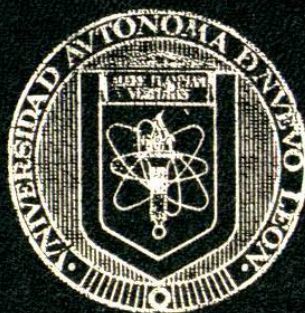


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE POSTGRADO



ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS EN EL
CRECIMIENTO, LA PRODUCCION DE TOXINA Y LA
UNION DE *Vibrio cholerae* A CELULAS

PROYECTO DE TESIS PRESENTADA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA.

PRESENTA:

Q.B.P. GINEBRA GUILLERMINA ALARCON FLORES

CD. UNIVERSITARIA

DICIEMBRE 2002

TM

RA644

.C3

A5

2002

c.1



1080124315

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

MT
2002
29

ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS EN EL
CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE TOXINA Y LA UNIÓN DE
VIBRIO *Vibrio cholerae* A CELULAS.



PROYECTO DE TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGÍA.

ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS EN EL
CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE TOXINA Y LA
UNIÓN DE *Vibrio cholerae* A CELULAS

Q. B. P. GINEBRA GUILLERMINA ALARCON FLORES.

COMISIÓN DE TESIS APROBADA

PROYECTO DE TESIS PRESENTADA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGÍA.

DRA. NORMA LAURA HER... ARIVEL GÓMEZ TRIVIÑO

PRESIDENTE

SECRETARIO

PRESENTA:

DR. J. Q.B.P. GINEBRA GUILLERMINA ALARCON FLORES

VOCAL

SUPLENTE

CD. UNIVERSITARIA

DICIEMBRE 2002



TM

RAC44

.C3

AS

2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

**ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS EN EL
CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE TOXINA Y LA UNIÓN DE
Vibrio cholerae A CÉLULAS.**

**PROYECTO DE TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGÍA.**

PRESENTA

Q. B. P. GINEBRA GUILLERMINA ALARCÓN FLORES.

COMISIÓN DE TESIS APROBADA



DRA. NORMA LAURA HEREDIA ROJAS

PRESIDENTE



DRA. MARIVEL GÓMEZ TRIVIÑO

SECRETARIO



DR. J. SANTOS GARCÍA ALVARADO

VOCAL



DR. JUAN M. ALCOCER GONZALEZ

SUPLENTE

CD. UNIVERSITARIA

DICIEMBRE 2002

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto 29359-B

Dedicatoria

Gracias a MAMÁ y a PAPÁ con todo el amor del mundo por sus consejos para lograr mis metas y sueños, por ayudar a superarme cada día y a salir adelante. Gracias a mis Hermanas GRECIA y CLARA porque cuando llegaron a mi mundo lo convirtieron en un lugar hermoso, por estar a mi lado y hacerme muy feliz. Gracias por ser mi FAMILIA, los AMO.

A mi ESPOSO, que sin planearlo de pronto comenzó a ser alguien muy importante en mi vida, de repente el amor llegó y sin darme cuenta un buen día descubrí que jamás podría vivir sin ti. Por ser mi mejor amigo y el amor de mi vida. TE AMO.

A Sharlli por brindarme su amistad, su compañía y por su apoyo en momentos difíciles.

Agradecimientos

Gracias a la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y al Dr. José Santos García Alvarado por su asesoría, apoyo, dedicación y por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigadores.

Gracias a la Dra. Marivel Gómez Treviño y al Dr. Juan Manuel Alcocer González por aceptar formar parte de mi comisión de tesis y por su asesoría y apoyo.

Al Dr. Hugo Alberto Luna Olvera, por su ayuda.

A Genoveva, Marco, Perla, Sharlli y Sigifredo por su ayuda en la realización de esta investigación.

Indice

Página de título	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice	iv
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	viii
Lista de abreviaturas	ix
Abstract	1
Resumen	3
Introducción	5
Antecedentes	8
Clasificación serologica de <i>V. cholerae</i>	9
<i>V. cholerae</i> O1	10
<i>V. cholerae</i> no-O1/no-O139	11
<i>V. cholerae</i> O139 Bengal	12
Toxina del cólera	13
Patogénesis	18
Manifestaciones clínicas	18
Defensas del hospedero	21
Epidemiología	21
Adhesión	23
Plantas medicinales	24
Actividad antimicrobiana de extractos de plantas	26
Efecto de extractos de plantas contra el crecimiento microbiano	28
Efecto de extractos de plantas sobre la producción de toxinas microbianas	34

Efecto de extractos de plantas sobre la adhesión microbiana	37
Hipótesis	42
Objetivo general	43
Objetivos específicos	44
Material y métodos	45
Cepas utilizadas	45
Activación de las cepas	45
Colecta de plantas	45
Plantas analizadas	46
Obtención de los extractos	48
Análisis de la actividad antimicrobiana de los extractos	49
Determinación de la concentración mínima inhibitoria del crecimiento	49
Inhibición de la producción de toxinas por extractos de plantas	50
Determinación de proteínas en <i>V. cholerae</i> por la técnica de Bradford	51
Cuantificación de la toxina de <i>V. cholerae</i> por una técnica de ELISA	51
Actividad de extractos de plantas sobre la adhesión de <i>V. cholerae</i> a la línea celular CHO	52
Radio marcaje de <i>V. cholerae</i>	52
Cultivo de la línea celular CHO	53
Determinación de la adhesión de <i>V. cholerae</i> a células CHO	53
i) Pre-exposición de <i>V. cholerae</i> a los extractos de plantas	53
ii) Pre-exposición de la línea celular CHO a extractos de plantas	54
Análisis estadístico	55
Resultados	56

Actividad antimicrobiana de extractos de plantas	56
Determinación de la concentración mínima inhibitoria del crecimiento	61
Inhibición de la producción de toxinas por extractos de plantas	62
Actividad de extractos de plantas sobre la adhesión de <i>V. cholerae</i> a la línea celular CHO	67
Discusión	77
Conclusión	87
Literatura citada	88

Lista de figuras

- Fig 1.- Modo de acción de la toxina de *V. cholerae* 17
- Fig 2.- Manifestaciones clínica del cólera 19
- Fig 3.- Espectro de la enfermedad mostrada en porcentaje de distribución de individuos infectados con el biotipo clásico de *V. cholerae* comparado con los individuos infectados con el biotipo El Tor. 20

Lista de tablas

Tabla 1.	Plantas analizadas	46
Tabla 2.	Inhibición del crecimiento de <i>V. cholerae</i> por extractos etanólicos de plantas.	57
Tabla 3.	Inhibición del crecimiento de <i>V. cholerae</i> por extractos acuosos de plantas.	59
Tabla 4.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos sobre el crecimiento de <i>V. cholerae</i> .	61
Tabla 5.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos acuosos sobre el crecimiento de <i>V. cholerae</i> .	62
Tabla 6.	Efecto del extracto etanólico del Palo de Brasil en la producción de la toxina de <i>V. cholerae</i> .	64
Tabla 7.	Efecto del extracto etanólico del Huisache en la producción de la toxina de <i>V. cholerae</i> .	65
Tabla 8.	Efecto del extracto del Estafiate en la producción de la toxina de <i>V. cholerae</i> .	66
Tabla 9.	Efecto de la pre-exposición de <i>V. cholerae</i> al extracto del Palo de Brasil sobre la adhesión a células CHO.	71
Tabla 10.	Efecto de la pre-exposición de <i>V. cholerae</i> al extracto del Huisache sobre la adhesión a células CHO.	72
Tabla 11.	Efecto de la pre-exposición de <i>V. cholerae</i> al extracto del Estafiate sobre la Adhesión a células CHO.	73
Tabla 12.	Efecto de la pre-exposición de las células CHO al extracto del Palo de Brasil sobre la adhesión de <i>V. cholerae</i> .	74
Tabla 13.	Efecto de la pre-exposición de las células CHO al extracto del Huisache sobre la adhesión de <i>V. cholerae</i> .	75
Tabla 14.	Efecto de la pre-exposición de las células CHO al extracto del Estafiate sobre la adhesión de <i>V. cholerae</i> .	76

Tabla de Abreviaturas

CMI	Concentración mínima inhibitoria
DPM	Desintegraciones por minuto
CO₂	Dióxido de carbono
°C	Grados centígrados
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
Ig	Inmunoglobulina
Kda	Kilodaltones
LB	Lurian Bertani
<	Menor que
μ	Micras
μg	Microgramo
μl	Microlitro(s)
μm	Micrómetro
mg	Miligramo
ml	Mililitro(s)
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto(s)
M	Molar

nm	Nanómetro
N	Normal
%	Por ciento
pH	Potencial de hidrogeno
r.p.m.	Revoluciones por minuto
CT	Toxina del cólera

Abstract

Vibrio cholerae has been a recognized problem for food safety and human health. Outbreaks of cholera cause deaths estimated at 120,000 annually worldwide, of which the vast majority occur in children. Cholera is characterized by a severe watery diarrhea caused by toxigenic *V. cholerae*, which colonizes the small intestine and produces an enterotoxin, cholera toxin. The transmission to human is by consumption of contaminated water or food. In the recent years, traditional medicine has become very important among scientific researchers in order to find new ways to treat sickness and to improve modern medicine. This is because plants represent a potential source of new antimicrobial agents. Many compounds in nature have the ability to inhibit microorganisms. As a consequence, it is recognized that antimicrobials can occur as natural components of some foods. In this work, the effect of ethanolic and aqueous extracts of 35 plants commonly used in the traditional medicine of Mexico was determined on growth, enterotoxin production and adherence of strains of *V. cholerae* O1 and O139 following treatment with different concentrations of plants extracts.

Of the 35 extracts tested, the ethanolic samples from *Artemisia mexicana* (MIC 4 - 6 mg/ml), *Haematoxylon brasiletto* (MIC 0.3 - 0.4 mg/ml) and *Acacia farnesiana* (MIC 4 - 7 mg/ml), were the most effective against growth of this bacterium. Enterotoxin production was also inhibited by these extracts. No enterotoxin formation was detected when amounts of extracts lower (75 and 50 %) than the minimal inhibitory concentration for growth were added to the media. At 25

% of the MIC: *H. brasiletto* caused a reduction in enterotoxin production of 86%, *A. mexicana* of 83 %, and *A. farnesiana* of 100%. Adhesion of *V. cholerae* strains was significantly reduced after exposure to various concentrations of *H. brasiletto*, *A. mexicana* and *A. farnesiana* (reduction between 28.4% to 89.2%). Different results were obtained by pre-incubation of CHO cells with *H. brasiletto* and *A. farnesiana*, in this case adhesion was increased or inhibited depending on strain and extract. No significant difference was observed in the adhesion treatment with *A. mexicana*. Due to safety concerns and consumer preference for natural products, the use of these natural compounds could potentially replace synthetic preservatives to avoid contamination of foods or to treat the diseases caused by microorganisms. It was concluded that most of the plants examined in this study had an antibacterial effect.

Resumen

Vibrio cholerae ha sido reconocido como un problema de la seguridad alimentaria y de la salud humana. Brotes de cólera han causado 120,000 muertes anualmente alrededor del mundo de los cuales la mayoría ocurre en niños. El cólera es caracterizado por una diarrea acuosa severa causada por *V. cholerae* toxigenica, el cual coloniza el intestino delgado y produce una enterotoxina, la toxina del cólera. La transmisión al humano es debido a el consumo de agua y alimentos contaminados. En los últimos tiempos, la medicina tradicional a tomado un gran auge entre los investigadores con el afán de encontrar nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades contra microorganismos que han adquirido resistencia a antibióticos para mejorar la medicina moderna, ya que las plantas representan una fuente potencial de nuevos agentes antimicrobianos. Los compuestos en la naturaleza tienen la habilidad de inhibir microorganismos. Como una consecuencia, es reconocido que los antimicrobianos pueden ocurrir como componentes naturales de algunos alimentos. En este trabajo, determinamos el efecto de los extractos etanólicos y acuosos de 35 plantas comúnmente utilizadas en la medicina tradicional mexicana, fue determinado sobre el crecimiento, producción de la enterotoxina y adherencia de las cepas de *V. cholerae* O1 y O139, seguido del tratamiento con diferentes concentraciones de los extractos de plantas. De los 35 extractos analizados, las muestras etanólicas de *Artemisia mexicana* (MIC 4 – 6 mg/ml), *Haematoxylon brasiletto* (MIC 0.3 – 0.4 mg/ml) y *Acacia farnesiana* (MIC 4 – 7 mg/ml), fueron las mas efectivas en el crecimiento de

esta bacteria. La producción de la enterotoxina fue también inhibida por estos extractos. No fue detectada producción de enterotoxina a concentraciones mas bajas (75 y 50%) de la concentración mínima inhibitoria del crecimiento (CMI). Al 25 % del MIC *H. brasiletto* causo una reducción del 86%, *A. mexicana* de 83% y *A. farnesiana* del 100%. La adhesión de las cepas de *V. cholerae* fue significativamente reducida después de la exposición a varias concentraciones de *H. brasiletto*, *A. mexicana* y *A. farnesiana* (reducción de 28.4% al 89.2%). Diferentes resultados fueron obtenidos bajo la pre-incubación de las células CHO con *H. brasiletto*, y *A. farnesiana* (aumento de 87.1% al 266.9%). Diferencia estadística significativa no fue observada en el tratamiento de la adhesión con *A. mexicana*. Debido a lo que en seguridad concierne y a la alta preferencia de consumidores por los productos naturales, el uso de componentes derivados de plantas podría potencialmente reemplazar a los preservativos sintéticos a fin de evitar la contaminación de los alimentos por los microorganismos.

Con lo anterior concluimos que la mayoría de las plantas analizadas en este estudio si presenta efecto antibacteriano.

Introducción

Las enfermedades gastrointestinales forman parte de la problemática del sector salud como causa de morbilidad y en circunstancias muy extremas de mortalidad en países industrializados y en vías de desarrollo. Estos desórdenes se presentan frecuentemente como dolencias en la población, presentando cuadros de diarrea y gastroenteritis. Dentro de los principales microorganismos patógenos causantes de cuadros gastrointestinales en el hombre se encuentra el género *Vibrio*, siendo la principal bacteria *V. cholerae*. La causa de sus síntomas típicos es provocada por la ingesta de alimentos que contienen considerables cantidades de estos microorganismos, debido a contaminación fecal, o contacto con material contaminado (Caceres, A. *et al.*, 1990).

V. cholerae es una bacteria ampliamente distribuida en estanques de agua dulce y estuarios de Asia, Oriente Medio, África, partes de Europa y las áreas costeras de Sudamérica, Centroamérica y Norteamérica. Dentro de las características que hacen a *V. cholerae* una bacteria muy importante se encuentran la producción de una toxina, su capacidad de crecer en condiciones aerobias o anaerobias, en una variedad de medios simples y con rango amplio de temperatura de crecimiento, que oscila desde los 18 a 37° C (Murray, P. R., 1997).

La enterotoxina ha sido implicada como el principal factor de virulencia causante de la enfermedad. Sin embargo, se han encontrado otros factores que

quizás contribuyen también como la enterotoxina termoestable y la termolábil, los flagelos, adhesinas y mucinasa (Salyers, A. A. and D. D. Whitt, 1994).

La toxina del cólera se puede unir a receptores específicos en el intestino delgado, entrar en las células de la mucosa intestinal e inducir una serie de reacciones que conducen una secreción rápida de sodio, potasio y bicarbonato hacia la luz intestinal, así mismo *V. cholerae* es capaz de penetrar a través de la cobertura mucosal de la superficie del intestino y adherirse a la capa de la mucosa (Murray, P. R., 1997).

Debido a todo lo anterior, la adhesión de la bacteria y/o su enterotoxina a la mucosa intestinal son las principales causas de la enfermedad del cólera, por lo que esta es clave para evitar o controlar la infección.

En los pasados 25 años, una lucha constante para mejorar la eficacia de la medicina moderna a llevado a descubrir nuevos antibióticos de utilidad clínica (Haslam, E. *et al.*, 1989), por otra parte, algunos de los antibióticos actuales presentan considerables desventajas desde el punto de vista de espectro antibacterial limitado o de serios efectos secundarios, los cuales incluyen hipersensibilidad, disminución de la flora normal del intestino, inmunosupresión y reacciones alérgicas, entre otros (Idose, O. *et al.*, 1968; Mitscher, L. A. *et al.*, 1972).

Debido a una gran cantidad de antecedentes sobre la utilización de plantas para la cura de diversas enfermedades, actualmente la tendencia de la investigación a puesto un gran interés en la búsqueda de nuevas estrategias para evitar la adhesión de las bacterias y/o sus toxinas a la mucosa intestinal, y se están inclinando en la búsqueda de plantas que posean compuestos con actividad antimicrobiana como una posible fuente de drogas (Haslam, E. *et al.*, 1989).

Motivo por el cual es necesario abocarse al estudio y análisis de las plantas que se encuentran en el territorio Mexicano, ya que éstas pueden contener y proveer una gran diversidad de compuestos que sean capaces de inhibir la adhesión de las bacterias y/o sus toxinas a la mucosa intestinal. En este trabajo se analizará un grupo de plantas que crecen en el Noreste Mexicano, las cuales han jugado un papel importante en la medicina herbal tradicional.

Antecedentes

La familia *Vibrionaceae* incluye tres géneros causantes de enfermedad humana: *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*. Esta familia se caracteriza por ser bacilos curvos o rectos, no esporulados, oxidasa positiva, reacción que los difieren de las enterobacterias. Se encuentran principalmente en el agua y son bien conocidos por su capacidad para producir enfermedades gastrointestinales (Murray, P. R. 1997). Las tres especies de *Vibrio* de importancia que son transmitidas por alimentos son *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

El cólera es un síndrome clínico epidemiológico causado por *V. cholerae*, descrito por primera vez en 1854 en Italia por Pacini, quien encontró un gran número de bacterias curvas en el contenido intestinal de víctimas con cólera (Karper, J. B. *et al.*, 1995).

Los vibrios del cólera son bacilos ligeramente curvos, gram negativos cuya motilidad depende de un solo flagelo polar. Sus requerimientos nutricionales son simples, en medio adecuado ellos crecen rápidamente con un tiempo de generación de menos de 30 minutos, aunque ellos presentan grandes densidades poblacionales cuando crecen en aeración también pueden crecer anaerobicamente (Finkelstein, R. A.).

Clasificación serológica de *V. cholerae*

La clasificación de *V. cholerae* en base al antígeno O fue iniciado por Gardner y Venkatraman (Nair, G. B. *et al.* , 1996). Hasta 1992, los vibrios que causaban la epidemia del cólera fueron subdivididos en dos biotipos: Clásico y El Tor. *V. cholerae* clásico fue aislado por primera vez en 1883 por Koch, subsecuentemente en 1900 algunos vibrios que se parecían a *V. cholerae* fueron aislados de personas que se encontraban en la estación de cuarentena

El Tor, en la península de Sinai, que había sido establecida para lograr el control del cólera asociada con viajeros. Estos vibrios se parecían a *V. cholerae* clásica en muchas características, eran responsables de la lisis de eritrocitos de cabra y oveja en el examen conocido como Greig. Estos vibrios llamados El Tor hemolíticos fueron considerados insignificantes excepto por la posibilidad de confusión con los verdaderos vibrios que causaban el cólera. En 1930 los vibrios hemolíticos fueron relacionados con brotes de diarreas, y en 1961 causaron un gran brote que surgió violentamente en Hong Kong y se extendió virtualmente por todo el mundo. Durante esta pandemia los vibrios perdieron su actividad hemolítica.

Hasta la génesis de *V. cholerae* O139, el cólera epidémico y pandémico fue asociado únicamente con el serogrupo O1, mientras que las cepas que no aglutinaban con el antisuero O1 eran ampliamente distribuidas en el ambiente acuático y eran responsables de casos esporádicos de gastroenteritis (Nair, G. B. 1996).

Sin embargo, con la reciente epidemia del cólera debida a cepas del serogrupo O139, tal distinción previa no resultó válida por mucho tiempo. Por lo tanto, actualmente se ha establecido la existencia de dos serogrupos, el O1 y el O139, que han sido asociados con enfermedades epidémicas (Karper, J. B. *et al.*, 1995).

***V. cholerae* O1**

Los miembros de este serogrupo producen la toxina del cólera, y han sido asociados con epidemias y pandemias (Murray, P. R. 1997). La serología de este grupo pertenecientes al antígeno O grupo 1 es relativamente simple, presentando dos biotipos El Tor y Clásico, los cuales contienen 2 principales serotipos, el Inaba y Ogawa. Estos serotipos son diferenciados mediante una prueba de anticuerpos vibriocidas y por aglutinación en base a su polisacárido somático O. El grupo del cólera tiene un antígeno común A, y los biotipos son diferenciados por los antígenos específicos, B (Ogawa) y C (Inaba). Un serotipo adicional, el Hikojima presenta ambos antígenos específicos.

Los vibrios El Tor originalmente fueron definidos como hemolíticos, característica que los diferencia del serogrupo clásico, hasta que perdieron tal capacidad, sin embargo la mayoría de las cepas El Tor son Voges-Proskauer positivo y resistentes a polimixina y al bacteriofago IV, mientras que las cepas clásicas son sensitivas. Ambos biotipos causan la misma enfermedad, la distinción entre El Tor y la clásica solamente tiene significado epidemiológico, a pesar de

esto, la cepa El Tor produce menor cantidad de entretoxina del cólera comparada con la cepa clásica (Nair, G. B. *et al.*, 1996).

***V. cholerae* no-O1/no-O139**

Únicamente las cepas que aglutinaban con el antisuero O1 fueron llamadas *V. cholerae* y fueron consideradas como verdaderos vibrios de cólera, capaces de causar el cólera, mientras que los otros vibrios fueron llamados vibrios no aglutinables o no cólera (Nair, G. B. *et al.*, 1996). El termino no aglutinable era un nombre no apto ya que este implicaba que estos vibrios no aglutinaban, pero estos si son capaces de aglutinar con su propio antisuero específico (Finkelstein, R. A. 2001). En años recientes, hasta la emergencia del serogrupo O139, todos los organismos aislados que fueron identificados como *V. cholerae* en base a pruebas bioquímicas pero que eran negativos para el serogrupo O1 eran referidos como "*V. cholerae* no-O1". En vista de la emergencia de la epidemia provocada por el serogrupo O139, ahora se refieren a O2-O138 como *V. cholerae* no-epidémico. Las cepas no-O1/no-O139 han sido divididas dentro de serogrupos del O2 al O138 en base al antígeno somático o del lipopolisacárido (Karper, J. B. *et al.*, 1995).

La gran mayoría de estas cepas no producen CT y no son asociadas con diarrea epidémica, pero han sido aisladas de una gran variedad de infecciones extraintestinales (Madden, J. M. 1988).

***V. cholerae* O139 Bengal**

La simple distinción entre *V. cholerae* O1 y no-O1 fue obsoleta a principios de 1993, cuando los primeros reportes de una nueva epidemia severa parecida al cólera, emergían de la India y Bangladesh. En primera instancia, el organismo responsable de este brote fue reportado como *V. cholerae* no-O1, porque este no aglutinaba con antisuero O1. Otras investigaciones revelaron un nuevo serogrupo, el cual fue designado como O139, en reconocimiento al origen de esta cepa también se le conoce como Bengali. Este organismo parece ser un híbrido de las cepas O1 y no-O1. Los factores de virulencia, incluyen, la enterotoxina del cólera y el pilus corregulado por la toxina (TCP). *V. cholerae* O139 es indistinguible de la cepa O1 "El Tor", sin embargo este organismo no produce el LPS O1, pero presenta un polisacárido capsular (Karper, J. B. *et al.*, 1995).

V. cholerae O139 parece haber derivado de la pandemia causada por el biotipo El Tor, pero esta cepa ha perdido la característica del antígeno somático O1; pero a su vez adquirió la habilidad de producir una cápsula de polisacáridos, así mismo produce la misma enterotoxina del cólera y presenta el mismo potencial epidémico de las cepas O1 (Finkelstein, R. A. 2001).

Toxina del Cólera

La toxina del cólera (CT), es una proteína oligomérica producida por *V. cholerae*. Es el principal factor de virulencia responsable de provocar los síntomas diarreicos severos (Fukuta, *et al.*, 1988).

La existencia de una toxina responsable de los síntomas del cólera fue primeramente adelantado por Roberto Koch en 1884, proponiendo que el agente causal del cólera producía un “envenenamiento especial” que actuaba sobre el epitelio intestinal. La existencia de esta toxina fue demostrada en 1959, cuando se demostró que el fluido era patogénico cuando filtrados de *V. cholerae* fueron introducidos en el tracto intestinal de conejos (Karper, J. B. *et al.*, 1995).

La CT pertenece a la familia de las proteínas designadas como enterotoxinas termolábiles, cada una de las holotoxinas tienen una proporción 1:5 de los polipéptidos A y B respectivamente, son potentes ADP-ribosiltransferasa, y se unen a uno o mas especies de gangliosidos encontrados sobre la superficie de las células eucarióticas. Serologicamente se ha establecido la existencia de 2 grupos de enterotoxinas termolábiles en la familia de enterotoxinas *V. cholerae*-*Escherichia coli*. En el serogrupo I (toxinas tipo I) incluye a la toxina del cólera (CT) y la toxina producida por cepas enterotoxigenicas de *E. coli* (LT-1) estas prefieren unirse al gangliosido G_{M1}. *V. cholerae* secreta un 95% aproximadamente de la CT al medio extracelular (Connell, *et al.*, 1995).

La CT consistente de dos dominios o regiones principales, es una típica toxina tipo A-B. La subunidad B, también conocida como coleragenoide sirve para unir la toxina al receptor de la célula eucariota así mismo es la porción dominante inmunológica de la holotoxina. La región A posee la función enzimática que actúa intracelularmente, esta formada por una subunidad unida mediante interacciones no covalentes con la región B la cual esta formada de cinco subunidades idénticas asociadas por cadenas no covalentes peptídicas (Finkelstein, R. A.).

La subunidad B contiene 103 aminoácidos con un peso molecular de 11.6 KDa; la subunidad A tiene una masa de 27.2 KDa y es dividida proteolíticamente dando dos cadenas polipeptídicas: el péptido A₁ de 195 residuos y el péptido A₂ de 45 residuos. Después de la división proteolítica, la subunidad A₁ y A₂ permanecen unidos mediante la unión de un enlace disulfuro antes de la internalización celular (Salysers, A. A. and D. D. Whitt. 1994).

El receptor específico para la CT es el monosialosilgangliosido (GM₁ gangliosido) presente sobre la superficie de las células mucosales intestinales. La bacteria produce una invasina y una neuroaminidasa durante la etapa de colonización que tienen la interesante propiedad de degradar el gangliosido a una forma monosialosil (GM₁), la cual es el receptor específico para la toxina (Todar, K. 1999).

Existen al menos 2 formas distintas de la enterotoxina del cólera relacionadas antigenicamente, llamadas CT-1 y CT-2. *V. cholerae* O1 clásica y la

cepa El Tor procedente de la costa de Gulf producen la CT-1, mientras que las otras cepas El Tor existentes y la cepa O139 producen la CT-2 (Finkelstein, R. A. 2001).

Los eventos moleculares de la enfermedad ocasionada por *V. cholerae* involucra la interacción entre la enterotoxina y la célula epitelial intestinal. El blanco intracelular de la CT es el adenilato ciclasa, uno de los sistemas regulatorios más importantes de las células eucarióticas. La enzima media la transformación de ATP a AMP cíclico, un mensajero intracelular de una variedad de vías celulares. La regulación de la adenilato ciclasa es mediado por GTP y por la proteína G, la cual sirve para unir muchos receptores celulares a proteínas efectoras. La proteína G consta de heterodímeros compuestos de tres distintas subunidades: α , β , y γ . La proteína G específica involucrada es la G_s , la cual al activarse conduce a una actividad incrementada de la adenilato ciclasa; sin embargo la activación es breve, normalmente debida a que otra proteína reguladora la proteína G_i , hidroliza el GTP siendo este evento el que inactiva la adenilato ciclasa en condiciones normales (Salyers, A. A. and D. D. Whitt. 1994).

Seguido de la unión de la toxina a su receptor, la región mayor de la subunidad A conocida como el péptido A1, transfiere ADP-ribosa del NAD a la subunidad α de la proteína G_s formando G_s ADP-ribosa en donde el GTP no puede ser hidrolizado y la enzima permanece continuamente activada. La subunidad α ADP-ribosilada se disocia de las otras subunidades de la proteína G_s y activa el

sistema adenilato cilasa, este a su vez incrementa la concentración intracelular de AMP cíclico. Los niveles altos de cAMP activan a la proteína quinasa A conduciendo a la alteración de transporte de iones (Cl^- , Na^+) y agua, conduciendo a la diarrea, pérdida de electrolitos y deshidratación que es característica del cólera (Karper, J. B. *et al.*, 1995).

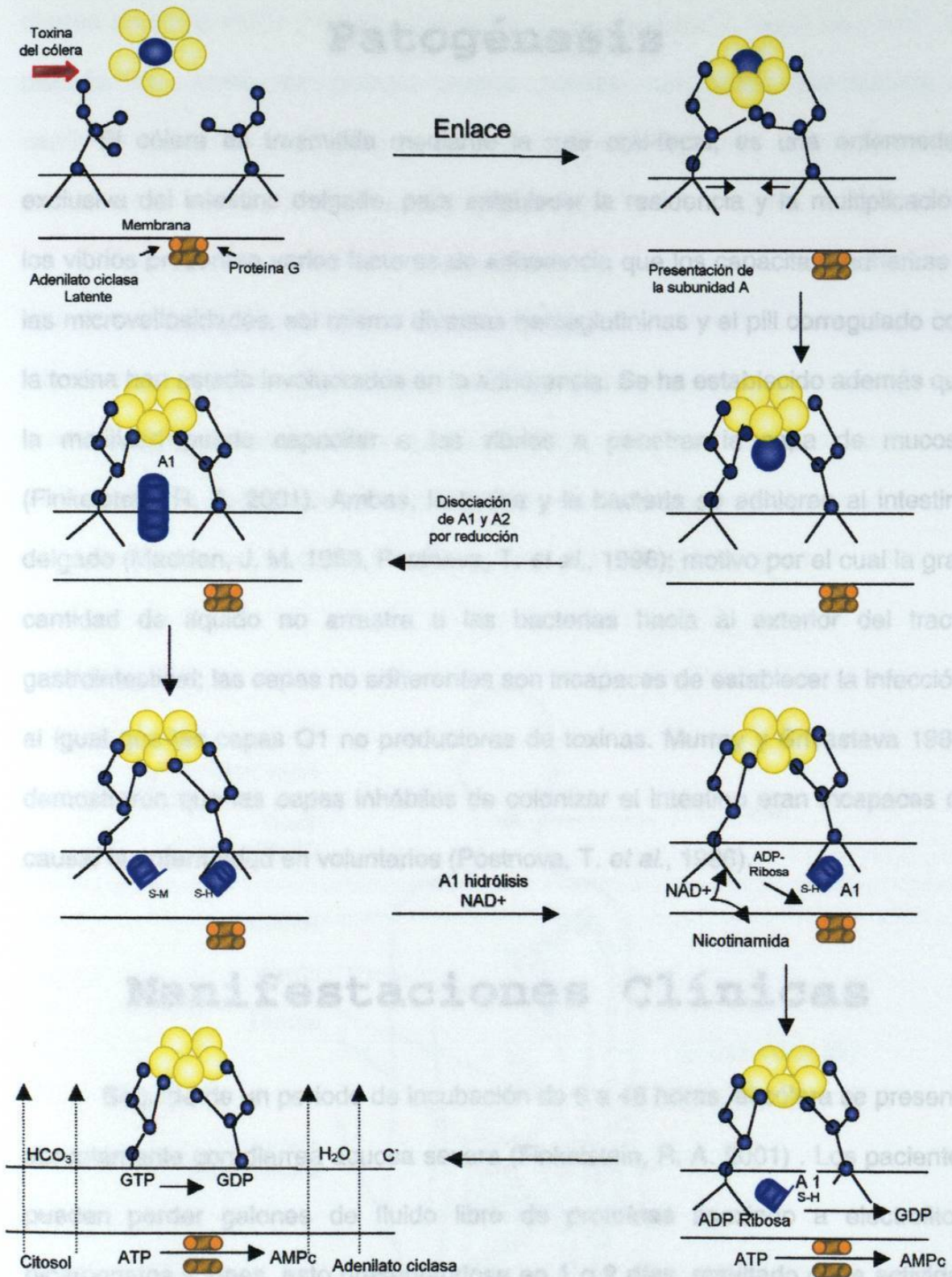


Fig. 1 Modo de acción de la toxina de *V. cholerae*

Patogénesis

El cólera es transmitida mediante la ruta oral-fecal, es una enfermedad exclusiva del intestino delgado, para establecer la residencia y la multiplicación, los vibrios presentan varios factores de adherencia que los capacita a adherirse a las microvellosidades, así mismo diversas hemaglutininas y el pili corregulado con la toxina han estado involucrados en la adherencia. Se ha establecido además que la motilidad puede capacitar a los vibrios a penetrar la capa de mucosa (Finkelstein, R. A. 2001). Ambas, la toxina y la bacteria se adhieren al intestino delgado (Madden, J. M. 1988, Postnova, T. *et al.*, 1996); motivo por el cual la gran cantidad de líquido no arrastra a las bacterias hacia al exterior del tracto gastrointestinal; las cepas no adherentes son incapaces de establecer la infección, al igual que las cepas O1 no productoras de toxinas. Murray y Srivastava 1980; demostraron que las cepas inhábiles de colonizar el intestino eran incapaces de causar la enfermedad en voluntarios (Postnova, T. *et al.*, 1996).

Manifestaciones Clínicas

Seguido de un periodo de incubación de 6 a 48 horas, el cólera se presenta abruptamente con diarrea acuosa severa (Finkelstein, R. A. 2001) . Los pacientes pueden perder galones de fluido libre de proteínas asociado a electrolitos, bicarbonatos y iones, esto presentándose en 1 o 2 días, resultado de la actividad de la enterotoxina del cólera. La pérdida de fluidos conduce a la deshidratación, anuria, acidosis y shock hipovulémico, el vomito ocasionalmente se presenta. La

diarrea presenta moco y células epiteliales lo que asemeja a “agua de arroz”. La pérdida de iones de potasio puede resultar en fallas circulatorias y cardiocomplicaciones. El cólera no tratado frecuentemente resulta en altas proporciones de mortalidad (50 al 60% de muertes, Todar, K. 1999).

Únicamente una minoría de las personas infectadas con la toxina del cólera desarrollan manifestaciones severas de la enfermedad llamada cólera grave. Las infecciones con las cepas clásica son generalmente mas severas que las producidas por las cepas El Tor. Se ha estimado que el 11% de los pacientes con infección por la cepa clásica desarrollan una enfermedad severa comparada con el 2% de las infecciones causadas por las cepas El Tor (Kaper, J. B. *et al.* , 1995).

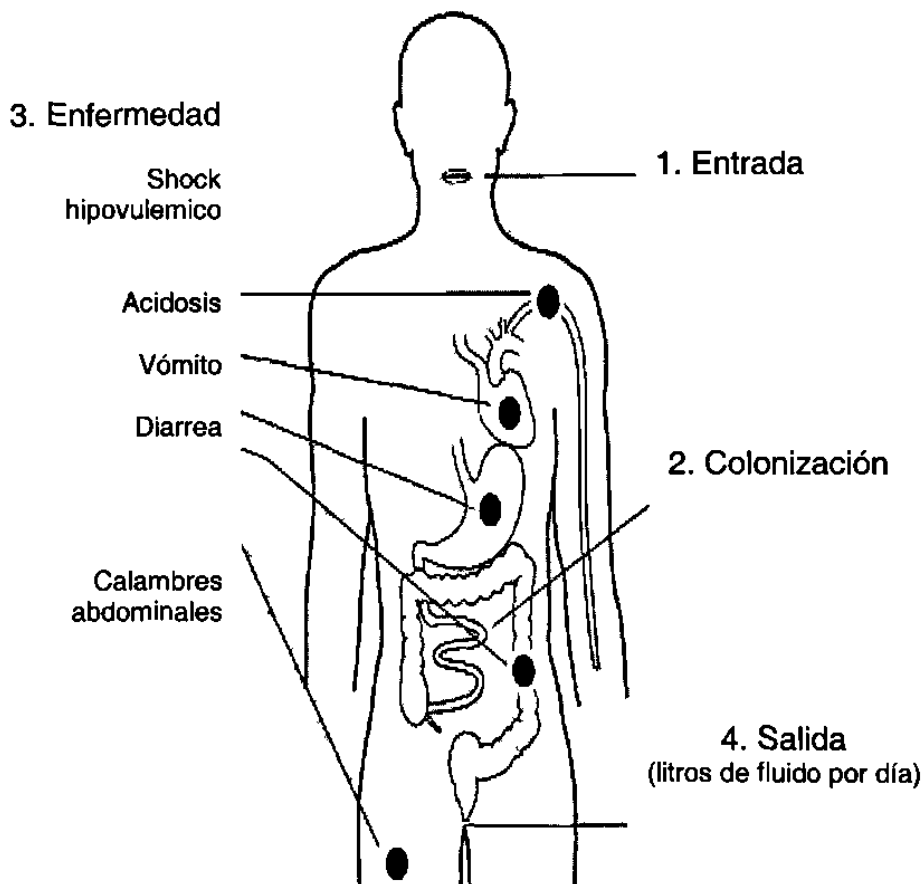


Fig 2. Manifestaciones clínicas del cólera

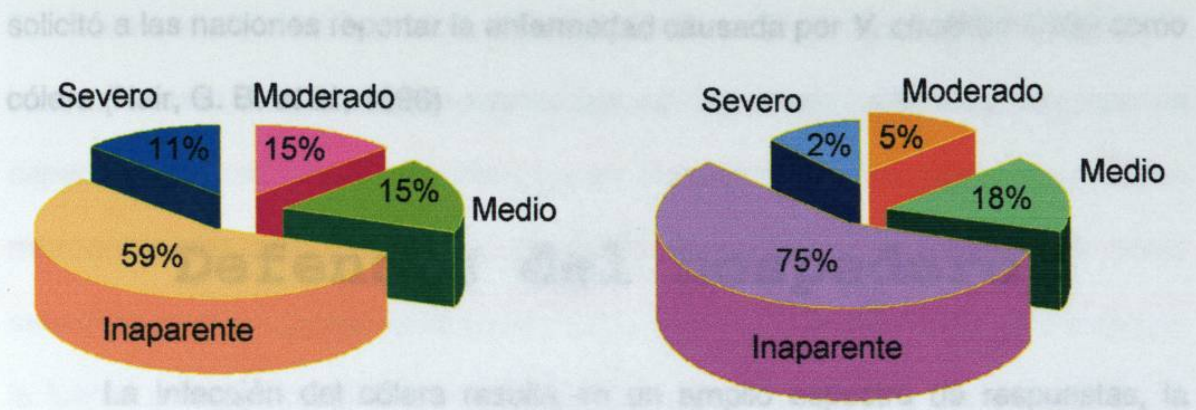


Fig 3.- Espectro de la enfermedad mostrada en porcentaje de distribución de individuos infectados con el biotipo Clásico de *V. cholerae* comparado con los individuos infectados con el biotipo El Tor. El término severo incluye a casos hospitalizados de cólera grave; moderado incluye a casos detectados en pacientes no hospitalizados; medio casos detectados en muestras biológicas.

Los síntomas de personas infectadas con *V. cholerae* O139 Bengal parece ser virtualmente idénticos a los presentados por las personas infectadas con la cepa O1, presentándose una diarrea deshidratante similar a lo observado en los pacientes de cólera infectados con el serogrupo O1. Pacientes con cólera O139 se quejaron de calambres abdominales, ausentes en el cólera causado por *V. cholerae* O1, así mismo se descubrió que los individuos con grupo sanguíneo O eran mas susceptibles a presentar diarrea causada por el serogrupo O139 de igual forma que había sido demostrado para el cólera causado por la cepa El Tor O1. Basado en los reportes de las características clínica de la enfermedad causada por *V. cholerae* O1 y O139, y debido a que la cepa O139 posee potencia epidémica similar que el serogrupo O1, la Organización Mundial de la salud

solicitó a las naciones reportar la enfermedad causada por *V. cholerae* O139 como cólera (Nair, G. B. *et al.*, 1996)

Defensas del hospedero

La infección del cólera resulta en un amplio espectro de respuestas, la razón de estas diferencias no está clara pero es conocido que los individuos difieren en el grado de acidez gástrica y se reconoce que las personas hipoclorhídricas son más propensas al cólera, así mismo la resistencia a la enfermedad está también relacionada con la presencia de anticuerpos circulatorios de los cuales los más importantes es la inmunoglobulina A (IgA) local. Dicha inmunoglobulina puede prevenir la adhesión de los vibrios a la superficie de las mucosas y por lo tanto neutralizar o prevenir la entrada de la toxina (Finkelstein, R. A. 2001). Por razones que no son claras aun, individuos con grupo sanguíneo O son los más susceptibles al cólera causado por la cepa O139 y El Tor O1 (Nair, *et al.*, 1996). La recuperación de la enfermedad probablemente depende de 2 factores: la eliminación de los vibrios mediante antibióticos o por la respuesta inmune del propio paciente y segundo, la regeneración de las células epiteliales intestinales (Finkelstein, R. A. 2001).

Epidemiología

V. cholerae se encuentra en estanques de agua dulce y estuarios de Asia, Oriente Medio, África, Partes de Europa y las áreas costera de Sudamérica,

Centroamérica y Norteamérica (Murray, P. R., 1997). Las cepas toxigénicas también están ampliamente distribuidas en el medio ambiente marino. La capacidad de sobrevivir en condiciones estaurinas ha sugerido que es un microorganismo autóctono de este medio. Datos recientes sugieren que el medio estaurino es el reservorio ideal (Hood, M. A. and P. A. Winter, 1997). Se cree que la fuente principal de infección son los portadores humanos y los crustáceos; la enfermedad se disemina por agua y alimentos contaminados (Murray, P. R., 1997).

El cólera exhibe tres patrones epidemiológicos principales: endémicos, neoepidémicos (áreas receptoras del cólera invadidas recientemente), y en países desarrollados con buena saneación, brotes ocasionales. Estos patrones dependen de factores ambientales dentro de los cuales se incluyen aspectos culturales y de saneación, estatus inmune, experiencia antigénica del huésped, así como las propiedades inherentes de los vibrios como la resistencia a la acidez gástrica, la habilidad para colonizar y la toxigenicidad (Finkelstein, R. A.).

McCarthy y Khambaty recuperaron de la epidemia de América del Sur cepas de *V. cholera* O1 de agua de lastre de las embarcaciones y mostraron que el organismo puede sobrevivir por más de 28 días en agua de mar no estéril y 240 días en agua de mar estéril. Con base en estos resultados, ellos sugirieron que el agua de mar es un medio de transmisión de *V. cholerae*. Otros reportes (Xu, H. S. *et al.*, 1982; Baker, R. M. *et al.*, 1983) han sugerido que *V. cholerae* posee estrategias muy efectivas para sobrevivir grandes períodos de tiempo en sistemas

acuáticos (Hood, M. A. and P. A. Winter, 1997). La transmisión persona a persona resulta inusual, puesto que es necesario un inóculo grande para establecer la infección (10^8 a 10^{10} microorganismos), en individuos con acidez gástrica normal, (Murray, P. R. 1997).

Adhesión

La habilidad de los microorganismos para adherirse y subsecuentemente colonizar la superficie de la mucosa es un prerequisite para la infección gastrointestinal (Alwan A. *et al.*, 1998). En la mayoría de las infecciones por bacterias, el encuentro de estas, con las células del hospedero, involucra la adhesión a la superficie de la mucosa de las células epiteliales del intestino delgado, resultando en la fijación a receptores expresados por las células y a la colonización por la bacteria, y subsecuentemente poderse presentar la enfermedad (Beachey, E. 1988). La habilidad de la bacteria para romper las barreras defensivas tanto químicas como físicas del hospedero, entre las que se encuentran una capa mucosal delgada y continua, pH bajo en el estomago y glicoproteínas que cubren el tracto gastrointestinal (Alwan A. *et al.*, 1998), y la habilidad de adherirse al epitelio intestinal, es lo que distingue a los patógenos de los microorganismos comensales, esta unión es tan selectiva que el estornudo, la tos, la perístalsis y el flujo de fluidos no son suficientes para desunirlos (Sherman, P. *et al.*, 1987).

El proceso de colonización es esencial para la patogénesis del cólera; los factores establecidos por Freter y Jones (1983) requeridos para que la bacteria colonice el intestino delgado son: i) hacer contacto con la superficie mucosal; ii) penetrar la capa de la mucosa; iii) adherirse a la superficie de las células epiteliales; y iv) multiplicarse. Así mismo, la bacteria vence un número de mecanismos no específicos de defensa del hospedero, entre los que se encuentran los movimientos peristálticos y la capa de mucosa que cubre al intestino delgado (Postnova, T. *et al.*, 1996)

Un gran número de factores bacterianos han sido implicados en el proceso de adhesión a la mucosa de las células epiteliales del intestino delgado, los cuales incluyen a los LPS, varias hemaglutininas, la toxina-coregulada por el pilus en el caso de *V. cholerae* biotipo clásico, así como diversas proteínas de membrana (OMP_s). El movimiento de la bacteria es esencial para que esta tenga contacto con la mucosa intestinal y se presente la colonización bacterial; Guentzel y Berry en 1975 y posteriormente Teppema en 1987 demostraron que las cepas mutantes enterotoxigénicas no motiles, exhibían una virulencia disminuida; por otro lado, Richardson, (1991) observó que las cepas Clásica y El Tor no motiles no colonizaban el intestino de conejos (Postnova, T. *et al.*, 1996).

Plantas medicinales

Una gran cantidad de compuestos en la naturaleza tienen la habilidad para inhibir microorganismos, entre estos se encuentran algunos componentes de

plantas o de alimentos. La actividad antimicrobiana de extractos de diversos tipos de plantas ha sido reconocida por siglos (Conner, D. E. 1993).

Existe una coincidencia de los investigadores en afirmar que después de las plantas alimenticias, de construcción y las de vestimenta, las plantas medicinales ocuparon un lugar importante en varios lugares del mundo de las sociedades prehistóricas. Existen hallazgos de restos de plantas en una cueva del hombre de Neardenthal, con una antigüedad de 60 mil años. De las ocho especies que se identificaron por los granos de polen, siete de ellas todavía son utilizadas en esa localidad (Lugo, E. E. 1992).

La extraordinaria riqueza florística ubica a México en el cuarto lugar mundial y ha permitido que la herbolaria floreciera desde época prehispánica. En México se encontraron restos de peyote y mezcal en el estado de Coahuila con una antigüedad de 800 años, plantas que a la fecha se siguen utilizando como alucinógenos y medicinales (Lugo, E. E. 1992).

El registro "escrito" mas antiguo de plantas medicinales corresponde a una serie de ideogramas sumerios, los cuales tienen una antigüedad aproximada de 4500 años, en ellos se mencionaba a la amapola y a la mandrágora (Lugo, E. E. 1992).

En América, el registro mas antiguo lo constituye el Código Badiano, escrito en Náhuatl por Martín de la Cruz en 1552. Posteriormente, Sahún mencionó el uso

de mas de 150 plantas medicinales en su obra sobre la historia general de las cosas de Nueva España. Y por otro lado el Dr. Leopoldo Río de la Loza en su obra de las Farmacodependencias mexicanas, a finales del siglo pasado (1874) (Lugo, E. E. 1992).

Actividad antimicrobiana de extractos de plantas

Pliny, Virgil, e Hipócrates mencionaron que el ajo era bueno para el tratamiento de una variedad de enfermedades, incluyendo indigestión, neumonía, e infecciones. Aunque civilizaciones ancestrales reconocieron el potencial antiséptico o antimicrobiano de muchos extractos de plantas, no fue hasta la década 80's que los científicos se enfocaron acerca de los efectos preservativos de especias (Conner, D. E. 1993).

En los últimos años se han realizado análisis de algunas de estas plantas utilizadas en la cultura tradicional, lo que ha estado proporcionando validez científica para su utilización.

La República Mexicana es uno de los países que cuenta con una mayor diversidad vegetal a nivel mundial, prueba de ello lo constituye la presencia de prácticamente todos los grandes biomas que se han descrito de la superficie de nuestro planeta (Lugo, E. E. 1992). Por lo que no es de extrañar que en nuestro

país se han realizado estudios para evaluar la acción microbiológica de una gran diversidad de plantas medicinales, como las utilizadas por los mayas en el sur de México (Meckes, M. *et al.*, 1995) así como otras utilizadas por los aztecas (Davidson, J. and B. M. Ortiz, 1983).

Existen muchos trabajos donde se describen los usos y las propiedades de muchas plantas, sin embargo pocos estudios han aislado e identificado los principios activos de estas plantas (Mitscher, L. A., *et al.*, 1972).

Se ha descrito que la actividad antimicrobiana de algunas plantas puede ser debida en parte a la presencia de fitoalexinas, compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, producidos por las plantas en respuesta a alguna condición de estrés, trauma o a infecciones (Conner, D. E. 1993). Además se han identificado terpenoides volátiles, fenilpropanoides, quinonas, cumarinas, flavanoides, taninos y otros compuestos fenolicos así como glicósidos como compuestos de plantas que han mostrado actividad antimicrobiana (Balandin, M. F., 1985).

La tendencia mundial está enfocándose en la utilización de productos y alimentos lo más naturales posibles, incluso la Organización Mundial de la Salud (WHO) ha recomendado que todos los gobernantes a que promuevan la medicina nativa en su país (Vijaya, K and S. Ananthan., 1996).

Durante los últimos años un gran número de investigadores se han dedicado a la búsqueda de plantas que posean compuestos activos contra patógenos, a continuación se mencionan algunas de las investigaciones realizadas:

Efecto de extractos de plantas contra el crecimiento microbiano

Desde hace mucho tiempo se han realizado estudios sobre la capacidad de algunas plantas para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables. Toda, *et al* (1989) encontró que el extracto de hojas del té verde japonés inhibía el crecimiento de varias bacterias causantes de enfermedades diarreicas, como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Vibrio cholerae* O1, *V. cholerae* no-O1, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *Campylobacter jejuni* y *Plesiomonas shigelloides*.

Un poco después estos mismos investigadores describieron que el extracto de té negro exhibió actividad antimicrobiana contra *V. cholerae*, por lo que se sugirió que la ingesta de este té presentaba actividad protectora contra la enfermedad provocada por este microorganismo (Toda, *et al*; 1991).

Estas mismas observaciones fueron hechas tiempo después, cuando Shetty (1994) reportó que los extractos de té negro, té verde japonés, té Chino y el café inhibieron el crecimiento de varias bacterias que causaban enfermedades

diarreicas. El té y el café mostraron actividad bactericida contra *V. cholerae* y *Salmonella spp.*

Se han probado una gran variedad de plantas por grupos de investigadores tal como Irobi y Daramola (1994) quienes analizaron extractos acuosos y etanólicos de *Mitracarpus villosus* y observaron que estos presentaron actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *Streptomices faecalis* y *Bacillus subtilis*. De los extractos probados, únicamente el extracto acuoso presentó actividad inhibitoria contra *E. coli*.

Brantner y Grein (1994) estudiaron el efecto de 35 extractos acuosos obtenidos de varias plantas sobre 5 especies bacterianas. Ellos observaron que un 60% de los extractos presentaron un pronunciado efecto antibacteriano contra una o mas de las especies bacterianas analizadas. Encontraron además, que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del crecimiento variaron en los microorganismos analizados de 0.08 a 30.7 mg/ml para las bacterias gram positivas y de 0.07 a 25.7 para las gram negativas.

Guevara, *et al.*, (1994) examinaron 14 plantas del Perú utilizadas para el tratamiento de diarreas. Ellos encontraron que la *Punica granatum*, *Malus sativa*, *Cydonia oblonga*, *Persea gratífsima*, el té Chino y la infusión de té y la decocción de la cáscara de *P. granatum* mostraron efecto bactericida, por lo que se sugirió el uso de estas plantas para tratar de detener el avance del cólera.

En ese mismo año Alonso, *et al.*, (1995) analizaron el efecto de 10 extractos acuosos de 9 plantas de Uruguay contra 7 especies bacterianas. Ellos encontraron que todos los extractos analizados mostraron actividad antibacterial contra *E. coli* y 8 de ellas contra *B. subtilis* y *P. aeruginosa* y algunos otros fueron activos contra *S. aureus* y *Micrococcus luteus*.

Sin embargo, no solo en América se ha estudiado la actividad de extractos de plantas, Tanira, *et al.*, (1994) analizaron 21 especies de plantas provenientes de los Emiratos Árabes Unidos (UAE) contra 8 especies bacterianas y 1 especie de levaduras, observando que 7 de los 21 extractos mostraron actividad inhibitoria del crecimiento contra *Candida albicans* y *Klebsiella pneumoniae*. Así mismo observaron que el crecimiento de *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus cloacae* y de *E. coli* no fue inhibido por ningunos de los extractos analizados, por su parte el crecimiento de *S. aureus* fue afectado por 3 de los extractos de plantas.

Así mismo se realizó un análisis de algunas plantas medicinales utilizadas en Nepal. Se probaron 21 extractos metanolicos, de los cuales todos mostraron actividad al menos contra 2 especies bacterianas y 20 de estos mostraron actividad contra al menos 2 hongos. Únicamente 3 extractos fueron activos contra bacterias gram negativas y ninguno de los extractos fue activo contra *P. aeruginosa* y *C. albicans* (Taylor, R. S. *et al.*, 1995).

Otro trabajo similar fue desarrollado por Vlietinck, *et al.*, (1995) quienes examinaron 267 extractos de plantas utilizadas en la medicina tradicional de

Rwanda. Ellos encontraron que el 45% de los extractos fueron activos contra *S. aureus*, 16% contra *P. aeruginosa* y 2% contra *E. coli*. Cuando se probó su efecto contra hongos, se determinó que 7% presentaron actividad contra *C. albicans*, 80% contra *Microsporium canis* y 60% contra *Trichophyton mentagrophytes*. De los extractos 12% inhibieron al virus de la polio, 16% a coxsackie y el 18% al virus herpes.

Un año después se reportó un estudio de 10 plantas medicinales de la India donde analizaron su actividad antimicrobiana contra microorganismos enteropatógenos. Se determinó que extractos de *Allium sativum*, *Camellia sinensis* y *Chamaesyce hirta* mostraron la mayor actividad inhibitoria. En este estudio, *V. cholerae* y *Shigella flexneri* fueron los mas susceptibles (Vijaya, K. and S. Ananthan, 1996).

Terminalia macroptera es una planta medicinal usada en Guinea-Bissau y en otros países del Oeste africano para el tratamiento de enfermedades infecciosas. El extracto etanólico de la raíz de esta planta fue analizado para establecer su actividad antimicrobiana contra 7 cepas bacterianas de referencia y contra *C. albicans*, resultando activo contra al menos uno de los microorganismos analizados. Los microorganismos mas susceptibles fueron *Shigella dysenteriae* y *V. cholerae*. Los autores hicieron énfasis, con sus resultados, en la importancia potencial de las plantas medicinales en el tratamiento de las enfermedades entéricas (Silva, O., *et al.*, 1997).

Continuando con la búsqueda de extractos de plantas que inhiban el crecimiento de enteropatógenos, Shitut, *et al.*, (1999) estudiaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de tallo y hoja de diferentes variedades de chile (*Piper betel* Linn). Encontraron que los extractos etanólicos y con acetato de etilo mostraron actividad significativa contra *V. cholerae* Ogawa, *S. aureus*, *Diplococcus pneumonie* y *K. aerogenes*. Por su parte, los extractos hexánicos y bencénicos mostraron una actividad moderada.

Mahasneh y El-Oqlah (1999) analizaron el efecto de 9 plantas utilizadas en la medicina tradicional de Jordania, observando que los extractos acuosos, éter de petróleo, butanol y etanol mostraron niveles variables de actividad contra 4 especies bacterianas y 3 especies de hongos. Se encontró además que los extractos de hexano y metanol no mostraron ninguna actividad.

Además de las plantas completas, varios investigadores han trabajado tratando de encontrar el o los compuestos responsables de la actividad biológica. Shetty, M., *et al.*, (1994) enfocaron su estudio al compuesto llamado berberine (alcaloide de muchas plantas medicinales), debido a sus características antidiarreicas, el cual mostró actividad contra *V. cholerae* O1 y *Escherichia coli*.

Por otra parte Paulo, *et al.*, (1994) investigaron la actividad de la criptolepina, principal alcaloide de la *Cryptolepis sanguinolenta*, planta utilizada en la medicina tradicional del oeste de africano contra 86 cepas de *V. cholerae* aisladas de pacientes con infecciones entéricas en Angola, Brasil y Portugal.

Tanto los extractos etanólicos de la planta así como la criptolepina mostraron actividad contra las cepas de *V. cholerae* analizadas, aunque la acción que mostraron fue menor que la de la tetraciclina. Estos resultados sugirieron que esta planta podía ser utilizada como terapia alternativa para el tratamiento de algunas diarreas en el oeste de África.

Ultee (2000) estudió la actividad antimicrobiana del carvacol (compuesto fenólico presente en la fracción de aceite esencial del orégano y del tomillo) contra *Bacillus cereus*, demostrando que este compuesto inhibía el crecimiento de la bacteria.

Además, se han analizado extractos acuosos y etanólicos de *Thymus capitatus*, así como saponinas, resinas, flavonoides y aceites esenciales de la planta, encontrando que los extractos acuosos y etanólicos en concentraciones de 200 mg/ml, así como las saponinas, resinas y fracciones de aceites esenciales en concentraciones mayores a 5000 µg/ml inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *Salmonella spp*, *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* y *Corynebacterium pyogenes* (Kandil, O. et al., 1994).

Se ha reportado que el jugo de limón concentrado, así como su aceite esencial inhibían completamente el crecimiento de *V. cholerae*, en tanto que la cáscara de limón fresca y la deshidratada inhibían parcialmente su crecimiento. El autor concluyó que el limón actúa como un agente biocida contra *V. cholerae* y por

lo tanto, pudiera ser un eficiente descontaminante inocuo para el humano (De Castillo, M. C., *et al.*, 2000).

Aunque se han estudiado muchas plantas en México existen muy pocos reportes de ellos. Verástegui, *et al.*, (1996) analizaron extractos etanólicos de *Agave lecheguilla*, *Baccharis glutinosa* y *Larrea tridentata*, plantas nativas del noreste mexicano, sobre levaduras, hongos y bacterias. Ellos encontraron que uno o mas de los extractos utilizados inhibía el crecimiento de los organismos analizados con excepción de *E. coli* y *Salmonella spp.*, quienes no fueron inhibidas por los extractos. Debido a esto y a la gran riqueza herbolaria de nuestro país, resulta necesario continuar con estudios en este importante campo.

Efecto de extractos de plantas sobre la producción de toxinas microbianas

Los trabajos realizados sobre este punto son mas escasos, que los existentes para el crecimiento microbiano. La búsqueda de factores o compuestos que interfieran con la biosíntesis de toxinas ha sido un campo estudiado desde hace tiempo. En 1988 Weintein, *et al.*, estudiaron el efecto de algunos factores fisicos como la temperatura y concentración de hierro sobre la producción de la toxina Shiga-Like de *E coli*. Se observó que el hierro suprimió la síntesis de la citotoxina de *E. coli*, y afectó también la síntesis de la Shiga toxina de *S.*

dysenteriae. Ellos también establecieron que la síntesis de la toxina era regulada por la temperatura de crecimiento.

Continuando con lo mismo, Duffy, *et al.*, (2000) analizaron el efecto del pH sobre la producción de verotoxinas por *E. coli* O157:H7. Ellos encontraron que las células que crecieron a pH de 5.6 presentaron menor producción de verotoxinas comparadas con las células cultivadas a pH de 7.4, concluyendo que las células adaptadas al ácido producían menor cantidad de toxina que las células no adaptas.

El glicerol monolaurato (GML) que es un surfactante natural, el cual ha sido utilizado como aditivo en medicamentos y vendas para reducir la incidencia de ciertas toxinas bacterianas fue analizado para determinar su efecto sobre el crecimiento microbiano. El GML inhibió el crecimiento de aislados clínicos del grupo A, B, F, y G de estreptococos a concentraciones de 10 a 20 µg/ml. La producción de enterotoxinas, incluyendo las exotoxinas piógenas y hemolisinas, fue reducida por debajo de la concentración inhibitoria del crecimiento. Además se encontró que la hemolisina, la toxina 1 del síndrome de shock toxico y la toxina A exfoliativa de *S. aureus* fue inhibida a concentraciones menores de GML necesarias para la inhibición del crecimiento. La endotoxina liberada al medio por *E. coli* fue también afectada por el GML. Estos estudios indican que el GML demora o bloquea la producción de exotoxinas de patógenos gram-positivos (Schlievert, P. M. 1992).

