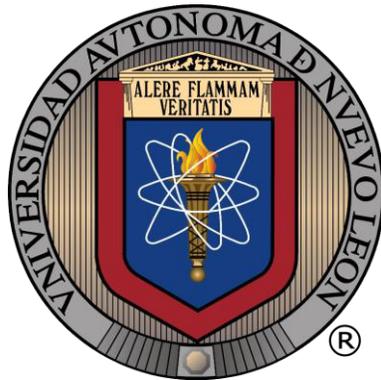


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

EFFECTO DE LOS POLIFENOLES DE LAS HOJAS DE AGUACATE MEXICANO

(*Persea americana* var. *drymifolia*) EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE

***Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA**

PRESENTA

Q.B.P MIGUEL ÁNGEL GARCÍA MORENO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

FEBRERO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

EFFECTO DE LOS POLIFENOLES DE LAS HOJAS DE AGUACATE MEXICANO

(*Persea americana* var. *drymifolia*) EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE

***Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA**

PRESENTA

Q.B.P MIGUEL ÁNGEL GARCÍA MORENO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

FEBRERO 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

EFFECTO DE LOS POLIFENOLES DE LAS HOJAS DE AGUACATE MEXICANO

(*Persea americana* var. *drymifolia*) EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE

***Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA**

PRESENTA

Q.B.P MIGUEL ÁNGEL GARCÍA MORENO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

FEBRERO 2017

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR
COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
COMITÉ PARTICULAR

Dr. Víctor Eustorgio Aguirre Arzola
Director

Dr. Guillermo Cristian G. Martínez Ávila
Co-Director

Dra. Adriana Gutiérrez Díez
Asesora

Dra. Ma. Del Carmen Ojeda Zacarías
Asesora

Dra. Adriana Gutiérrez Díez
Subdirectora de Posgrado e Investigación

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida y darme a los padres que hoy tengo.

Por la mujer que colocó en mi camino uniendo nuestras vidas, luchando contra dificultades y barreras.

Y Para mi nueva familia que me acogió dándome todo su cariño y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a todo el apoyo proporcionado por parte del Dr. Víctor E. Aguirre Arzola, estos dos años de carrera. Con su forma de guiar tan particular, obteniendo lo mejor de mí y haciéndome crecer constantemente, que sin importar las situaciones, logramos el objetivo principal ante tantos obstáculos. Espero que las expectativas que tenía, hayan sido superadas con lo logrado hasta hoy.

A mis maestros asesores Dr. Cristian Martínez, Dra. Adriana Gutierrez y Dra. Carmen Ojeda por brindarme la ayuda necesaria, en la obtención de un trabajo de calidad a la altura de un Posgrado.

Para el Dr. Jorge Ramírez, encargado de la Unidad de Microarreglos de ADN del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por apoyarnos con los datos obtenidos del experimento con el microarreglo.

A los compañeros de Laboratorio, Jesús Esquivel, Guadalupe Medina, Dolores (Lolis) González, Nidia Vázquez, Josué Martínez. A los compañeros de licenciatura: Edith González, Jaziel Valdez, Cecy Castro por apoyarme en mi investigación aportando de sus conocimientos.

Al señor Baldemar Villanueva por proporcionarme el material vegetal, para la realización de tan increíble investigación.

A aquellas personas, que estuvieron involucrados en mi carrera y que de algún modo aportaron algo esencial, ya sea, en conocimiento o apoyo moral.

ÍNDICE DE CONTENIDO	Página
INDICE DE CUADRO	xi
INDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xvi
1. INTRODUCCIÓN	18
2. REVISIÓN DE LITERATURA	23
2.1 El aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.)	23
2.1.1 Taxonomía del aguacate	23
2.1.2 Razas o grupos ecológicos	23
2.1.3 Distribución geográfica de <i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	24
2.1.4 Descripción botánica del aguacate de raza Mexicana (<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	25
2.1.5 Caracterización química foliar de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	25
2.2 Metabolitos secundarios de origen vegetal	26
2.2.1 Metabolitos secundarios contra bacterias patógenas	26
2.2.2 Obtención de metabolitos secundarios de material vegetal	27
2.3 Caracterización de compuestos fenólicos por medio de Cromatografía Líquida de alto rendimiento (UPLC)	28
2.4 Resistencia bacteriana	29
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.5.1 <i>S. aureus</i> resistente a metilina (MRSA)	30
2.6 Microarreglos	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37

3.1	Recolecta de material vegetal	37
3.1.1	Extracción de polifenoles	38
3.1.2	Purificación de polifenoles	39
3.2	Preparación de extractos etanólicos para ensayos	40
3.3	Material biológico bacteriano	41
3.4	Ensayos microbiológicos	41
3.4.1	Antibiograma Kirby-Bauer	41
3.4.2	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	42
3.4.3	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	43
3.4.4	Ensayo de sensibilidad a los antibióticos β -lactámicos de MRSA cepa μ 3 por medio de los polifenoles de hojas de aguacate mexicano	44
3.5	Preparación del material genético para el análisis de microarreglos	45
3.5.1	Inducción de la cepa MRSA cepa μ 3 con los extractos etanólicos de hojas de aguacate	45
3.5.2	Obtención y preparación del RNA total de la cepa control e inducida por los polifenoles	46
3.5.3	Análisis de Microarreglos	47
3.5.4	Preparación de la sonda y la hibridación de microarreglos	47
3.5.5	Adquisición y análisis de imágenes de matriz de datos	48
3.5.6	Análisis de datos del microarreglo	48
3.6	Ensayo para la comprobación de la expresión de <i>agrA</i> mediante qPCR	48
3.6.1	Preparación del cDNA para qPCR con Syber Green	50

3.7	Ensayos fitoquímicos	52
3.7.1	Capacidad captadora de DPPH	52
3.7.2	Detección de Taninos condensados	52
3.7.3	Flavonoides totales	52
3.7.4	Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'azinobis-(3 etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)	53
3.7.5	Detección de Saponinas	53
3.7.6	Caracterización fitoquímica de los polifenoles totales del cultivar María Elena mediante UPLC-Q-TOF-MS^E	53
3.8	Análisis estadístico	54
4.	RESULTADOS	56
4.1	Extracción de polifenoles de hojas de aguacate mexicano	56
4.2	Antibiograma de sensibilidad (Kirby-Bauer) de MRSA cepa μ3 frente a los polifenoles de hojas de los cinco cultivares de aguacate	56
4.2.1	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)	57
4.2.2	Ensayo a la sensibilidad a antibióticos por inducción de los polifenoles de aguacate	57
4.3	Análisis de microarreglos	59
4.4	Ensayo para la expresión de <i>agrA</i> por medio de qPCR punto final de cuatro cepas de MRSA.	65
4.5	Detección fitoquímica	67
4.6	Detección de los polifenoles de hojas de aguacate mediante UPLC- QTOF/MS^E	68

5. DISCUSIÓN	72
6. CONCLUSIONES	89
7. BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Secuencia de los iniciadores requeridos para la medición de la expresión de <i>agrA</i> y un gen “housekeeping” o constitutivo (16s) para qPCR.	51
2	Protocolo de las condiciones requeridas para la amplificación del gen <i>agrA</i> de MRSA.	51
3	Clasificación en dependencia de la altura de la espuma para las saponinas.	53
4	Análisis estadístico de los halos de inhibición de las cinco variedades, comparación de medias por Tukey.	57
5	Análisis estadístico de los halos de inhibición de los tratamientos para la sensibilidad de antibióticos, comparación de medias por Tukey.	59
6	Resultado del puntaje z de los genes sobre expresados (<2) de MRSA cepa $\mu 3$ mediante la comparación de la condición control (Cy3) y la condición experimental (Cy5) y el Id de identificación del gen correspondiente.	60
7	Resultado del puntaje z de los genes sub expresados (>-2) de MRSA cepa $\mu 3$ mediante la comparación de la condición control (Cy3) y la condición experimental (Cy5) y el Id de identificación del gen correspondiente.	62
8	Cuantificación de la cantidad relativa de RNA, para la expresión del gen <i>agrA</i> en MRSA cepa $\mu 3$.	66
9	Fitoquímica de los compuestos presentes en el extracto del cultivar	68

	María Elena.	
10	Capacidad de captación de radical DPPH* y capacidad antioxidante del radical ABTS* de los compuestos presentes en el extracto del cultivar María Elena.	68
11	Señal MS observada para los 12 compuestos contenidos el extracto de hojas de aguacate cultivar María Elena en polaridad de iones negativos.	70
12	Identidad tentativa de las 12 señales MS ([M-H]-), encontradas en los extractos de hojas de aguacate mexicano (<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>) con base a una revisión de literatura.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Región del municipio de Aramberri, municipio que se encuentra al sur del estado de Nuevo León, México.	25
2	Diferencia entre cassette cromosómicos de <i>S. aureus</i> . a) Cassette cromosómico de <i>S.aureus</i> asociado a hospitales. b) Cassette cromosómico de <i>S.aureus</i> asociado a comunidad.	33
3	Representación esquemática del sistema bifásico (operón <i>agr</i>) de <i>S. aureus</i> .	34
4	Análisis de microarreglos de cDNA de fluorescencia de doble color.	35
5	Mapa indicando la zona en la cual fue realizada la recolección de material vegetal para la realización de los ensayos en la investigación presente.	37
6	Muestra colocada en baño sónico para la liberación de los polifenoles de las células vegetales.	39
7	Filtración de la solución acuosa, para la eliminación de las partículas de material vegetal.	39
8	Purificación de los polifenoles de las hojas de aguacate en columna de resina (XAD-16).	39
9	Recuperación de los polifenoles de hojas de aguacate en recipiente.	39
10	Eliminación del solvente mediante rotavapor, para la obtención de los polifenoles.	40

11	Extractos etanólicos de hojas de aguacate mexicano.	40
12	Método de inoculación de la bacteria sobre las placas Petri con agar Muller-Hinton.	42
13	Distribución de los sensi-discos con polifenoles en las placas Petri con la bacteria inoculada 24 horas después.	42
14	Esquema de lectura para la determinación del CMI y el CMB de los polifenoles de hojas de aguacate mexicano.	44
15	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 (0.01mg, 0.015mg, 0.02mg).	56
16	Imágenes de los resultados de los ensayos del CMI y CMB del cultivar María Elena.	58
17	Gráfico del ensayo de sensibilidad a antibióticos promovido por la exposición de los polifenoles de aguacate (cultivar María Elena) en MRSA cepa $\mu 3$.	59
18	Gráfica de los genes afectados por los polifenoles de aguacate mexicano. Están clasificados por distintos grupos en base a su actividad en el sistema bacteriano. (Genes sub expresados puntaje Z -2 color azul; genes sobre expresados puntaje Z +2, color verde).	65
19	Curva de <i>Melting</i> de la expresión de agrA de MRSA cepa $\mu 3$, de la muestra control (etanol 70%) y la muestra inducida por el extracto del cultivar María Elena. El gen16S, fue utilizado como	66

“housekeeping”.

20	Grafico de barras de la expresión del gen <i>agrA</i> de las cuatro cepas de MRSA expuestos a los polifenoles de aguacate mexicano (cultivar María Elena).	67
21	Cromatograma obtenido mediante una ionización en modo negativo ([M-H] ⁻) de los extractos de las hojas de aguacate mexicano cultivar María Elena.	69
22	Estructura fenólica común de flavonoides, flavan, la numeración de sus átomos de C y nombres de sus anillos.	82
23	Estructura de las catequinas y epicatequinas.	83

RESUMEN

En nuestros días, la salud humana y animal se ve afectada por enfermedades generadas por microorganismos patógenos, que cada día, aumentan su resistencia ante los antimicrobianos más recientes, como es el caso de *S. aureus* resistente a meticilina. Se han estado realizando investigaciones alrededor de los metabolitos secundarios de las plantas medicinales debido a sus propiedades antimicrobianas. En Nuevo León, se tiene conocimiento que la zona sur del Estado, forma parte del centro de origen del aguacate raza Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*), punto en el cual los habitantes utilizan las hojas como remedio etnobotánico contra enfermedades causadas por patógenos.

El objetivo fue determinar las propiedades, mecanismos y compuestos contenidos que le confieren actividad antimicrobiana a los polifenoles obtenidos de hojas de aguacate mexicano del sur del Estado de Nuevo León.

Los polifenoles de aguacate, fueron utilizados en ensayos microbiológicos contra MRSA cepa $\mu 3$. Además, por medio de microarreglos fue analizado el comportamiento de expresión genética inducido por los polifenoles. Posteriormente, la identificación de dichos compuestos, fue lograda por medio de ensayos fitoquímicos y de caracterización por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas.

La actividad antimicrobiana, fue positiva contra MRSA cepa $\mu 3$, presentando un CMI 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un de CMB de 100 - 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Los datos obtenidos del microarreglo, demuestran una modulación celular en mecanismos como la

comunicación bacteriana, síntesis de proteínas, síntesis de membrana celular y factores de virulencia. Los compuestos contenidos en los extractos, pertenecen la familia de los flavonoides en su mayoría, derivados de catequina apigenina y quercetina; además, de encontrarse perseitol, comúnmente presente en aguacate.

Los árboles de aguacate raza Mexicana, pueden ser considerados un reservorio importante de Bio-moléculas con propiedades antimicrobianas a nivel de modulación celular.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad hay un gran número de microorganismos, que poseen la capacidad de resistir múltiples tratamientos antimicrobianos, esto deriva en la ineffectividad para combatir patógenos que transfieren enfermedades de importancia en la salud pública (Senok *et al.*, 2012).

La resistencia antimicrobiana, permite a la bacteria evadir el efecto de algún antibiótico; provocado, por cambios en la bacteria que reduce o elimina el mecanismo de acción del antimicrobiano o cualquier compuesto con la finalidad de evitar o advertir alguna infección. La capacidad de resistencia antimicrobiana, puede lograrse mediante el camino de la selección natural o más recurrido hoy en día, por el usos inadecuado de los compuestos antimicrobianos (De la Fuente *et al.*, 2016).

Dentro de los microorganismos que poseen una amplia gama de mecanismos para sobrevivir a los antimicrobianos se encuentra *Staphylococcus aureus*; el cual es un microorganismo considerado tanto comensal como patógeno. Una colonización por parte de esta bacteria, proporciona un reservorio mediante el cual puede implantarse cuando las defensas del huésped están bajas. De tal forma que esto produce la transmisión de la bacteria entre los individuos de hospitales y de la comunidad (Pahissa, 2009; Crossley *et al.*, 2009). *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) es un causante principal de infección bacteriana que puede variar su severidad en el hospedero que habita. La mayor parte de estas cepas, poseen la resistencia a una gran variedad de antibióticos β -lactámicos (Cervantes *et al.*, 2014 a; Cervantes *et al.*, 2014 b).

Abundantes investigaciones realizadas en distintas regiones del planeta, demuestran que las plantas medicinales son un importante punto de partida en el descubrimiento de nuevos fármacos, tanto así que aproximadamente el 25% de los medicamentos prescritos mundialmente son de origen vegetal, y de los restantes, un significativo número son obtenidos por síntesis a partir de precursores naturales (Rates, 2001; Gurib-Fakim, 2006). Estos precursores son conocidos como metabolitos secundarios, que pueden ser del grupo de ácidos fenólicos, flavonoides, taninos (Stalikas, 2007). La función de estos compuestos es muy variada, entre la cual destaca su poder antimicrobiano (Castillo *et al.*, 2009).

México es considerado como centro de origen del aguacate. En el caso de la raza Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*) evidencias de aguacate primitivos en áreas de la Sierra Madre Oriental del Estado Nuevo León demuestran que el Estado es el centro de origen de la misma (Sánchez, 1999). En Nuevo León aún es posible encontrar plantas silvestres de *P. americana* que forman parte de la vegetación, cuyas características son contrastantes a las variedades mejoradas que se cultivan en diferentes sistemas agrícolas y de forma intensiva, tanto en huertas familiares como de traspatio. (Gutiérrez *et al.*, 2009). Las personas que habitan en los pueblos cercanas a la región, de forma tradicional, utilizan las hojas de aguacate “criollo” (*P. americana* var. *drymifolia*) como remedio medicinal contra la diarrea, amebiasis y helmintiasis (Díaz *et al.*, 2013).

En este estudio, fue evaluado el efecto bactericida de los polifenoles de las hojas de aguacate mexicano mediante un análisis fitoquímico, evaluación de la actividad antimicrobiana, análisis de la expresión génica de MRSA mediante microarreglos y la

propuesta de un mecanismo de acción de los compuestos presentes en los extractos etanólicos.

HIPÓTESIS

Los polifenoles obtenidos de las hojas de aguacate raza Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) producen un efecto negativo en el desarrollo y la expresión génica de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial de los polifenoles de hojas de aguacate mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) como agente antimicrobiano de MRSA.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Extraer y evaluar la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los polifenoles de las hojas de aguacates en MRSA.
- Determinar el mecanismo de acción de los polifenoles mediante el análisis de la expresión del genoma bacteriano.
- Caracterizar los polifenoles con mayor efecto bactericida obtenidos de una variedad de aguacate mexicano.

METAS

- Determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de los polifenoles de las hojas de aguacate mexicano.
- Proponer el mecanismo de acción de los polifenoles mediante el análisis de los cambios en la expresión de RNA.
- Caracterizar parcialmente los compuestos contenidos en las hojas de aguacate de al menos una variedad de *P. americana* var. *drymifolia* basados en la actividad antimicrobiana y el contenido de polifenoles.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El aguacate (*Persea americana* Mill.)

El aguacate es un producto de gran importancia en la agricultura y en la dieta mexicana. Cuenta con más de 150 mil hectáreas plantadas, menos del 1% de la superficie cultivable nacional, pero aporta cerca del 3.4% del valor de la producción agrícola total (SIAP, 2013). Es además un cultivo de importancia socio-económico y nutrimental. La fruta posee alto contenido de lípidos, la parte comestible es rica en ácidos grasos saturados como el oleico, palmítico, linoleico (Lu *et al.*, 2009).

2.1.1 Taxonomía del aguacate

Nombre científico: *Persea americana*

Familia: *Lauraceae*

Género: *Persea*

Especie: *americana* (Garbanzo, 2011)

2.1.2 Razas o grupos ecológicos

Las variedades de aguacate se agrupan en tres variedades:

1. Mexicana: Pertenecen algunas variedades de altura como Ettinguer y Puebla. Su característica principal es que las hojas despiden un olor a anís al triturarlas.
2. Guatemalteca: Las variedades de esta raza se adaptan a zonas altas e intermedias. (Reed, Booth).

3. Antillana: Pertenecen a estas algunas variedades de zonas bajas (Lorena, Trappica) (Garbanzo, 2011).

2.1.3 Distribución geográfica de *P. americana* var *drymifolia*

México es considerado centro de origen de *Persea americana* Mill., en el caso del cultivar mexicano o subespecie *drymifolia*, los descubrimientos de aguacates primitivos en áreas de la Sierra Madre Oriental del Estado de Nuevo León evidencian que el Estado es centro de origen de la misma (Sánchez, 1999) (**Figura 1**). Además, pueden hallarse árboles silvestres de *P. americana* var. *drymifolia*, que forman parte de la flora, donde sus características, hacen notar las diferencias con las variedades que se utilizan de cultivo en sistema agrícola en huertas o como árboles de traspatio (Gutiérrez *et al.*, 2009).

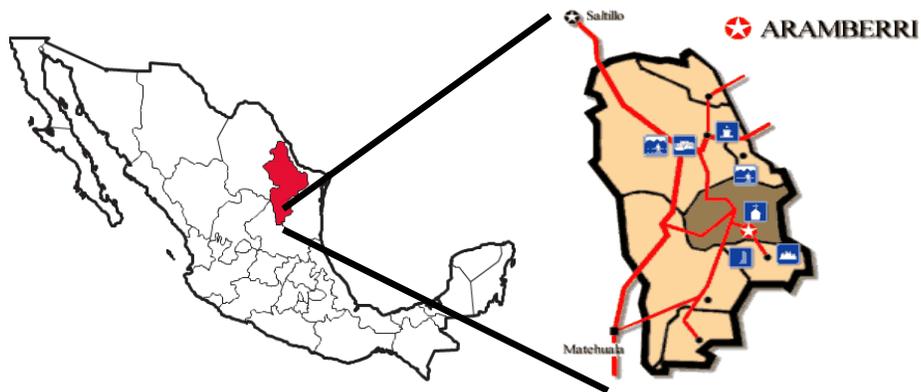


Figura 1. Región del municipio de Aramberri, municipio que se encuentra al sur del estado de Nuevo León, México.

2.1.4 Descripción botánica del aguacate de raza Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*)

El aguacate raza Mexicana tiene como características principales, su resistencia al frío, un alto contenido de aceite y un singular aroma a anís en la mayoría de los especímenes. Generalmente se desarrolla en altitudes mayores a 2000 m.sn.m; posee hojas de color verde, pero cuando son brotes jóvenes presentan una coloración verde claro o rojiza, su fruto posee una delgada cáscara, suave y lisa, la semilla puede ser adherida o suelta, regularmente la pulpa presenta fibra, aunque no se encuentra en todas las especies cultivadas (Barrientos y López, 2002).

2.1.5 Caracterización química foliar de *P. americana* var. *drymifolia*

Estudios realizados en las hojas de aguacate de *P. americana* var. *drymifolia* han mostrado la actividad de ciertos compuestos bioactivos contra patógenos y herbívoros, en especial los terpenoides y fenilpropanoides (Rincón y Espinosa, 2008). Estas plantas producen aceites esenciales que son mezclas complejas de sustancias que ayudan a combatir microorganismos infecciosos, algunos de estos compuestos son los terpenos o terpenoides los cuales poseen una amplia gama de actividad biológica, entre ellas la antimicrobiana (Edris, 2007). Hurtado *et al.* (2011) mediante la utilización de la técnica de HPLC-DAD-ESI-TOF MS, han encontrado otros constituyentes químicos, como los polifenoles de la familia de los ácidos fenólicos, flavonoides y otros derivados de flavonoides (flavonas, flavanoles, flavononas, flavonoles). El contenido de compuestos fitoquímicos en las plantas

también son atribuidos a la actividad antimicrobiana (Calvo *et al.*, 2012), además, de presentar adicional a esto, un alto poder antioxidante (Boskou 2006).

2.2 Metabolitos secundarios de origen vegetal

El grupo más rico en diversidad de sustancias químicas son aquellos de origen vegetal denominados compuestos polifenólicos. Investigaciones entorno de estos compuestos, han demostrado que una alimentación rica en polifenoles de origen vegetal, ayudan a tener una mejor salud (Schroeter *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2009). Los polifenoles pueden formarse a través de dos rutas bioquímicas: la del shikímico que forma compuestos fenilpropanoides y cumarinas en la ruta del acetato, que genera fenonas y quinonas. Del mismo modo, en rutas intermedias pueden producirse los flavonoides, unos de los grupos más abundantes en el reino vegetal (Piñeiro, 2013). Estos compuestos, también son capaces de lograr una regulación o modulación de la actividad de distintas enzimas, así como la irrupción de otros mecanismos de señalización celulares en distintos procesos. Esto se debe en algún sentido, a sus distintos atributos fisicoquímicos, que les permite interactuar en los procesos celulares de oxido-reducción, ligando así sus características antioxidantes con sus efectos positivos en el organismo (Quiñones *et al.*, 2012).

2.2.1 Metabolitos secundarios contra bacterias patógenas

En el mundo, el uso de productos de origen natural ha tomado un papel muy importante en el campo del cuidado de la salud. Las plantas medicinales proveen de compuestos químicos que pueden ser usados contra infecciones bacterias en sustitución de los tratamientos tradicionales, de este modo son consideradas desde

hace tiempo, un reservorio muy valioso de moléculas que presentan una acción fisiológica importante en el cuerpo humano. De tal modo, la fitoquímica se ha vuelto una herramienta importante en el ámbito de la salud en muchos países. Esto ha llevado a la alternativa de la producción de medicamentos a partir de plantas medicinales; este camino se está llevando a cabo porque recientemente los tratamientos contra infecciones están perdiendo su efecto cada vez más rápido, debido al incremento de la resistencia a los antibióticos por parte de los patógenos, de los cuales algunos medicamentos pueden llegar a causar efectos adversos a los pacientes. En cambio con el uso de los compuestos de plantas medicinales se pueden producir compuestos poco o no tóxicos, capaces de combatir patógenos. También es necesario realizar estudios de, análisis fitoquímico, el aislamiento, caracterización, identificación y demás estudios de los compuestos obtenidos de plantas medicinales (Akinpelu *et al.*, 2014; Alli y Mangamoori, 2016).

2.2.2 Obtención de metabolitos secundarios de material vegetal

Las plantas tienen un papel importante en la vida del hombre ya que las ha utilizado para cubrir sus necesidades más básicas. El uso de las plantas como tal es un hecho que existe desde muchos años atrás de la especie humana (Celis *et al.*, 2008). Los productos naturales de origen vegetal, son la principal fuente de componentes terapéuticos del hombre durante muchos años, siendo así una costumbre arraigada el uso de estos en las culturas. En las últimas dos décadas se han incrementado los estudios de los productos naturales por poseer una gran diversidad química y biológica, siendo una gran fuente renovable para el desarrollo de compuestos moleculares de interés terapéutico. Alrededor del 50% de los productos naturales son

usados en drogas de uso clínico en países en desarrollo (Ortíz, 2006). Estos compuestos bioactivos provenientes de plantas pueden ser obtenidos de las partes aéreas, como hojas, ramas, frutos y pulpa, así como de raíces y troncos. Algunos métodos que se realizan para la obtención de los compuestos bioactivos puede ser desde extracción con agua, infusión, destilación por arrastre de vapor de agua y decocción; extracción con solventes orgánicos (maceración, lixiviación o percolación), extracción Soxhlet, digestión y por fluido supercrítico (González, 2004).

Otro método que se está utilizando con mayor frecuencia, es el método de extracción por ultrasonido. Esta técnica permite la liberación de las sustancias que se encuentran en las células de material vegetal (hojas, fruto, etc.). El modo en que actúan las ondas ultrasónicas producidas es un fenómeno llamado cavitación, el cual permite la liberación de los compuestos contenidos en el material sólido, además de crear una deformación en este permitiendo la aparición de canales que permitan una mejor difusión de sustancias y liberación en un medio líquido (Soria y Villamiel, 2010). Este proceso aumenta la eficiencia del método de secado y conlleva una reducción en los costos de producción (Rodríguez *et al.*, 2009).

2.3 Caracterización de compuestos fenólicos por medio de Cromatografía

Líquida de alto rendimiento (UPLC)

En el estudio de las sustancias que se encuentran en los distintos órganos de las plantas, los investigadores han recurrido a nuevas técnicas para identificarlas, como por ejemplo, el empleo de la cromatografía líquida de ultra resolución adaptada a espectrometría de masas y tiempo de vuelo cuadrupolar (Q-TOF) (Qiu *et al.*, 2012;

López *et al.*, 2014; Talhaoui *et al.*, 2014). Estas técnicas en conjunto, permite la obtención de una mayor separación y una eficiente determinación de los fragmentos que se obtengan de las muestras, lo cual facilita un mejor análisis en la estructura de los compuestos con una medición de masas más precisa. Estas fragmentaciones que presentan los compuesto polifenólicos, son utilizados como referencia de compuestos desconocidos, aun sin usar compuestos de referencia (Gonzales *et al.*, 2015).

2.4 Resistencia bacteriana

La resistencia a antibióticos es reconocida como un problema importante de salud pública, que es causado por la mayor parte de los patógenos bacterianos más importantes y se expande a todo tipo de escenarios nosocomiales, afectando también en la población general (Rossolini *et al.*, 2008; EARSS, 2008). El desarrollo de antibióticos en nuestra era, ha llevado consigo una extrema dependencia a estos compuestos, con lo cual si no contamos con ellos, las personas que presentan defensas bajas, pacientes de cuidados intensivos y niños recién nacidos, morirían a causa de infecciones. Debido a esta producción a escala industrial de antibióticos ha generado el surgimiento de una “contaminación global de antibióticos”, como parte de un problema mundial (Baquero y Turrientes, 2013).

Los efectos que se están presentando debido a esta producción desmedida, son en el sentido ecológico lo que conlleva la eliminación en bacterias de cepas silvestres por otras más agresivas. Estas sustancias sintéticas van causando modificaciones en los componentes génicos de los microorganismos ejerciendo procesos selectivos

forzados e incitando a una variación más constante de las poblaciones bacterianas, por ejemplo, mutación, recombinación, transposición, modulación, transferencia de genes (Galán *et al.*, 2013).

Lo anterior es uno de los retos principales en tratamientos terapéuticos, en particular la resistencia múltiple a fármacos en bacterias Gram-positivas; esta creciente resistencia pone en evidencia que los tratamientos que una vez fueron eficaces y de un costo bajo contra este tipo de patógenos son cuestionados, dentro de estos tratamientos están la penicilinas y los macrólidos para su uso en infección de neumococos y la oxacilina contra casos de *Staphylococcus* (Cornaglia, 2009).

2.5 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un microorganismo que puede pasar de un estado inocuo a una bacteria patógena. Su hábitat principal es las fosas nasales posteriores, de igual forma coloniza otras superficies del cuerpo humano como: la piel, tracto gastrointestinal, ingle, etc. Esta forma de colonizar, le permite a la bacteria cuando hay una baja en el sistema de defensa del cuerpo o surge una herida en la superficie cutánea, invadir el tejido afectado; esto además, promueve la transmisión de cepas patógenas en pacientes internados en clínicas y la comunidad en general (Cervantes *et al.*, 2015).

2.5.1 *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA)

S. aureus es la especie más patógena y virulenta para el humano y animales. Una variante patógena de *S. aureus* es MRSA, la cual en las últimas décadas ha llamado la atención de instituciones de salud por ser el principal microorganismo causante de

infecciones en el mundo, que producen afecciones de diferentes severidades. Así mismo, un gran número de microorganismos del tipo MRSA, tienen la capacidad de resistir todas las penicilinas que hay en la actualidad, al igual que con otros antibióticos de la familia de los β -lactámicos. La capacidad que posee la bacteria para obtener la resistencia a los antibióticos se debe a distintos mecanismos y además, a otros determinantes de virulencia que le beneficia a su emergencia en ambientes hospitalarios y en la comunidad general. Aunado a esto, la selectividad por antibiótico, le ha permitido el desarrollo de cepas con características muy notables entre los aislados en hospitales y los encontrados en la comunidad (Cervantes *et al.*, 2014 a, b, c; Cervantes *et al.*, 2015). De la población general, aproximadamente el 1,5% son asintomáticos portadores nasales de MRSA, la prevalencia entre los trabajadores de la salud es de aproximadamente 3 veces mayor (4,6%) (Chambers y De Leo, 2009; CDC, 2014).

MRSA posee elementos en su genoma bacteriano que le permiten inhibir los mecanismos de acción de los antibióticos (principalmente penicilinas), este es el caso del gen *mecA*; es un elemento móvil genético, que le permite a las cepas resistentes tanto de comunidad como hospitalarias, la resistencia a múltiples antibióticos y que se encuentra en un cassette cromosomal (*SCCmec*). La proteína de unión a la penicilina (PBP2a), está codificada en este gen, la cual impide la unión del anillo β -lactámico de los fármacos, que tienen como función la inhibición de la síntesis de la pared celular de la bacteria (**Figura 2**). Otro elemento en la patogénesis de MRSA, es la existencia de la exotoxina Leucocidina Pantón Valentine

(PVL). Esta actúa hiriendo leucocitos y posiblemente tejidos (Cervantes *et al.*, 2014a).

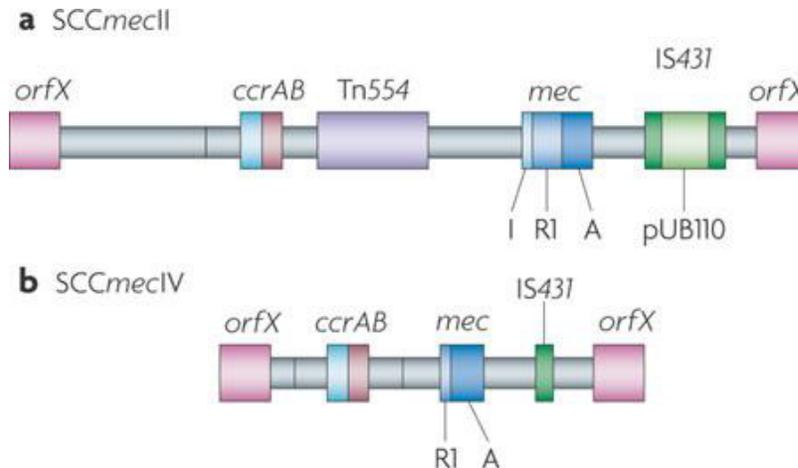


Figura 2. Diferencia entre cassette cromosómicos de *S. aureus*. a) Cassete cromosómico de *S.aureus* asociado a hospitales. b) Cassete cromosómico de *S.aureus* asociado a comunidad (Referencia: Chambers y De Leo, 2009).

Las cepas asociadas a comunidad causan cuadros de infección en piel y tejidos blandos como la celulitis, forunculitis y abscesos, se dan principalmente en cuello y cabeza como una linfadenitis cervical, otitis externa o mastoiditis aguda, infecciones orbitarias y periorbitarias, mientras que las cepas asociadas a hospitales, producen enfermedades como neumonías y sepsias.

Del mismo modo esta bacteria es de importancia en el área zootécnica, debido que es también reconocido, como uno de los agentes principales en la mastitis bovina (inflamación de las ubres). Esta condición afecta principalmente animales productores de leche para su uso comercial (bovinos, caprinos), afectando la calidad de este producto y la condición de vida del animal, trayendo como consecuencia pérdidas monetarias altas para las industrias que utilizan la leche como materia

prima. Además, una vez que el tejido de la glándula mamaria se dañó debido a la respuesta inflamatoria a la infección, el nivel de producción no podrá ser recuperado (Moellering, 2006; Growitz, 2008; Akers y Nickerson, 2011; Benjamin, 2016).

Para poder realizar todos estos mecanismos de infección y demás factores de virulencia, esta bacteria posee un sistema de comunicación complejo, que le permite determinar el momento adecuado en el cual invadir los tejidos del hospedero en el cual reside. Esto sucede a través de una señalización de célula-célula, con la cual regulan la densidad poblacional y es conocido como *Quorum sensing* (QS).

El sistema de QS en *S. aureus*, es el mecanismo principal de la bacteria para causar una infección exitosa, controlando sus factores de virulencia y demás procesos celulares. Este es controlado por un operón llamado *agr*, el cual está encargado de la regulación en la expresión de los factores de virulencia de la bacteria, así como con la síntesis de toxinas y la baja de expresión de proteínas asociadas a la adhesión en la fase de crecimiento estacionaria de la población. La regulación de este sistema, es por medio de un péptido auto-inductor (AIP) que produce la misma bacteria, el cual es reconocido en cierta densidad bacteriana. Este péptido se une a la membrana, donde es reconocido y procesado por una quinasa de histidina (AgrC) activando una proteína reguladora llamada AgrA, que se inserta en el parte promotora del operón *agr* (P1 y P2) iniciando la transcripción de este (**Figura 3**) (Cervantes *et al.*, 2015).

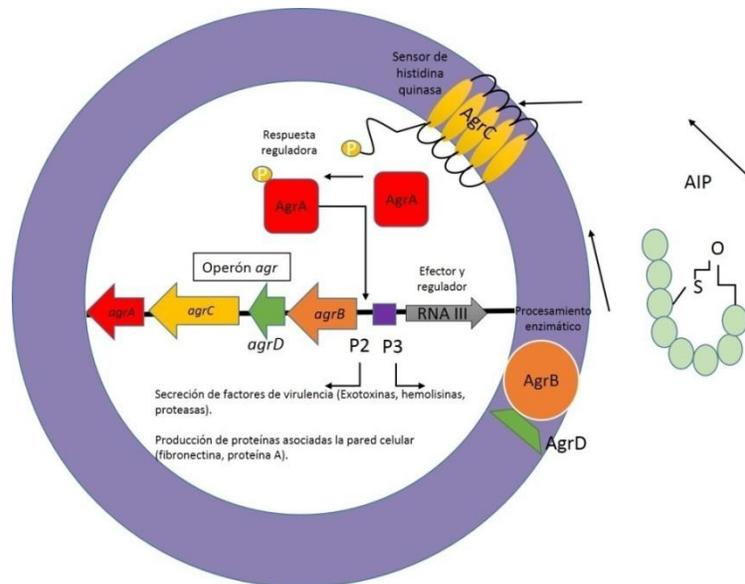


Figura 3. Representación esquemática del sistema bifásico (operón *agr*) de *S. aureus*. Basado de Rodríguez y Pascual, 2008.

2.6 Microarreglos

La tecnología de los Microarreglos utiliza las propiedades de hibridación y de fluorescencia de los ácidos nucleicos utilizando moléculas unidas a una superficie sólida para complementarlos, estas moléculas llamadas sondas se utilizan para medir la cantidad de transcritos de ácido nucleico específicas de interés que están presentes en una muestra (Huber *et al.*, 2005). De tal forma, en el sitio donde se logró la hibridización habrá fluorescencia y esta intensidad será correspondiente al nivel de expresión del gen o genes en estudio. Una parte indispensable es que cada uno de los genes que esté debidamente identificado, por medio de bases de datos públicas (*KEGG*, *Genbank*, *Aureowiki*) o por experimentos de prueba y error (Barrero, 2005).

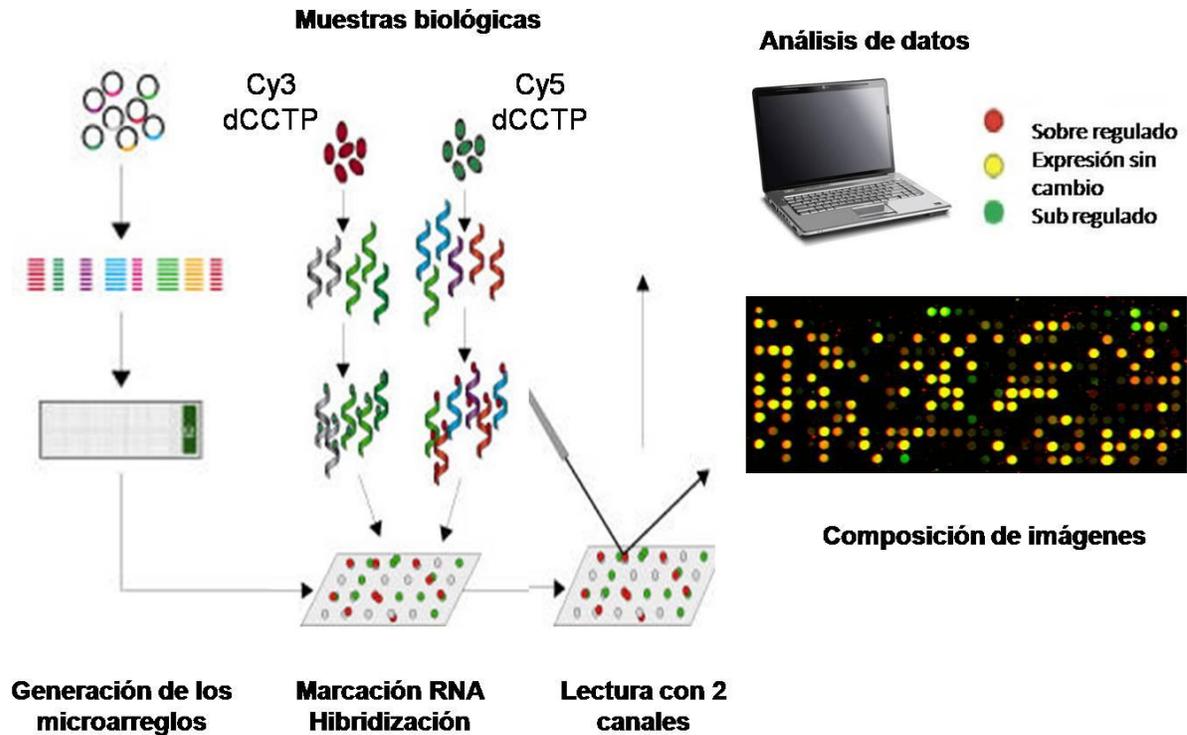


Figura 4. Análisis de microarreglos de cDNA de fluorescencia de doble color. Basado de White y Salamonsen, 2005; Barrero, 2005.

Los clones de interés (sondas) se amplifican mediante PCR e imprimen sobre láminas de vidrio tratadas usando una impresora robótica. Las muestras de RNA total extraídas de las células / tejidos tratados (testigo) y de control se transcriben inversamente y se etiquetan con Cy3 (verde) o Cy5 (rojo). Las muestras se combinan y se hibridan competitivamente al microarreglo bajo condiciones rigurosas. Después del lavado para eliminar el blanco no hibridado, se aplica la excitación con láser y se miden las emisiones en cada canal de color. El software especializado se utiliza para fijar nombres de genes, valores de intensidad de fluorescencia e índices de intensidad a cada punto, que luego se exportan para un análisis estadístico

avanzado para identificar genes expresados diferencialmente (**Figura 4**) (White y Salamonsen, 2005).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Recolecta de material vegetal

La recolección de material vegetal de aguacate raza Mexicana requerido para la obtención de polifenoles, fue realizada en el sur del Estado de Nuevo León, en el Municipio de Aramberri (Latitud: 24.11463 | Longitud: -99.81622) (**Figura 5**). Las muestras de hojas de cinco cultivares distintos de aguacate mexicano, fueron tomadas de una huerta familiar perteneciente al agricultor Baldemar Villanueva, la cual está ubicada cerca de la cabecera del municipio antes mencionado. Esta zona, es el posible centro de origen de la variedad de raza Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) (Sánchez, 1999).

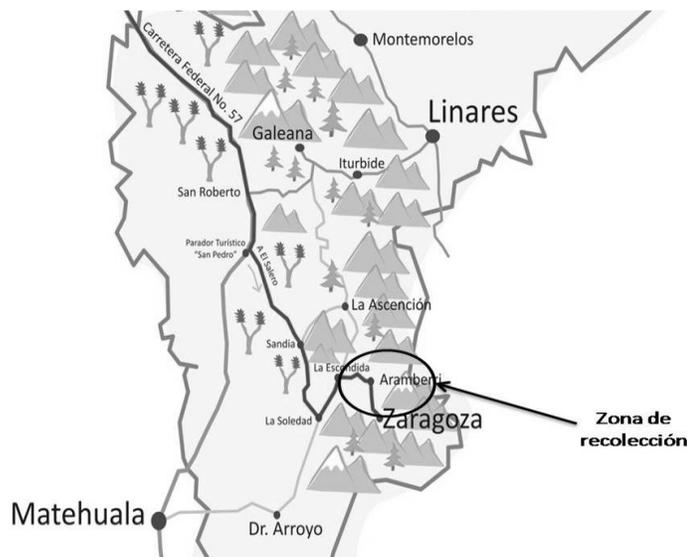


Figura 5. Mapa indicando la zona en la cual fue realizada la recolección de material vegetal para la realización de los ensayos en la investigación presente (Latitud: 24.11463 | Longitud: -99.81622).

Los cinco tipos de cultivares de aguacate que fueron empleados son: Plátano, Cuerno, Plátano Temprano, Criollo Baldemar y María Elena. De estos árboles, fueron tomadas las hojas más alejadas con respecto al tronco, siendo depositadas en bolsas de plástico con cierre hermético, identificando cada uno de los cultivares y la fecha en la cual fue realizada la recolecta. Posteriormente, para evitar la descomposición de los polifenoles contenidos en las muestras, fueron colocadas en hieleras con bolsas de gel refrigerante. Ya resguardadas las muestras, pasaron a una congelación de -20°C durante un mes hasta su procesamiento en el laboratorio.

3.1.1 Extracción de polifenoles

La metodología utilizada para la extracción de los polifenoles de las hojas de aguacate mexicano es la siguiente:

Las hojas fueron colocadas en charolas de aluminio previamente desinfectadas con etanol al 70%. Posterior a esto, en una estufa con flujo continuo de aire, fueron secadas durante 24h a una temperatura de 45°C . Una vez transcurrido el secado, el material vegetal fue triturado, empleando una licuadora convencional hasta lograr tener un tamaño de partícula con el cual resulta una superficie de contacto mayor. Se agregó un gramo de muestra y 20 mL de agua destilada estéril en tubos Corning® tipo Falcon de 50 mL (20 tubos por cultivar). Posterior a esto, los tubos fueron colocados en un baño de sonicación, durante una hora a temperatura ambiente (27°C) (**Figura 6**). Terminado el tiempo de sonicación, el contenido fue filtrado con un papel Whatman del número 1 para eliminar las partículas grandes de la solución y depositando esta en recipientes de plástico protegidos de la luz (**Figura 7**).



Figura 6. Muestra colocada en baño sónico para la liberación de los polifenoles de las células vegetales.



Figura 7. Filtración de la solución acuosa, para la eliminación de las partículas de material vegetal.

3.1.2 Purificación de polifenoles

Para la obtención de los polifenoles totales, fue empleada una columna de Amberlita como fase inmóvil (tipo XAD-16) de grado alimenticio y etanol 96% como fase móvil, para liberar los polifenoles de la fase inmóvil (**Figura 8**). El extracto resultante fue colocado en recipientes de plástico y cubiertos de la luz, para evitar la degradación de los compuestos (**Figura 9**).



Figura 8. Purificación de los polifenoles de las hojas de aguacate en columna de resina (XAD-16).



Figura 9. Recuperación de los polifenoles de hojas de aguacate en recipiente.

3.2 Preparación de extractos etanólicos para ensayos

Para eliminar el solvente del extracto etanólico, fue empleado un rotavapor marca Heidolph. En un matraz bola acoplado a este, que estuvo en estufa de flujo continuo a temperatura constante durante 24 horas y después pesado, fue depositado el extracto etanólico, estuvo en una rotación constante a 50 rpm en un baño María a una temperatura de 75°C (**Figura 10**) hasta la eliminación completa del solvente (una hora). Ya eliminado el solvente, y los polifenoles quedaron adheridos a las paredes del matraz, fue pesado en una balanza para obtener la diferencia antes y después de haber agregado los compuestos purificados; para la obtención de una solución madre de 3000 ppm, se agregaron 10 mL de etanol al 70% por cada 30 mg de polifenoles recuperados (**Figura 11**).



Figura 10. Eliminación del solvente mediante rotavapor, para la obtención de los polifenoles.

Figura 11. Extractos etanólicos de hojas de aguacate mexicano.

3.3 Material biológico bacteriano

Fue empleada una cepa ATCC Rosenbach de *S. aureus* resistente a meticilina y resistencia media a vancomicina MRSA cepa $\mu 3$ (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC®700698™).

Además, también fueron empleadas tres cepas de MRSA: aislado de comunidad BA1552; ATCC 35592 asociado a hospital; CCIV cepa silvestre con resistencia.

3.4 Ensayos microbiológicos

3.4.1 Antibiograma Kirby-Bauer

Para determinar la sensibilidad de MRSA cepa $\mu 3$, fue utilizado el antibiograma de Kirby-Bauer, empleado por De Bellis (2013) con modificaciones para los cinco extractos etanólicos, correspondientes a cada cultivar.

En los ensayos de antibiograma con los polifenoles de las hojas de aguacate, fue empleado agar Muller Hinton, sensi-discos y placas Petri. Las cepas fueron inoculadas un día anterior a la prueba. Una vez obtenido el cultivo bacteriano, se tomaron de dos a tres colonias con un hisopo estéril que fueron sumergido en tubos con solución salina al 0.9% para descargar los microorganismos, ajustando la turbidez a 0.5 Mc Farland con solución salina, utilizando como referencia una solución de BaCl₂. **Nota:** Este inóculo no puede utilizarse por más de 15 minutos, debido a que la turbidez cambiará su valor por el crecimiento de la densidad poblacional bacteriana. Tomando otro hisopo, en una placa Petri con agar Muller Hinton, fue inoculada la bacteria en tres direcciones distintas girando la placa (**Figura 12**). Una vez realizado la inoculación en las placas Petri requeridas, los sensi-discos

con los polifenoles de los cinco cultivares de aguacate, fueron colocados las placas por separado y en tres concentraciones distintas (0.01 mg/mL, 0.015 mg/mL, 0.02 mg/mL) se realizaron cinco réplicas por sensi-disco de cada concentración y tres repeticiones, se utilizó como control etanol al 70% (**Figura 13**). Las placas Petri fueron incubadas por 24 horas a 37°C.



Figura 12. Método de inoculación de la bacteria sobre las placas Petri con agar Muller-Hinton.

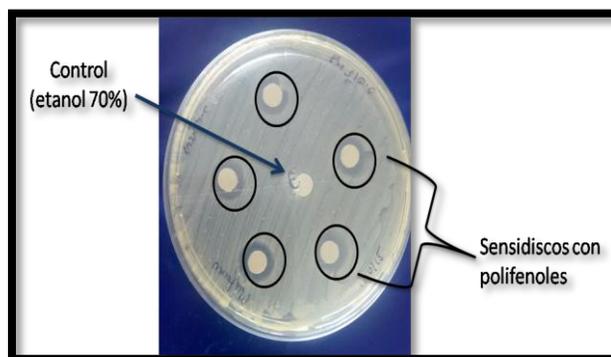


Figura 13. Distribución de los sensi-discos con polifenoles en las placas Petri con la bacteria inoculada 24 horas después.

3.4.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se siguió la metodología utilizada por De Bellis (2013) con modificaciones.

En el ensayo, fueron requeridos tubos de ensayo 13x100 mL, los cuales contenían caldo soja triptica cada uno, además fueron añadidos los polifenoles pufiricados de aguacate en distintas concentraciones (50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL) convolumen final de un mililitro, por triplicado cada concentración, usando como control un tubo con caldo sin inóculo, un tubo con etanol al 70% y u tubo solamente con caldo. Además, en otro tubo, solamente con

caldo se añadieron los polifenoles como control de esterilidad. Para la preparación del inóculo fue empleada la misma metodología anterior. Fueron depositados 100 μ L de inóculo de bacteria, en cada uno de los tubos con polifenoles purificados y controles. Estos estuvieron en incubación a 37°C durante 24 horas. Para la lectura del resultado, fueron observadas las concentraciones que presentaron turbidez y las que no. El rango de concentración entre el primer tubo que presente turbidez y el tubo que no presente crecimiento bacteriano, es el rango de la CMI para el extracto ensayado (**Figura 14**).

3.4.3 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Para este ensayo, fueron tomados 10 μ L de inóculo del primer tubo que presentó crecimiento bacteriano (turbidez) de las concentraciones de polifenoles utilizados y el tubo de la concentración que no presentó crecimiento bacteriano, los cuales se depositaron en placas Petri, después fue vertido agar Muller-Hinton, esto realizándolo por triplicado. Las placas estuvieron incubadas a 37°C por 24 horas. Para la lectura de este ensayo, la placa inoculada que no presente crecimiento bacteriano de determinada concentración se consideró el CMB de los polifenoles ensayados (**Figura 14**).

Nota: El cultivar que exhibió mayor actividad antimicrobiana de los ensayos anteriores, fue empleado para la caracterización de cromatografía líquida y el ensayo con microarreglos.

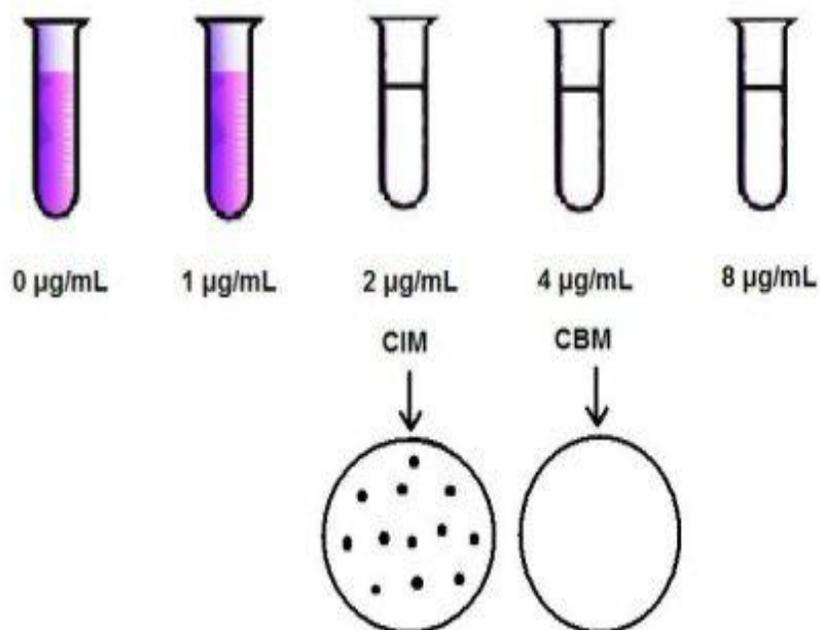


Figura 14. Esquema de lectura para la determinación del CIM y el CMB de los polifenoles de hojas de aguacate mexicano (Referencia: Fica, 2005).

3.4.4 Ensayo de sensibilidad a los antibióticos β -lactámicos de MRSA cepa μ 3 por medio de los polifenoles de hojas de aguacate mexicano

Fue empleado el antibiograma de Kirby-Bauer por De Bellis (2013) con modificaciones, para la comprobación del efecto de los polifenoles sobre la resistencia de antibióticos de MRSA cepa μ 3.

En el ensayo de antibiograma con los polifenoles purificados de las hojas de aguacate, fue empleado agar Muller Hinton, sensi-discos y placas Petri. Un día anterior a la prueba inoculamos la cepa, para obtener el cultivo bacteriano, tomando dos a tres colonias con un hisopo estéril, fueron sumergidos en tubos con solución

salina al 0.9% para descargar los microorganismos, ajustando la turbidez a 0.5 Mc Farland con solución salina, utilizando como referencia una solución de BaCl₂. Este inóculo no puede utilizarse por más de 15 minutos. Tomando otro hisopo, en una placa Petri con agar Muller Hinton, fue inoculada la bacteria en tres direcciones distintas girando la placa (**Figura 12**). Una vez realizado la inoculación en las placas Petri requeridas, fueron colocados cuatro sensi-discos, los cuales uno contenía solamente polifenoles de la variedad María Elena, otro dicloxacilina (5 µg/mL), en otro Gentamicina (3 µg/mL) como control positivo y el ultimo la combinación de dicloxacilina y los polifenoles de la variedad mencionada. Fueron realizadas tres replicas con cinco repeticiones. Las placas Petri estuvieron incubadas por 24 horas a 37°C. La concentración que utilizamos en este ensayo fue el CMI, obtenido del experimento anterior.

3.5 Preparación del material genético para el análisis de microarreglos

3.5.1 Inducción de la cepa MRSA cepa µ3 con los polifenoles de hojas de aguacate

Fueron realizados dos ensayos inoculando MRSA cepa µ3 en dos matraces Erlenmeyer con 50 mL de caldo soja tripticasa. Estuvieron en incubación durante cinco días a 37°C en agitación constante. Después de este lapso, en uno fue agregado los polifenoles de hojas de aguacate mexicano a una concentración final de 0.16 mg/mL y en el otro fue agregado un mililitro de etanol al 70% como control. Ya agregados los polifenoles y el etanol, nuevamente fueron puestos a incubación los matraces inoculados por el lapso de una hora. Terminado el tiempo requerido, el contenido de los matraces fue depositado en tubos Corning® de 50 mL y se

centifugaron a 1000 rpm para precipitar la masa bacteriana además de retirar el caldo sobrenadante.

3.5.2 Obtención y preparación del RNA total de la cepa control e inducida por los polifenoles

El RNA total fue extraído utilizando el siguiente protocolo de un kit comercial FastRNA®Pro Green Kit.

1. El precipitado bacteriano del ensayo anterior, se depositó en un tubo con tapa verde que contiene la matriz D de lisado, proveniente del kit y posteriormente en fue añadido 1 mL de solución de RNA_{pro}TM
2. Este tubo de tapa verde se procesó en un instrumento FastPrep® por 40 segundos en el nivel de 6.0.
3. Posteriormente fue centrifugado el tubo a 10,000 rpm durante cinco minutos a 4°C.
4. El líquido sobrenadante fue transferido a un microtubo de centrifugación nuevo. Con precaución de no transferir el pellet y la matriz de lisado. Inmediatamente lo transferido estuvo incubación durante cinco minutos a temperatura ambiente.
5. El líquido depositado en el tubo nuevo, se añadieron 300 µL de cloroformo y aplicado vortex durante 10 segundos, luego incubado cinco minutos a temperatura ambiente.
6. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo de microcentrifugación.

7. Fueron añadidos 500 μ L de etanol absoluto enfriado previamente a -10°C al sobrenadante resultante del clotoformo y mezclado por inversión 5X y colocado a -20°C durante 30 minutos.
8. Pasado es tiempo requerido, el tubo fue centrifugado a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y removido el sobrenadante (etanol).
9. Una vez removido el etanol, fue secado a temperatura ambiente (no completamente) y resuspendió el RNA in 100 μ L de DEPC- H_2O .
10. La concentración de RNA se determininó mediante un NanoDrop™ 2000C de Thermo Scientific Posteriormente fue resguardado a -70°C .

Una vez obtenido el RNA total de la bacteria. Fue agregado una solución de acetato de sodio 1 M a un pH de 4.5 y etanol al 95% frío, posteriormente se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm durante cinco minutos para concentrar el RNA en el fondo. Los tubos fueron sellados y empacados para ser enviados junto con el microarreglo específico para MRSA cepa μ 3.

3.5.3 Análisis de Microarreglos

La hibridación y la lectura del microarreglo fueron llevadas a cabo en la Unidad de Microarreglos de ADN (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

3.5.4 Preparación de la sonda y la hibridación de microarreglos

El RNA total (4 -10 μ g) fue utilizado para la síntesis de cDNA que incorpora dUTP-Alexa555 o dUTP-Alexa647 usando el kit de marcaje de First-Strand cDNA (Invitrogen). La incorporación del fluoróforo fue analizada a una longitud de onda de 555 nm para Alexa555 y 650 nm para Alexa647. Las cantidades iguales de cDNA

marcado fueron hibridadas con una solución HyBIT2 (Tele-Chem International Inc.). Los microarreglos fueron incubados durante 14 horas a 42 ° C, y después se lavaron tres veces con 1X SCC, 0,05% SDS a temperatura ambiente (Aguirre *et al.*, 2013).

Nota: Esta etapa fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

3.5.5 Adquisición y análisis de imágenes de matriz de datos

La adquisición y cuantificación del conjunto de imágenes fue analizado en ScanArray 4000 con su correspondiente software de ScanArray 4000 del biochips Packard. Todas las imágenes fueron capturadas utilizando el aumento de 65% PMT, de 70 a 75% de la potencia del láser y 10 micras de resolución en velocidad de barrido de 50%. Para cada punto, la densidad y Alexa555 Alexa647 valor medio y el fondo valor medio se calcularon con el software ArrayPro Analizador de Media Cibernetics (Aguirre *et al.*, 2013).

3.5.6 Análisis de datos del microarreglo

El chip de MRSA cepa μ 3, fue hibridado con la muestra control marcado con Alexa555 contra la muestra inducida con los polifenoles, marcado con Alexa647.

3.6 Ensayo para la comprobación de la expresión de *agrA* mediante qPCR

Para la medición de la expresión de *agrA*, fue empleado el protocolo de la sección 3.5.1. Se ensayaron las cuatro cepas de MRSA (cepa μ 3, BA1552, CCIV-4 y ATCC 35592), donde la expresión génica de estas bacterias fue medida mediante PCR de tiempo real, expresando el resultado como “cantidad relativa de RNA”.

Para la síntesis de cDNA, fue empleado el kit GoScript™ *Reverse Transcription* System de Promega (Madison, USA) siguiendo el protocolo a continuación.

1. Fueron empleados 2 µg de RNA. En un tubo de microcentrífuga libre de RNasa estéril, fue depositado 0,5 µg del iniciador por microgramo de la muestra de RNAm en un volumen total de ≤ 15 µL en agua. El tubo se calentó a 70°C durante cinco minutos. Este rápidamente pasó a colocarse sobre hielo (evita la formación de estructuras secundarias).
2. Los siguientes componentes fueron añadidos al primer/plantilla en el orden siguiente:

M-MLV 5X Reaction Buffer	5 µl
dATP, 10mM	1.25 µl
dCTP, 10mM	1.25 µl
dGTP, 10mM	1.25 µl
dTTP, 10mM	1.25 µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	25 unidades/ 1 µl
M-MLV RT	200 unidades/ 1µl
Nuclease-Free Water to final volume	25 µl

3. Posteriormente fue mezclado suavemente haciendo pasar el tubo e incubar durante 60 minutos a 37° C para los *random primers*. La temperatura de extensión puede ser optimizada entre 37 y 42 ° C.
4. Una vez obtenido el cDNA, pasó a ser cuantificado en un NanoDrop™ 2000C de Thermo Scientific para conocer la concentración obtenida e iniciar el

protocolo para la utilización del termociclador *Exicycler™* Quantitative Real-Time PCR System de Probiotek, para la observación de la expresión génica de *agrA*.

3.6.1 Preparación del cDNA para qPCR con Syber Green

El siguiente protocolo se utilizó para el análisis de la expresión de *agrA* utilizando los *primers* del **Cuadro 1**. Las condiciones para amplificación están contenidas en el **Cuadro 2**.

1. Se preparó una solución coctel con los siguientes componentes, para cada reacción se requieren 25 μ L a temperatura ambiente.
2. Todos los componentes fueron mezclados a excepción del cDNA.

Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	12.5 μ L
Forward <i>Primer</i>	1 μ L
Reverse <i>Primer</i>	1 μ L
Plantilla de DNA	\leq 500 ng
Agua, libre de nucleasas	a 25 μ L
Volumen total	25 μ L

3. El coctel se depositó de manera individual en tubos de PCR evitando la formación de burbujas de aire.
4. Posteriormente, la cantidad de DNA requerido para la reacción fue depositada individualmente en los tubos que contenían el master mix de PCR.
5. Fueron mezclados y depositados en tubos de PCR.

6. Finalmente el termociclador fue programado de acuerdo a las condiciones necesarias para la reacción e iniciar el protocolo.

Cuadro 1. Secuencia de los *primers* requeridos para la medición de la expresión de *agrA* y un gen “housekeeping” o constitutivo (16s) para qPCR.

<i>agrA reverse</i>	<i>agrA forward</i>
ATG GGC AAT GAG TCT GTG AG	AAA GTT GCA GCG ATG GAT TT
<i>16S reverse</i>	<i>16S forward</i>
CGT TTA CGG CGT GGA CTA	CGT GGA GGG TCA TTG GA

El programa térmico utilizado fue el siguiente:

Cuadro 2. Protocolo de las condiciones requeridas para la amplificación del gen *agrA* de MRSA

Paso	Función	Temperatura	Tiempo (hh:mm:ss)	Repetir
1	Incubar	95.00	0:2:0	0
2	Incubar	95.00	0:0:3	0
3	Incubar	60.00	0:0:10	0
4	Incubar	72.00	0:0:30	0
5	Escanear			0
6	Ir a	Paso 1		40
7	Punto de fusión 55°C to 94°C, cada 1.0°C	1 Sec.		
8	Final			

Para conocer la cantidad relativa de RNA fue utilizada la siguiente fórmula:

$$C. \text{ relativa RNA} = (\text{Ct gen muestra} / \text{Ct gen control})^{-1}$$

3.7 Ensayos fitoquímicos

Lo polifenoles totales, fueron caracterizados utilizando reacciones de color de acuerdo los siguientes protocolos:

3.7.1 Capacidad captadora de DPPH

De una solución de 60 μM de radical DPPH' fueron tomados 2.9 mL y añadidos a 100 μL de extracto. A continuación, en un tiempo de 30 minutos estuvieron colocadas las muestras en un lugar oscuro. Después, la absorbancia (Abs) fue tomada a 517nm (Martínez *et al.*, 2011). La capacidad de eliminación de radicales del extracto fue calculada con la siguiente ecuación, expresándose como porcentaje de inhibición DPPH':

$$\text{Inhibición (\%)} = (\text{Abs control} - \text{Abs muestra}) / \text{Abs control} * 100$$

3.7.2 Detección de Taninos condensados

Una alícuota de 0.65 mL de una solución recién preparada de vainillina (1 g/100 mL) en ácido sulfúrico al 25 % fue depositada a 0.25 mL de muestra (0.01 g/mL). Esta mezcla estuvo en incubación a 30 °C durante 15 minutos. La absorbancia fue medida a 500nm (Hagerman y Butler, 1989).

3.7.3 Flavonoides totales

Fueron adicionados 150 μL NaNO_2 al 5% a 150 μL de muestra. Después, depositados 150 μL de AlCl_3 al 10% y por último, depositado un mililitro de NaOH 1M. La Absorbancia fue medida a 510 nm inmediatamente (Martínez *et al.*, 2011).

3.7.4 Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'azinobis-(3 etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)

En 50 µL de muestra, fueron depositados 950 µL de solución de ABTS. Una vez homogenizada y reaccionó durante un minuto. Pasado este tiempo, fue medida la absorbancia a 732 nm (Martínez *et al.*, 2011).

3.7.5 Detección de Saponinas

A una solución de metanol y agua (9:1), fue añadida una muestra de extracto en una concentración de 1 mg/mL, agitándola durante 30 segundos. El resultado es obtenido del **Cuadro 3** de Galindo *et al.* (1989).

Cuadro 3. Clasificación en dependencia de la altura de la espuma para las saponinas.

Altura (mm)	Clasificación
5	Prueba negativa
5-9	Contenido bajo
10-14	Contenido moderado
>15	Contenido alto

3.7.6 Caracterización fitoquímica de los polifenoles totales del cultivar María Elena mediante UPLC-Q-TOF-MS^E

Los polifenoles de las hojas de aguacate, fueron resuspendidos en solución utilizando metanol grado UPLC y diluidos hasta obtener una concentración de 100ppm. Con la siguiente metodología los compuestos contenidos en la suspensión

fueron caracterizados. Para la separación fue requerida una columna Waters Acquity UPLC HSS T3 C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 μ m) utilizando un sistema Waters Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.), funcionando a un caudal de 0.3 mL / min a lo largo del gradiente. La temperatura de la columna era 40 ° C, y el volumen de inyección era de 20 μ L (1 mg / mL). Los eluyentes eran A, 0.1% de ácido fórmico en agua y B, acetonitrilo. La separación de polifenoles fue llevado a cabo bajo las siguientes condiciones: 0-2 min, 5% B; 2-4 min, 7% B; 4 - 5 min, 9% de B; 5 – 6 min, 15% de B; 6-7 min, 25% de B; 7-10 min, 10% de B. Los datos de espectrometría de masas fueron adquiridos en un espectrómetro de masas Xevo G2 Q-TOF (Waters MS Technologies, Manchester, U.K.) usando ionización por electrospray de iones negativos. El rango de exploración era de 50 a 1200 m/z. Las condiciones de ionización por electro-espray (ESI) incluían una tensión capilar de 2.8 kV para el modo negativo; Una tensión de cono de 40 V, una guía de iones a 6 V, una temperatura de fuente de 100°C y una temperatura de gas de desolvatación de nitrógeno de 400°C fluyendo a 50 L/h. Para los experimentos MSE fueron involucradas dos funciones, una realizada en LE (15 eV) y la segunda en rampa HE (15-35 eV) para inducir la fragmentación. La caracterización estructural de los polifenoles fue basada en la masa molecular obtenida, patrón de fragmentación y literatura publicada anteriormente.

3.8 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias por el estadístico Tukey, para los ensayos de antibiograma de los cinco cultivares de aguaca raza

Mexicana y, para el ensayo de sensibilidad a antibióticos, Fue empleado InfoStat versión 2015, para los análisis.

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. Básicamente se sustrajo el valor de señal y el valor de fondo, se fijó al canal donde se encuentra la muestra control y se normalizaron los valores obtenidos para la muestra experimental (para esta normalización se utilizaron funciones complejas como Loess y/o Lowess). Una vez que los valores fueron normalizados, empleó una prueba rasero que identificó aquellos genes que se alejaron de la normalización. El software de GenAriase identifica los genes expresados diferencialmente mediante el cálculo de un puntaje Z dependiente de la intensidad.

$$z_i = (R_i - \text{mean}(R)) / \text{sd}(R)$$

Donde z_i es el valor de Z para cada individuo, R_i es el logaritmo de la relación del valor de intensidad de señal obtenido para el experimento entre el valor del control y $\text{sd}(R)$ es la desviación estándar del logaritmo de esa relación. Con esta función, para aquellos genes con el valor de Z mayor a 2 se considera que existe un cambio estadísticamente significativo entre la condición experimental y el control (genes con mayor expresión) y para valores menores que -2 (genes con menor expresión) (Aguirre *et al.*, 2013).

4. RESULTADOS

4.1 Extracción de polifenoles de hojas de aguacate mexicano

El rendimiento de los polifenoles por gramo de materia seca fue de 18 mg + 1.12 mg de polifenoles totales, lo que equivale al 1.8% de contenido de polifenoles.

4.2 Antibiograma de sensibilidad (Kirby-Bauer) de MRSA cepa $\mu 3$ frente a los polifenoles de hojas de los cinco cultivares de aguacate

Para este ensayo fueron empleadas tres concentraciones distintas, de los polifenoles obtenidos de los distintos cultivares. El cultivar María Elena, presentó una actividad antimicrobiana más elevada a comparación de los otros cultivares, formó un halo de inhibición con un diámetro promedio de 0.993 +/- 0.3 cm.

En la **Figura 15**, puede apreciarse los diámetros de inhibición (cm) que produjeron los polifenoles de hojas de aguacate contra MRSA cepa $\mu 3$.

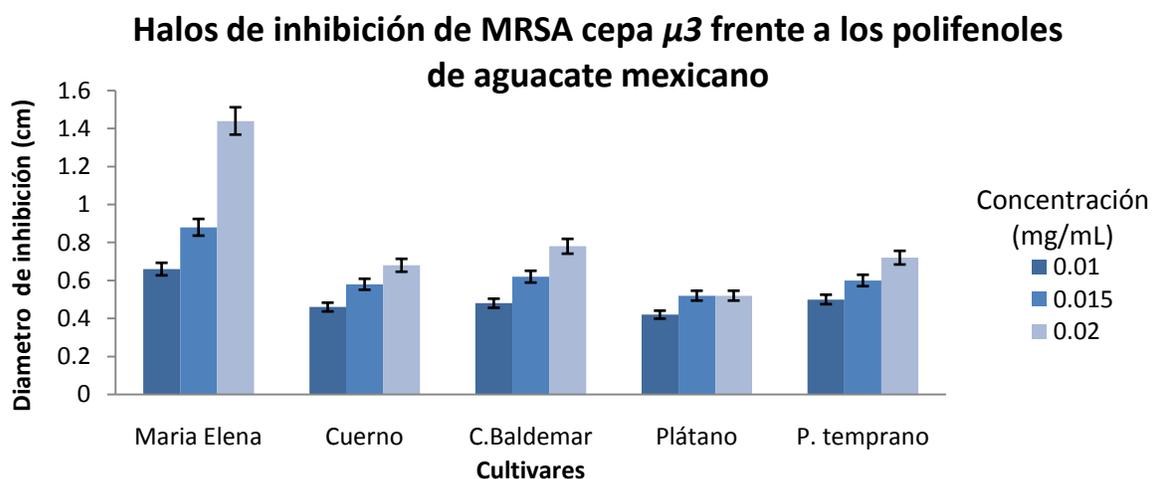


Figura 15. Gráfico de los halos de inhibición (cm) de MRSA cepa $\mu 3$ frente a los polifenoles totales de los extractos de hojas de aguacate mexicano en tres concentraciones distintas (0.01 mg/mL, 0.015 mg/mL, 0.02 mg/mL).

En el análisis de comparación de medias realizado bajo el estadístico de Tukey, dio como resultado que la variedad de María Elena posee una actividad antimicrobiana mayor en comparación a las otras cuatro variedades de aguacate mexicano (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. 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

Variedades con la misma letra, no hay una diferencia significativa. $p > 0.01$. N: tamaño de la muestra. E.E: error estándar.

4.2.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

En la determinación de la CMI y el CMB, fue utilizada la variedad María Elena, por presentar la mayor inhibición en el ensayo de antibiograma. Presentando un CMI de 100 μ -200 μ g/mL y un CMB de 200 μ g/mL. En la figura 19 están las observaciones obtenidas de estos dos ensayos.

4.2.2 Ensayo a la sensibilidad a antibióticos por inducción de los polifenoles de aguacate

En la **Figura 16**, puede observarse el resultado de la exposición MRSA cepa μ 3 frente a los distintos tratamientos del ensayo de antibiograma para la sensibilidad a

los antibióticos provocado por los polifenoles de aguacate, se presentaron presentando como diámetro de los halos de inhibición. Puede observarse, que el tratamiento de dicloxacilina no presentó ningún efecto sobre la bacteria. En el tratamiento que conlleva usar los polifenoles con el CMI obtenido de los ensayos anteriores, mostró una inhibición menor a lo obtenido en el antibiograma de Kirby-Bauer. Mientras en el tratamiento que combina los polifenoles junto con dicloxacilina, presenta una inhibición mayor de MRSA cepa $\mu 3$ que estas sustancias por separado, dando como resultado, un diámetro de inhibición de 0.953 ± 0.15 cm. Por medio del estadístico Tukey que se encuentra en el **Cuadro 5**, los resultados entre los tratamientos son estadísticamente distintos.

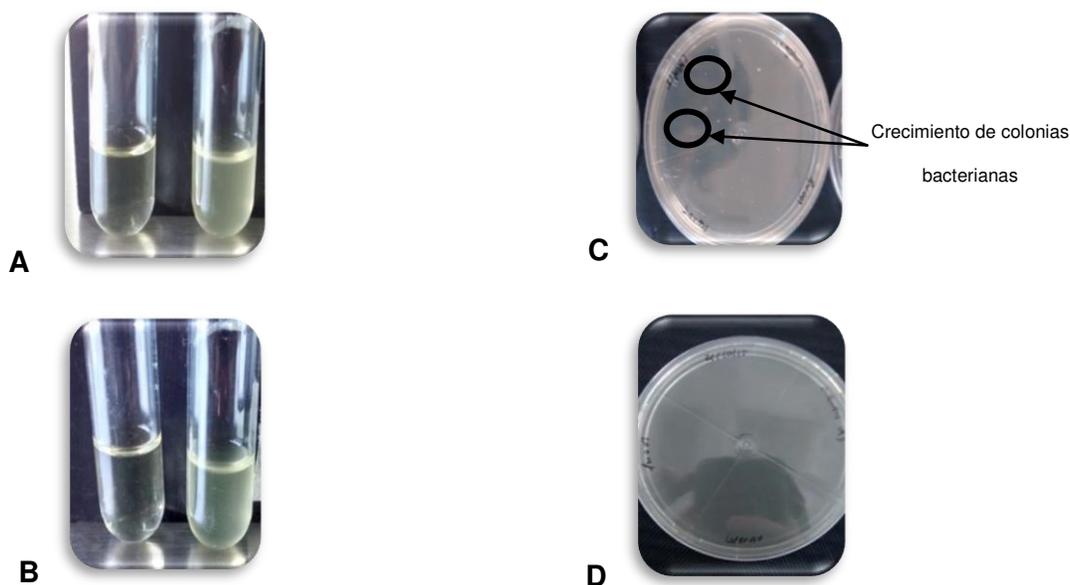


Figura 16. Imágenes de los resultados de los ensayos del CMI y CMB del cultivar María Elena. A; Comparación del tubo inoculado con MRSA cepa $\mu 3$ y polifenoles a una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ (izquierdo) y el inóculo inicial (derecho); B. Comparación del tubo inoculado con MRSA cepa $\mu 3$ y polifenoles a $200 \mu\text{g/mL}$ (izquierdo) contra el inóculo inicial (derecho). C; Crecimiento de colonias bacterianas, inóculo de tubo con MRSA y polifenoles a $100 \mu\text{g/mL}$ (A); D. Ausencia de crecimiento bacteriano del inóculo de MRSA y polifenoles a $200 \mu\text{g/mL}$ (B).

Cuadro 5. Análisis estadístico de los halos de inhibición de los tratamientos para la sensibilidad de antibióticos. Comparación de medias por Tukey.

Tratamiento	medias	n	E.E	
Extracto	0.5	15	0.02	A
Extr/Dicloxa	0.95	15	0.02	B
Genta	1.5	15	0.02	C
Dicloxacilina	0	15	0.02	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Exrt: Extracto; Dicloxa: Dicloxacilina.

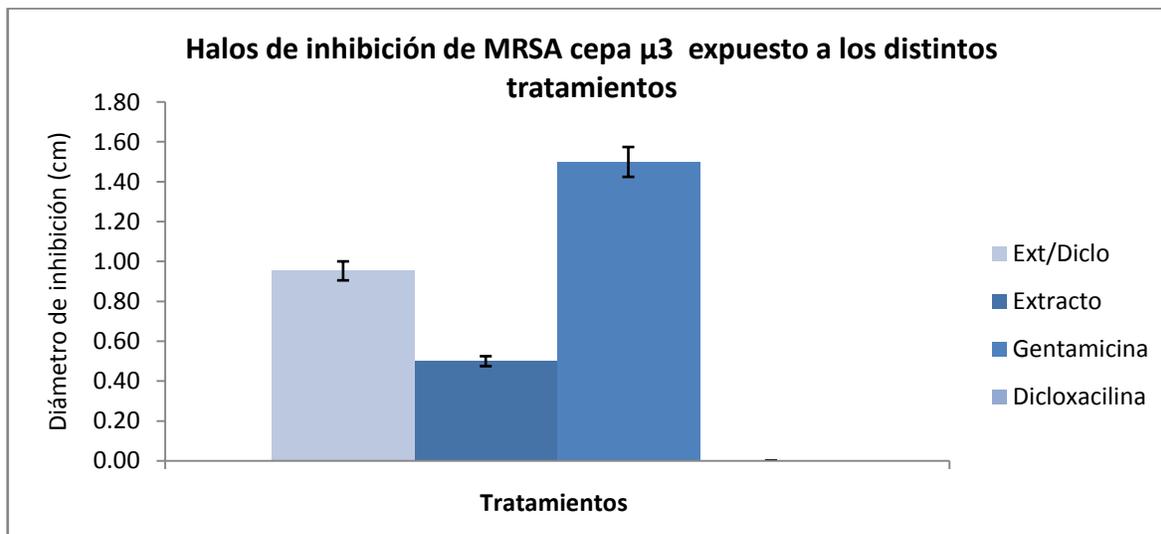


Figura 17. Gráfico del ensayo de sensibilidad a antibióticos promovido por la exposición de los polifenoles de aguacate (cultivar María Elena) en MRSA cepa $\mu 3$. Fue utilizado dicloxacilina como antibiótico experimental (β -lactámico). Se empleó como control Gentamicina. Dicloxacilina dio negativo para la prueba de sensibilidad, al no presentar halo de inhibición.

4.3 Análisis de microarreglos

En el **Cuadro 6** y **Cuadro 7**, están los datos resultantes de la comparación de la lectura del microarreglo de MRSA cepa $\mu 3$, comparándose la condición experimental (inducción con polifenoles) *versus* la condición control (inducción con etanol 70%). Los datos que corresponden a los que genes que presentaron una sobre expresión,

un puntaje z de +2 o mayor, mientras que los genes sub expresados, presentan un puntaje z de -2 o menor.

Cuadro 6. Resultado del puntaje z de los genes sobre expresados (<2) de MRSA cepa $\mu 3$ mediante la comparación de la condición control (Cy3) y la condición experimental (Cy5) y el Id de identificación del gen correspondiente.

Cy3 (control)	Cy5 (experimental)	Id	Symdesc	Puntaje Z
94	163	SAHV_1811	yent2	2.543894
111.3	171.3	SAHV_0973	null	2.001756
125.1	187.7	SAHV_0064	null	2.80358
127.9	192.3	SAHV_1125	null	2.68009
133.4	216.9	SAHV_2018	null	2.48236
135.2	234.9	SAHV_1022	null	2.949017
154.9	228.2	SAHV_1292	null	2.011734
160.5	228.4	SAHV_1780	null	2.248035
162.6	227.4	SAHV_1491	null	2.123231
161.3	261.1	SAHV_2296	null	2.088385
147.8	286.8	SAHV_1921	null	2.964744
161.9	262.2	SAHV_0854	null	2.093129
152.2	298.9	SAHV_0847	null	3.329749
146.1	339.3	SAHV_1407	null	3.611826
186.2	276.3	SAHV_0881	null	2.287404
183.1	318.2	SAHV_1321	null	2.862349
192.3	304	SAHV_2552	null	2.315957
200.1	339.2	SAHV_0614	sarA	2.162131
196.9	351.2	SAHV_1304	null	2.543293
208.6	331.9	SAHV_0060	ccrB	2.00001
202.5	365.3	SAHV_1569	hrcA	2.84449
217.2	350.6	SAHV_1268	null	2.417614
210.9	370.4	SAHV_1300	null	2.892848
197	428	SAHV_1391	null	3.604858
239.8	376.8	SAHV_0631	null	2.69264

249.9	369	SAHV_2440	null	2.212521
238.1	393.1	SAHV_2473	null	3.113731
257.6	392.3	SAHV_2463	null	2.232533
233.1	456.6	SAHV_0034	bleO	3.311195
300.8	419.5	SAHV_1608	null	2.044173
238.1	620.7	SAHV_0765	clpP	3.961524
308.2	500.1	SAHV_1766	null	2.035911
278.2	565	SAHV_2123	dps	3.047659
273.5	603.9	SAHV_0210	null	3.309007
331.4	522.1	SAHV_1264	pnpA	2.374647
321.6	580.3	SAHV_2005	null	2.836067
350.5	552.8	SAHV_0166	aldA	2.130447
318.3	623.6	SAHV_1568	grpE	3.407609
352.3	587.1	SAHV_2072	null	2.801193
363	624.4	SAHV_1810	sen	2.698714
367.7	650.6	SAHV_1054	null	3.27718
420.7	632.5	SAHV_1854	null	2.017001
367.6	783	SAHV_1567	dnaK	2.940555
337.7	891.1	SAHV_2671	null	3.691087
435.6	720.9	SAHV_0062	null	2.050452
382.3	889.4	SAHV_0335/	gloA	3.990427
470.3	818.6	SAHV_0336	null	3.017623
539.8	777	SAHV_1486	null	2.031106
748.5	1134.9	SAHV_2533	null	2.287866
774.2	1141.3	SAHV_1822	null	2.291101
930.1	1785.1	SAHV_2540	null	3.311455
1008.9	1655.5	SAHV_0522	clpC	2.548353
1219.5	1931.6	SAHV_0519	ctsR	2.395177
1286.9	2381.3	SAHV_0521	null	2.916026
1815.5	3754.7	SAHV_2236	null	3.315975
23161.3	37007.1	SAHV_0782	null	2.356129

*null: gene sin nombre asignado

Cuadro 7. Resultado del puntaje z de los genes sub expresados (>-2) de MRSA cepa $\mu 3$ mediante la comparación de la condición control (Cy3) y la condición experimental (Cy5) y el Id de identificación del gen correspondiente.

Cy3 (control)	Cy5 (experimental)	ID	Symdesc	Puntaje Z
165.3	128.6	SAHV_1447	null	-2.073348
184.2	137.4	SAHV_0958	null	-2.289698
194.1	135.6	SAHV_2133	null	-2.478025
197.9	138	SAHV_0310	null	-2.600175
214	137.5	SAHV_0624	null	-2.354342
243	122	SAHV_0201	null	-3.58663
218.4	151.2	SAHV_0743	null	-2.136528
232	150.8	SAHV_2311	null	-2.077183
233.4	151.2	SAHV_0779	null	-2.00563
236.1	152.4	SAHV_1164	null	-2.107044
272.6	144.7	SAHV_2566	null	-2.891764
261	155.1	SAHV_1258	null	-2.374425
261.8	157.1	SAHV_2378	narI	-2.524287
255.9	169.7	SAHV_2682	null	-2.091945
317.6	150.9	SAHV_2449	null	-2.833654
290.4	165.4	SAHV_0856	null	-2.182144
281.9	173.7	SAHV_2342	null	-2.110021
286.6	173.7	SAHV_2169	null	-2.605068
258.6	198.7	SAHV_0207	rlp	-2.141827
328.6	187.6	SAHV_1712	ptaA	-2.932967
312.8	202.9	SAHV_2423	null	-2.460657
315.3	202.3	SAHV_1986	null	-2.518411
327.1	220.8	SAHV_1932	null	-2.157985
329.6	219.8	SAHV_0343	null	-2.224844
364.8	211.6	SAHV_0126	null	-2.638494
362	227.4	SAHV_2028	nrgA	-2.646907

359.8	229.6	SAHV_0118	null	-2.600226
456.5	212	SAHV_2305	yocS	-3.938026
397.9	251.3	SAHV_0073	kdpC	-2.565867
393.2	256.2	SAHV_0529	null	-2.359582
400.4	259.3	SAHV_1431	null	-2.415408
390.4	269.2	SAHV_1706	tnp	-2.11236
396.2	272.7	SAHV_2007	null	-2.12447
455.1	264.6	SAHV_2428	null	-2.464493
434.9	281	SAHV_1845	tnp	-2.036585
449.7	277.4	SAHV_0011	null	-2.614179
493.2	272.1	SAHV_2554	null	-3.880806
500.1	287.1	SAHV_2479	null	-2.415552
486.3	306.6	SAHV_2166	asp23	-2.064461
480.4	325.2	SAHV_0010	null	-2.044444
504.3	331.2	SAHV_2221	rpsN	-2.083689
504.2	353.8	SAHV_1394	null	-2.00715
511.8	355.1	SAHV_1936	null	-2.0417
582.6	350.4	SAHV_0361	null	-2.612302
567.9	362.8	SAHV_0705	null	-2.330722
575.6	379.5	SAHV_2383	nasE	-2.243119
574.7	380.3	SAHV_0180	null	-2.35272
581.1	401.4	SAHV_2604	null	-2.100699
628.9	405.7	SAHV_1692	null	-2.046637
635.9	402.9	SAHV_0113	sirB	-2.326966
621.6	413.3	SAHV_0955	argH	-2.09445
767.3	425.3	SAHV_0223	null	-2.753558
757.9	469.2	SAHV_0628	null	-2.368637
808.2	455.8	SAHV_1070	null	-2.91626
775.9	494.9	SAHV_1259	infB	-2.533459
764.3	562.5	SAHV_1007	null	-2.016898
1084.6	433.4	SAHV_2692	null	-3.894599

1212.5	488.7	SAHV_2558	null	-4.331845
1054.4	679.9	SAHV_1154	null	-2.546802
1066.7	672.1	SAHV_2562	null	-2.693061
1111.9	665.5	SAHV_2669	null	-2.73146
1123.7	710.2	SAHV_0852	null	-2.366012
1225.8	816.3	SAHV_0162	capO	-2.261754
1224	840.8	SAHV_0240	lctE	-2.146612
1362.1	799.8	SAHV_2691	null	-2.774595
1396.3	912.2	SAHV_2527	null	-2.614082
1364.8	971.6	SAHV_0671	null	-2.220543
2034.5	1168	SAHV_2350	null	-3.55395
3162.7	1872.9	SAHV_0435	lpl2	-2.270429
4397.1	2887.7	SAHV_2303	null	-2.238524
8829.7	5535	SAHV_1933	null	-2.479052
29522.7	18593.1	SAHV_0577	null	-2.454968
51074.3	22744.7	SAHV_1433	null	-4.245987

*null: el nombre no pudo ser proporcionado por la base de datos.

Utilizando la base de datos de KEGG y Aureowiki, fueron localizados los nombres de los genes en base al Id (etiqueta de identificación) y clasificados en grupos de procesos celulares con base a la función que desarrollan en la bacteria (**Figura 21**).

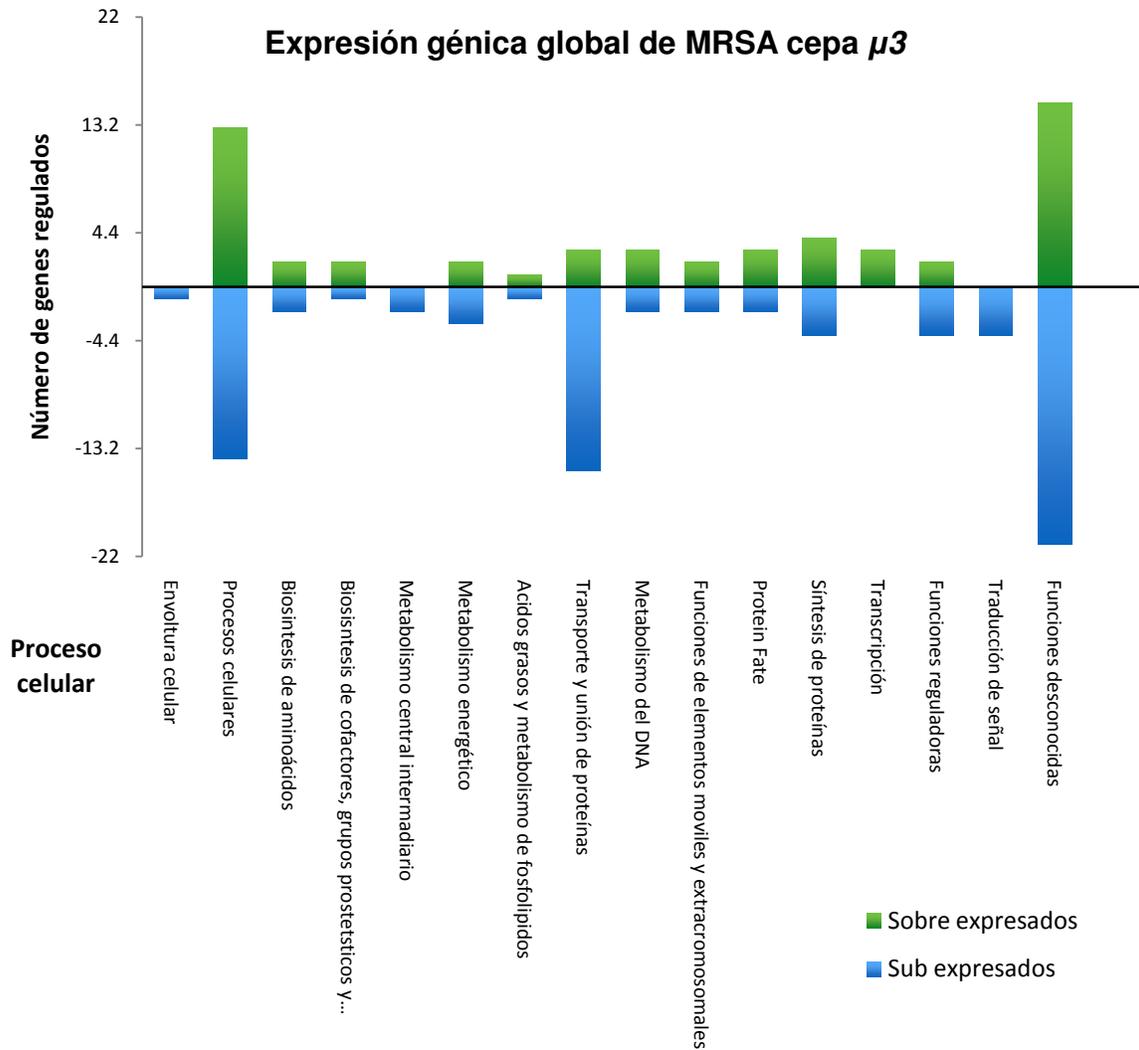


Figura 18. Gráfico de los genes afectados por los polifenoles de aguacate mexicano. Están clasificados por distintos grupos en base a su actividad en el sistema bacteriano. (Genes sub expresados puntaje Z -2 color azul; genes sobre expresados puntaje Z +2, color verde).

4.4 Ensayo para la expresión de *agrA* por medio de qPCR punto final de cuatro cepas de MRSA.

En la siguiente imagen (**Figura 19**) puede observarse una disminución en la expresión del gen *agrA* mediante la inducción de polifenoles de hojas de aguacate en

la cepa MRSA cepa $\mu 3$. Así mismo, fue calculada la cuantificación relativa de la cantidad de RNA para la expresión de *agrA* (**Cuadro 8**).

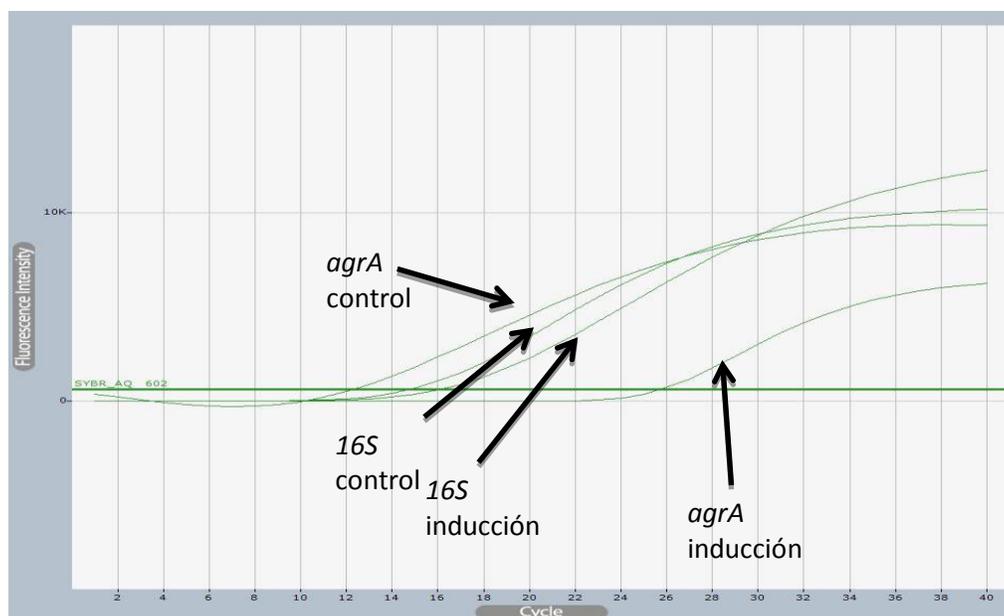


Figura 19. Curva de *Melting* de la expresión de *agrA* de MRSA cepa $\mu 3$, de la muestra control (etanol 70%) y la muestra inducida por el extracto del cultivar María Elena. El gen16S, fue utilizado como “housekeeping”.

Del mismo modo, este ensayo fue utilizado para las otras tres cepas de MRSA y la cepa $\mu 3$, obteniendo la cuantificación relativa de RNA de cada cepa contenida en la

Figura 20.

Cuadro 8. Cuantificación de la cantidad relativa de RNA, para la expresión del gen *agrA* en MRSA cepa $\mu 3$.

Gen	Valor de Ct	Cuantificación relativa	Cantidad relativa de RNA
16s inducido	14.72		
agrA inducido	25.68	1.74	0.57
16s control	16.04		
agrA control	12.24	0.76	1.31

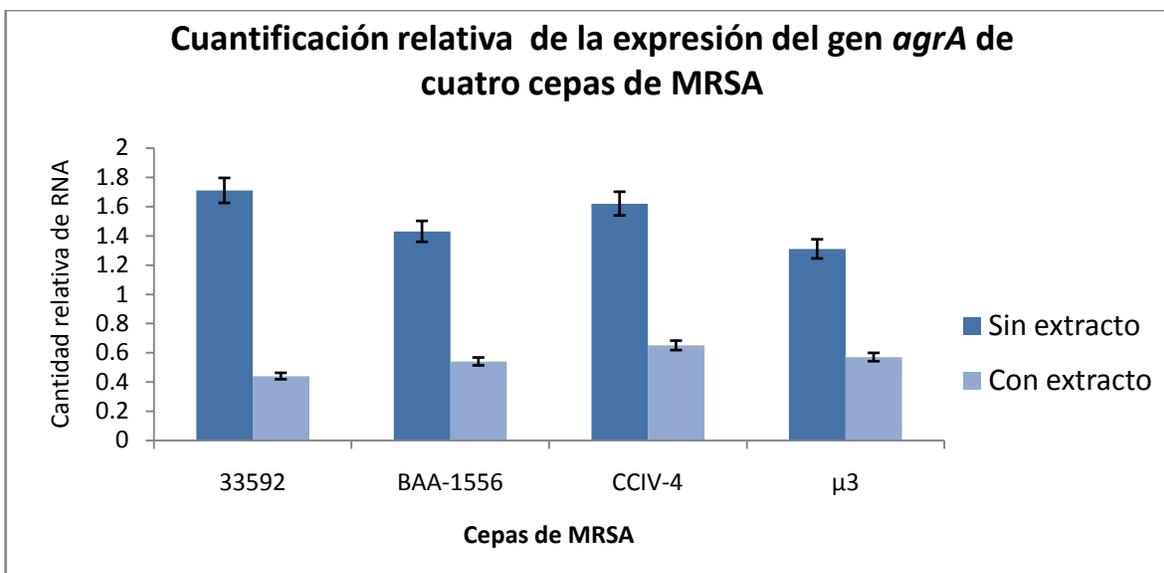


Figura 20. Gráfico de barras de la expresión del gen *agrA* de las cuatro cepas de MRSA expuestas a los polifenoles de aguacate mexicano (cultivar María Elena). Puede observarse, que la expresión de este gen es disminuida probablemente por los compuestos contenidos en el extracto, en comparación con el control, donde fue empleado etanol 70%.

4.5 Detección fitoquímica

Los ensayos fitoquímicos que se llevaron a cabo, demuestran (**Cuadro 9**) que no existe presencia de taninos o son de una concentración indetectable en los extractos. La concentración de flavonoides fue determinada, a base de la concentración 3 mg/mL de extracto, correspondió al equivalente de 1633.73 ppm de quercetina, esto quiere decir que el 54.4% del extracto posiblemente corresponde a este grupo de moléculas del total del contenido. En el caso de las saponinas, su presencia en los extractos fue baja. La captación del radical DPPH y la capacidad antioxidante contra el radical ABTS (**Cuadro 10**), dio como resultado un alto poder antioxidante por parte del extracto del cultivar de María Elena.

Cuadro 9. Fitoquímica de los compuestos presentes en el extracto del cultivar María Elena.

Prueba fitoquímica	Cultivar María Elena
Flavonoides	+++
Saponinas	+
Taninos	-

Nota: reacción negativa -, reacción positiva +, ++, +++.

Cuadro 10. Capacidad de captación de radical DPPH* y capacidad antioxidante del radical ABTS* de los compuestos presentes en el extracto del cultivar María Elena.

Ensayo fitoquímico	Cultivar María Elena
Capacidad de Captación radical DPPH (%)	94.23 ± 0.8
Capacidad antioxidante de radical ABTS	96.29 ± 1.5

Nota: La capacidad secuestradora y capacidad antioxidante fue expresada como el porcentaje de inhibición de DPPH* y ABTS*. Los valores son el promedio de n=3 ± 1.

4.6 Detección de los polifenoles de hojas de aguacate mediante UPLC-QTOF/MS^E

De la suspensión realizada a los polifenoles totales del cultivar María Elena, fue obtenida la siguiente cromatografía (**Figura 21**) con un total de 12 señales. El tiempo de retención de 0.78 minutos señalado como con el número **1**, corresponde al compuesto que presenta una mayor concentración que los demás contenidos en la muestra.

En el **Cuadro 11**, pueden observarse las masas experimentales obtenidas por la ionización en modo negativo y su patrón de fragmentación. A partir de estos datos,

puede indagarse sobre la identidad de los compuestos que están contenidos en el extracto de hojas de aguacate mexicano.

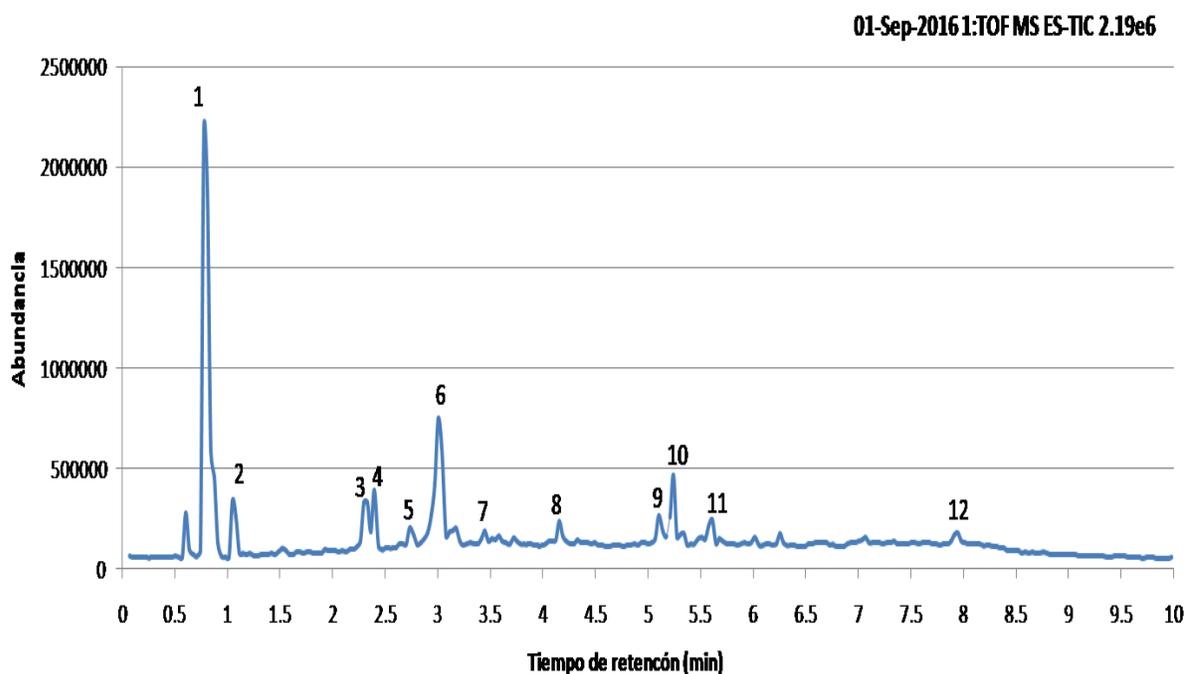


Figura 21. Cromatograma obtenido mediante una ionización en modo negativo ($[M-H]^-$) de los extractos de las hojas de aguacate mexicano cultivar María Elena. Obteniendo 12 señales, que corresponden posiblemente a polifenoles de la familia de los flavonoides. El primer pico se desprecia, ya que corresponde al tiempo que tarda la muestra entrar a la columna.

Para obtener un cromatograma, en la cual pueda observarse una buena calidad de separación, intervienen varios factores, como los compuestos que serán divididos y el modo en cual interaccionen con la columna y el disolvente (Hurtado *et al.*, 2011).

Cuadro 11. Señal MS observada para los 12 compuestos contenidos el extracto de hojas de aguacate cultivar María Elena en polaridad de iones negativos.

Señal	T. de retención (min)	m/z experimental	m/z teórica	Fragmentos
1	0.78	211.0914	212.0914	174.9744
2	1.05	375.0949	376.0949	309.1045 174.9745
3	2.30	451.1591	452.1591	174.9748
4	2.40	427.1299	428.1299	174.9740
5	2.74	563.1373	564.1373	463.1188 174.9745
6	3.01	431.1383	432.1383	174.9745
7	3.45	521.1053	522.1053	433.1561 389.1078 174.9751
8	4.16	401.0654	402.0654	174.9745
9	5.11	461.0098	462.0098	447.0360 174.9741
10	5.24	473.0982	474.0982	447.0351 174.9742
11	5.62	473.0979	474.0979	174.9745
12	7.95	493.1548	494.1548	174.9745 116.9577

Hay que considerar los parámetros cromatográficos ideales para la separación de los compuestos, como lo son: las fases móviles, temperatura, tipo de columna, modos cromatográficos, etc., de tal modo, podrá obtenerse una separación de calidad y una mejor resolución de las sustancias contenidas en la muestra (Naczki y Shahidi, 2006; Harnly *et al.*, 2007; Henrotin, 2008). Considerando los reportes ya publicados de compuestos provenientes de otras frutas y plantas, los resultados que obtenidos

fueron determinados por medio del uso de las fase móviles como agua + ácido fórmico (0.1%) y acetonitrilo.

En el **Cuadro 12**, se observan los compuestos tentativos contenidos de los extractos hojas de aguacate raza Mexicana. La información obtenida de los compuestos, es proveniente de otros ensayos de *Persea americana*. Los compuestos 2 y 9 no pudieron ser identificados por la ausencia de información referente a sus masas.

Cuadro 12. Identidad tentativa de las 12 señales MS ([M-H]⁻), encontradas en los extractos de hojas de aguacate mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) con base a revisión de literatura.

Señal	Tiempo de retención	m/z Experimental [M-H] ⁻	m/z Teórica	m/z Experiment al literatura	Identificación tentativa	Fórmula química	Referencia
1	0.78	211.0914	212.0914	211.0823	Perseitol	C7H16O7	López-Cobo <i>et al.</i> , 2016
2	1.05	375.0949	376.0949	ND*	-	-	-
3	2.30	451.1591	452.1591	451.1244	Catechin-O-hexoside	C21H24O11	Heras <i>et al.</i> , 2016
4	2.40	427.1299	428.1299	428.393	Catechin 3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexene-1-carboxylate)	C22H20O9	NCBI a, 2016
5	2.74	563.1373	564.1373	563.1406	Apigenin-C-hexoside-pentoside	C26H28O14	Vallverdú-Queralt <i>et al.</i> , 2011
6	3.01	431.1383	432.1383	431	Apigenin 8-C-glucoside	C21H20O10	Desta <i>et al.</i> , 2016
7	3.45	521.1053	522.1053	522.415	Quercetagenin-7-O-(6"-O-acetyl-beta-glucopyranoside)	C23H22O14	NCBI b, 2016
8	4.16	401.0654	402.0654	401.0878	Apigenin 7-xyloside	C20H18O9	("LIPID MAPS Databases", 2016)
9	5.11	461.0098	462.0098	ND*	-	-	-
10	5.24	473.0982	474.0982	473	Apigenin 7-O-(4-acetyl-Glc)	C23H22O11	Švehlíková <i>et al.</i> , 2004
11	5.62	473.0979	474.0979	473	Apigenin 7-O-(6-acetyl-Glc)	C23H22O11	Desta <i>et al.</i> , 2016
12	7.95	493.1548	494.1548	494.449	Peruvianoside II	C23H26O12	NCBI c, 2016

Nota: ND*, No hay datos

5. DISCUSIÓN

MRSA, es un microorganismo capaz de presentar resistencia prácticamente ante cualquier antimicrobiano existente, lo cual, demuestra la gran capacidad para adaptarse y sobrevivir en muchos medios. El éxito de la emergencia de cepas en hospitales y de comunidad, es debido a sus mecanismos de resistencia a antibióticos y factores de virulencia (Cervantes *et al.*, 2015). Además, este microorganismo es uno de los principales causantes de la mastitis bovina, lo cual produce una pérdida económica en este sector agropecuario. La tasa de mortandad por parte de *S. aureus* antes de los antibióticos era de un 80% en la salud humana y animal. Cuando la penicilina ingresó al cuidado animal y humano disminuyó hasta un 20%, pero, esto sucedió durante los primeros dos años, antes de que empezara el surgimiento de cepas resistentes, causando una preocupación más alarmante en el sector salud (DeLeo y Chambers, 2009). La utilización de productos medicinales a partir de plantas ha sido de una de las alternativas más eficaces para el control de enfermedades por patógenos infecciosos, debido a las propiedades antimicrobianas que poseen, demuestran que son el medio adecuado para combatir a *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos (Moromi *et al.*, 2007; Rachuonyo *et al.*, 2016).

Para la realización del extracto vegetal, fueron considerados diversos aspectos, como: toma de muestra, la conservación, la preparación de la misma y el análisis. Ésta fue preparada, para poder posteriormente aislar (es decir, extraer) y separar los componentes presentes de forma que puedan ser analizados (Andersen y Markham, 2006). En los tejidos vegetales existen enzimas endógenas (polifenoloxidasas)

(Rodríguez y Magro, 2008) que pueden degradar estos compuestos. Es por esto, que al momento de obtener el material vegetal, fue empaquetado y sometido a temperaturas frías, inmediatamente en el lugar de la recolecta que fue, evitando la degradación de los compuestos de interés. El proceso de secado de las hojas también fue considerado, debido a que la mayoría de los compuestos fenólicos son lábiles en estas condiciones, degradándose térmicamente antes del análisis (Grotewold *et al.*, 2006; Rostagno *et al.*, 2009). El material vegetal seco, una vez triturado, permite aumentar la superficie de contacto, facilitando la extracción (Machón *et al.*, 2015). Para la obtención de los compuestos del material vegetal, fue utilizada la extracción asistida por ultrasonido. A esta técnica es atribuido el fenómeno de cavitación, donde aplicando ultrasonido se forman y comprimen burbujas cavitatorias; provocando “ondas de choque” que pasan a través del medio, formando una solución disolvente-compuestos (Rostagno *et al.*, 2009). Para recuperar los compuestos de esta mezcla, la Amberlita XAD-16 de Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) es una resina que recupera moléculas no polares como los fenoles, por adsorción en solventes polares (etanol 96%). El mantener la columna de resina húmeda en todo momento es crucial, para un mejor rendimiento en la captación de los compuestos fenólicos (Villegas *et al.*, 2012).

Para la actividad antimicrobiana exhibida por los extractos de hojas de aguacate mexicano, obtuvimos inhibición de estos frente a MRSA cepa $\mu 3$. En una concentración de 0.02 mg/mL de polifenoles fue obtenido una media de 14 ± 0.2 mm de halo de inhibición de MRSA cepa $\mu 3$. Además, los valores correspondientes al CMI y CMB, 0.1 mg/mL y 0.1–0.2 mg/mL respectivamente. Akipenlu *et al.* (2014),

reportan el uso de extracto crudo de corteza del tallo y la fracción butanólica en una concentración de 25 mg/mL y 10 mg/mL, frente a un microorganismo Gram positivo (*Bacillus cereus*), obteniendo una zona de inhibición de 10 mm y 26 mm respectivamente. También, fue obtenido un CMI de 0.78 and 5.00 mg/mL respectivamente. Para el CMB fue de un rango de 3.12 mg/mL–12.5 mg/mL y 1.25–10 mg/mL. Rodríguez-Carpena *et al.* (2011), emplearon acetona para obtener extractos a partir de pulpa, cáscara y semilla de variedades de aguacate comercial, como el “Hass” y el “Fuerte”, realizaron pruebas de sensibilidad de estos extractos frente a *S. aureus*, en donde el extracto de pulpa de la variedad “Fuerte” obtiene el mejor resultado con una zona de inhibición de 8.93 mm de diámetro con una concentración de extracto de 2 mg/mL. Pesewu *et al.* (2008) para inhibir MRSA aislado de una úlcera, utilizaron extractos de *Persea americana* obtenidos con cloroformo y reconstituidos en etanol al 80%. La zona de origen del árbol de aguacate es en el país de Ghana, en el cual también es utilizado como planta medicinal. Con una concentración de extracto de 0.5 mg/mL, presenta una zona de inhibición de 24 mm. Además, para este extracto presenta un CMI de 6.3 mg/mL y un CMB de 25 mg/mL. Ortega *et al.* (2011), obtienen una zona de inhibición de 3.77+0.49 mm de diámetro, al utilizar éter etílico para obtener extractos de semilla de la variedad comercial de aguacate “Hass” contra *S. aureus*.

Las diferencias obtenidas en los distintos ensayos encontraste con esta investigación, es probable las diferentes variantes entre estos, desde la toma de la muestra vegetal, la condiciones en las que fue recolectada, la temporada, así como su preservación para evitar la degradación de los compuestos bioactivos de interés,

que están involucrados posiblemente en la actividad antimicrobiana de las especies vegetales. Otro punto importante y crucial, es el método de extracción de los componentes bioactivos, ya que, dependerá de la polaridad del solvente con el cual se desea extraer los compuestos o el utilizar cierta fracción de un extracto madre, para el aislamiento de un grupo en particular de moléculas para estudiar su actividad biológica presente. Siendo así, el resultado obtenido por Pesewu *et al.* (2008) es más cercano, al obtenido en la investigación, pero, la diferencia que deja entrever un mejor resultado analizando los datos, por la concentración empleada en el ensayo, requiriendo 50 veces más extracto, en la cita ya mencionada, que en el de esta investigación.

Durante los últimos años, hay una alza en la búsqueda de moléculas adecuadas para la modulación de la expresión génica en bacterias patógenas, principalmente la inhibición o atenuación de factores de virulencia y principalmente el bloqueo del sistema comunicación bacteriana, llamado *Quorum Sensing* (QS). Este sistema, es un proceso de señalización celular, que les permite a las bacterias secretar moléculas señal llamadas péptidos autoinductores (AIP) y reconocer la concentración de estas en el ambiente. Cuando hay una población celular alta, estos AIP's aumentan conforme a la densidad bacteriana. Una vez alcanzado cierto nivel de moléculas señal, ciertos genes son blancos de estas señales y pueden ser regulados a través de este mecanismo. Estos genes pueden involucrar diversas funciones vitales para la bacteria, como: proteasa extracelular, polisacárido extracelular (EPS), bioluminiscencia, biosíntesis de antibióticos, formación de biofilm, movilidad, transferencia conjugada de plásmido y factores de virulencia (**Figura 3**). Todo este

despliegue de procesos son indispensables en la expansión y supervivencia de las bacterias (Tan, Yin, y Chan, 2013; Chen y Xie, 2011).

La secuenciación ha venido a revolucionar los análisis en la metagenómica, permitiendo comprender la expresión génica en una escala global a través del uso de microarreglos (Elinav *et al.*, 2016). Por lo tanto, los datos obtenidos del análisis, ayudarán a puntualizar qué genes se transcriben y en que medida (Franzosa *et al.*, 2014). De este modo podemos identificar las vías metabólicas funcionales de las bacterias y asociarlas en un medio o estímulo específico (Bikel *et al.*, 2015). De tal forma, pueden observarse los cambios en la expresión génica de MRSA cepa $\mu 3$ frente a los polifenoles de las hojas de aguacate mexicano y como sus componentes influyen en las diferentes funciones que desarrollan en la bacteria. La expresión en diversos procesos celulares importantes para MRSA cepa $\mu 3$ presentaron una modulación en su expresión, ya sea en un modo sub-expresado exhibiendo un puntaje z de -2 o menor a este, o una sobre-expresión en su comportamiento, con un puntaje z de +2 o mayor. Dentro del grupo de genes afectados, sobresalen el grupo de Procesos celulares, Energía de metabolismo Síntesis de proteínas, Transcripción, Regulación de funciones de proteínas, Transporte y unión de proteínas, Traducción de señal, Funciones de elementos móviles y extracromosomales, además, de Envoltura celular. Esto puede corresponder a la presencia de los compuestos identificados contenidos en el extracto de hojas de aguacate mexicano: flavonoides y saponinas, conocidos por ser biológicamente activos y contribuir a las actividades antimicrobianas, además de presentar un alto poder antioxidante, como lo obtenido en el ensayo de DPPH y ABTS (Sharma *et al.*,

2011; Wojdyło *et al.*, 2013; Legua *et al.*, 2013). Los componentes del extracto, presentan distintos mecanismos de acción sobre las bacterias patógenas. En el caso de los flavonoides, ácidos fenólicos y saponinas, tienen la capacidad de inhibir la acción enzimática de proteínas, ruptura de ácidos grasos, aumentar la permeabilidad de la membrana celular, así, como la inhibición del transporte de proteínas (Lamb y Cushnie, 2005). Observamos la caída en la expresión de proteínas que regulan el paso de iones en la bacteria, como son las bombas de flujo, *mnhF* (transporte de iones Na⁺ y K⁺) (Sannasiddappa *et al.*, 2015), de la proteína anti transporte de Na⁺ (*yjbQ*) (Yu y Ye, 2015). También fue afectada la expresión de las bombas de flujo *norA* y *norB*, las cuales están encargadas de la salida de moléculas letales a la célula bacteriana (Ding *et al.*, 2008) las cuales forman parte de los factores de virulencia, así como, el operón *Vra*, importante en el metabolismo de la pared bacteriana y la formación de *biofilm* (Cuarón *et al.*, 2012). El operón *Vra*, es un componente que presentan los *S. aureus* resistente a vancomicina (Cuarón *et al.*, 2012).

Otro de los mecanismos que presentan los polifenoles, es la propiedad de inhibir factores de patogenicidad e inhibición de biosíntesis de proteínas (Lamb y Cushnie, 2005; Lizcano y Vergara, 2008). Conforme al mecanismo de los polifenoles, genes como el *r17AE*, el cual codifica para una proteína ribosomal, que forma parte del ribosoma 70S (SACOL1287 - AureoWiki, 2016) y el gen *infB* (Baba *et al.*, 2007), son elementos esenciales para la síntesis de proteínas, presentaron una sub-expresión por inducción de los compuestos contenidos en los extractos de aguacate.

Por otra parte, los flavonoides y los polifenoles afectaron otras funciones bacterianas, como el transporte de proteínas en membrana y la estabilidad de la membrana,

provocando una mayor permeabilidad (Lamb y Cushnie, 2005). Esto provocó la inhibición de *Kpdc*, componente del sistema de MRSA cepa $\mu 3$, que es una proteína integral de la membrana, sensor y bomba de flujo de iones K^+ , que además, es también un efector en la expresión de genes de virulencia (Xue *et al.*, 2011). Este gen (*Kpdc*), es un efector independiente del locus de *agr*, parte del sistema de (QS), que también a su vez, todos sus componentes (*agrA*, *agrB*, *agrC* y *agrD*) están en una sub-expresión. Esto produce una interrupción en la comunicación con las demás bacterias circundantes, al igual, *RNAIII* presentó una sub-expresión al no estar el efector *agrA* activándolo, evitando el despliegue de genes de virulencia (Chevalier *et al.*, 2010), como los genes que codifican para la él polisacárido incorporado a la membrana bacteriana, como lo son *capO* y *capD*, quienes codifican la síntesis de las proteínas CapO y CapD, las cuales estas asociadas a la colonización del patógeno (Xue *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2014) presentan una sub-expresión debido a la interrupción de estos genes asociados la patogénesis de MRSA.

Además, los componentes fitoquímicos de *P. americana* var. *drymifolia*, provocaron la sobre-expresión de componentes celulares en respuesta a la desestabilidad homeostática de MRSA cepa $\mu 3$. En esta situación, está sobre-expresado el gen para la proteína *ChB* (QuitinosaB) (Chung *et al.*, 2014), la cual tiene como función la modulación de la superficie de membrana, así, como la formación de *biofilm*. También, encontramos sobre-expresados genes adicionales, para mantener el equilibrio de la membrana, como el gen *AcpD*, encargado en la síntesis de ácidos grasos y Fosfolípidos (Gardete *et al.*, 2012). De igual forma, el gen *ecsA*, el cual pertenece al transportador de casete (ABC) unido a ATP, tiene la función en la

membrana además de transportador, dar estructura (Jonsson *et al.*, 2010). Estos genes fueron sobre-expresados en consecuencia de la des estabilidad de la membrana, causada por los compuestos fenólico contenidos en los extractos. Los fitoquímicos presentes, 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.

En otro grupo de genes que presentó una sobre-expresión, están el gen *gloA*, que codifica para la proteína de resistencia glyosa/bleomicina (SAUPAN001874000-AureoWiki, 2016); *bleO*, para la proteína de resistencia a bleomicina (Cheng *et al.*, 2016). Esta expresión de genes de resistencia a antimicrobianos, deja entre ver el mecanismo que desencadenan los polifenoles una vez que están dañando los procesos celulares más importantes de la bacteria, produciendo un efecto similar a los antimicrobianos sintéticos, pero, sin producir una resistencia a estos. Una sobre-expresión de los genes *senB*, que produce la enterotoxina N (Bardiau *et al.*, 2016); *yent2*, enterotoxina (Brackman *et al.*, 2016) es del modo en cual la bacteria intenta atacar los compuestos que están afectando la integridad de la bacteria.

Uno de los operones más importantes dentro de los sistemas de virulencia de MRSA cepa $\mu 3$ que se encuentra en sobre-expresión, es el operón *clp*, es encargado de regular distintos procesos fisiológicos como el metabolismo, virulencia y resistencia a los antimicrobianos (Hecker, Schumann y Völker 1996, Conlon *et al.*, 2013). Siendo esto, un sistema importante para la patogénesis de la bacteria (Farrand *et al.*, 2013). La sobre-expresión del operón *clp*, provoca una proteólisis incontrolada causando la muerte celular bacteriana (Brötz *et al.*, 2005).

En última instancia, MRSA cepa $\mu 3$, sobre expresa *sarA*, el cual es un regulador global de la virulencia de MRSA por medio de sus factores principales como adhesinas y toxinas, además de la construcción de *biofilm* (Liang *et al.*, 2016). Pero, al estar bloqueado el sistema *agr* y por consiguiente la comunicación bacteriana (*quorum*) (Snowden *et al.*, 2013), no podría desplegarse ningunos de los mecanismos de patogenicidad u otro factor de virulencia. Debido a esta interrupción, provocó que la bacteria tenga un gasto de energía, de proteínas y producción de moléculas señal que no podrán ser traducidas y efectuar el mensaje.

Es por ello, fue realizada una identificación más precisa de los compuestos que están contenidos en los extractos de hojas de aguacate mexicano y de este modo, hacer una conjetura del mecanismo de acción de los polifenoles de hojas de aguacate raza Mexicana obtenido del cultivar María Elena.

Durante las últimas dos décadas, los estudios sobre extractos de plantas, ha venido en aumento, esto debido a los beneficios producen su uso. Información recabada de investigaciones sugieren, que la utilización de estos productos naturales, pueden prevenir enfermedades causadas por microorganismos patógenos, además, de evitar otro tipo de enfermedades degenerativas (Moromi *et al.*, 2007). Esto es posible a la estrecha relación que hay por la presencia de compuestos fenólicos.

De los compuestos observados en los extractos de hojas de aguacate mexicano, son moléculas pertenecientes a la familia de los flavonoides. Estos poseen tres anillos fenólicos comunes en su estructura (C6-C3-C6), a los cuales se les denomina anillo A, B y C. A esta forma se le denomina flavan. Con base a su conformación en la

hidroxilación y oxidación de sus anillos, son clasificados en diferentes clases como: flavonas, flavonoles, flavononas, flavanoles y antocianidinas (Heim *et al.*, 2002). En la **Figura 22**, pueden observarse las distintas estructuras de los diferentes tipos de flavonoide.

Los compuestos 5, 6, 8, 10, 11 y 12 (**Cuadro 12**), son sintetizados a partir de la apigenina, la cual, es un flavonoide de la clase flavon, moléculas de bajo peso molecular que son inofensivos en varias plantas, vegetales y frutas (Lefort y Blay, 2013). Otras propiedades que son atribuidas a los compuestos derivados de apigenina son: efecto antioxidante, anti-inflamatorio, efectos anti-carcinogénicos y antimicrobianos (Pereira, *et al.*, 2016; Lefort y Blay 2013; Shukla y Gupta 2010; Patel *et al.*, 2007).

Los compuestos 7, son moléculas obtenidas a partir de la quercetina, la cuales también pertenecen a los flavonoides vegetales de la clase flavonol, contenido en frutas y verduras. Generalmente, puede encontrarse como aglicona o glucósidos, especialmente glucósidos, en plantas. Este compuesto posee además de actividad antioxidante y antimicrobiana (Pereira *et al.*, 2016; Mukai *et al.*, 2016).

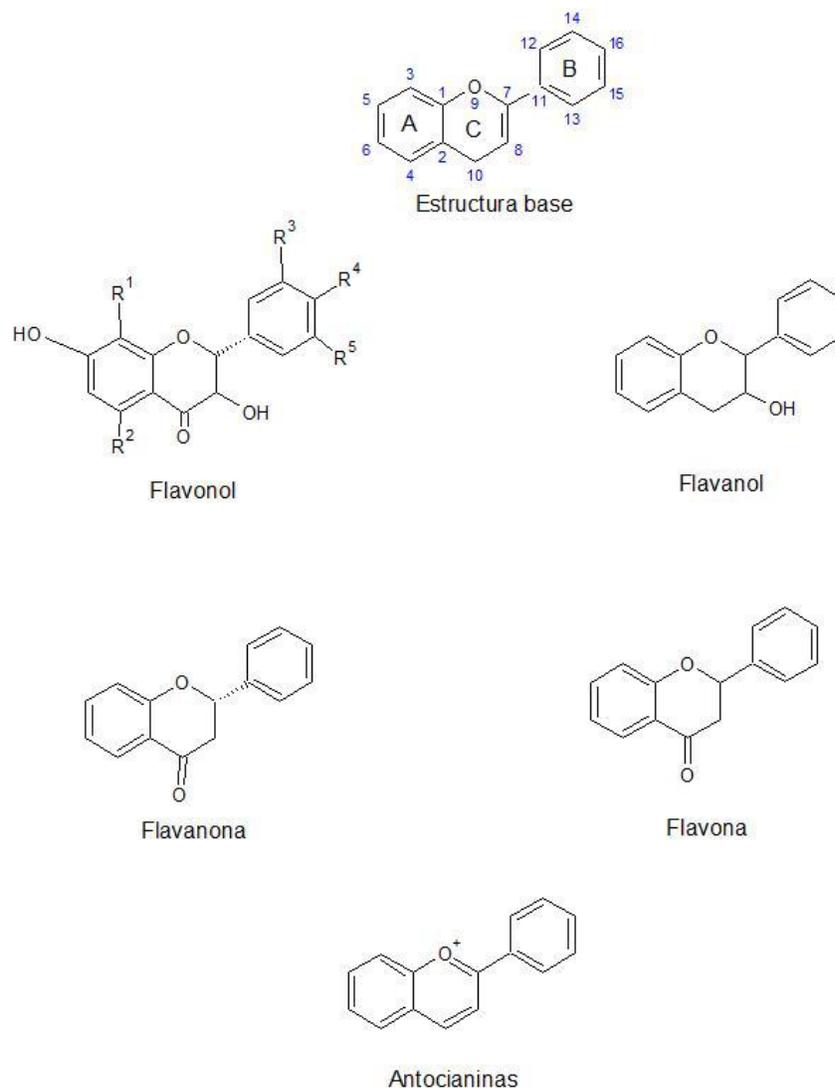


Figura 22. (a) Estructura fenólica común de flavonoides, flavan, la numeración de sus átomos de C y nombres de sus anillos. b) Estructuras de subclases de flavonoides. Basado en Pallauf *et al.*, 2016.

Las masas que corresponde a los compuestos 3, 4 y 12, son moléculas sintetizadas a partir de la Catequina. Es un flavonoide de la clase flavonoles (flavan 3-oles) el cual es una molécula que posee actividad antioxidante, anti-cancerígena, actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas y bacterias causantes de problemas periodontales (Ali *et al.*, 2011). En el caso del compuesto 12 (4'-O-methyl(-)-epicatechin-3'-O-beta-glucuronide), es una Epicatequina., Donde su estructura se

diferencia de los otros compuestos de Catequina, por la presencia de un grupo hidroxilo adicional en el anillo B aromático (**Figura 23**).

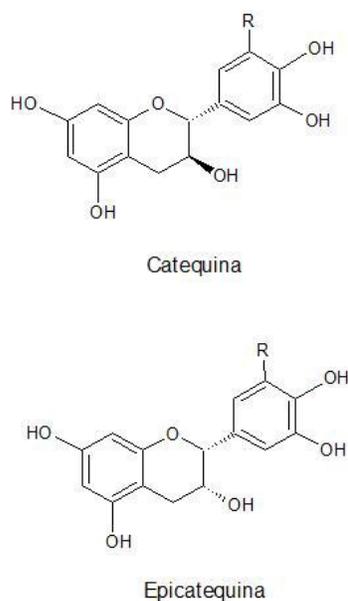


Figura 23. Estructura de las catequinas y epicatequinas. Basado en Taylor *et al.*, 2005.

Bhattacharya *et al.* (2016), refiere que los extractos que contienen compuestos fenólicos y flavonoides, son los responsables de la actividad antimicrobiana en estos. Además, esta capacidad antimicrobiana, está relacionada con la estructura de los compuestos fenólicos y los flavonoides, esto ha sido una suposición de distintos investigadores. Con base en informes realizados por Rojas *et al.* (1992) y Cushnie y Lamb (2011), la existencia del anillo hidroxilado en las posiciones 5 y 7 del anillo A y la posición 3 del anillo C contribuyen a la actividad antibacteriana de estos compuestos polifenólicos. El grupo (s) hidroxilo libre (s) en el anillo B de los flavonoides, se especula que también favorece la capacidad antimicrobiana de estos compuestos fenólicos (Cushnie y Lamb, 2011). Estos compuestos, siendo no solo agentes antimicrobianos, los compuestos fenólicos también presentan propiedades

anti-virulencia frente a la patogénesis de diferentes microorganismos (Yin *et al.*, 2015). Taylor *et al.* (2005) mencionan, que moléculas como las catequinas, tiene este efecto indirecto en la modulación de los mecanismos de infección y de resistencia a antibióticos de patógenos. Grupos japoneses como el de Zhao *et al.* (2001) con el uso de compuestos derivados a partir de catequina y galocatequina, reducen notablemente la CMI de meticilina, oxacilina y otros antibióticos β -lactámicos en aislamientos clínicos de MRSA. Stapleton *et al.* (2004) aplicando catequinas y galocatequinas, promueve la sensibilidad a los antibióticos β -lactámicos en 40 aislados clínicos de MRSA y encontrando que 12,5-25 mg/L de estos compuestos, reducen los valores de CIM para la oxacilina desde niveles de 256 y 512 mg/L a 1-4 mg/L.

También se ha podido ver el efecto que tienen las catequinas sobre la modulación de la resistencia bacteriana a los fármacos por medio de la inhibición de la bomba de las bombas de flujo asociadas a esta, como las bombas *Tet*, (Roccaro *et al.*, 2004). En este sentido, las bombas de flujo *Tet*, como las bombas de flujo *norA* y *norB*, son parte de los factores de resistencia en MRSA, en el análisis de microarreglos, como anteriormente mencionado, están en una condición de sub-expresión, con lo cual, esto podría indicar, otro vía de “sensibilización” a los antibióticos por parte de los compuestos contenidos en los extractos de hojas de aguacate mexicano. Zhang y Rock (2004) logran interrumpir los mecanismos y enzimas encargadas de la síntesis de la membrana y la pared celular, impidiendo la elongación de ácidos grasos necesarios para estos componentes esenciales a la bacteria. De igual modo, se afirma, que el daño a la membrana citoplasmática por generación de peróxido de

hidrógeno es debido a compuestos derivados de estos tipos de flavonoide, lo cual sucede por dentro de la bicapa (Arakawa *et al.*, 2004).

En estudios adicionales de la relación entre la estructura y la función de modificación de β -lactámicos, estos investigadores determinaron que las modificaciones del anillo B (**Figura 22**) de estos compuestos del tipo flavonoides, modifican el grado de sensibilidad a la resistencia de antibióticos. Estas observaciones sugieren que las interacciones de la membrana con estos compuestos, va de la mano con el grado de hidroxilación del anillo B, la presencia de un resto de galato y la estereoquímica del anillo en C. Algunos penetran en el núcleo hidrofóbico de la membrana, mientras que otros flavonoides, adoptan una estacionamiento más superficial cerca de la interfase fosfolípido-agua (Caturla *et al.*, 2003).

Estos resultados, sugieren que compuestos tipo flavonoide, producen una reversión a la sensibilidad a los antibióticos β -lactámicos en cepas de MRSA, en función de su capacidad para unirse a la membrana citoplásmica y penetrar en ella. Esta unión, produce un ambiente propicio para el daño de la superficie de la membrana y lograr una penetración en esta. Este comportamiento, produce cambios en el diseño de la pared celular, lo cual reduce la eficacia de la función de una serie de proteínas de la membrana, tales como las PBP (Taylor *et al.*, 2005).

Aunado a esta capacidad antimicrobiana por partes de estos grupos de compuestos fenólicos, existen distintos mecanismos de acción que presentan frente a las bacterias patógenas, algunas de la cuales, los antibióticos de última generación no logran combatir. Este modo de “ataque” por parte de flavonoides y polifenoles,

consiste en degradar la membrana citoplasmática de las bacterias, lo que produce la pérdida de iones (K^+), causando la autólisis de la bacteria, agregando, un aumento a la permeabilidad de su membrana de la membrana y disminuyendo el potencial produciendo que la bacteria no se capaz de moverse. También se evita el transporte de membrana y síntesis de ATP, haciéndolas más susceptibles al ataque inmunológico y potencia los antibióticos (Ponce y Millones 2015). Otro mecanismo que se sugiere poseen los flavonoides, es la inhibición de la actividad enzimática de varias proteínas requeridas en el desarrollo y crecimiento de las bacterias (Premoli *et al.*, 2010).

Con base a la literatura citada, en comparación a los resultados obtenidos del análisis del microarreglo de MRSA cepa $\mu 3$, generó datos, sobre el mecanismo de los polifenoles de aguacate mexicano sobre la bacteria. Causaron una modulación del comportamiento de los mecanismos más importantes, para su desarrollo, así como, en los mecanismos importantes en la patogénesis de la bacteria. Desde la inhibición de los genes relacionados con la comunicación bacteriana, en el cual también logró observarse una inhibición del gen encargado de la síntesis de la proteína señal del QS en MRSA, como lo logrado por Gordon *et al.* (2013), mediante la síntesis de compuestos con anillos hidroxilados, logran “atenuar” los genes de virulencia en MRSA, inhibiendo también la transcripción de *nalIII* y *SarA*, componentes que expresan factores de virulencia. De igual forma, con el ensayo de sensibilidad a antibióticos, pudo corroborarse que los polifenoles contenidos en las hojas de aguacate raza Mexicana, devuelven la sensibilidad a los compuestos β -lactámicos, mostrando una alternativa en la eliminación de infecciones relacionadas

con esta bacteria. No solo por irrupción de la membrana puede ser posible la eliminación de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos, sino también, en la expresión del gen *mecR1*, sensor activador, que encuentran en el cassette cromosomal móvil (SCCmec) de MRSA (Peacock y Paterson, 2015). MecR1, permite la activación de *mecA*, responsable de la resistencia, que le permite la biosíntesis de la pared celular, el blanco de antibióticos β -lactámicos. En el anexo 1, puede observarse, que este gen se encuentra una sub-expresión con un puntaje z de -1.987535, con lo cual, esto apunta que los polifenoles, no lo 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 de los compuestos encontrados, es el perseitol. El cual, no corresponde a ningún grupo de los compuestos fenólicos, este se encuentra en gran presencia en plantas como el aguacate, contenido en el floema y dirigido a las flores (Minchin *et al.*, 2012). Ha sido reportado, la presencia de este compuesto, en otras partes de la planta, como en la pulpa, cáscara y semilla (López *et al.*, 2016). En esta investigación, se encontró en los extractos provenientes de las hojas de aguacate raza Mexicana, de tal modo, su presencia también se extiende estos órganos de la planta. Además, se desarrolló una patente con la utilización de este componente del aguacate, como método de protección para la piel sana e inmadura de bebés y niños; piel patológica e inmadura de bebés y niños; o una piel saludable o patológica de individuos adultos o ancianos. Este formulación permite estimula péptidos antimicrobianos de la familia de las catelicidas y / o de las beta-defensinas (Piccirilli *et al.*, 2015). Este mismo podría estar de igual forma que los flavonoides detectados,

está influenciando en la represión de la expresión de procesos celulares bacterianos importantes, afectando ciertos mecanismos o en conjunto con los compuestos ya mencionados.

Cabe destacar, que los picos de las señales 2 y 9 del cromatograma del extracto de hojas de aguacate, podrían ser compuestos, que estén involucrados en el mecanismo de acción antimicrobiana, dentro de los mencionados sitios diana, en los cuales los polifenoles del tipo flavonoide actúan.

6. CONCLUSIONES

- Los polifenoles obtenidos de hojas de aguacate raza Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), poseen actividad antimicrobiana sobre MRSA cepa $\mu 3$. Donde el cultivar María Elena, presentó el mayor efecto antimicrobiano con CMI de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un CMB de 100- 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Los polifenoles contenidos en las hojas de aguacate raza Mexicana, en su mayor parte son del tipo flavonoide, derivados a partir de apigenina, catequina y quercetina.
- Los polifenoles contenidos en las hojas de aguacate raza Mexicana, provocaron una modulación de distintos procesos bacterianos como, comunicación bacteriana, factores de virulencia y patogénesis, regulación de la membrana, síntesis de ácidos grasos de la membrana plasmática, síntesis de proteínas y resistencia a antibióticos β -lactámicos.

PERSPECTIVAS

Para conocer más sobre los mecanismos de acción que poseen los compuestos contenidos en el extracto de hojas de aguacate mexicano, hará falta hacer una purificación de estos y analizar el efecto que desarrollan por separado. También, es necesario realizar ensayos con células animales y corroborar que no exista una toxicidad o muy sea muy baja, para el desarrollo de fármacos. Además, de hacer experimentos en otras bacterias patógenas de gran importancia en las actividades humanas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, V., Pereyra, B., Sánchez, R., Galán, L., De La Garza, M. y Alcázar, A. 2013. Evidence of cross gene regulation of some virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* by *Streptococcus intermedius*. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 12: pp. 4498-4502.
- Akers, R. y Nickerson S. 2011. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 16(4): pp. 275-289.
- 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): pp. 416-429.
- Ali, F., Hossein, O., Ahmad, M., y Shayan, G. 2011. Biochemical and biological properties of polyphenolic catechins in green tea extract for health benefits. *Clinical Biochemistry*, 44(13): pp. 338.
- Alli, K. y Mangamoori, L. 2016. Phytochemical compound identification and evaluation of antimicrobial activity of *Eugenia Bracteata* Roxb. *International journal of biotechnology and biochemistry*, 12(1): pp. 73-83.
- Andersen, Ø. y Markham, K. 2006. *Flavonoids*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor y Francis. pp. 1-36.

- Arakawa H, Maeda M, Okubo S, Shimamura T. 2004. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27: pp.277–281.
- Baba, T., Bae, T., Schneewind, O., Takeuchi, F., y Hiramatsu, K. 2007. Genome sequence of *staphylococcus aureus* strain newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *Journal of Bacteriology*, 190(1): pp. 300-310.
- Baquero, F. y Turrientes, M. 2013. Un ecosistema malalt: la lluita contra la resistència a antibiòtics des d'una perspectiva global. *Mètode Popular Science Journal*, 0(78).
- Bardiau, M., Caplin, J., Detilleux, J., Graber, H., Moroni, P., Taminiau, B., y Mainil, J .2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Veterinary Microbiology*, 185: pp. 1-6.
- Barrero, P.R. 2005. Aplicaciones de la técnica de microarrays en ciencias biomédicas: presente y futuro. *QuímicaViva*, número 3, año 4.
- Barrientos, A. y López, L. 2002. Historia y genética del aguacate. In: Memoria de la Fundación Salvador Sánchez Colín. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México. Coatepec de Harinas, México: pp.100-121.

- Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Patra, M. M., Chakravorty, S., Sarkar, S., Chakraborty, W., Koley, H. y Gachhui, R. 2016. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against enteric bacterial pathogens. *Current Microbiology*, 73(6): pp. 885-896.
- Bikel, S., Valdez L, A., Cornejo G, F., Rico, K., Canizales Q, S. y Soberón, X. 2015. Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 13: pp. 390-401.
- Brackman, G., Breyne, K., De Rycke, R., Vermote, A., Van Nieuwerburgh, F., y Meyer, E. 2016. The *Quorum Sensing* inhibitor hamamelitannin increases antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms by affecting peptidoglycan biosynthesis and eDNA release. *Sci. Rep.*, 6: pp. 20321.
- Brötz O, H., Beyer, D., Kroll, H., Endermann, R., Ladel, C., Schroeder, W., Hinzen, B., Raddatz, S., Paulsen, H., Henninger, K., Bandow, J. E., Sahl, H. y Labischinski, H. 2005. Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat Med*; 11: pp.1082–7.
- Castillo J, I., González, V., Jaime A, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., y Romero, I. 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2): pp. 402-405.

- Caturla N, Vera S E, Villalaín J, Reyes Mateo C, Micol V. 2003. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology and Medicine*; 34: pp. 648–662.
- CDC. 2014. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Infections*. Centers for Disease Control and Prevention. [http://www.cdc.gov/mrsa/health care/index.html](http://www.cdc.gov/mrsa/health%20care/index.html). Revisado el 24 de Junio del 2015.
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, José., Delgado, W., Cuca, L.E. 2008 Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. Una revisión. *Revista de Agronomía Colombiana*.; 26(1): pp.97-106.
- Cervantes, E., García, R., Salazar, P. 2014a. Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinamer Patol Clin*. 61: pp. 28-40.
- Cervantes E., García R., y Salazar P. 2014b. Importancia de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. *Rev Latinamer Patol Clin*.; 61: pp.196-204.
- Cervantes, E., García, R., y Salazar P. 2015a. *Staphylococcus aureus* asociado a la comunidad (CA-MRSA). *Revista Latinoamericana De Patologia Clinica*, 62(2): pp.100-111.
- Chambers, H. y DeLeo, F. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9): pp. 629-641.

- Chan, Y., Kim, H., Schneewind, O. y 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): pp.15680-15690.
- Chen, J. y Xie, J. (2011). Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *Journal Of Cellular Biochemistry*, 112(10): pp. 2694-2702.
- Cheng, J., Zhao, L., Fu, G., Zhou, W., Sun, Y., 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., y Fechter P. 2010. *Staphylococcus aureus* RNAIII 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., y van Hoek M. 2014. Chitinases are negative regulators of *Francisella novicida* biofilms. *PLoS ONE* 9(3): pp.93-119.
- Conlon, B., Nakayasu, E., Fleck, L. 2013. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature*; 503: pp. 365–70.
- Cornaglia, G. 2009. Fighting infections due to multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 15 Number 3.

- Crossley, K., Jefferson, K., Archer, G., Fouler, V. 2009. *Staphylococci in human disease*. 2nd Edition. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Cuaron, J. A., Dulal, S., Song, Y., Singh, A. K., Montelongo, C. E., Yu, W., Nagarajan, V., Jayaswal, R. K., Wilkinson, B. J. y Gustafson, J. E. 2012. Tea tree oil-induced transcriptional alterations in *Staphylococcus aureus*. *Phytother.Res.*, 27(3): pp. 390-396.
- Cushnie, T., Lamb, A. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag* (38): pp. 99–107.
- Daum R. 2007. Skin and soft tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Med Association*.35: pp. 380-390.
- 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.
- De la Fuente, N., Villarreal, J., García, A., Díaz, M. 2016. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46: pp.7-16. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57946148002>.
- DeLeo, F., Chambers, H. 2009. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *Journal of Clinical Investigation*: 119(9): pp. 2464-2474.

Desta, K. T., Lee, W. S., Lee, S. J., Kim, Y., Kim, G., Lee, S. J., Kim, S. T., Abd El-Aty, A. M., Warda, M., Shin, H., Shim, J. H. y Shin, S. C. 2016. Antioxidant activities and liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry characterization and quantification of the polyphenolic contents of *Rumex nervosus* Vahl leaves and stems. *J. Sep. Science*, 39(8): pp. 1433-1441.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Díaz, E., Almeyda, H., y Hernández, L. 2013. Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: región norte. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*; 4: pp.531-542.

Ding, Y., Onodera, Y., Lee, J., y Hooper, D. 2008. NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. *Journal of Bacteriology*, 190(21): pp. 7123-7129.

Edris, AE. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res*; 21: pp.308-323.

Elinav, E., Bashardes, S., Zilberman-Schapira, G. y Elinav, E. 2016. Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research. *BBI*, 19.

- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Bilthoven: EARSS, 2008. Disponible en: [http:// www.earss.rivm.nl/](http://www.earss.rivm.nl/).
- Farrand, A., Reniere, M., Ingmer, H., Frees, D., y Skaar, E. 2013. Regulation of host hemoglobin binding by the *Staphylococcus aureus* Clp proteolytic system. *Journal of Bacteriology*, 195(22): pp.5041-5050.
- Franzosa, E., Morgan, X., Segata, N., Waldron, L., Reyes, J. y Earl, A. 2014. Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings of The National Academy Of Sciences*, 111(22): pp. E2329-E2338.
- Galán, J. C.; González, F., Rolain, J. y Cantón, R. 2013. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the β -lactamases world. *Frontiers in Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*.
- Galindo, W.F., Rosales, M., Murgueitio, E. y Larrahondo, J.E. 1989. Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón. *Livestock Research for Rural Development*. 1(1): pp. 1-6.
- Garbanzo, M. 2011. Manual de Aguacate: Buenas prácticas de Cultivo variedad hass. 2 Ed. San Jose, C.R.
- Gardete, S., Kim, C., Hartmann, B., Mwangi M. y 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.
- Garro, A., Cardona, W., Rojano, B., Robledo, S., y Alzate, F. 2015. Antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Pilea dauciodora* Wedd (*Urticaceae*). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 20(1): pp.88-97.
- González, G., Raes, K., Vanhoutte, H., Coelus, S., Smaghe, G., Van Camp, J. 2015. Liquid chromatography–mass spectrometry coupled with multivariate analysis for the characterization and discrimination of extractable and nonextractable polyphenols and glucosinolates from red cabbage and Brussels sprout waste streams. J. Chromatogr.1402: pp. 60–70.
- González, A. 2004. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas. Pregrado Tesis, Universidad Nacional de Colombia- Sede Maizales.
- Gordon, C., Williams, P., y Chan, W. 2013. Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: a medicinal chemistry perspective. J. Med. Chem., 56(4): pp. 1389-1404.
- Grotewold, E., M. Stobiecki, y P. (2006). Kachlicki, Isolation and Identification of Flavonoids, in The Science of Flavonoids. Springer New York. pp. 47-69.
- Growitz, R. 2008. A review of community-associated *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. Pediatr Infect Dis J.; 27: pp. 1-7.

- Gurib, A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27: pp. 1–93.
- Gutiérrez, A., Martínez, J., García, E., Iracheta, L., Ocampo, J. D. y Cerda, I. M. 2009. Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(1): pp. 9-18.
- Hagerman, A. y Butler L. 1989. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *J ChemEcol*; 15: pp.1795-810
- Harnly, J., Bhagwat, S. y Lin, L. 2007. Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 389(1): pp. 47-61.
- Hecker, M., Schumann, W., Völker, U. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19: pp. 417– 28.
- Heim, K., Tagliaferro, A. y Bobilya, D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure- activity relationships. *J Nutr Biochem* 13: pp.572–584.
- Henrotin, Y. 2008. Avocado/soybean unsaponifiable (ASU) to treat osteoarthritis: a clarification. *Osteoarthritis And Cartilage*, 16(9): pp.1118-1119.
- Heras, R., Quifer, P., Andrés, A., y Lamuela, R. 2016. Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Journal of Functional Foods*, 23: pp.370-377.

- Huber W., Gentleman R., Carey V.J., Irizarry R.A., Dudoit S. 2005. Bioinformatics and computational biology solutions using r and bioconductor. Statics for biology and health. Springer Science-Business Media, Inc. USA. pp.3.
- Hurtado, E., Carrasco, A., y 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): pp. 2255-2267.
- Información sobre el producto. Amberlita XAD polymeric resins.
<http://www.sigmaaldrich.com/>
- Jonsson, I., Juuti, J., François, P., AlMajidi, R. y 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.
- Lamb, A. y Cushnie, T. 2005. Errata for “Antimicrobial activity of flavonoids”. Int J Antimicrobial Agents 26: pp. 343-356.
- Lefort, E., Blay, J. 2013. Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers. Mol Nutr Food Res 57: pp.126–144.
- Legua, P., Serrano, M., Melgarejo, P., Valero, D., Martínez, J., Martínez, R. y Hernández, F. 2013. Quality parameters, biocompounds and antioxidant activity in fruits of nine quince (*Cydonia oblonga* Miller) accessions. Scientia Horticulturae, 154: pp. 61-65.

Liang, L., Ambrose, C., Bayer, A., Chen, L., Abdelhady, W., Kreiswirth, B., Yeaman, M. y Xiong, Y. 2016. The global regulon *sarA* regulates β -Lactam antibiotic resistance in *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* in vitro and in endovascular infections. *The Journal of Infectious Disease*. 214: pp. 1421-1429.

LIPID MAPS Databases: LIPID MAPS Lipidomics Gateway .2016. *Lipidmaps.org*.

Revisado el 15 Noviembre del 2016 de
<http://www.lipidmaps.org/data/LMSDRecord.php?LMID=LMPK12110341>

Lizcano, A. y Vergara, J. 2008. Evaluación de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos. Pontificia Universidad Javeriana: pp. 1-131.

López, A., Gómez, A., Pasini, F., Caboni, M., Segura, A., y Fernández, A. 2016. HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. *LWT - Food Science And Technology*, 73: pp. 505-513.

López, A.; Gómez, A. M.; Cerretani, L.; Segura, A.; Fernández, A. 2014. Distribution of phenolic compounds and other polar compounds in the tuber of *Solanum tuberosum* L. by HPLC-DAD-q-TOF and study of their antioxidant activity. *J. Food Compos. Anal.* 36: pp. 1-11.

- Lu, Q., Zhang, Y., Wang, Y., Lee, R. P., Gao, K., Byrns, R., y Heber, D. 2009. California Hass avocado: profiling of carotenoids, tocopherol, fatty acid, and fat content during maturation and from different growing areas. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 57(21): pp.10408-10413.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémés, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*; 79: pp. 727-747.
- Manchón, N., Rostagno, M., Vivaracho, L., Pedrola, M. y D'Arrigo, M. 2015. Métodos avanzados para el análisis, conservación y extracción de compuestos fenólicos en alimentos (Doctorado). Universidad de Valladolid.
- Martínez, G., Aguilera, A., Rodríguez, R., y Aguilar, C. 2011. Fungal enhancement of the antioxidant properties of grape waste. *Ann Microbiol*, 62(3): pp. 923-930.
- Minchin P., Thorp T., Boldingh H., Gould N., Cooney J., Negm F., Focht E., Arpaia M., Hu H., Brown P. 2012. A possible mechanism for phloem transport of boron in 'Hass' avocado (*Persea americana* Mill.) trees. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 87: pp. 23–28.
- Moellering, R. 2006. The growing menace of community-acquired *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med.*; 144: pp. 368-370.
- Moromi, H., Martínez, E., Gutiérrez, M., Ramos, D., Núñez, M., Burga, J., Tello, J. y Trevejo, I. 2007. Efecto antimicrobiano in vivo de la infusión de *Camellia sinensis* sobre bacterias orales. *Odontol. Sanmarquina.*; 10(2): pp.12-14.

Mukai, R., Matsui, N., Fujikura, Y., Matsumoto, N., Hou, D., Kanzaki, N., Shibata, H., Horikawa, M., Iwasa, K., Hirasaka, K., Nikawa, T. y Terao, J. Mukai. 2016. Preventive effect of dietary quercetin on disuse muscle atrophy by targeting mitochondria in denervated mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 31: pp. 67-76.

Naczki, M. y Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 41(5): pp.1523-1542.

National Center for Biotechnology Information (a). PubChem Compound Database; CID=21676357, Revisado el 14 de Noviembre del 2016 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21676357>

National Center for Biotechnology Information (b). PubChem Compound Database; CID=102209469, Revisado el 15 de Noviembre del 2016 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/102209469>

National Center for Biotechnology Information (c). PubChem Compound Database; CID=42608014, Revisado el 8 de Diciembre del 2016 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/42608014>

Ortega, A., Cruz, Y., Alonso, A. y Montalvo, C. 2011. Residuos de aguacate (*Persea americana* var. Hass) con actividad antimicrobiana. En *XIV Congreso de Biotecnología y Bioingeniería*. Querétaro, Querétaro: Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.

- Ortiz, G. 2006. Actividad Antifúngica de los extractos etanólicos de la flor de *Bourreria huanita* y la hoja de *Lippia graveolens* y sus particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa contra los hongos *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*. Informe de Tesis presentado para optar el título de Química Bióloga. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Pahissa A. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Barcelona, España: ICG, Marge, SL.
- Pallauf, K., Duckstein, N., y Rimbach, G. 2016. A literature review of flavonoids and lifespan in model organisms. *Proceedings of the Nutrition Society*. pp. 1-18.
- Patel, D., Shukla, S. y Gupta, S. 2007. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol* 30: pp. 233–245.
- Peacock, S., Paterson, G. 2015. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*; 84: pp. 577–601,
- Pereira, C., Barros, L., Alves, M., Santos, C. y Ferreira, I. 2016. Artichoke and milk thistle pills and syrups as sources of phenolic compounds with antimicrobial activity. *Food Funct.*, 7(7): pp. 3083-3090.
- Pérez, F., Duarte, J., Jiménez, R., Santo, C. y Osuna, A. 2009. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep*; 61: pp. 67-75.

- Pesewu, G., Cutler, R., y Humber, D. 2008. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1): pp. 102-111.
- Piccirilli, A., Piccardi, N., Msika, P., Paul, F. y Bredif, S. 2015. Use of a compound comprising D-mannoheptulose and/or perseitol for treating and preventing innate immunity modification diseases. Google Patents, US Patent 9,023,810.
- Piñeiro, Z. 2013. Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico (Doctorado). Universidad de Cádiz.
- Ponce A., Millones P. 2015. Efectividad antibacteriana de productos naturales frente a microorganismos patógenos de la flora oral. In *Crescendo. Ciencias de la Salud*. 2015; 2(2): pp. 530-537.
- Premoli, G., Laguado, P., Díaz, N., Romero, C., Villarreal, J. y González, J. 2010. Uso del propóleo en odontología. *Act. Odontol. Venez.*; 48(2): pp.1-13.
- Qiu, J., Chen, L., Zhu, Q., Wang, D., Wang, W., Sun, X., Liu, X. y Du, F. 2012. Screening natural antioxidants in peanut shell using DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS methods. *Food Chem.*135: pp.2366-2371.
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 27(1): pp.76-89.

- Rachuonyo, H., Ogola, P., Arika, W. y Wambani, J. 2016. Efficacy of crude leaf extracts of *Aloe secundiflora* on selected enteric bacterial pathogens and *Candida albicans*. *J Antimicro*, 2: pp.112.
- Roccaro, A., Blanco A., Giuliano, F., Rusciano, D. y Enea, V. 2004. Epigallocatechin gallate enhances the activity in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: pp.1968–1973.
- Rodriguez S., Gomes M., Gallão M., Fernandez F. 2009. Effect of ultrasound assisted osmotic dehydration on cell structure of sapotas, *J. Sci. Food Agric.* 89: pp. 665–670.
- Rodríguez, V. y Magro E. 2008. Bases de la alimentación humana. Paola Paz. España, Editorial Netbiblo, S.L. pp.565.
- Rodríguez, J., Morcuende, D., Andrade, M., Kylli, P., y 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(10): pp.5625-5635.
- Rodríguez, J. y Pascual, A. 2008. Actividad de los antimicrobianos en biocapas bacterianas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 26(2): pp.107-14.
- Rojas, A, Hernández, L., Pereda, R. y Mata, R. 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 35: pp.275–283.

Rossolini, G. y Mantengoli, E. 2008. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. *Clin Microbiol Infect*; 14 (suppl 6): pp.2–8.

Rostagno, M., Villares, A., Guillamón, E., García, A., y Martínez, J. 2009. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1): pp.2-29.

SACOL1287 - AureoWiki. *Aureowiki.med.uni-greifswald.de*. Revisado en Mayo 2016, de <http://aureowiki.med.uni-greifswald.de/SACOL1287>.

Sánchez, J. 1999. Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana Mill.*) y especies afines en México. *Rev. Chapingo. S. Hort.* 5: pp.7-18.

Sannasiddappa, T., Hood, G., Hanson, K., Costabile, A., Gibson G. y Clarke SR. 2015. *Staphylococcus aureus* MnhF mediates cholate efflux and facilitates survival under human colonic conditions. *Infect Immun* 83: pp.2350-2357.

SAUPAN001874000 - AureoWiki. *Aureowiki.med.uni-greifswald.de*. Revisado en Mayo 2016, de <http://aureowiki.med.uni-greifswald.de/SAUPAN001874000>.

Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C., Hollenberg, N., Sies, H., Kwik, C., Schmitz H. y Kelm M. 2006. (-)- Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103: pp.1024-1029.

- Senok, A., Botta G. y Soge, O. 2012. Emergence and spread of antimicrobial-resistant pathogens in an era of globalization. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, pp. 1-3
- Sharma, R., Joshi, V. y Rana, J.C. 2011. Nutritional composition and processed products of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 2: pp.354-357.
- Shukla, S. y Gupta, S. 2010. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res* 27: pp.962–978.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción Agrícola 2013. (Consultado 05 de Junio del 2015). Disponible en <http://www.siap.gob.mx/>.
- Snowden, J., Beaver, M., Beenken, K., Smeltzer, M., Horswill, A., y Kielian, T. 2013. *Staphylococcus aureus sarA* regulates inflammation and colonization during central nervous system biofilm formation. *Plos ONE*, 8(12): pp.84-89.
- Soria, A.C., Villamiel, M., 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21: pp.323–331.
- Stalikas, C. 2007. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.*, 30: pp.3268–3295.

- Stapleton, P., Shah, S., Anderson, J., Hara, Y., Hamilton, J. y Taylor, P. 2004. Modulation of β - lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 23: pp.462–467.
- Švehlíková, V., Bennett, R., Mellon, F., Needs, P., Piacente, S., Kroon, P. y Bao, Y. 2004. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Phytochemistry*, 65(16): pp.2323-2332.
- Talhaoui, N., Gómez, A., León, L., De la Rosa, R., Segura, A. y Fernández, A. 2014. Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by HPLC-DAD-TOFMS. Comparison with its parents 'Arbequina' and 'Picual' olive leaves. *LWT-Food Sci. Technol.*, 58: pp.28–34.
- Tan, L., Yin, W., y Chan, K. 2013. *Piper nigrum*, *Piper betle* and *Gnetum gnemon* Natural Food Sources with Anti-Quorum Sensing Properties. *Sensors*, 13(3): pp.3975-3985.
- Taylor, P., Hamilton, J. y Stapleton, D. 2005. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci Technol Bull*. Vol. 2: pp.71–81.
- Vallverdú, A., Jáuregui, O., Di Lecce, G., Andrés-Lacueva, C., y Lamuela-Raventós, R. 2011. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI-QTOF). *Food Chemistry*, 129(3): pp.877-883.

- Villegas, N., Escriche, I., y Doménech, E. 2012. Determinación de compuestos con actividad antioxidante en productos untables de fresa (*vc. Camarosa*) (Doctorado). Universidad Politecnica de Valencia.
- White, C. y Salamonsen, L. 2005. A guide to issues in microarray analysis: application to endometrial biology. *Reproduction*, 130(1): pp.1-13.
- Wojdylo, A., Ozmíanski, J. y 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: pp.2762-2772.
- Xue, T., You, Y., Hong, D., Sun, H. y 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): pp.2154-2167.
- Yin H., Deng Y, Wang H, Liu W, Zhuang X y Chu W. 2015. Tea polyphenols as an antivirulence compound Disrupt Quorum-Sensing Regulated Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports* 5, Article number: 16158.
- Zhang, Y. y Rock, C. 2004. Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *Journal of Biological Chemistry*; 279: pp.30994–31001.

Zhao, W., Hu Z., Okubo, S., Hara, Y. y Shimamura, T. 2001. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -lactams against *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 45: pp.1737–1742.

ANEXOS

Anexo 1. Resultado del puntaje z de los genes sub-expresados (>-1.5) de SARM cepa μ 3 mediante la comparación de la condición control (Cy3) y la condición experimental (Cy5) y el Id de identificación del gen correspondiente.

Id	Symdesc	Zscore
SAHV_1769	null	-1.847871
SAHV_0041	mecR1	-1.987535
SAHV_0393	null	-1.960045
SAHV_1447	null	-2.073348
SAHV_1595	null	-1.505481
SAHV_1217	recG	-1.701576
SAHV_0958	null	-2.289698
SAHV_2401	null	-1.778083
SAHV_2686	vraE	-1.596239
SAHV_2133	null	-2.478025
SAHV_0310	null	-2.600175
SAHV_0624	null	-2.354342
SAHV_0201	null	-3.58663
SAHV_0754	null	-1.609226
SAHV_2478	null	-1.567707
SAHV_0743	null	-2.136528
SAHV_0954	glpQ	-1.543216
SAHV_1937	null	-1.618098
SAHV_2311	null	-2.077183
SAHV_0779	null	-2.00563
SAHV_1164	null	-2.107044
SAHV_2511	null	-1.70389
SAHV_2566	null	-2.891764
SAHV_0692	norA	-1.839037
SAHV_1389	null	-1.567901
SAHV_1258	null	-2.374425
SAHV_2378	narI	-2.524287
SAHV_1172	mraY	-1.686815
SAHV_0227	null	-1.754863
SAHV_2682	null	-2.091945
SAHV_0458	yrhB	-1.979094
SAHV_2344	null	-1.615908
SAHV_0200	null	-1.745626
SAHV_0622	null	-1.71437
SAHV_1758	null	-1.512854
SAHV_2589	null	-1.714659
SAHV_2449	null	-2.833654

SAHV_0856	null	-2.182144
SAHV_1648	null	-1.813666
SAHV_0214	null	-1.597293
SAHV_2342	null	-2.110021
SAHV_2169	null	-2.605068
SAHV_0173	null	-1.712886
SAHV_0207	rlp	-2.141827
SAHV_0879	null	-1.906671
SAHV_1668	null	-1.542655
SAHV_0262	lrgB	-1.553473
SAHV_2314	hutI	-1.687525
SAHV_2100	null	-1.6848
SAHV_2525	null	-1.707365
SAHV_0646	fhuG	-1.638793
SAHV_2698	rpmH	-1.548293
SAHV_0347	null	-1.54446
SAHV_1759	null	-1.717647
SAHV_1490	null	-1.626442
SAHV_2266	null	-1.546582
SAHV_0178	null	-1.592836
SAHV_0358	null	-1.572939
SAHV_1712	ptaA	-2.932967
SAHV_2423	null	-2.460657
SAHV_1986	null	-2.518411
SAHV_1784	null	-1.744601
SAHV_2365	null	-1.765661
SAHV_0500	mfd	-1.782871
SAHV_1365	null	-1.754121
SAHV_1226	null	-1.574432
SAHV_0876	null	-1.805208
SAHV_2524	null	-1.913693
SAHV_0690	null	-1.828786
SAHV_1932	null	-2.157985
SAHV_0343	null	-2.224844
SAHV_2044	leuC	-1.543906
SAHV_0126	null	-2.638494
SAHV_0023	null	-1.765896
SAHV_0386	pbuX	-1.711932
SAHV_2028	nrgA	-2.646907
SAHV_0118	null	-2.600226
SAHV_0349	null	-1.742252
SAHV_0109	lctP	-1.703913
SAHV_1754	ribA	-1.640481

SAHV_2634	null	-1.68542
SAHV_2399	null	-1.932408
SAHV_0862	null	-1.764351
SAHV_2305	null	-3.938026
SAHV_1577	null	-1.685134
SAHV_2628	null	-1.660979
SAHV_0073	kdpC	-2.565867
SAHV_0529	null	-2.359582
SAHV_1431	null	-2.415408
SAHV_1706	tnp	-2.11236
SAHV_2007	null	-2.12447
SAHV_1529	null	-1.680653
SAHV_0110	spa	-1.670241
SAHV_0127	null	-1.801333
SAHV_0774	null	-1.6256
SAHV_2428	null	-2.464493
SAHV_2098	null	-1.695515
SAHV_1845	tnp	-2.036585
SAHV_0011	null	-2.614179
SAHV_0230	null	-1.54095
SAHV_0603	adh1	-1.782491
SAHV_0189	null	-1.5207
SAHV_2554	null	-3.880806
SAHV_0353	metE	-1.57892
SAHV_0380	null	-1.719981
SAHV_2479	null	-2.415552
SAHV_2166	asp23	-2.064461
SAHV_0010	null	-2.044444
SAHV_1232	null	-1.509759
SAHV_1624	secF	-1.812233
SAHV_2221	rpsN	-2.083689
SAHV_1394	null	-2.00715
SAHV_1936	null	-2.0417
SAHV_2403	hlgA	-1.508175
SAHV_2219	rplF	-1.735531
SAHV_1120	null	-1.589779
SAHV_0361	null	-2.612302
SAHV_0705	null	-2.330722
SAHV_2383	nasE	-2.243119
SAHV_0180	null	-2.35272
SAHV_0217	null	-1.944425
SAHV_2604	null	-2.100699
SAHV_2499	null	-1.856698

SAHV_1692	null	-2.046637
SAHV_0113	sirB	-2.326966
SAHV_0955	argH	-2.09445
SAHV_1724	null	-1.914038
SAHV_0926	dltX	-1.809154
SAHV_0223	null	-2.753558
SAHV_0628	null	-2.368637
SAHV_1070	null	-2.91626
SAHV_1259	infB	-2.533459
SAHV_1007	null	-2.016898
SAHV_2307	glvC	-1.560668
SAHV_2692	null	-3.894599
SAHV_2636	null	-1.626552
SAHV_2558	null	-4.331845
SAHV_1422	ebhA	-1.633721
SAHV_1154	null	-2.546802
SAHV_2562	null	-2.693061
SAHV_2669	null	-2.73146
SAHV_0131	null	-1.578371
SAHV_0852	null	-2.366012
SAHV_0404	Null	-1.769918
SAHV_2097	GlyA	-1.707049
SAHV_0162	capo	-2.261754
SAHV_0240	LctE	-2.146612
SAHV_2691	Null	-2.774595
SAHV_2527	Null	-2.614082
SAHV_0671	Null	-2.220543
SAHV_0071	Null	-1.678533
SAHV_0325	Null	-1.680089
SAHV_2502	Null	-1.670016
SAHV_0630	Null	-1.905756
SAHV_1599	Null	-1.505857
SAHV_0151	CapD	-1.740651
SAHV_1591	Null	-1.860692
SAHV_2178	LacB	-1.866927
SAHV_2350	Null	-3.55395
SAHV_1400	odhB	-1.996497
SAHV_2446	Null	-1.64159
SAHV_1287	GlpP	-1.548824
SAHV_2367	Null	-1.965584
SAHV_0811	Nuc	-1.640361
SAHV_0629	Null	-1.882449
MY-QC		-1.868428

SAHV_0098	Null	-1.747251
SAHV_0435	lpl2	-2.270429
SAHV_2303	Null	-2.238524
SAHV_1933	Null	-2.479052
SAHV_0577	Null	-2.454968
SAHV_1433	null	-4.245987
