protegerse de los compuestos bioactivos. Además, genes adicionales para mantener el equilibrio de la membrana como el gen *AcpD*, encargado en la síntesis de ácidos grasos y fosfolípidos, pueden ser resultado de la disrupción de la membrana celular, aunado a la represión de genes asociados al transporte de iones que mantiene la presión osmótica de la célula (Gardete *et al.*, 2012). Esta desestabilidad de la membrana también se refleja en el gen *ecsA*, el cual pertenece al transportador de casete (ABC) unido a ATP, que tiene como función en la membrana además de transportador, dar estructura a la membrana (Jonsson *et al.*, 2010). Estos genes están sobre expresados a causa por los compuestos fenólicos contenidos en los extractos. Estos fitoquímicos, actuaron en el sistema bacteriano asociado a la membrana lo cual probablemente, provoque la lisis de la bacteria por la disrupción de la membrana celular.

La bacteria sobre expresó otros genes asociados a patogenicidad, el gen *gloA*, que codifica para la proteína de resistencia glyosa/bleomicina (SAUPAN001874000-AureoWiki, 2016), así como el gen *bleO* que codifica para la proteína de resistencia a bleomicina (Cheng *et al.*, 2016), esto es señal de como la bacteria intenta degradar los componentes bioactivos de los extractos de aguacate

drymifolia. Un gen de gran importancia en factores de virulencia es *sarA*, otro efector del sistema *agr*, pero como se menciona anteriormente, está bloqueado completamente, irrumpiendo la comunicación bacteriana (*quórum*) (Snowden *et al.*, 2013); este proceso estaría provocando que la bacteria tenga un gasto de energía y producción de moléculas señal que no podrán ser traducidas y efectuar el mensaje.

Como ya se mencionó, esta sobre expresión de genes es debido a la disrupción de la membrana celular, esto puede resultar en la eliminación de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos, pero además, ocurre una sub expresión del gen *mecRI*, sensor activador, que se encuentran en el cassette cromosomal móvil (SCCmec) de MRSA (Peacock y Paterson, 2015). *MecRI*, permite la activación de *mecA*, responsable de la resistencia antibiótica que le permite la biosíntesis de la pared celular, el blanco de antibióticos β -lactámicos. Este gen presentó un puntaje z de -1.987535, con lo cual, esto apunta que los polifenoles, no solo afectan la resistencia de MRSA por medio del daño a la membrana, sino también, por medio de la expresión de la resistencia a los antibióticos por los cuales MRSA es normalmente invulnerable. Otro gen de gran importancia es el *Clp*, que se encarga de la degradación de proteínas. En este caso se menciona que, si la expresión de este gen no es controlada, produce la autólisis de la bacteria (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005), lo cual es un mecanismo muy efectivo para la eliminación de la bacteria patógena, posiblemente sin generar resistencia alguna.

Conclusión

El extracto etanólico obtenido del genotipo ‘María Elena’ presentó el mayor efecto inhibitorio y modulador génico del desarrollo de MRSA cepa $\mu 3$, estableciendo la importancia del uso etnobotánico de los árboles de aguacate de la raza mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*). Visto de ésta manera los genotipos de aguacate raza mexicana, se convierten en un reservorio de compuestos bioactivos invaluable, por los efectos potenciales antimicrobianos que poseen las hojas de estos. En esta investigación, se presentó un alto poder bactericida en concentraciones muy bajas en comparación con lo reportado en la literatura; además, presentaron un efecto modulante en la expresión génica de MRSA, lo que abre la posibilidad a la creación de tratamientos que eliminen patógenos multirresistentes, mediante la sensibilización a los antibióticos o por la lisis de la célula bacteriana, debido a la activación o inactivación de distintas funciones biológicas importantes. De igual manera es importante hacer un análisis fitoquímico de este cultivar y determinar los polifenoles presentes en el extracto formulado

Referencias

- Abe F., Nagafuji S., Okawa M., Kinjo J., Akahane H., Ogura T., Martinez-Alfaro M.A. Reyes-Chilpa R. (2005). Trypanocidal constituents in plants 5. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. Biol. Pharm. Bull. 28, 1314-1317.
- Akinpelu, D., Aiyegoro, O., Akinpelu, O., y Okoh, A. (2014). Stem Bark Extract and Fraction of *Persea americana* (Mill.) Exhibits Bactericidal Activities against Strains of *Bacillus cereus* Associated with Food Poisoning. Molecules, 20, 1, 416-429.
- Brötz-Oesterhelt, H., Beyer, D., Kroll, H., Endermann, R., Ladel, C., Schroeder, W., Hinzen, B., Raddatz, S., Paulsen, H., Henninger, K., Bandow, J. E., Sahl, H., Labischinski, H. (2005). Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. Nature Medicine. 11, 10, 1082-1087.
- Burt, S. (2004) .Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223–253.

- Castillo J, I., González, V., Jaime A, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 2, 402-405.
- Castro-López, C., Bautista-Hernández, I., González-Hernández, M. D., Martínez-Ávila, G., Rojas, R., Gutiérrez-Díez, A., Medina-Herrera, N., Aguirre-Arzola, V. E. (2019). Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Leaf Purified Hydroalcoholic Extracts from Seven Mexican *Persea americana* Cultivars. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24, 1, 173.
- Cervantes E., García R., Salazar P. (2014b). Importancia de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. *Rev Latinamer Patol Clin.* 61,196-204.
- Cervantes, E., García, R., Salazar, P. 2014a. Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinamer Patol Clin.* 61, 28-40.
- Cervantes, E., García, R., Salazar P. (2015). *Staphylococcus aureus* asociado a la comunidad (CA-MRSA). *Revista Latinoamericana De Patología Clínica*, 62, 2, 100-111.
- Chan, Y., Kim, H., Schneewind, O., Missiakas, D. (2014). The capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus* is attached to peptidoglycan by the LytR-CpsA-Psr (LCP) family of enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 22, 15680-15690.
- Cheng, J., Zhao, L., Fu, G., Zhou, W., Sun, Y., Zheng, P. (2016). A novel strategy for protein production using non-classical secretion pathway in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact*, 15(1).
- Chevalier, C., Boisset, S., Romilly, C., Masquida, B., Fechter, P. (2010) *Staphylococcus aureus* RNAlII Binds to Two Distant Regions of coa mRNA to Arrest Translation and Promote mRNA Degradation. *PLoS Pathog* 6(3): e1000809.
- Chung, M., Dean, S., Marakasova, E., Nwabueze, A., van Hoek, M. (2014). Chitinases are negative regulators of *Francisella novicida* biofilms. *PLoS ONE*. 9, 3, pp.93-119.
- D'Ambrosio, S.M., Han, C., Pan, L., Kinghorn, A.D., Ding, H. (2011). Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 465-469.
- De Bellis, L. (2013). Evaluación de la actividad de extractos y aceites vegetales de plantas de la región contra *Proteus mirabilis* uro-patogénico. Departamento de Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo-Uruguay.
- Dike, I.P., Obembe, O.O., Adebisi, F.E. (2012). Ethnobotanical survey for potential anti-malarial plants in south-western Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* 144, 618-626.
- Domingo, D.; López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Española Quimioterapia*. 16, 4, 385-393.
- Edeoga, J.H.O.; Okwu, D.E.; Mbaebie, B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.* 4, 685-688.
- Flores, A. (2008). Conflictos en el empleo de Medicina Tradicional. *Región y Sociedad*. Vol. XX, 43, 213- 217.
- García-Moreno, M.A, de la Garza-Ramos, M.A., Martínez-Ávila, C.G.C., Gutiérrez-Díez, A., Ojeda-Zacarias, Ma. del C. y Aguirre-Arzola, V.E. 2017. Inhibición de la expresión del sistema agr de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina mediante el uso de polifenoles totales de hojas de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*). *Nova Scientia* ISSN 2007 - 0705, 9, 18, 200 – 221.

- Gardete, S., Kim, C., Hartmann, B., Mwangi, M., Roux, CM. (2012). Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain of Clonal Type USA300. PLoS Pathog. 8,(2): e1002505.
- Hurtado, E., Carrasco, A., Fernández, A. (2011). Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS method for the determination of phenolic metabolites from avocado (*Persea americana*). J. Agric. Food Chem., 59, 6, 2255-2267.
- Jiménez-Arellanes A., Luna-Herrera J., Ruiz-Nicolás R., Cornejo-Garrido J., Tapia A., Yépez-Mulia L. (2013). Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. BMC Complement. Altern. Med. 13: 109. Documento en línea. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/109>.
- Jonsson, I., Juuti, J., François, P., AlMajidi, R., Pietiäinen, M. (2010). Inactivation of the Ecs ABC Transporter of *Staphylococcus aureus* attenuates virulence by altering composition and function of bacterial wall. PLoS ONE 5(12): e14209.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracuncululus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracuncululus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 9452–9458.
- Kozikowski, A., Tückmantel, W., Böttcher, G., Romanczyk, L. (2003). Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 4.1 Synthesis of Trimeric, Tetrameric, Pentameric, and Higher Oligomeric Epicatechin-Derived Procyanidins Having All-4 β ,8-Interflavan Connectivity and Their Inhibition of Cancer Cell Growth through Cell Cycle Arrest1. The Journal of Organic Chemistry, 68, 5, 1641-1658.
- Lamb A.J, Cushnie T.P. (2005) Errata for “Antimicrobial activity of flavonoids”. Int J Antimicrobial Agents. 26, 343-356.
- Legua, P., Serrano, M., Melgarejo, P., Valero, D., Martínez, J., Martínez, R., Hernández, F. (2013). Quality parameters, biocompounds and antioxidant activity in fruits of nine quince (*Cydonia oblonga* Miller) accessions. Scientia Horticulturae, 154, 61-65.
- O'Rourke, J.P, Daly, S.M, Triplett, K.D, Peabody, D., Chackerian, B. (2014). Development of a Mimotope Vaccine Targeting the *Staphylococcus aureus* Quorum Sensing Pathway. PLoS ONE 9(11): e111198.
- Ortega, N., Benitez-Campo, N., Cabezas-Fajardo, F. (2011). Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de zonas climáticas del Departamento del Cauca. Rev Bio Agro 2011; 9, 1, 8-16.
- OMS. (2006). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- Peacock, S., Paterson, G. (2015). Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Annu Rev Biochem. 84, 577–601.
- Pesewu, G., Cutler, R., Humber, D. (2008). Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. Journal of Ethnopharmacology, 116, 1, 102-111.
- Piddock L. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev. 19, 382-402.
- Rincón-Hernández, C.A., Espinosa-García, F.J. (2008). Relationship between the phytochemical diversity in creole avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) leaves and the incidence of foliar gall psyllid (*Trioza anceps*). Allelopathy Journal, 21, 175-182.

- Rodríguez-Carpena J. G., Morcuende D., Andrade M. J., Kylli P., Estévez M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5625-5635.
- San Martín, B.; Bravo, B.; Borie, C. (2005). Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. *Arch. Med. Vet. (Chile)*. 37, 2, 117-123.
- Sharma, R., Joshi, V., Rana, J.C. (2011). Nutritional composition and process sed products of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 2, 354-357.
- Sheng, J., Chen, T., Tan, X., Chen, T., Jia, A. (2015). The *quorum-sensing* inhibiting effects of stilbenoids and their potential structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 22, 5217-5220.
- Snowden, J., Beaver, M., Beenken, K., Smeltzer, M., Horswill, A., Kielian, T. (2013). *Staphylococcus aureus* sarA Regulates Inflammation and Colonization during Central Nervous System Biofilm Formation. *Plos ONE*, 8(12), e84089.
- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Nagau, F., Legault, J. (2006). Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology*. 103, 99–102.
- Wojdylo, A., Ozmianski, J., Bielicki, P. (2013). Polyphenolic composition, antioxidant activity, and polyphenol oxidase (PPO) activity of quince (*Cydonia oblonga* Miller) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 2762-2772.
- Xue, T., You, Y., Hong, D., Sun, H., Sun, B. (2011). The *Staphylococcus aureus* KdpDE Two-Component System Couples Extracellular K⁺ Sensing and Agr Signaling to Infection Programming. *Infection and Immunity*, 79, 6, 2154-2167.

Cuadro 1. Análisis estadístico de los halos de inhibición de las cinco variedades, comparación de medias por Tukey.

Variedad	Medias	N	E.E	
Plátano	0.49	15	0.05	A
Cuerno	0.57	15	0.05	A
P. Temprano	0.63	15	0.05	A
Criollo	0.63	15	0.05	A
María Elena	0.99	15	0.05	B

$P > 0.01$, N: tamaño de la muestra, E.E: error estándar.

Cuadro 2. Grupos principales de genes afectados por los polifenoles de aguacate mexicano. Están clasificados por distintos grupos en base a su actividad en el sistema bacteriano

Función celular	Genes sub expresados Puntaje z >-2	Genes sobre expresados Puntaje z <+2
Bombas de flujo	<i>mnhF</i> (transporte de iones Na ⁺ y K ⁺), <i>norA</i> y <i>norB</i>	
Biofilm	Operón <i>Vra</i>	
Síntesis de proteínas	<i>rpl7AE</i> , <i>nfB</i>	
Estabilidad de membrana	<i>Kpdc</i> sensor de iones K ⁺	<i>ChB</i> , <i>AcpD</i> , <i>ecsA</i>
Factores de virulencia	Operón <i>agr</i> , <i>RNA III</i> , <i>mecR1</i> *	<i>gloA</i> , <i>bleO</i> , <i>clp</i> , <i>sarA</i>
Polisacárido de la membrana	<i>capO</i> <i>capD</i>	

**mecR1* obtuvo un puntaje z de -1.98, pero por su importancia médica se añadió al conjunto de genes.

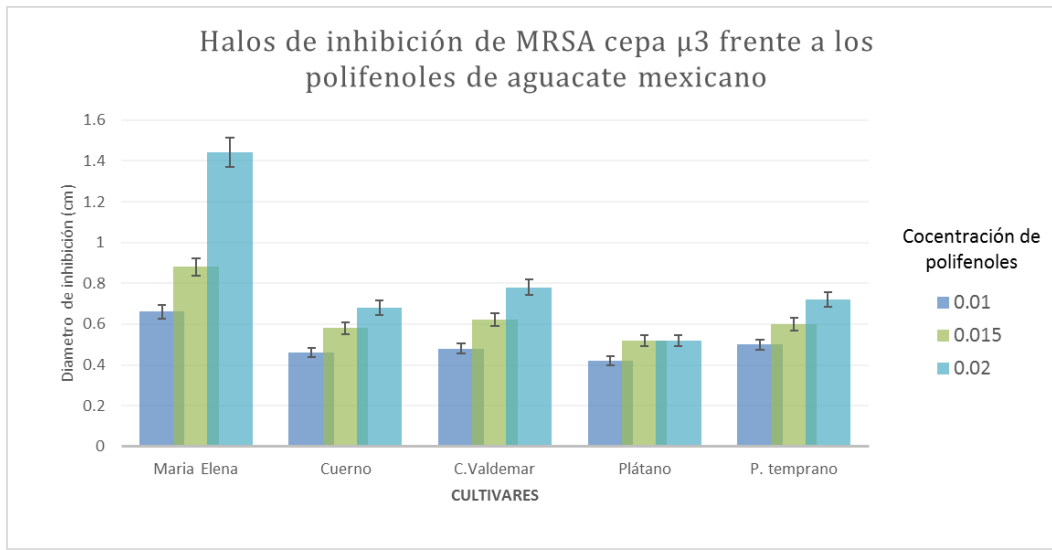


Figura 1. Gráfico de los halos de inhibición (cm) de MRSA cepa $\mu 3$ frente a los polifenoles totales de los extractos de hojas de aguacate mexicano en tres concentraciones distintas ($0.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.015 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).