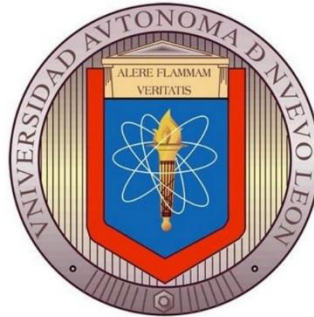


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**EXTRACTOS DE CÍTRICOS COMO INHIBIDORES DEL “QUÓRUM SENSING” EN  
*CAMPYLOBACTER JEJUNI* Y SU EFECTO SOBRE ALGUNOS FACTORES DE  
VIRULENCIA RELACIONADOS.**

Por

MC. Sandra Loruhamá Castillo Hernández

Como requisito parcial para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA.**

Enero 2014

EXTRACTOS DE CÍTRICOS COMO INHIBIDORES DEL “QUÓRUM SENSING” EN  
*CAMPYLOBACTER JEJUNI* Y SU EFECTO SOBRE  
ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA.

Comité de Tesis

---

Dr. José Santos García Alvarado  
Presidente

---

Dra. Elva Aréchiga Carvajal  
Secretaria

---

Dra. Norma Laura Heredia Rojas  
Vocal

---

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna  
Vocal

---

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero  
Vocal

## AGRADECIMIENTOS

Quiero Agradecer primeramente a Dios, por sus innumerables muestras de su presencia en cada paso que doy.

A mis hijos por su comprensión y paciencia a lo largo del tiempo que les robé y estuve ausente por realizar este trabajo.

A mi Madre, Padre, Hermanos y Sobrinos por sus constantes consejos y buenos deseos.

Al Dr. Santos García y la Dra. Norma Heredia, por su apoyo para la realización de este trabajo.

A los Doctores: Eduardo Sánchez, Elva Aaréchiga, Griselda Menchaca y Juan Francisco Contreras por su incondicional disposición ante mis dudas y a la MC. Cindy por su sonrisa y alegría contagiosas.

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

Y a todos aquellos alumnos, becarios y compañeros, que de alguna u otra manera estuvieron presentes en los momentos más difíciles.

TABLA DE CONTENIDO		
SECCIÓN		PÁGINA
AGRADECIMIENTOS.....		iii
LISTA DE TABLAS.....		viii
LISTA DE FIGURAS.....		ix
RESUMEN.....		x
ABSTRACT.....		xi
1. INTRODUCCIÓN.....		1
2. JUSTIFICACIÓN.....		3
3. HIPÓTESIS.....		4
4. OBJETIVOS.....		5
4.1 Objetivo General.....		5
4.1.1. Objetivos Particulares.....		5
5. ANTECEDENTES.....		6
5.1 Quórum Sensing.....		6
5.2 Importancia de <i>Campylobacter</i> .....		9
5.3 Factores de virulencia y papel de AI-2.....		10
5.4 Biopelículas.....		13
5.5 Actividad de plantas sobre enteropatógenos y AI-2.....		15
6. MÉTODOS.....		21
6.1 Cepas microbianas y condiciones de cultivo.....		21
6.2 Obtención de los extractos.....		21

6.3 Compuestos naturales comerciales.....	22
6.4 Ensayos preliminares de Susceptibilidad Antimicrobiana.....	22
6.5 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	22
6.6 Determinación del efecto de concentraciones subinhibitorias sobre el crecimiento de <i>C. jejuni</i> .....	23
6.7 Condiciones de cultivo para la obtención de sobrenadantes para ensayos de bioluminiscencia.....	23
6.8 Ensayo de Bioluminiscencia para detectar AI-2.....	24
6.9. Ensayo para determinar la actividad de extractos de cítricos y compuestos naturales comerciales sobre la actividad de AI-2.....	24
6.10 Ensayo para la determinación de Biopelículas.....	25
6.11 Ensayo de movilidad.....	25
6.12 Ensayo para determinar la adhesión e invasión de <i>Campylobacter</i> a la línea celular HeLa.....	25
6.13 Ensayo para determinar la influencia de extractos de cítricos en la expresión de algunos genes de virulencia.....	26
6.14 Análisis Estadístico.....	27
7. RESULTADOS.....	28
7.1 Ensayos preliminares de Susceptibilidad Antimicrobiana.....	28
7.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	28
7.3 Efecto de concentraciones subinhibitorias sobre el crecimiento de <i>C. jejuni</i> .....	31

7.4 Efecto de los extractos de cítricos y compuestos naturales comerciales sobre la actividad de AI-2.....	31
7.5 Efecto de los extractos de cítricos sobre la movilidad de <i>C. jejuni</i> .....	38
7.6 Efecto de los extractos sobre la formación de niopelícula.....	41
7.7 Efecto de los extractos de cítricos sobre la adhesión e invasión a células HeLa.....	43
7.8 Efecto de los extractos de cítricos sobre la expresión de genes relacionados.....	44
8. DISCUSIÓN.....	47
9. CONCLUSIONES.....	54
10. LITERATURA CITADA.....	55
11. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	69

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Pruebas preliminares de actividad antimicrobiana de varios extractos de cítricos.....	29
II. Inhibición y concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos seleccionados y los compuestos naturales comerciales sobre cuatro especies de <i>C. jejuni</i> .....	30
III. Porcentaje de reducción en movilidad de tres cepas de <i>C. jejuni</i> en presencia de extractos de cítricos y/o compuestos naturales comerciales.....	40

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Efecto de las concentraciones subinhibitorias de extractos de cítricos sobre el crecimiento de <i>C. jejuni</i> .....	34
2. Porcentaje de unidades relativas de luz mediadas por AI-2 determinados mediante el ensayo de bioluminiscencia por <i>V. harveyi</i> BB170 antes y después del tratamiento con extractos y/o compuestos naturales comerciales.....	35
3. Curva de crecimiento de <i>V. harveyi</i> BB170 después de la adición de extractos de cítricos mezclados con sobrenadantes.....	36
4. Población de <i>V. harveyi</i> BB170 presente a las 4h de incubación con sobrenadantes tratados con compuestos naturales comerciales.....	37
5. Movilidad de cuatro cepas de <i>Campylobacter jejuni</i> .....	39
6. Movilidad de <i>C. jejuni</i> cepa NCTC 11168 con y sin concentraciones subinhibitorias de extracto de limón .....	41
7. Formación de biopelícula en tres cepas de <i>C. jejuni</i> a concentraciones subinhibitorias (75% de la CMB).....	42
8. Células de <i>C. jejuni</i> adheridas a células HeLa antes y después del tratamiento con extractos de cítricos. Las barras azules muestran las UFC inoculadas mientras que las barras rojas muestran las UFC/ml adheridas recuperadas.....	44
9. Niveles de expresión de los genes <i>glyA</i> , <i>flaA-B</i> , <i>ciaB</i> y <i>cadF</i> relacionados con la adhesión e invasión a células de cuatro cepas de <i>C. jejuni</i> sometidas a tratamientos con diferentes extractos de cítricos.....	46



## RESUMEN.

El Quórum Sensing (QS) es un sistema de señalización presente en bacterias que tiene influencia en una gran variedad de factores de virulencia. En el presente estudio se investigó la habilidad de extractos de cítricos para inhibir la actividad AI-2 del QS en *Campylobacter jejuni* y su habilidad para inhibir la movilidad, la formación de biopelículas, la capacidad de adhesión e invasión de *Campylobacter* a células HeLa y el efecto sobre la expresión de los genes: *flaA*, *flaB* (relacionados con la movilidad y formación de biopelícula), y *ciaB* y *cadF* (relacionados con adhesión e invasión). Se prepararon extractos acuosos de cáscara y bagazo de diferentes cítricos, se determinó la actividad antimicrobiana en pozo y la concentración mínima bactericida (CMB) contra *C. jejuni*. Se eligieron los extractos de *C. limon*, *C. aurantium*, *C. medica* por presentar las CMBs más bajas, oscilando entre 1.5 y 3mg/ml, utilizándose para los estudios posteriores. Se evaluó también el efecto de estos extractos sobre la formación de biopelícula de *C. jejuni* en microplacas de 96 pozos, donde se cultivó *C. jejuni* con y sin tratamiento con extracto. Se tiñó la biopelícula con safranina, y se midió la absorbancia en un lector de ELISA para determinar la cantidad de biopelícula formada, encontrándose una reducción concentración-dependiente en la mayoría de los casos. Para determinar el efecto sobre la movilidad de *C. jejuni*, se prepararon placas con 0.3% de agar Muller Hinton, se sembró en el centro una alícuota de *C. jejuni* previamente activada, se incubaron a 42°C/48h en las mismas condiciones y se midieron los halos de migración encontrándose una reducción por efecto de los extractos hasta en un 40%. Para relacionar la influencia de los extractos sobre el QS, se obtuvieron sobrenadantes de cultivos de *C. jejuni* y se mezclaron con los extractos. Se agregaron a los cultivos de *V. harveyi* BB170 y se midió la bioluminiscencia emitida. Se encontró que la actividad AI-2 del QS disminuyó significativamente comparado con el control después de la adición de extractos.

Al realizar los ensayos de adherencia e invasión a células se encontró que la capacidad de adhesión de *C. jejuni*, no se redujo por efecto de los extractos; sin embargo, la invasión disminuyó en células tratadas con extracto comparadas con las no tratadas.

Al determinar el efecto de la adición de extractos sobre la expresión de los genes de virulencia relacionados, se evidenció una disminución en la expresión de los genes *flaA*, *flaB*, *cadF* y *ciaB* en la mayoría de los casos.

## ABSTRACT

Quorum Sensing (QS), a signaling system present in bacteria, is able to influence the expression of a variety of virulence factors. Substances capable of interfering with QS could be alternate mechanisms for targeting virulence, and as result, control of the pathogenic microorganisms or the disease it causes. This study investigated the effect of citrus extracts, and their influence on the activity of AI-2 molecules responsible of QS in *C. jejuni* and their influence on virulence processes such as motility, biofilm formation, adherence, invasion and expression of *flaA-B*, *ciaB* and *cadF*. Cultures of *Campylobacter jejuni* were exposed to various concentrations of citrus peel extracts (lime, citron and bitter orange). To test swarm motility, concentrations lower than the MBC of the citrus extracts, were mixed with Muller Hinton (0.3% agar). *C. jejuni* was placed in the center of the plate and after incubation, the extent of swarming motility was determined by measuring the diameter of migration and compared with control. Biofilm formation on polystyrene microtiter plates with *Brucella* broth was quantified at O.D. 492nm after staining with safranin. AI-2 activity was determined from supernatants of *C. jejuni* cultured in *Brucella* broth, which were added into fresh culture of *V.harveyi* BB170 (on AB medium) using a bioluminescence assay. Culture supernatants of *V. harveyi* BB152 were used as positive control. Adherence and invasion were measured using HeLa cells assay and the levels of expression of *flaA-B*, *ciaB* and *cadF* were determined by qRT-PCR before and after addition of citrus extracts. Results showed that swarm motility was reduced 50% when treated with lime or citron extract, and 35 to 40% for bitter orange extract. Citric extracts reduced by 60 to 75% biofilm formation depending on extract concentration and/or *Campylobacter* strain tested. Citrus extracts decreased AI-2 activity in most cases at levels of 90% Relative Light Units (RLU). All extracts at 75% of MBC reduced ( $P \leq 0.05$ ) the expression of *flaA-B*, *ciaB* and *cadF* and invasion of *C. jejuni* to HeLa cells. This study provides an insight of the effect of natural edible antimicrobials on QS and virulence factors of *Campylobacter jejuni*.

## 1. INTRODUCCIÓN.

El Quórum Sensing (QS) es una forma de regulación genética que se activa por cambios en la población bacteriana. Este sistema, está mediado por moléculas autoinductoras como acil-homoserin-lactonas o tipo “hormonas” (AI-1) y/o furanosil borato diéster (AI-2). La acumulación de estas moléculas señalizadoras (AI) regulan la transcripción de los genes. Muchos comportamientos bacterianos son regulados por QS incluyendo producción de antibióticos, formación de biopelículas y virulencia (Shauder and Bassler 2001). Las bacterias Gram negativas normalmente producen las moléculas AI-1 de tipo “hormonas” llamadas acil-homoserinlactonas clasificadas como un tipo de señalización autoinductora- (AI-1) la cual monitorea la población en relación con otras especies bacterianas. El QS mediado por la señalización 2 (AI-2) existe tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas y monitorea la población con otras especies bacterianas (Bassler *et al.*, 1994). Esta última molécula (AI-2) es mediada por furanosil borato diéster y se considera sumamente importante por su distribución casi universal entre las bacterias analizadas (Roy *et al.* 2011). El gen responsable de la producción de este tipo de moléculas ha sido identificado como *luxS* en *Vibrio harveyi*. Múltiples estudios muestran que homólogos de *luxS* están presentes en más de 30 especies bacterianas (Surette *et al.*, 1999).

*Campylobacter jejuni* es una de las principales causas de enteritis bacteriana alrededor del mundo. A pesar de su importancia clínica, la genética, fisiología y virulencia del mismo no se han dilucidado completamente, impidiendo de esta manera establecer estrategias efectivas para su prevención (Byeonghwa *et al.*, 2003). *C. jejuni* se considera responsable de una enfermedad conocida como campilobacteriosis cuyos síntomas incluyen: fiebre, náusea, dolor abdominal e incluso diarrea severa y en ocasiones sanguinolenta. La dosis infectiva para contraer campilobacteriosis se ha reportado de 500 a 800 células, con un período de incubación de 2 a 7 días y comúnmente la enfermedad cede espontáneamente (Black *et al.*, 1988). Como complicación a una campylobacteriosis en aproximadamente el 1% de los pacientes, se puede desarrollar del síndrome de Guillan Barré, el cual se presenta como una polineuropatía desmielinizante, que causa, una parálisis flácida, que puede derivar en

la muerte (Nachamkin *et al.*, 1998). Así mismo otras complicaciones importantes como el síndrome de Reiter o la artritis reactiva (Ganan *et al.*, 2012) se han reportado.

Debido al uso indiscriminado de antibióticos, los microorganismos han desarrollado resistencia a los mismos, por lo que actualmente se buscan alternativas medicinales para su control. Es por esto que la utilización de la medicina natural desde tiempos muy antiguos ha resultado en una estrategia actual.

Los extractos de cítricos han sido frutas muy utilizadas en la industria debido a la producción de jugos de los mismos. Las propiedades benéficas de estos frutos han sido conocidas desde tiempos antiguos, utilizándose en la medicina tradicional en muchos países (Peixoto *et al.*, 2012).

Tomando en cuenta la importancia de este microorganismo y la influencia del QS para controlar sus factores de virulencia, es de vital importancia conocer el efecto de extractos o compuestos de plantas sobre la señalización AI-2 que nos permita ayudar a dilucidar el mecanismo de acción de extractos de plantas sobre *C. jejuni*

## 2. JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades alimentarias siguen siendo un problema de salud mundial, por lo que el control de los patógenos causantes de ellas es clave para asegurar la salud de los consumidores. Debido a lo anterior se ha incrementado el interés en el desarrollo de nuevos métodos para prevenir, reducir o eliminar este tipo de enfermedades.

Las enfermedades causadas por *C. jejuni*, constituyen un problema de salud a nivel mundial, ya que un gran número de las gastroenteritis se relacionan con este microorganismo. Actualmente se pretende buscar nuevas alternativas para controlar la incidencia de este tipo de enfermedades debido a la alta incidencia de cepas resistentes a antibióticos, tanto en la industria farmacéutica como alimentaria. Se necesitan nuevos modelos de mecanismos de acción sobre los microorganismos y el QS representa un blanco nuevo para las investigaciones científicas, ya que al inhibir el QS se evita la presión selectiva debido a que más que actuar sobre el crecimiento bacteriano se actúa sobre las moléculas autoinducidas que al ser bloqueadas son incapaces de desencadenar comportamientos virulentos

Sabemos que México cuenta con una florística amplia y que desde mucho tiempo atrás se han utilizado como "remedios" para enfermedades. Sin embargo, no hay suficientes hallazgos científicos. En nuestro trabajo, se pretende contribuir con la comunidad científica proporcionando información de gran importancia para la industria alimentaria y médica.

### 3. HIPÓTESIS:

Los extractos de cáscara de limón, de cidra y de naranja agria poseen actividad inhibitoria contra el QS mediado por moléculas AI-2 en *C. jejuni* así como sobre la expresión fenotípica y genotípica de algunos factores de virulencia.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 *Objetivo General*

Determinar la actividad biológica de extractos de cítricos así como su efecto sobre el QS mediado por señalización AI-2 y sobre la expresión fenotípica y genotípica de algunos factores de virulencia regulados por QS en *C. jejuni*.

#### 4.1.1. *Objetivos particulares:*

1. Determinar mediante ensayos preliminares la actividad biológica de 6 extractos de cítricos.

2. Establecer la concentración mínima bactericida de los extractos seleccionados que presentaron la mejor actividad antimicrobiana y comparar su actividad con algunos compuestos naturales comerciales.

3. Determinar la influencia de concentraciones subinhibitorias de los extractos de cítricos sobre el crecimiento de *C. jejuni*.

4. Determinar la capacidad de los extractos de cítricos y tres productos naturales comerciales para inhibir la actividad de la molécula auto-inductora AI-2 mediante el ensayo de bioluminiscencia con *V. harveyi* BB170.

5. Determinar la influencia de los extractos de cítricos seleccionados sobre el comportamiento fenotípico de *C. jejuni* particularmente:

- b) movilidad
- c) formación de biopelículas
- e) adhesión bacteriana
- f) invasión a células

6. Determinar la influencia de los extractos de cítricos sobre la expresión relativa de los genes de virulencia relacionados: *gly* A (serinhidroximetil transferasa), *cad* F (proteína de unión a fibronectina), *fla* A-B (flagelina), y *cia*B (antígeno invasivo B) mediante qRT- PCR tiempo real.



## 5. ANTECEDENTES.

### 5.1 *Quórum Sensing (QS)*.

Una gran cantidad de especies bacterianas, regulan la expresión genética en respuesta al incremento de la población microbiana. Este fenómeno llamado QS (Fuqua *et al.*, 1994), ha llamado la atención de los investigadores por su influencia en una amplia gama de comportamientos microbianos (Yoon and Sofos, 2008). Este tipo de comunicación está mediada por moléculas señal de bajo peso molecular llamados auto-inductores (AI) o feromonas (Smith *et al.*, 2004). El sistema de QS se ha estudiado en un gran número de especies bacterianas principalmente en aquellas pertenecientes a los grupos  $\alpha$ ,  $\beta$  y subclases de proteobacteria (Deep *et al.*, 2011). La función básica del QS es muy probablemente conferir una ventaja nutricional, particularmente en un ambiente altamente poblado de diferentes especies. Estas sustancias (AI) son secretadas al medio extracelular y al alcanzar cierta concentración son detectadas por las bacterias y derivan en el inicio de una cascada de la transcripción provocando un cambio en la expresión genética y por lo tanto en el comportamiento microbiano (Surette *et al.*, 1999; Waters and Bassler, 2005).

Algunos estudios han demostrado que la bacterias utilizan QS para coordinar actividades tales como conjugación de plásmidos, bioluminiscencia, producción de proteínas, virulencia y biopelículas entre otros (Yoon and Sofos, 2008). Se ha visto por ejemplo, que en varios casos cuando existe una alta densidad celular, se dispara el sistema QS, y la transcripción de los factores de colonización se suprimen y se remplazan por la expresión de factores de virulencia (Yoon and Sofos, 2008; Gobbetti *et al.*, 2007); En la actualidad, se ha demostrado que una gran porción del genoma bacteriano (4-10%) y proteoma (20%), puede ser influenciados por QS (Deep *et al.*, 2011).

Las moléculas de tipo oligopéptidos y N-acilhomoserina lactonas (AHL) son las principales moléculas autoinductoras del tipo 1 (AI-1) involucradas en comunicación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente. Mientras que moléculas borato-diéster (autoinductores del tipo 2, AI-2) están involucradas en comunicación intra e inter especies tanto en Gram positivas como

Gram negativas (Girenavar *et al.*, 2008, Galloway *et al.*, 2012). Es por ello que estas últimas se consideran de distribución universal entre las especies bacterianas (Roy *et al.*, 2011).

Las moléculas señal N-acil-homoserin-lactonas (AHLs) fueron las primeras moléculas encontradas en bacterias Gram negativas. Este mecanismo de QS mediado por AHLs fue descrito por vez primera en *V. fischeri*, una bacteria marina bioluminiscente que vive en simbiosis con otros organismos marinos (Gobbetti *et al.*, 2007). En otras bacterias Gram negativas, se han identificado varios tipos de moléculas autoinducidas del tipo 1 (AI-1), las cuales difieren solo en modificaciones menores.

El paradigma general del QS específico entre especies en bacterias Gram-negativas, mediado por moléculas acil homoserin lactonas (AHL's), se ha denominado señalización 1 (AI-1) (Fuqua *et al.*, 2001). Se ha demostrado que este sistema (AI-1) posee una comunicación específica y por lo tanto limitada entre especies microbianas (Surette and Bassler 1998, Lu *et al.*, 2004). Las moléculas mediadoras de este sistema han sido identificadas como N-3-oxododecanoyl-homoserina lactona y N-butyryl-homoserina lactona (Pearson *et al.*, 1995, Deep *et al.*, 2011).

Existe otro tipo de señalización referida como tipo 2 que involucra una molécula llamada Autoinductor 2 (AI-2), que ha sido considerada universal entre bacterias (Roy *et al.*, 2011). Se observó por primera vez en *Vibrio harveyi*, y se demostró que el gen *luxS* estaba directamente involucrado en la producción de AI-2, además de ser altamente conservado entre diferentes especies bacterianas (Gram positivas y Gram negativas) incluyendo *Escherichia coli* (Xavier and Bassler 2005), *Salmonella* ser. Typhimurium (Surette and Bassler 1998), *Campylobacter jejuni* (Elvers and Simon 2002) entre más de 30 especies microbianas (Byeonghwa *et al.*, 2003). Estudios previos demuestran que las moléculas implicadas en este sistema son del tipo borato-diéster tal es el caso del furanosil borato diéster involucrado en la bioluminiscencia de *V. harveyi* (Girenavar *et al.*, 2008).

Existen varios estudios que describen la importancia del gen *luxS* relacionada con la expresión de algunos factores de virulencia en diferentes microorganismos. Se ha comprobado que mutaciones en este gen reducen significativamente la patogenicidad de algunas bacterias (Choi *et al.*, 2007).

En el caso de *E. coli*, se ha demostrado que mediante la señalización AI-2 se modula la expresión de algunos genes de virulencia tales como los implicados en movilidad, toxina Shiga, síntesis de sideróforos y formación de biopelículas entre otros (Lee *et al.*, 2008).

Choi *et al* (2007) demostraron que el gen *luxS* juega un papel muy importante para la virulencia en *S. Typhimurium*. Encontrando que cuando el gen *luxS* no estaba presente, disminuía la capacidad de invasión a células de esta bacteria. Así mismo la expresión del gen *invF* involucrado en la invasión se veía disminuido. En este mismo estudio, también demostraron que en la presencia de moléculas AI-2 tanto la capacidad de invasión como la expresión del gen *invF* aumentaban significativamente.

En otro estudio Elvers y Simon (2002) demostraron que cepas mutantes de *C. jejuni* carentes del gen *luxS*, mostraron un decremento importante en la capacidad de movilidad mientras que Reeser *et al.*, (2007) encontraron que estas cepas reducían su habilidad para formar biopelículas y determinaron que el flagelo jugaba un papel muy importante en la formación de los mismos.

Byeonghwa *et al.*, (2003), demostraron que el QS mediado por AI-2 en *C. jejuni*, tiene influencia directa en la transcripción de *flaA* (gen que codifica para la flagelina), y que, mutantes de *luxS*, inducían una reducción en la movilidad de este microorganismo.

Dada la estrecha relación que existe entre el sistema QS y los mecanismos de virulencia, no sería extraño que las nuevas estrategias terapéuticas se centraran en la destrucción o bloqueo de estas moléculas para el tratamiento de diversas infecciones causadas por bacterias (Galloway *et al.*, 2012).

## 5.2 Importancia de *Campylobacter*.

Dentro del género *Campylobacter*, existen 16 especies de las cuales *C. jejuni*, *C. coli*, y *C. fetus*, son las más frecuentemente aisladas en humanos (Dasti *et al.*, 2010). Estas bacterias, son bacilos Gram-negativos, con forma espiral y móviles por contar con un flagelo polar ó en ocasiones bipolar. Crecen óptimamente en atmósfera microaerofílica (10% CO<sub>2</sub>), en temperaturas de entre 37 y 42°C (Konkel *et al.*, 2001).

*C. jejuni* se considera responsable de la enfermedad conocida como campylobacteriosis cuyos síntomas incluyen: fiebre, náusea, dolor abdominal e incluso diarrea severa la cual pudiera ser sanguinolenta. La dosis infectiva para contraer campilobacteriosis se ha reportado de 400 a 800 células, esto, aunado a la gran diversidad de campylobacterias y a su habilidad de entrar en un estado viable no cultivable, hacen de *Campylobacter* una bacteria de creciente interés para el desarrollo de nuevos métodos de control (Hwang *et al.*, 2011). El período de incubación es de 2 a 7 días y aunque comúnmente la enfermedad cede espontáneamente, existen secuelas post-infección como el Síndrome de Guillain Barre, el Síndrome de Reiter, la artritis reactiva, y el síndrome de colon irritable que pueden derivar en la muerte (Iovine, 2013).

La infección se adquiere en forma general, por mal manejo y consumo de pollo contaminado, aunque también por consumo de leche no pasteurizada y por agua contaminada entre otros alimentos (Friedman *et al.*, 2000); aunque en ocasiones puede ser debido al contacto directo o indirecto con heces contaminadas de algunos animales como pollo, rumiantes o aves de vida libre (Bessell *et al.*, 2012). Se considera que cerca del 90% de los casos de campilobacteriosis son esporádicos y se presentan durante el verano, sin embargo, *Campylobacter* es el responsable de la mayoría de las infecciones intestinales alrededor del mundo afectando anualmente al 1.1% y 1% de la población de Reino Unido y Estados Unidos respectivamente (Hong *et al.*, 2004, Hwang *et al.*, 2011).

La incidencia real de casos, debido a los no reportados, se estima al menos 10 veces mayor a los casos documentados (Allos *et al.*, 2001). Debido a esto, *C. jejuni*, es considerada como la principal causa de diarreas a nivel mundial (Wassenaar and

Newel, 2000; Hwang *et al.*, 2011).

Una de las características más notorias durante la enfermedad causada por *Campylobacter* es la variabilidad de la severidad clínica. En un estudio realizado en niños, los datos clínicos variaron desde infecciones asintomáticas hasta diarrea secretora y en unos cuantos casos, diarrea inflamatoria (Carvahlo *et al.*, 2001).

Otras de las manifestaciones clínicas de la infección por *Campylobacter* incluyen, meningitis, bacteremia, infecciones extraintestinales localizadas, así como complicaciones inmuno-reactivas como es el caso de artritis reumatoide y del síndrome de Guillain Barré (Konkel *et al.*, 1998), éste último se presenta aproximadamente en el 1% de los pacientes después de la infección gastrointestinal, provocando una parálisis flácida, que puede derivar en la muerte (Nachamkin *et al.*, 1998).

Este amplio rango de manifestaciones clínicas, depende de la respuesta del hospedero y de las características del patógeno. Normalmente la infección no requiere hospitalización, únicamente se ingieren electrolitos para mantener al paciente hidratado (Allos *et al.*, 2001), en situaciones especiales como pacientes con Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA) o mujeres embarazadas, sí se utilizan antibióticos.

Factores como el abuso de antibióticos en las dietas de aves de engorda o animales, así como la automedicación, han contribuido a la emergencia de cepas de *Campylobacter* resistentes a antimicrobianos (Nachamkin, 2002). El incremento en el número de infecciones humanas, por este tipo de cepas, hace muy importante a la campilobacteriosis (Fields and Swerdlow, 1999, Ganán *et al.*, 2012).

### **5.3 Factores de virulencia y el papel de AI-2.**

La identificación y caracterización de los factores de virulencia producidos por microorganismos patógenos resulta de gran importancia en la investigación microbiológica; el conocimiento de la naturaleza, la regulación y mecanismo de

acción de estos factores de virulencia es indispensable para la prevención y el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Wassenaar, 1997). Los mecanismos específicos de virulencia en *Campylobacter* no han sido totalmente dilucidados, sin embargo la movilidad mediada por el flagelo, la adhesión e invasión a mucosa, la producción de enterotoxina y citotoxina, así como la expresión de genes, son considerados factores de virulencia determinantes durante la infección (Ripabelli *et al.*, 2010). Así mismo, García y Heredia (2009), mencionaron que la adherencia e invasión a las superficies mucosas son pasos cruciales en la patogénesis de *Campylobacter* en donde la quimiotaxis, la movilidad, las adhesinas, la actividad hemolítica, el lipopolisacárido, los antígenos capsulares y la toxina citoletal distensora juegan un papel importante.

*Campylobacter* posee un lipopolisacárido que le confiere cierta resistencia, endotoxicidad y adhesión (Van-Vliet y Ketley, 2001). Varios estudios han demostrado que el LPS de *Campylobacter* es similar al de *Haemophilus* y *Neisseria* spp (Logan y Trust, 1984; Konkel *et al.*, 2001).

El papel de la movilidad en la patogénesis está bien definido (Morooka *et al.*, 1985). La movilidad está ligada a dos proteínas FlaA y FlaB, pero específicamente a la síntesis de FlaA, ya que los niveles de producción de FlaB son muy bajos. Se ha establecido que *Campylobacter* penetra la capa mucosa utilizando su flagelo polar, que es el responsable del movimiento de sacacorchos del mismo (Szymanski *et al.*, 1995). Las mutantes carentes de *flaA*, el principal gen para la síntesis de la proteína FlaA del flagelo, son incapaces de colonizar pollos de tres días de nacidos así como células intestinales de humano *in vitro* (Fields y Swerdlow, 1999). Las flagelinas y el Quorum Sensing (QS) juegan un papel importante en la movilidad y quimiotaxis que son requeridas para la colonización de tejidos animales (Asakura *et al.*, 2007). Es por ello que se considera a la adhesión e invasión, como procesos dependientes de movilidad y expresión flagelar de este microorganismo (Van-Vliet y Ketley, 2001).

La adhesión e invasión de *C. jejuni/coli* a líneas celulares, ha sido ampliamente estudiada (Konkel *et al.*, 1992). La adhesión de la bacteria a mucosas es necesaria para la colonización y subsecuentemente la patogénesis (Mc Swegan y Walker, 1986). Se ha demostrado que *C. jejuni* es capaz de adherirse a células humanas (INT407,

Hep-2, HeLa, y 293), así como a células de origen animal (VERO, CHO-K1 y MDCK) con la misma eficiencia (Konkel *et al.*, 2001). Se ha encontrado una relación entre la severidad de los síntomas y la capacidad de adhesión e invasión del microorganismo (Dasti *et al.*, 2010).

Se han identificado factores de adhesión que incluyen la proteína de unión a fibronectina CadF codificada por *cadF* que interactúa con la matriz extracelular del hospedero y es requerida para la adhesión y colonización (Chansiripornchai y Sasipreeyajan, 2009). Estudios han demostrado que diferencias en la expresión de este gen puede derivar en variabilidad en la capacidad de adhesión e invasión (Krause-Gruscynska *et al.*, 2007).

Otro de los principales genes involucrados en la invasión es *ciaB* (Antígeno B invasivo de *Campylobacter*). Algunos estudios han demostrado que esta proteína parece entrar a la célula hospedera durante la invasión. Se ha propuesto la función de CiaB como una proteína secretora que inyecta, mediante el sistema de exportación flagelar, moléculas efectoras a la célula hospedera (Dasti *et al.*, 2010).

Desde el descubrimiento del sistema QS como un posible regulador en la expresión de genes de virulencia que derivan en características fenotípicas como la movilidad, adhesión, formación de biopelículas, producción de antibióticos entre muchos otros, el interés de varios grupos de investigación se ha centrado en definir el mecanismo exacto por el cual ocurre este sistema, para poder bloquearlo y así, desarrollar nuevos terapéuticos con distintos blancos de acción que evadan la resistencia antimicrobiana (Roy *et al.*, 2011, Clatworthy *et al.*, 2007). Uno de los genes más relacionados con el sistema QS AI-2 es *luxS*.

Se ha demostrado la presencia del gen *luxS* (relacionado con la actividad AI-2) en *C. jejuni* (Orla *et al.*, 2002). Por lo tanto se han realizado estudios para definir su papel en la producción de factores de virulencia y así poder relacionarlos con la actividad AI-2. Por ejemplo, en un estudio realizado por Elvers y Simon (2002), demostraron que la señalización AI-2 en *C. jejuni* es dependiente de *luxS* y que su producción máxima fue a las 18 h de incubación. Ellos compararon la capacidad de crecimiento de campylobacterias normales contra mutantes *luxS*<sup>-</sup>, en donde

encontraron que el crecimiento no era dependiente de este gen sin embargo, demostraron que la movilidad de *C. jejuni* sí está regulada por AI-2, ya que cepas mutantes *luxS* mostraron una disminución en la movilidad en medio semisólido.

Se ha relacionado a los genes *flaA* y *flaB* con la producción de flagelina y por lo tanto están involucrados tanto en la movilidad como en adherencia y la colonización (Guerry *et al.* 1990). Según Byeonghwa *et al.*, (2003), al comparar la capacidad de movilidad de cepas mutantes *luxS*<sup>-</sup> contra cepas nativas de *Campylobacter*, se observó una disminución de movilidad hasta en un 45% en las cepas mutantes comparada con las cepas nativas. Al realizar el análisis de expresión genética, se evidenció que la expresión de *flaA* se disminuyó hasta en un 43% en mutantes *luxS* comparadas con las cepas nativas.

#### **5.4 Biopelículas**

La formación de biopelículas va de la mano con la patogenicidad (Ren *et al.*, 2005). Las biopelículas bacterianas son comunidades adheridas a una superficie con una alta densidad de células (Donlan, 2002) que se encuentran presentes en diferentes ambientes y son de gran preocupación para la industria alimentaria y para la salud pública (Gilbert *et al.*, 2003). La ocurrencia de biopelículas en la industria no solo es un problema de higiene sino que puede conllevar a pérdidas económicas fuertes ya que, por encontrarse en una matriz de polisacáridos, las bacterias se encuentran protegidas a la acción de antibióticos (Hu *et al.*, 2006) y desinfectantes (Gilbert *et al.*, 2003). Debido a que las biopelículas son de vital importancia en la industria alimentaria y en el ámbito clínico, se necesitan urgentemente métodos para su control y su remoción (Yoon and Sofos 2008).

Algunas teorías sugieren que la transición a un estado de biopelícula es dependiente del contenido nutricional del medio. En tanto que hay algunos trabajos que sugieren que la formación de biopelículas se desarrolla en múltiples pasos (Costerton *et al.*, 1995). En ambientes naturales, las bacterias son expuestas a estreses ambientales incluyendo falta de nutrientes, cambios osmóticos, variaciones de temperatura y tensiones de oxígeno y se ha determinado mediante algunos estudios, que esto favorece la formación de biopelículas (Donlan, 2002).



Se ha demostrado que el flagelo y el pili juegan un papel importante en las primeras fases de formación de biopelículas (Bendinger *et al.*, 1993). Un estudio realizado por Reeser *et al.*, (2007) demostró que cepas mutantes para la expresión del flagelo, tenían una capacidad disminuida de adherencia a superficies así como la formación de biopelículas.

Existen múltiples estudios que han demostrado la adherencia y formación de biopelículas bacterianas en diferentes superficies tales como vidrio, acero inoxidable, poliestireno y PVC entre otras (Yoon and Sofos 2008., Reeser *et al.*, 2007). A este respecto, se ha reportado la formación de biopelículas por algunas enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella spp.* en diferentes superficies tales como: plástico, metal, vidrio y superficies rugosas (Austin *et al.*, 1998). Además se ha demostrado que las fimbrias y la celulosa producida por ciertas cepas de *Salmonella* tienen un efecto significativo en favorecer la formación de biopelículas (Jain y Chen, 2007). La identificación de los factores ambientales que afectan la iniciación de la formación de las biopelículas es de suma importancia para el estudio del comportamiento de los microorganismos cuando se encuentran fuera del hospedero (Reeser *et al.*, 2007).

En el caso de *E. coli* 0157:H7 algunos estudios han demostrado que ciertas cepas son capaces de producir un tipo de estructuras tipo fimbrias compuestas principalmente por proteínas con un peso molecular de 15kDa, las cuales participan en la capacidad de adherencia sobre superficies de poliestireno y acero inoxidable de esta bacteria. La formación de biopelículas por este tipo de cepas, podría provocar que las cepas fueran muy resistentes a saneadores comúnmente utilizados en industria alimentaria haciendo de esta manera muy difícil su remoción (Ryu *et al.*, 2004).

Reeser *et al.*, 2007 demostraron la capacidad de *C. jejuni* para formar biopelículas en superficies abióticas tales como plástico y PVC. Así mismo se demostró el importante papel que juega el flagelo en la formación de biopelículas de esta bacteria, ya que experimentos con cepas de *C. jejuni flaA-B* mutantes, mostraron una disminución significativa para formar biopelículas a las 48-72 h, así como en la adherencia a diferentes superficies al compararse con cepas nativas. La influencia del QS mediado por AI-2 en la formación de biopelículas quedó demostrada también en este estudio, ya que cepas de *Campylobacter* mutantes en *luxS* mostraron una

disminución en la capacidad para formar biopelículas que pudo ser restaurada cuando se incubaron con sobrenadantes de cepas nativas conteniendo AI-2.

Debido a la importancia de la formación de biopelículas y su posible relación con el QS, diversos estudios se han desarrollado para demostrar esta correlación, por ello la influencia de AI-2 en la formación de biopelículas, ha sido demostrada en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Listeria monocytogenes* entre otras (Yoon and Sofos 2008).

### **5.5. Actividad de plantas sobre enteropatógenos y AI-2.**

En nuestro país, la Secretaría de Salud ha demostrado que uno de los principales problemas de salud que atañen a la población son las enfermedades gastrointestinales, las cuales son debidas principalmente al consumo de agua y alimentos contaminados con microorganismos patógenos. Una de las alternativas actuales para la conservación de los alimentos o el control de la proliferación de microorganismos patógenos o deteriorantes, es el uso de antimicrobianos naturales, los cuales van acordes con la tendencia mundial de volver a lo natural, así como la necesidad de encontrar nuevas alternativas a las cuales los microorganismos no hayan establecido mecanismos de resistencia (McDevitt *et al.*, 2002).

Se han reportado datos importantes sobre el efecto antimicrobiano de diferentes compuestos. Entre ellos mencionaremos el realizado por Vanhoof *et al.*, (1980) quienes probaron el efecto bacteriostático y bactericida de 24 agentes antimicrobianos (penicilina G, ampicilina, amoxicilina, entre otros) contra *C. jejuni* aislada de heces humanas. En ese mismo trabajo se encontró un alto grado de resistencia (23%) a estos antimicrobianos y la eritromicina fue la que presentó menor resistencia contra estos microorganismos. Con este y otros antecedentes se puso de manifiesto la gran necesidad actual de contar con alternativas para el control de estos microorganismos.

Paulo *et al.* en 1994, demostraron la actividad antimicrobiana del extracto alcohólico de *Cryptolepis sanguinolenta* (una planta utilizada en la medicina tradicional del este de África), contra *Campylobacter* spp. y *V. cholerae*. Un año después Tassou *et al.*, (1995) reportaron el efecto antimicrobiano del aceite de menta

(*Menta piperita*) contra *S. enteritidis* y *L. monocytogenes*. Así mismo Jones *et al.*, (1997) reportaron que la capsaicina, compuesto extraído del chile, tenía un efecto inhibitorio contra *Helicobacter pylori* así como contra *Candida albicans*.

Así mismo se comprobó la susceptibilidad de algunas bacterias como *Pseudomonas spp.* al extracto crudo de *Myrtus communis*, planta tradicional Iraní (Manssouri *et al.*, 2001). Por otro lado, Lambert *et al.*, (2001), reportaron la acción bactericida del aceite esencial de orégano contra *P. aeruginosa* y *S. aureus* encontrando que la primera fue más susceptible.

Ziwei y Gauri (2003) probaron los efectos de algunos extractos de plantas contra microorganismos que pueden contaminar a la sidra de manzana, entre ellos *E. coli* O157:H7. Encontraron que el clavo y la menta disminuían la cantidad de estos microorganismos hasta en 2 y 3 logaritmos. Notaron además una disminución de hasta 6 logaritmos, cuando la sidra era sometida a un tratamiento previo de 45°C. Se concluyó, de acuerdo a los resultados, que el clavo fue el que poseía el mayor efecto antimicrobiano y cuando se sometía la muestra a un tratamiento previo se incrementaba la actividad antimicrobiana de todos los extractos.

Smith-Palmer *et al.*, (1998), reportaron la actividad antibacteriana de aceites esenciales de canela, clavo y tomillo contra *Campylobacter spp.*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*, siendo *Campylobacter* el más resistente. Se encontró también que el clavo y tomillo fueron los aceites que ofrecieron mayor inhibición teniendo una concentración bacteriostática al 0.075% contra todas las bacterias mencionadas.

Por su parte, Dadalioglu y Akademir (2004) evaluaron los efectos bactericidas de los aceites esenciales del orégano, laurel y lavanda sobre *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *S. aureus*; los estudios revelaron que el orégano presentó una fuerte actividad antimicrobiana en concentraciones de 5µl/ml para *Salmonella*, 80µl/ml para *Listeria*, y 80µl/ml para *E. coli*. En esta mismo estudio, se determinó por cromatografía de gases, que los componentes principales de estos aceites eran carvacrol (68.23%), cinolona (60.72%), fenconona (55.79%), y trans-anetola (85.63%).

Con respecto a los compuestos antimicrobianos de plantas, Fernández *et al.*, (1972), demostraron que la fabitina (un péptido aislado del frijol que es muy semejante a la tionina) inhibió el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Enterococcus hirae*. Posteriormente, algunos experimentos mostraron que los extractos de *Prosopis juliflora*, poseían actividad inhibitoria contra de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y *Bacillus* (Aqeel *et al.*, 1989).

En el año de 2002, Nagayama *et al.*, examinaron la actividad bactericida de algunos compuestos (fluorotaninos) extraídos de algas cafés en contra de *Staphylococcus* meticilina-resistente, *S. pyogenes* y algunas otras bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales. Estos compuestos se compararon con el efecto producido por las catequinas, donde se determinó que los fluorotaninos presentaron mayor efectividad que las catequinas, siendo *Campylobacter* spp. la más sensible, inhibiendo el crecimiento a concentraciones de 0.003  $\mu\text{mol/ml}$ , mientras que las otras bacterias, aunque también presentaron susceptibilidad, lo hicieron a concentraciones mayores. Estos estudios se suman a los resultados reportados por Tsuchya *et al.*, (1996), en donde se encontró actividad antimicrobiana de flavonoides contra *S. aureus* meticilina-resistente.

Fitzgerald *et al.*, (2004) comprobaron que la vainillina (compuesto fenólico de la vainilla) posee actividad inhibitoria contra el crecimiento de *E. coli*, *Lactobacillus plantarum* y *Listeria innocua*.

Por su parte, Dadalioglu y Akademir (2004) evaluaron los efectos bactericidas de los aceites esenciales del orégano, laurel y lavanda sobre *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *S. aureus*; los estudios revelaron que el orégano presentó una fuerte actividad antimicrobiana en concentraciones de 5 $\mu\text{l/ml}$  para *Salmonella*, 80 $\mu\text{l/ml}$  para *Listeria*, y 80 $\mu\text{l/ml}$  para *E. coli*. En esta mismo estudio, se determinó por cromatografía de gases, que los componentes principales de estos aceites eran carvacrol (68.23%), cinolona (60.72%), fencona (55.79%), y trans-anetola (85.63%).

Kisko y Roller (2005) evaluaron la capacidad antimicrobiana de los compuestos puros carvacrol y *p*-cymeno (tanto en forma individual como combinados) a muy

bajas concentraciones (0.25-1.25mM) adicionándolos a jugos frescos de manzana (no pasteurizados) para medir su efecto sobre *E. coli* O157:H7 y así poder contar con una alternativa natural para eliminar a este patógeno sin que el jugo fuera sometido al proceso normal de pasteurización. Se encontró que la combinación de ambos compuestos redujo significativamente la carga microbiana e inhibió al patógeno mencionado, y con ello aumentó la vida de anaquel del producto.

Tomando en consideración estos antecedentes, se ha evidenciado la necesidad de nuevos blancos de control microbiano, y en donde las plantas pueden jugar un papel crucial. Sin embargo, también se puso de manifiesto, que no siempre es necesario buscar compuestos capaces de afectar el crecimiento microbiano, sino una cuestión más importante era que afectara algunas funciones fisiológicas que provocaran como consecuencia una alteración en la capacidad patogénica de microorganismo, sin necesariamente afectar su crecimiento (Clatworthy *et al.*, 2007). Uno de esos blancos potenciales es el QS, por su relación directa con el desencadenamiento en la expresión de genes de virulencia. Por ello, se han realizado estudios para evaluar el efecto de extractos de plantas o compuestos naturales sobre la señalización AI-2 y la correlación tanto en la formación de biopelículas, como en la movilidad y la expresión de algunos genes de virulencia.

Un ejemplo de ello es la investigación realizada por Persson *et al.*, (2005) en donde encontraron que compuestos sulfonados extraídos del ajo mostraron actividad inhibitoria contra el QS AI-2 en *P. aeruginosa*, y aunque no presentaron actividad antimicrobiana, disminuyeron la expresión de las proteínas *LasR* y *LuxR* implicadas en el QS.

En el año de 2006, Hu *et al.*, aislaron por medio de procedimientos químicos naturales, 2-5 urseno-triterpenos de *Diospyros dendo* (planta originaria de Angola). Ellos demostraron una potente actividad de este compuesto para inhibir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*.

En un estudio realizado por Garo *et al.*, (2007) se probaron diferentes concentraciones de ácido asiático y corosólico (productos derivados de las planta asiáticas del género *Lagerstroemia sp.* para inhibir la formación de biopelículas en *P.*

*aeruginosa*. Ellos encontraron que no hubo disminución en la formación de biopelículas pero sí aumento en la susceptibilidad a ciertos antibióticos como tobramicina.

Widmer *et al.*, (2007) demostraron que los ácidos grasos derivados de pollo, inhibían la señalización QS AI-2 en *E. coli*. Ensayos con cromatografía de gases evidenció que los ácidos grasos que poseían actividad antimicrobiana fueron ac. linoléico, oléico, palmítico y esteárico.

Girenavar *et al.*, (2008) demostraron que el jugo de uva y sus compuestos bioactivos (furocumarinas) inhibieron la señalización-2 (AI-2) y la formación de biopelículas de *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 y *P. aeruginosa*.

En ese mismo año, Joost *et al.*, (2008) investigaron la influencia de borato-furanonas sobre la formación de biopelículas en *S. Typhimurium*. Ellos encontraron que estos compuestos inhibieron la formación de biopelículas, mas no así el crecimiento microbiano. Al realizar las pruebas de expresión genética se evidenciaron que estos compuestos interfirieron con la síntesis del flagelo más sin embargo, no se encontró evidencia de interferir con la señalización AI-2.

Adicionalmente se comprobó que la oroidina y sus análogos (alcaloides marinos naturales) presentaron actividad anti-biopelículas contra *Acinetobacter* spp. microorganismo que ha repuntado en últimos años, causando enfermedades nosocomiales (Richards *et al.*, 2009).

Lee *et al.*, (2009) demostraron las propiedades antimicrobianas del galato de epigallocatequina (EGCG), un compuesto natural abundante en el té verde, sobre *E. coli* O157:H7. En este estudio se demostró que tanto la movilidad como la formación de biopelículas de esta bacteria se vieron afectadas significativamente al agregar diferentes concentraciones de EGCG. También se comprobó una disminución de AI-2 y capacidad infectiva cuando la bacteria se incubaba con concentraciones subinhibitorias de EGCG.

Khan *et al.*, (2009) estudiaron la actividad de aceites esenciales y su influencia

sobre el QS AI-2 en *P. aeruginosa*. Ellos encontraron que los aceites esenciales del clavo, la canela, lavanda y la menta tuvieron un efecto inhibitorio sobre la actividad AI-2, además de disminuir la movilidad por swarming.

A partir de estos estudios se dejaron entrever algunas sustancias naturales que son antagonistas del QS y de ahí surgieron investigaciones para elucidar el mecanismo de acción de las mismas y estudios para determinar su estructura molecular (Galloway *et al.*, 2012). Compuestos como las furanonas brominadas extraídas de algas, flavonoides extraídos de cítricos, y el EGCG extraído de té verde, son solo unos cuantos considerados con actividad anti-QS.

A pesar de la diversidad de estudios realizados, muy pocos están dirigidos hacia *C. jejuni* y debido los antecedentes aquí expuestos y quedando claro que el QS constituye un blanco novel para combatir microorganismos, las investigaciones sobre drogas y nuevas estrategias deben ir dirigidas a productos que conformen una nueva generación de agentes antimicrobianos más naturales y con menores efectos secundarios (Hentzer y Givskov, 2003; Galloway *et al.*, 2012). Los compuestos naturales pueden ser una alternativa real para atacar este tipo comunicación célula-célula, por lo que es de vital importancia continuar sumando esfuerzos en este tipo de investigaciones.

## 6. MÉTODOS.

### **6.1. Cepas microbianas y condiciones de cultivo.**

Se utilizaron las cepas: *Campylobacter jejuni* NADC 5653 donada por la Dra. Irene Wesley, Iowa E.U.A., *C. jejuni* ATCC 70019 (NCTC 11168) adquirida del ATCC culture collection (Manassas, VA.), *C. jejuni* 238ip y 180ip ambas donadas por el Dr. Guillermo Ruiz-Palacios del Instituto Raúl Zubirán (México, DF). Las cepas se encontraron como cultivos de reserva a -80°C y fueron activadas en caldo Mueller Hinton adicionado con 0.6% de extracto de levadura a 42°C/48h, para posteriormente cultivarse en placas de agar Muller Hinton con 5% de sangre hemolizada a 42°C/48h en una atmósfera microaerofílica (10% CO<sub>2</sub>). Una vez estando los cultivos crecidos, se tomaron algunas colonias y se colocaron en tubos con solución salina (0.85% p/v), y fueron ajustados a una OD<sub>600</sub> de 0.5 (5-7 x 10<sup>8</sup> UFC/ml) para los ensayos preliminares de actividad antimicrobiana y para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB). Para el ensayo de actividad AI-2 las cepas se activaron en caldo Muller Hinton a 42°C/24h en condiciones microaerofílicas (Byeonghwa *et al.*, 2005).

En este estudio también se utilizaron las cepas de *Vibrio harveyi* cepa reportera BB170 (sensor AI-1<sup>-</sup> AI-2<sup>+</sup>) y *V. harveyi* BB152 (productor AI-2<sup>+</sup>) obtenidas del ATCC culture collection, las cuales fueron mantenidas como cultivos de reserva a -80°C, y fueron cultivadas en medio AB (“autoinducer assay”) a 30°C/ 16h (Orla *et al.*, 2002).

### **6.2 Obtención de los extractos.**

En este trabajo se utilizaron las cáscaras y bagazos de 6 cítricos *Citrus x medica* (cidra), *Citrus x aurantium* (naranja agria), *Citrus x limon* (limón), *Citrus x paradisi* (toronja), *Citrus x aurantifolia* (lima), *Citrus x tangerina* (mandarina). Se pesaron 20g de las cáscaras secas y se trituraron en una licuadora (Osterizer mod. Classic), después se agregaron 100 ml de etanol al 96% como solvente de extracción. Se dejó macerando por 48h a temperatura ambiente, se filtraron utilizando papel Whatman #1 y se dejaron secar en platos de vidrio a temperatura ambiente hasta sequedad; una vez evaporado totalmente el solvente, los extractos fueron resuspendidos en 10 ml de agua miliQ estéril (García *et al.*, 2005).



### **6.3 Compuestos naturales comerciales.**

Los compuestos naturales comerciales utilizados en este trabajo fueron: 2(5H) furanona (Sigma Aldrich), galato de epigallocatequina (EGCG) Sigma Aldrich, citrol ® K Ultra (Corpo Citrik México, SA de CV).

### **6.4 Ensayos preliminares de Susceptibilidad Antimicrobiana.**

Para evaluar en forma preliminar el efecto antimicrobiano de los extractos de cítricos obtenidos, se utilizó el método de difusión del pozo en agar (Alarcón, 2002; García *et al.*, 2005). El cual consistió en inocular 100 µl de la cepa de *Campylobacter* activada y ajustada, sobre placas Petri con agar Mueller Hinton adicionado con 5% de sangre hemolizada. Después de sembrar por extensión con un asa de Driglasky, se realizaron pozos en el agar, utilizando un tubo Durham invertido (5 mm de diámetro). En cada pozo se agregaron 100 µl de los extractos o compuestos naturales comerciales a probar; como controles se adicionó etanol o agua miliQ estéril. Las placas se incubaron a 42°C por 48 h en condiciones de microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>). El efecto del extracto se determinó mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo. De todos los extractos y compuestos naturales comerciales probados se seleccionaron aquellos que presentaron dicha inhibición, para realizar los ensayos posteriores.

### **6.5 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).**

Para determinar la CMB se utilizó el método propuesto por Valtierra *et al.*, (2009) en el cual se utilizaron microplacas estériles de 96 pozos a las cuales se les adicionaron 150µl de 2X caldo MH (Muller Hinton) a los cuales se les agregaron 150µl de los extractos o compuestos naturales comerciales con actividad biológica, para posteriormente realizar diluciones seriadas. Posteriormente se le agregó a cada pozo 1.5 µl del cultivo activado y ajustado a una concentración aproximada de  $5-7 \times 10^8$  células/ml (OD<sub>600</sub> 0.5). Las microplacas se incubaron a 42°C/48h en condiciones de microaerofilia. Trascurrido este tiempo, se tomaron 20 µl de cada pozo y se realizó una siembra por goteo en placas de agar Muller Hinton (con 5% de sangre hemolizada) según el método mencionado por Lee *et al* (2009). Las placas se incubaron a las mismas condiciones arriba mencionadas. Pasado el tiempo de

incubación se determinó la CMB la cual se definió como la concentración más baja del extracto que inhibió completamente el crecimiento microbiano.

#### ***6.6 Determinación del efecto de concentraciones subinhibitorias sobre el crecimiento de *C. jejuni*.***

Para determinar el efecto de concentraciones subinhibitorias de cada extracto sobre el crecimiento microbiano se utilizaron concentraciones que correspondían al 25, 50 y 75% de la CMB. Dichas concentraciones se sembraron en tubos con Mueller Hinton adicionado con 0.6% de extracto de levadura. Una vez sembrado el cultivo bacteriano con las concentraciones subinhibitorias de los extractos, se incubaron por 48h a 42°C en microaerofilia. Para el conteo microbiano se tomó una alícuota de 200µl y se realizaron diluciones decimales seriadas con solución salina fisiológica estéril (0.85% NaCl) (Ravishankar *et al.*, 2008); luego de cada dilución se tomó una alícuota y se sembró por extensión en placas de agar Muller Hinton suplementado con 5% de sangre hemolizada. Las placas se incubaron a 42°C por 48h en microaerofilia. Pasado el tiempo de incubación se determinaron las unidades formadoras de colonias. Como controles de crecimiento se utilizaron las cepas que no tuvieron contacto con el extracto y agua miliQ esteril en vez del extracto.

#### ***6.7 Condiciones de cultivo para la obtención de sobrenadantes para ensayos de bioluminiscencia.***

Los sobrenadantes se prepararon de acuerdo al método mencionado por Surette y Bassler (1998) con algunas modificaciones. Se tomaron 50µl de los cultivos previamente activados de *C. jejuni* NADC 5653, NCTC 11168, 180ip, 238ip y se adicionaron a tubos conteniendo 5ml de medio Brucella (Difco). Se incubaron durante 42°C/40h en condiciones microaerofílicas (Orla *et al* 2002). Pasado este tiempo, se obtuvo el sobrenadante centrifugando la muestra a 15000 rpm/5min. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron a través de un poro de 0.2µm en membranas de nitrocelulosa (Millipore) y fueron congelados a -20°C. Estos se utilizaron posteriormente para analizar la presencia de AI-2; (Lu *et al* 2004). Para *V. harveyi* BB152, se procedió de la misma forma, sin embargo en este caso, se cultivó en medio AB a 30°C.

### **6.8 Ensayo de Bioluminiscencia para detectar AI-2.**

Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos *C. jejuni* y *V. harveyi* BB152 se analizaron para comprobar la presencia de moléculas AI-2 capaces de inducir luminiscencia en *V. harveyi* BB170, de acuerdo al método mencionado por Surette y Bassler (1998). En este ensayo, 10µl de los sobrenadantes de *Campylobacter* obtenidos, fueron adicionados en placas de microtitulación de 96 pozos. La cepa reportera de *V. harveyi* BB170, fue cultivada por 16 h a 30°C en medio AB, bajo condiciones de aeración (100 rpm), al término de lo cual fue diluida 1:5000 en medio fresco AB. Se tomaron 90µl de ésta solución y se adicionaron a pozos de una placa de microtitulación de 96 pozos previamente inoculada con los sobrenadantes obtenidos. El control positivo fue aquel que contenía sobrenadantes de *V. harveyi* BB152 mientras que como control negativo se adicionaron 10µl del medio de cultivo (AB). Los valores de luminiscencia se midieron en un luminómetro (Víctor X2, Perkin Elmer, Walthman, MA). Cada experimento se hizo por triplicado.

### **6.9. Ensayo para determinar la actividad de extractos de cítricos y compuestos naturales comerciales sobre la actividad de AI-2.**

Para determinar la influencia de los extractos de cítricos y compuestos naturales sobre la actividad AI-2 se procedió según la técnica de Girenavar *et al* (2008). Una vez que los sobrenadantes fueron obtenidos como se mencionó en el punto 6.7 y después que se comprobó la presencia de actividad AI-2, se procedió a realizar el ensayo de bioluminiscencia con sobrenadantes mezclados con los extractos de cítricos o los compuestos comerciales. Para esto, 3.5µl del sobrenadante a probar se mezcló con 1.5 µl del extracto o compuesto comercial y 5 µl de medio AB (obteniendo una concentración final de extracto del 75% de la CMB). Esto fue agregado a la placa de 96 pozos conteniendo 90 µl de cultivo de *V. harveyi* BB170. Las lecturas se tomaron como se especificó en el punto 6.8. El crecimiento de *V. harveyi* BB170 fue monitoreado durante el desarrollo del ensayo para asegurar la supervivencia del mismo.

#### **6.10. Ensayo para la determinación de Biopelículas.**

Se utilizó la Técnica de Reeser *et al.*, 2007 y Mortero *et al.*, 2003 con algunas modificaciones. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 180µl de caldo Brucella conteniendo *C. jejuni* al 1% v/v. Se agregaron volúmenes de los extractos de cítricos a diferentes concentraciones para llegar a un volumen final de 200µl y finalmente las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia a 42°C por 48 y 72h. Para cuantificar la biopelícula formada, la suspensión celular fue removida y las placas se lavaron tres veces con agua miliQ estéril. La biopelícula se tiñó con 0.1% de safranina por 20 min. Pasado este tiempo, se retiró el colorante y se lavó tres veces con agua miliQ estéril, para remover el exceso del mismo. Se dejó secar alrededor de media hora, para posteriormente agregar 200µl de etanol al 95% y realizar las lecturas en un lector de microplacas a una O.D de 496 nm.

#### **6.11. Ensayo de movilidad.**

Para este ensayo se utilizó el medio agar semisólido MH, el cual contiene solo 0.3% de agar (MHB). Los cultivos de *C. jejuni* se sembraron (al 1% v/v en MHB y se incubaron por 48h en microaerofilia a 42°C (Elvers y Simmon, 2002). Pasado este tiempo se tomó una alícuota de 5 µl y se inoculó en el centro de cada placa conteniendo el agar semisólido y se incubó por 48 h en condiciones de microaerofilia; al término de lo cual se midieron los halos de migración (Lee *et al* 2009). Para determinar el efecto de los extractos sobre la movilidad, se adicionaron al agar cantidades subinhibitorias de los extractos, para luego proceder como ya se mencionó.

#### **6.12. Ensayo para determinar la adhesión e invasión de *Campylobacter* a la línea celular HeLa.**

El método que se utilizó fue el mencionado por Elvers y Simon (2002) y Boyle *et al.*, (2007) con algunas modificaciones. Se utilizaron monocapas de la línea celular HeLa (cáncer cervicouterino) donadas por la Dra. Rocío Ortiz de la Facultad de Medicina de la UANL, las cuales fueron cultivadas en medio D-MEM (Invitrogen) suplementado con 3% de suero fetal bovino (Invitrogen), 1% L-glutamina (Invitrogen) y se incubaron en frascos F25 (Costar) en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C hasta alcanzar confluencia. La monocapa fue disgregada por tripsinización (tripsina 0.25mM, Invitrogen). La suspensión celular se ajustó a una concentración de 10<sup>3</sup>

cel/ml aproximadamente; de esta suspensión se tomaron 400µl que fueron agregados a placas de 24 pozos para microtitulación. Las células se incubaron por 48-72 h con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, para permitir la adherencia y confluencia de las mismas antes de agregar las células bacterianas. Posterior a esto, se agregó una concentración aproximada de 10<sup>7-8</sup> células bacterianas (multiplicidad de infección de 10:1) previamente incubadas con extractos de plantas a concentración del 75% de la CMB. Después de esto, las placas de 24 pozos, se incubaron en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 3h para permitir su adherencia, al término de lo cual los pozos se lavaron dos veces con PBS (0.1M, pH 7.4) para remover las bacterias no adheridas. Las bacterias adheridas se recuperaron por la adición de desoxicolato 0.5%, y se realizaron diluciones seriadas (solución salina 0.85%) para contar las bacterias adheridas en placas de MHS. Para el caso de la determinación de la invasión bacteriana a las células HeLa, se procedió del mismo modo arriba mencionado, sin embargo, después de lavar con PBS, se adicionó gentamicina (Sigma, Aldrich) a una concentración de 150µg/ml disuelta en D-MEM a fin de matar a las bacterias extracelulares, dejando de esta manera viables solo las bacterias internalizadas en la línea celular. Después de incubar durante una hora, las células HeLa fueron lavadas dos veces y se les agregó desoxicolato de sodio al 0.5% y finalmente se procedió al conteo en placa como ya se mencionó arriba.

### ***6.13. Ensayo para determinar la influencia de extractos de cítricos en la expresión de algunos genes de virulencia.***

La influencia de los extractos de cítricos sobre la expresión de algunos genes de virulencia se realizó de acuerdo al método reportado por Soni *et al* (2008) y Preeti *et al.*, 2009). De las cepas activadas de *Campylobacter* se tomó una alícuota (1% v/v) y se colocó en 5 ml de medio fresco de MH con o sin extractos de cítricos (a concentraciones subletales), se dejó crecer hasta alcanzar una O.D<sub>600</sub> de 0.5, al término de lo cual las células fueron centrifugadas (3500 x g a 4°C) y finalmente se les retiró el sobrenadante. A las células bacterianas, se les hizo una extracción de RNA (Trizol-Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido, se trató dos veces con DNasa a 37°C/30 min para remover el DNA genómico (Preeti *et al.*, 2009) y fue guardado a -80°C hasta su uso.

Para determinar la expresión de los genes se realizó una PCR transcriptasa reversa en tiempo real cuantitativo. Tomando como base el RNA extraído, se realizó la prueba utilizando un sistema de un solo paso qRT-PCR (BioRad), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El análisis del RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando un termociclador IQ5 minicycler (BioRad), con las siguientes condiciones: 10min a 50°C, (1x), 95°C a 5min (1x) más 30 ciclos de tres pasos: 95°C/30s, 50/1min, 72°C/30s. Para determinar los valores de expresión ( $C_t$ ) se utilizó el software Prism SDS. Se utilizó un método comparativo con el gen *gly A* para normalizar los valores (Preeti *et al.*, 2009), según la guía de aplicación del PCR tiempo real de la Compañía BioRad, con la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio (test/calibrator)} = 2^{-\Delta CT} \quad \text{where } \Delta CT = CT_{(\text{calibrator})} - CT_{(\text{test})}.$$

Se analizó la expresión del gen de la proteína flagelar *flaA* y *flaB* (*flaA-B*) involucrada en movilidad y formación de biopelículas en *C. jejuni*, así como la expresión de *cadF* y *ciaB* involucrados en adhesión e invasión tomando como referencia el gen *glyA* con los siguientes primers: (Byeonghwa *et al.*, 2003; Byeonghwa *et al.*, 2005)

*flaAB-F* 5'ATATACTTGACATTTTATAACAGTGGCTTG-3'

*flaAB-R* 5'GAGTTAATTCTAAGACCTGAACTAAGTC-3'

*ciaB-R* 5' TGC GAG ATT TTT CGA GAA TG 3'

*ciaB-F* 5' TGCCCGCCTTAGAACTTACA 3'

*cadF* 'F 5' TTGAAGGTAATTTAGATATG 3'

*cadF* R 5' CTAATACCTAAAGTTGAAAC 3'

*glyA* F 5' CGATGGAACGGATAATCACC 3'

*glyA* R5' ATACCTGCATTTCCAAGAGC 3'

#### **6.14. Análisis Estadístico.**

Para realizar los análisis estadísticos, se realizó una comparación múltiple de medias utilizando el programa Statistical Package for the Social Science (SPSS), versión 14.

## 7. RESULTADOS

### ***7.1. Ensayos preliminares de Susceptibilidad Antimicrobiana.***

Se obtuvieron los extractos de cáscara y bagazo de varios cítricos tales como la mandarina, naranja agria, lima, limón, cidra y toronja. Al realizarse la prueba de pozo para cada uno de los extractos de cítricos, destacó la actividad antimicrobiana de la cáscara de limón, de cidra y de naranja agria obteniendo halos de inhibición en un rango de 1.8 a 2.4 cm (Tabla I) por lo que se seleccionaron estos extractos para los ensayos posteriores.

Al analizar la actividad antimicrobiana de los compuestos de furanona, galato de epigallocatequina (EGCG), y citrol® K ultra se pudo observar igual o mayor actividad antimicrobiana que el extracto de limón (rangos de 2.1 a 4.6 cm), siendo la furanona el compuesto más activo en estos ensayos (Tabla II).

### ***7.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).***

Después de comprobar el efecto bactericida de los extractos de cáscara de limón, naranja agria y cidra, además de los compuestos naturales comerciales, se procedió a determinar la CMB de los mismos. Al obtener los valores de CMB observamos que para el caso de los extractos, el limón tuvo una mejor actividad antimicrobiana, seguida de la cidra y posteriormente la naranja con valores fluctuando de 1.3 – 3.25 mg/ml (Tabla II). Cuando se determinaron las CMBs de furanona, galato de epigallocatequina (EGCG), y citrol® K ultra pudimos apreciar que las concentraciones de CMB para estos compuestos resultaron mucho menores que las de los extractos crudos, fluctuando en rangos de 0.3 a 310 µg/ml siendo el citrol® K ultra el que mejor actividad antimicrobiana presentó seguido del EGCG y finalmente la furanona (Tabla II).

Tabla I. Pruebas preliminares de actividad antimicrobiana de varios extractos de cítricos. Como control se utilizó el citrol® K ultra. Las zonas de inhibición están dadas en centímetros.

Nombre común	Parte utilizada	Nombre científico	Zona de inhibición en cm para cada cepa de <i>Campylobacter</i>			
			NCTC 11168	5653	238ip	180ip
Cidra	Cáscara	<i>Citrus medica</i>	1.9±0.1	1.8±0.1	2.2±0.1	2.1± 0.2
Naranja agria	Cáscara, semilla, bagazo	<i>Citrus x aurantium</i>	2.1±0.1	2.0 ±0.1	2.2±0.2	2.3±0.2
Limón	Cáscara, semilla, bagazo	<i>Citrus x limon</i> L.	2.4±0.1	2.4±0.2	2.3±0.2	2.4±0.1
Toronja	Cáscara, semilla, bagazo	<i>Citrus x paradisi</i>	NI	NI	0.8±0.01	NI
Lima	Cáscara	<i>Citrus x aurantifolia</i>	NI	NI	NI	NI
Mandarina	Cáscara	<i>Citrus x tangerina</i>	NI	NI	NI	NI
citrol® K ultra			2.8±0.2	2.7±0.2	3.0±0.4	2.9±0.3



Tabla II. Inhibición y concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos de cítricos seleccionados y los compuestos naturales comerciales sobre cuatro especies de *C. jejuni*.

Extracto o compuesto utilizado	<i>Campylobacter jejuni</i>							
	NCTC 11168		NADC 5653		238ip		180ip	
	Zona de Inhibición (cm)	CMB (mg/ml)	Zona de Inhibición (cm)	CMB (mg/ml)	Zona de Inhibición (cm)	CMB (mg/ml)	Zona de Inhibición (cm)	CMB(mg/ml)
Limón	2.4±0.1	2.25±0.2	2.4±0.2	2.25±0.2	2.3±0.2	1.3±0.2	2.4±0.1	2.1±0.2
Cidra	1.9±0.1	2.5±0.4	1.8±0.1	2.3±0.4	2.2±0.1	1.5±0.4	2.1± 0.2	2.5±0.4
Naranja Agria	2.1±0.1	3.25±0.2	2.0 ±0.1	3.25±0.2	2.2±0.2	2.75±0.28	2.3±0.2	3.15±0.4
	NCTC 11168		NADC 5653		238ip		180ip	
	Zona de Inhibición (cm)	CMB (µg/ml)	Zona de Inhibición (cm)	CMB (µg/ml)	Zona de Inhibición (cm)	CMB (µg/ml)	Zona de Inhibición (cm)	CMB(µg/ml)
	EGCG	2.1±0.15	87±0.08	2.25±0.2	125±0.1	2.37±0.15	31±0.2	2.3±0.14
2 (5H) Furanona	4.6±0.44	230±0.08	4.6±0.53	310±0.01	4.5±0.57	150±0.01	4.5±0.52	270±0.06
Citrol® K ultra	2.8±0.21	0.35±0.0008	2.7±.189	0.3±0.0008	2.8±0.05	0.3±0.0005	2.9±0.082	0.3±0.0001

### **7.3 Efecto de concentraciones subinhibitorias sobre el crecimiento de *C. jejuni*.**

Las concentraciones subinhibitorias (25, 50 75% de la CMB) de los extractos de cítricos aplicados a los cultivos de las diferentes cepas de *C. jejuni*, no disminuyeron significativamente la población de las mismas ( $P \geq 0.05$ ), ya que durante los tratamientos con diferentes concentraciones de los extractos, la población bacteriana se mantuvo siempre en los mismos logaritmos que los controles, ( $1 \times 10^{7-8}$  UFC/ml, Fig. 1). Esto nos permitió realizar los ensayos posteriores utilizando concentraciones más bajas de la CMB teniendo la certeza de que no provocarían una disminución en la población bacteriana. Para algunos ensayos se utilizaron las tres concentraciones, para otros solo la del 75%, concentración ya que fue la que mostró mayor efectividad en los ensayos de movilidad y formación de biopelícula.

### **7.4. Efecto de los extractos de cítricos y compuestos naturales comerciales sobre la actividad de AI-2.**

Al agregar los sobrenadantes no tratados de *C. jejuni* al cultivo de *V. harveyi* BB170, se detectó bioluminiscencia a niveles muy semejantes a los que presentó el control utilizado (*V. harveyi* BB152 productor de moléculas AI-2). Esto nos indicó la presencia de moléculas AI-2 en los sobrenadantes de *C. jejuni* los cuales al ser mezclados con los extractos y/o compuestos naturales comerciales, provocaron un decremento significativo en la emisión de bioluminiscencia comparados con el control y los sobrenadantes no tratados de *C. jejuni*. (Fig.2).

La población de *V. harveyi* BB170, fue monitoreada durante este ensayo y los resultados mostraron que la población no disminuyó por el efecto de los sobrenadantes agregados incluso cuando estos se mezclaron con los extractos de cítricos (Fig. 3), o los compuestos naturales comerciales. Cabe señalar que en el caso de los compuestos naturales comerciales, el monitoreo de la población de *V. harveyi* BB170, se analizó a la mitad de la fase logarítmica, momento en el que se tomó la lectura de bioluminiscencia (Fig. 4). Debido a lo anterior, podemos asumir que la disminución de bioluminiscencia no fue debida a la una baja población de *V. harveyi* sino a un posible efecto sobre las moléculas señaladoras. La mayor disminución en bioluminiscencia fue en los sobrenadantes tratados con extractos de limón, aunque los demás extractos mostraron

también una disminución significativa  $p \geq 0.05$  (respecto al control); para el caso de los compuestos naturales comerciales, el que presentó mayor actividad inhibitoria sobre la actividad AI-2 fue el citrol® K ultra seguido del EGCG y finalmente la 2 (5H) furanona (Fig. 2) mostrando también una disminución significativa comparados con los controles no tratados. Al hacer un comparativo entre los compuestos comerciales naturales y los extractos de cítricos, pudimos notar que la actividad AI-2 disminuyó en niveles comparables tanto en los compuestos naturales como en los extractos de cítricos no habiendo diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre ellos, a excepción de la 2(5H) furanona en donde la disminución fue significativamente menor (Fig. 2).

Fig. 1. Efecto de concentraciones menores a la CMB (25, 50 y 75%) de extractos de cítricos sobre el crecimiento de *C. jejuni*

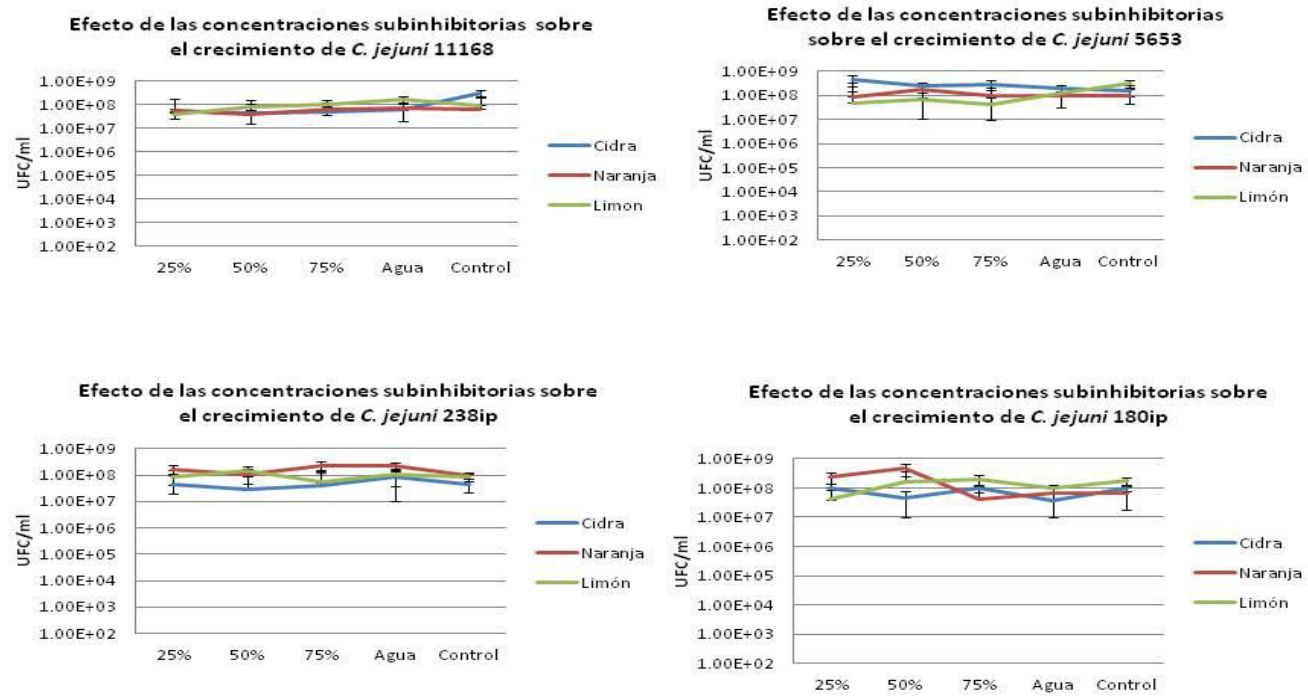


Figura 2. Porcentaje de unidades relativas de luz mediadas por AI-2, determinados mediante el ensayo de bioluminiscencia con *V. harveyi* BB170, antes y después del tratamiento con extractos y/o compuestos comerciales naturales. Como control positivo se utilizaron los sobrenadantes de *V. harveyi* BB152.

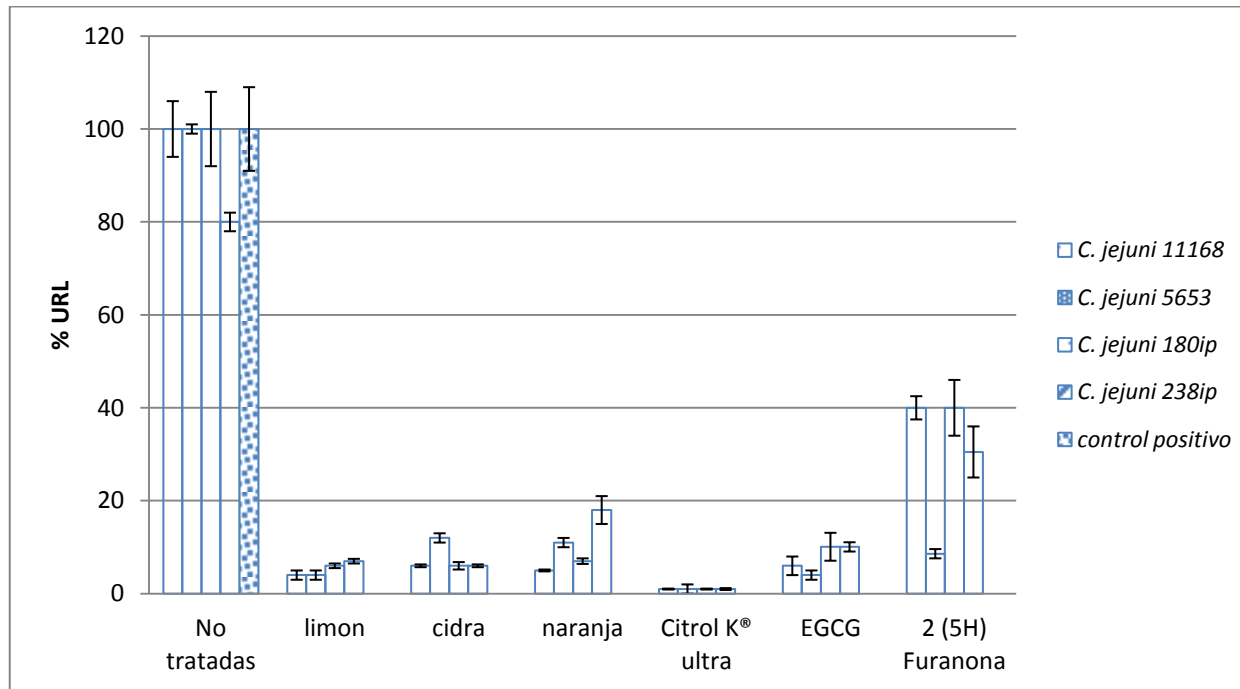


Fig. 3. Curva de crecimiento de *V. harveyi* BB170 después de la adición de extractos de cítricos mezclados con sobrenadantes.

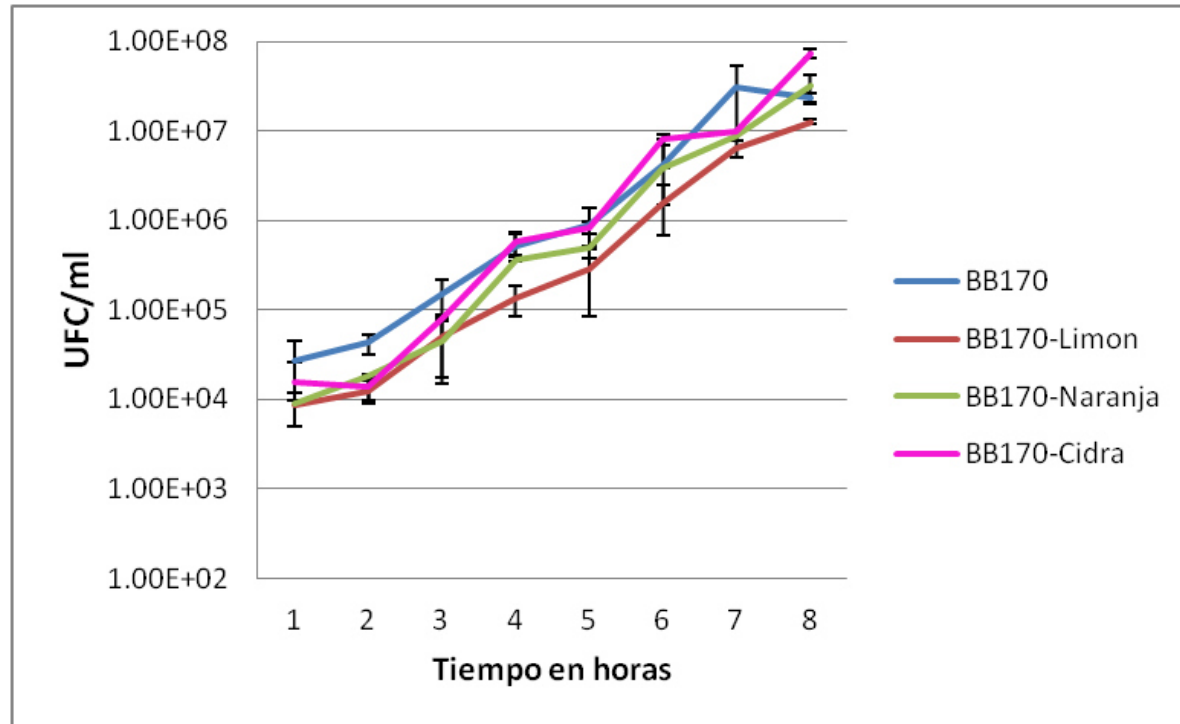
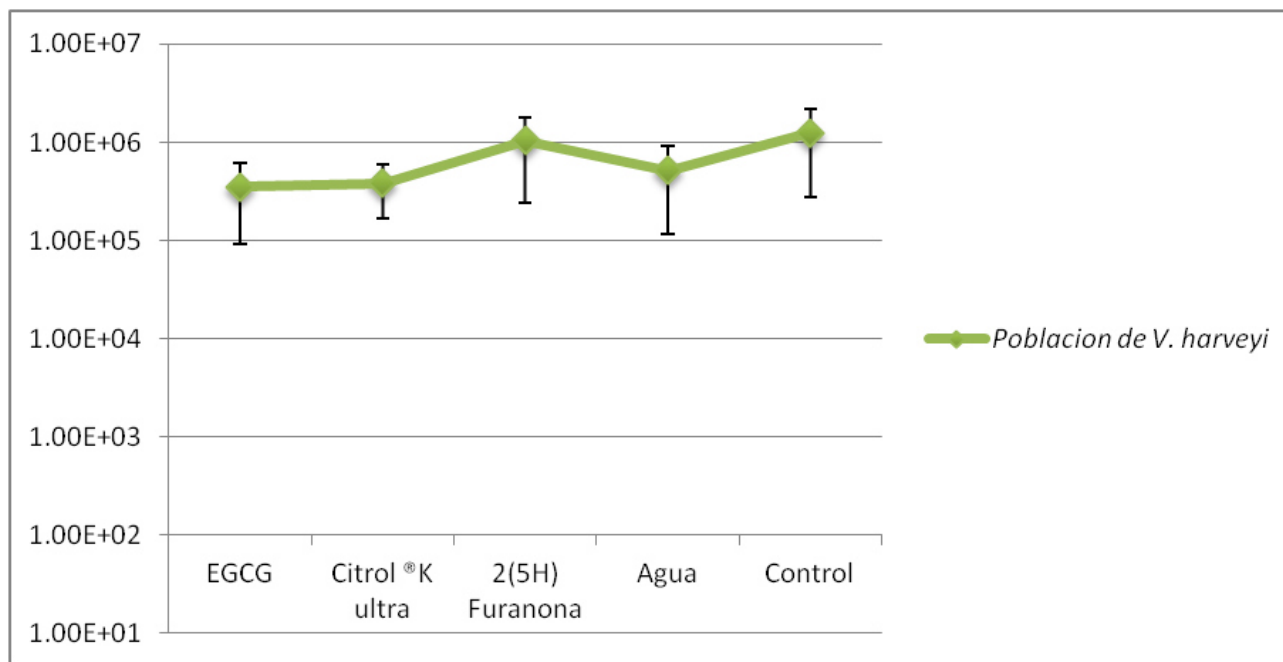


Figura 4. Población de *V. harveyi* presente a las 4h de incubación con sobrenadantes tratados con compuestos naturales comerciales



### **7.5. Efecto de los extractos de cítricos sobre la movilidad de C. jejuni.**

En este trabajo establecimos que la movilidad de *C. jejuni* varió de acuerdo a la cepa analizada (Fig. 5), siendo la NCTC 11168 y NADC 5653 las que presentaron mayor movilidad. La cepa 238ip mostró una movilidad menor mientras que la 180ip no fue móvil, por lo que esta última, se utilizó como control negativo.

El comportamiento de todas las cepas de *C. jejuni* al agregar los extractos de cítricos y/o los compuestos naturales comerciales fue similar, ya que la movilidad se vio disminuida significativamente ( $p > 0.05$ ) al compararse con su control respectivo. En todos los casos, la movilidad se afectó al agregar el 50 y 75% de la CMB. La mayor inhibición fue causada por el EGCG, variando entre las cepas mientras que la menor inhibición correspondió al limón en algunos casos (Tabla III). Solo los compuestos comerciales naturales presentaron una inhibición sobre la movilidad de *C. jejuni* a concentraciones del 25% de la CMB ya que los extractos de cítricos no presentaron disminución significativa comparada con su control. En todos los casos, se pudo observar un efecto dependiente de concentración, ya que a mayor concentración de extracto o compuesto comercial, menor movilidad de *C. jejuni*. En la Tabla III se muestra el porcentaje de inhibición en la movilidad de *C. jejuni* después de la adición de extractos o compuestos naturales comerciales, mientras que la Figura 6 se puede apreciar la disminución causada por la adición de concentraciones subinhibitorias de limón en la cepa NCTC 11168.



Figura 5. Movilidad de cuatro cepas de *C. jejuni*

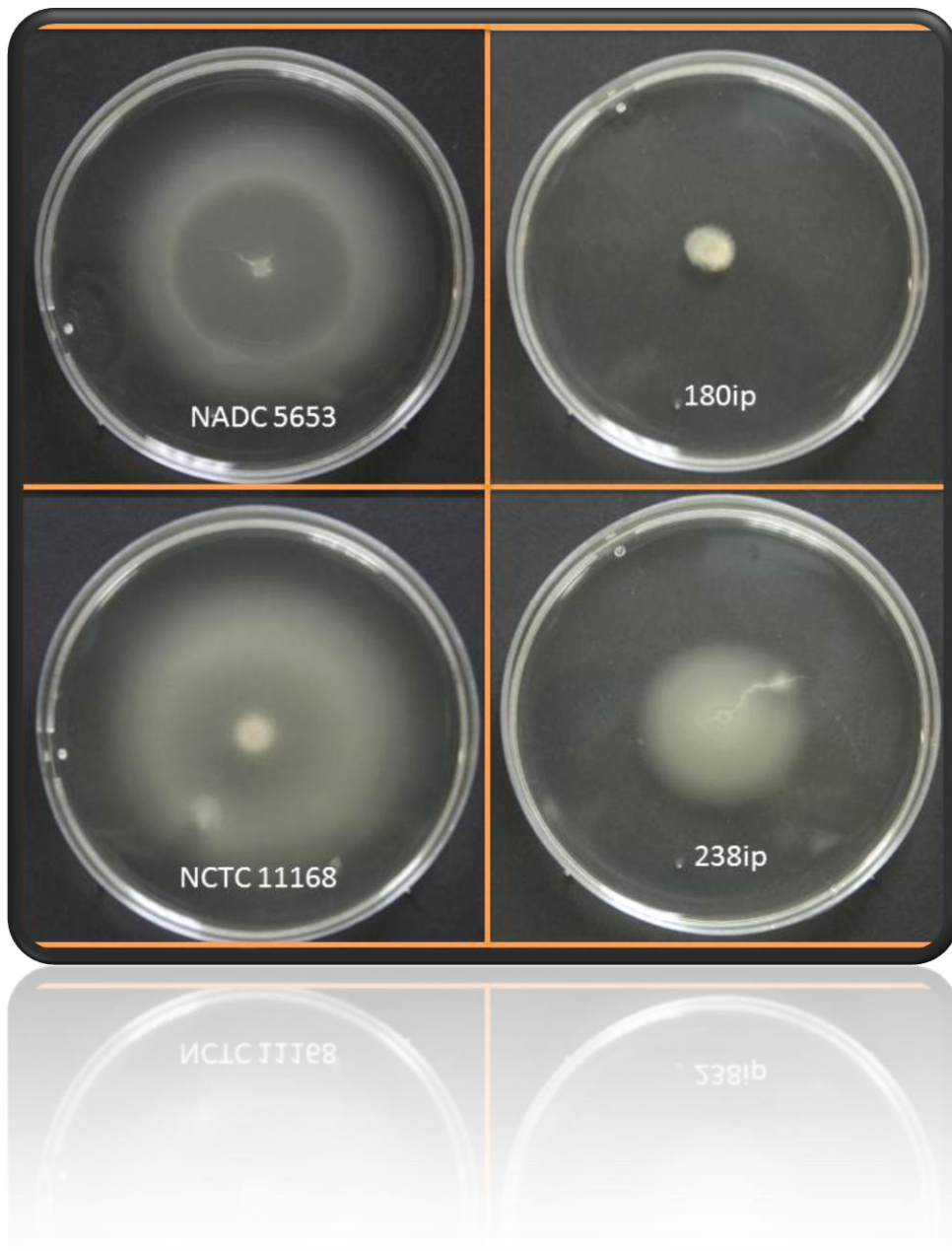


Tabla III. Porcentaje de reducción en movilidad de tres cepas de *C. jejuni* en presencia de extracto de cítricos y/o compuestos naturales comerciales.

Extracto	Reducción de la movilidad (%)								
	<i>C. jejuni</i> 11168			<i>C. jejuni</i> 5653			<i>C. jejuni</i> 238ip		
	Concentración subinhibitoria			Concentración subinhibitoria			Concentración subinhibitoria		
	75%	50%	25%	75%	50%	25%	75%	50%	25%
citrol®K ultra	44±4.2	40±1.9	33±3.1	34±2.6	28±2.4	15±1.1	57±1.9	38±1.6	26±2.6
2(5H) furanona	54±2.2	19±1.5	0	30±1.0	23±2.1	23.1±3.4	51.3±2.6	26.9±3.6	21.1±2.4
EGCG	51±3.4	41±1.6	27±1.7	45±3.0	38±1.8	20±3.6	62±3.0	49±3.1	20±3.7
Limón	27±2	19±2.2	0	42±2.5	17±1.8	0	50±4.7	31±3.8	23±1.5
Cidra	33± 1.1	17±3.4	0	40±2.6	34±2.8	0	44±4.3	21±4.2	0
Naranja	59±2.9	30± 2.8	0	40±3.9	24±4.1	0	38±4.1	14±4.9	0
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 6. Movilidad de *C. jejuni* cepa NCTC 11168 con y sin concentraciones subinhibitorias de extracto de limón. A) Control, B) 75% de la CMB y C) 50% de la CMB.



#### ***7.6. Efecto de los extractos sobre la formación de Biopelícula.***

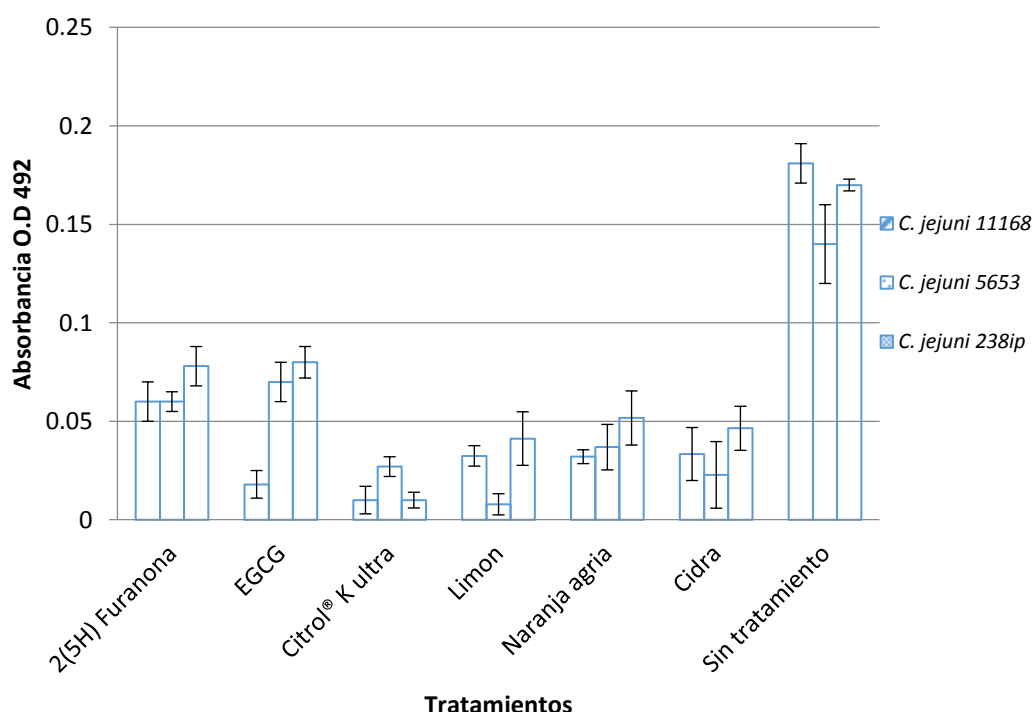
El efecto de las concentraciones subinhibitorias (25, 50, 75% CMB) de los extractos de cítricos y/o compuestos comerciales sobre la formación de biopelícula, se evaluó después de 72 h de incubación en las diferentes cepas de *C. jejuni*. La cepa de *C. jejuni* 180ip no formó biopelícula en las condiciones analizadas. Como control positivo se utilizó cada cepa de *C. jejuni* sin adición de los extractos y/o compuestos comerciales.

En cuanto a las demás cepas, al adicionar los extractos de cítricos y/o compuestos comerciales se observó una disminución significativa en la formación de

biopelícula comparada con el control en las concentraciones de 50 y 75% de la CMB. La disminución observada en todos los casos fue dependiente de concentración, es decir, a mayor concentración de extracto menor formación de biopelícula, sin embargo las diferencias significativas se encontraron solo a concentraciones de 75 y 50% de la CMB ya que la concentración de 25% no presentó diferencia significativa en comparación con el control. En la Figura 7 se muestran las disminuciones causadas por los extractos de cítricos y los compuestos comerciales a concentraciones del 75% de la CMB.

Debido a que la concentración más efectiva en el decremento en movilidad y biopelícula fue la del 75% solo esta concentración se siguió utilizando en los ensayos posteriores.

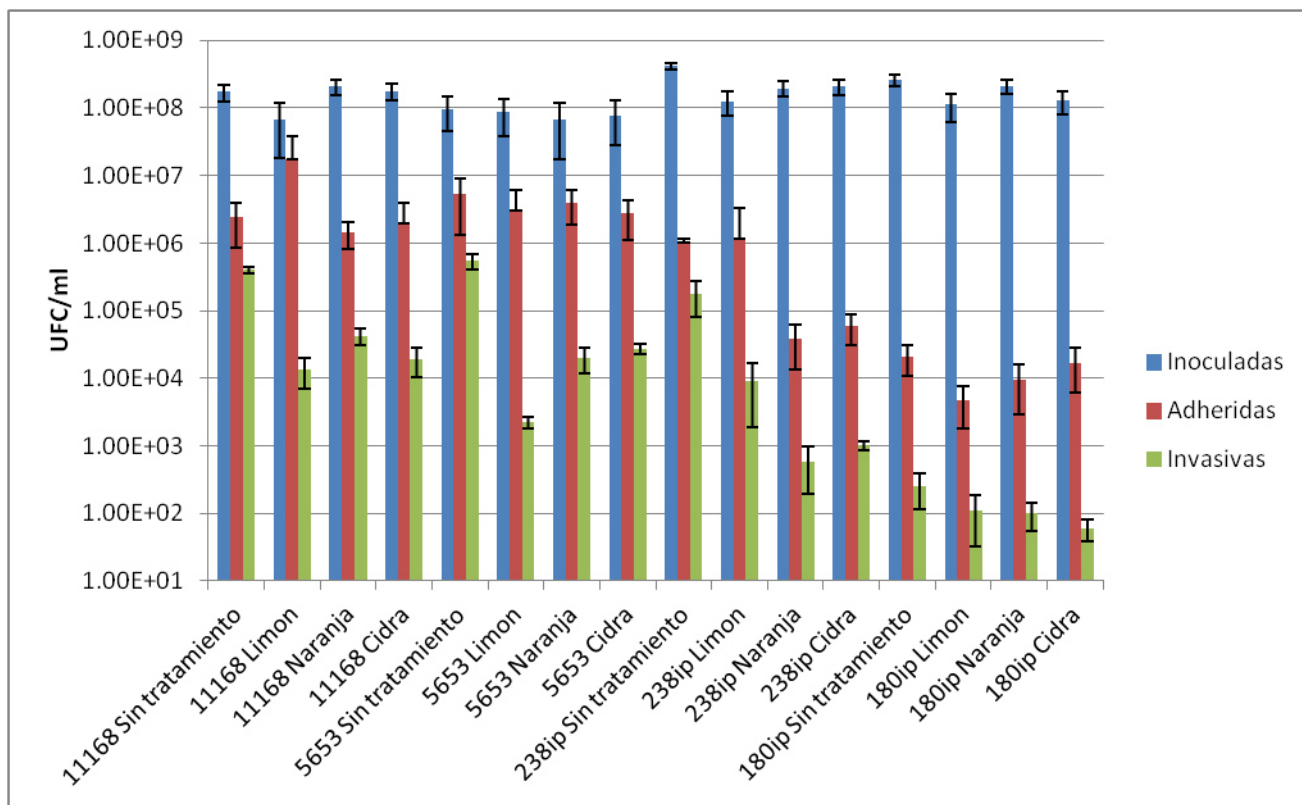
Figura 7. Formación de biopelícula en tres cepas de *C. jejuni* a concentraciones subinhibitorias (75% de la CMB) de los extractos naturales



### ***7.7. Efecto de los extractos de cítricos sobre la adhesión e invasión a células HeLa.***

Al realizar los ensayos de adhesión a células y analizar los resultados, se pudo apreciar la capacidad de adhesión de todas las cepas al adicionar un inóculo de entre 7-8 log/UFC, encontrándose que las cepas de *C. jejuni* en general presentaron una adherencia de entre 5-6 log/UFC (Fig. 8). Cuando las cepas de *C. jejuni* fueron sometidas a tratamientos con extractos no hubo diferencia significativa entre la recuperación celular de los controles adheridos y sus respectivos tratamientos. Al realizar la prueba de invasión, se evidenció la capacidad invasiva de *C. jejuni* encontrándose en las cepas móviles (NCTC 11168, 5653, 238ip) una mayor capacidad de invasión (4-5 log/UFC) al compararse con la cepa no móvil (180ip, 3 log/UFC). En todos los casos, después del tratamiento con extractos de cítricos, se observó una disminución significativa en la capacidad de invasión de *C. jejuni* en comparación con los controles no tratados (Fig.8).

Fig. 8. Células de *C. jejuni* adheridas a células HeLa antes y después del tratamiento con extractos de cítricos. Las barras azules muestran las UFC inoculadas mientras que las barras naranjas muestran las UFC/ml adheridas recuperadas



### 7.8. Efecto de los extractos de cítricos sobre la expresión de genes relacionados.

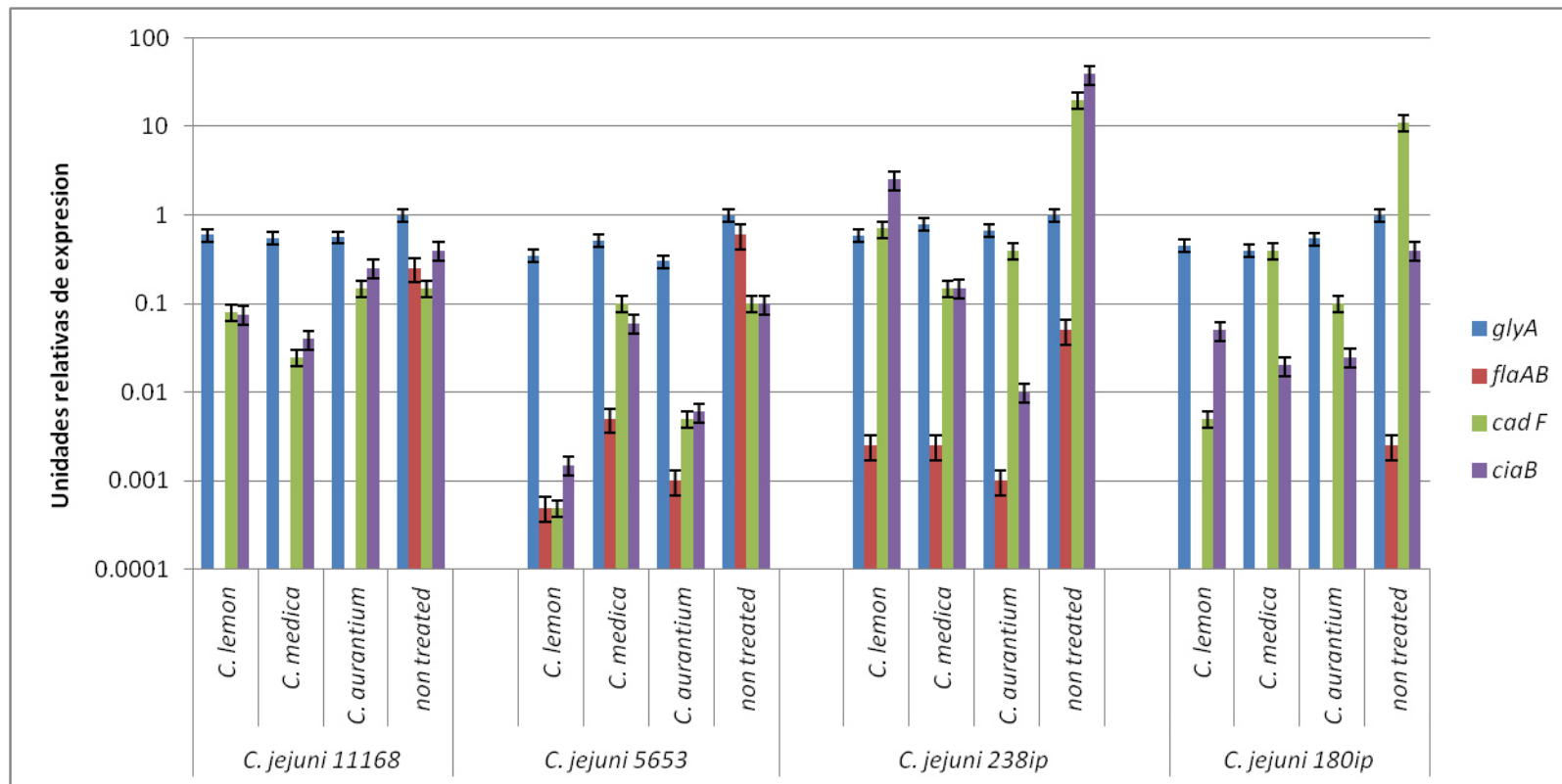
Al realizar el análisis de expresión de los genes *flaA-B* relacionado con la movilidad, *ciaB* y *cadF* relacionados con la adhesión e invasión, tanto en células tratadas con extractos como en no tratadas, se pudo observar una variación en la expresión de estos genes tomando como base el gen de referencia de una sola copia *glyA*. En el caso de *flaA-B*, las cuatro cepas presentaron expresión del mismo, y a pesar de que la cepa 180ip no presentó movilidad, sí presentó la expresión de este gen aunque en niveles significativamente más bajos que las otras cepas (Fig. 9). Cuando se comparó el nivel basal de expresión del control sin tratar con células tratadas con extractos, se pudo observar una disminución significativa en la expresión en los tratamientos a los que se les adicionaron extractos, siendo el de limón el que presentó la disminución más notable en la mayoría de los casos. Las cepas NCTC 11168 y 180ip presentaron niveles

indetectables de este gen en todos los tratamientos. Los tratamientos de cidra y naranja disminuyeron significativamente los niveles de expresión de este gen comparados con los controles no tratados (Fig. 9).

Para el caso de los genes *cadF* y *ciaB* relacionados con la adhesión e invasión a células, al realizar el análisis de expresión de estos genes se pudo apreciar ambos se expresaron en todas las cepas de *C. jejuni*, aunque habría que destacar que comparados con el nivel de expresión de *glyA*, las cepas 238ip y 180ip presentaron una sobreexpresión de los mismos. Curiosamente, estas dos cepas presentan menor o nula movilidad comparada con las cepas 5653 y 11168.

Después del tratamiento con extractos, las cepas 238ip y 180ip presentaron una disminución en la expresión de los genes *ciaB* y *cadF* en todos los tratamientos, mientras que en las cepas NCTC 11168 y 5356 hubo más variación en la respuesta. Para la cepa NCTC 11168 los extractos que causaron una disminución significativa en la expresión de estos genes al compararse con el control, fueron los extractos de limón y cidra mientras que en la cepa 5653, los extractos limón y naranja presentaron una disminución significativa (Fig. 9).

Fig. 9. Niveles de expresión de los genes *glyA*, *fla* A-B, *ciaB* y *cadF* relacionados con la adhesión e invasión a células, de 4 cepas de *C. jejuni* sometidas a tratamientos con diferentes extractos de cítricos





## 8. DISCUSIÓN

El incremento en brotes de enfermedades de transmisión alimentaria y la habilidad por parte de los microorganismos para desarrollar resistencia a antibióticos, ha despertado el interés de los investigadores quienes se han enfocado en descubrir nuevas estrategias para el control microbiano (Roy *et al.* 2011). La actividad antimicrobiana de plantas ha sido observada desde hace tiempo y se ha pretendido su utilización tratando de evitar la aparición de resistencia a antibióticos (Negi, 2012). Diversos estudios han sido realizados utilizando extractos de plantas, quedando demostrada su actividad biológica (Castillo *et al.* 2011, Sánchez *et al.* 2011, Valtierra *et al.* 2010). Debido a la presión selectiva que algunos compuestos ejercen sobre las bacterias al inhibir su crecimiento, grupos de investigación han sugerido la necesidad de nuevos antimicrobianos que vayan dirigidos a factores de virulencia y de esta forma evitar esta presión selectiva (Roy *et al.* 2011). Es por ello que algunos estudios se han enfocado en la utilización de extractos de plantas o compuestos naturales para la inhibición de algunos factores de virulencia como la movilidad o formación de biopelícula en diversas especies bacterianas, entre las que se encuentra *E. coli* (Khan *et al.* 2009, Lee *et al.* 2009).

Se ha comprobado que el QS está involucrado en una gran variedad de procesos que incluyen movilidad, formación de biopelícula, producción de toxinas así como la expresión de genes de virulencia, que habilitan a la bacteria para colonizar a su hospedero con mayor facilidad. El entendimiento de los mecanismos del QS, permiten llegar a silenciarlo y de esta forma inhabilitar el proceso patogénico de la bacteria sin dañar su crecimiento. La inhibición del QS es una estrategia antimicrobiana potencial no solo por evadir la presión selectiva sino por el hecho de controlar una gran cantidad de factores de virulencia que hacen a la bacteria patógena (Roy *et al.* 2011).

Durante muchos años, los productos naturales han sido una fuente para el desarrollo de drogas, sin embargo en años recientes la combinación de estos con las técnicas químicas ha sido benéfica para el desarrollo de nuevas drogas terapéuticas (Hjelmgaard *et al.* 2003).

En el presente trabajo, se buscó primeramente la actividad antibacteriana de varios extractos de cítricos (realizados a partir de cáscara y bagazo) y compuestos comerciales naturales contra cuatro cepas de *C. jejuni*. Al realizar las pruebas preliminares en pozo, se pudo determinar por medio de halos de inhibición aquellos extractos activos contra esta bacteria. Los halos más grandes obtenidos de los extractos de cítricos fueron los de limón y naranja agria seguidos de cidra, mientras que los extractos de toronja, lima y mandarina no mostraron actividad (Tabla 1). Según se ha reportado, existen más de 400 compuestos naturales presentes en los aceites esenciales de cítricos, cuyo contenido depende del tipo específico de cultivo, así como de la separación y método de extracción entre muchos otros factores (Nannapaneni *et al.* 2009). En este trabajo utilizamos extractos crudos extraídos con etanol, que influyó en la cantidad y tipo de compuestos presentes en los extractos obtenidos (Cowan, 1999), además es importante mencionar que cada fruto fue tomado de zonas geográficas diferentes, lo cual puede influir en los compuestos presentes y como consecuencia, en la actividad antimicrobiana de los extractos. Al realizar los ensayos para la determinación de las CMBs de aquellos extractos de cítricos que mostraron actividad preliminar, los resultados mostraron diferencias entre cepas, encontrando que la cepa 238ip, fue más resistente ( $p \leq 0.05$ ) que las otras, mostrando concentraciones más pequeñas en la CMB que las demás cepas analizadas en todos los casos. Esto podría atribuirse a la variabilidad en la susceptibilidad de las cepas utilizadas, ya que según algunos estudios (Nannapaneni *et al.* 2009, Klancnik *et al.* 2010) se ha demostrado diferencias en la susceptibilidad de cepas bacterianas en *E. coli* y *C. jejuni*. Así mismo la cantidad y tipo de compuestos activos presentes en cada uno de los extractos utilizados pudo haber influenciado su actividad biológica (Cowan *et al.* 1999).

Para continuar con este estudio, se debían utilizar para las pruebas posteriores, concentraciones menores a la CMB encontradas. Por ello era necesario determinar el efecto de estas concentraciones de extractos sobre el crecimiento de *C. jejuni*, ya que disminuciones significativas en la población microbiana podrían provocar resultados inferiores en los ensayos realizados. Debido a esto, se determinó el efecto de concentraciones menores a la CMB encontrada en cada caso (75, 50 y 25%) sobre las cepas analizadas. Los resultados mostraron que concentraciones menores a la CMB no afectaron significativamente la población de las cepas analizadas de *C. jejuni*, manteniéndose en todos los casos en 7-8 log/CFU. Por lo que el efecto observado cuando se agregan estas concentraciones se debía únicamente al efecto de los extractos

agregados. Estos resultados concuerdan con aquellos presentados por Castillo *et al.* (2011), Vikram *et al.* (2011), Lee *et al.* (2009), en los cuales concentraciones menores a la CMB de extractos de plantas y compuestos naturales comerciales no afectaron significativamente la población de especies bacterianas como *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 y *V. harveyi*.

Uno de los objetivos en el desarrollo de nuevos antimicrobianos, es evitar la resistencia provocada por los mismos, que se da, al interferir con el crecimiento microbiano derivando en la muerte del patógeno. Se ha visto que esta condición es la responsable de la pronta respuesta de los microorganismos en defensa propia debido a la presión selectiva, desencadenando mecanismos de resistencia (Roy *et al.*, 2011; Metris *et al.*, 2011). Tomando en cuenta que el QS no interfiere con el crecimiento microbiano, los inhibidores de QS son considerados como una buena opción para una nueva generación de antimicrobianos (Roy *et al.*, 2011; Girenavar *et al.* 2008). La gran variedad de generadores de señal de QS, receptores, transportadores, reguladores e incluso las mismas moléculas señalizadoras representan múltiples blancos que pueden ser bloqueados para silenciar el proceso de QS (Roy *et al.*, 2011).

Por otra parte, las moléculas AI-2 se han visualizado como blancos perfectos para el control bacteriano debido a su distribución universal entre las bacterias Gram+ y Gram (Sun *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2001). El sistema AI-2 ha demostrado estar involucrado en la expresión de genes y la regulación de factores de virulencia en una amplia variedad de patógenos (Girenavar *et al.*, 2008). La actividad AI-2 comúnmente es medida por el ensayo de autoinducción en *V. harveyi* (Surette y Bassler, 1998); la técnica se basa en la habilidad que tiene *V. harveyi* para producir bioluminiscencia en presencia de moléculas AI-2 (Milton, 2006) presentes en sobrenadantes recolectados de diferentes especies bacterianas (Girenavar *et al.* 2008).

Tomando esta información como antecedente, en el presente trabajo se hicieron pruebas para determinar si los extractos de cítricos y/o compuestos naturales comerciales presentaban algún efecto sobre las moléculas señalizadoras AI-2 del QS presentes en sobrenadantes de cultivos de *C. jejuni*. Para este efecto, se mezclaron los sobrenadantes obtenidos de *C. jejuni* con pequeñas concentraciones de extractos de cítricos o compuestos naturales comerciales. Al realizar los ensayos de la medición de la inhibición de QS, se pudo observar una disminución significativa ( $P \leq 0.05$ ) en la

bioluminiscencia emitida por *V. harveyi* BB170 después de la adición de los extractos y/o compuestos naturales en todos los casos comparados con los controles no tratados, siendo el citrol® K ultra el más efectivo de los compuestos naturales y el extracto de limón para el caso de los extractos de cítricos adicionados. En el caso de aquellos sobrenadantes de *C. jejuni* no tratados con extractos y/o compuestos naturales comerciales, la emisión de bioluminiscencia fue comparable con el sobrenadante control de *V. harveyi* BB152 productor de AI-2. Es por ello que se asume la presencia de AI-2 en los sobrenadantes de *C. jejuni*.

De acuerdo a los procesos que forman parte del QS descritos en la literatura (Roy *et al.*, 2011, Vikram *et al.*, 2011) y del diseño del experimento, creemos que los extractos de cítricos y/o compuestos comerciales, pudieran estar afectando a la molécula señalizadora AI-2 cuando ya ha sido producida y de esta forma impedir su reconocimiento por parte de *V. harveyi* BB170, derivando entonces en una disminución drástica en la emisión de bioluminiscencia. Para asegurar la viabilidad de *V. harveyi* BB170 durante el desarrollo del experimento y descartar que la baja emisión de bioluminiscencia se debiese a una baja en la población de este microorganismo, se monitoreó el crecimiento de *V. harveyi* después de la adición de los extractos de cítricos. Así mismo, se monitoreó la cantidad de bacterias presentes al momento de la lectura de bioluminiscencia para los compuestos naturales comerciales y se evidenció que la población de *V. harveyi* BB170 se mantuvo siempre en niveles de entre 5-6 log/UFC, no habiendo diferencia ( $P \leq 0.05$ ) con el control en ningún tratamiento esto nos aseguró que cualquier cambio en bioluminiscencia no fue debido a la diferencia poblacional entre tratamientos sino a una disminución real en la respuesta de *V. harveyi*.

Es bien sabido que el QS juega un papel muy importante en la movilidad y formación de biopelícula de *C. jejuni* (Cloak *et al.*, 2002; Vikram *et al.*, 2011). Algunos estudios han demostrado que la adición externa de AI-2 incrementan la movilidad y la masa de biopelícula, mientras que un bloqueo en esta molécula, disminuye ambas condiciones (Roy *et al.*, 2011).

En ambos procesos está involucrado el flagelo, ya que la movilidad se requiere para la migración al sitio blanco y la colonización intestinal (Cloak *et al.*, 2002). La expresión de los genes de flagelina *flaA* y *flaB* se consideran muy importantes para la movilidad ya que habilitan a la bacteria a responder a diferentes ambientes. Se ha demostrado que el flagelo, juega un papel importante en la adherencia inicial a

superficies sólidas durante la formación de biopelícula (Kalmokoff et al. 2006); mutantes de genes del flagelo son incapaces de adherirse a fibra de vidrio y de formar biopelícula; por ello, se considera que el flagelo no se limita únicamente a proporcionar movilidad (Guerry, 2007). Estudios han demostrado que campylobacterias mutantes en genes *flaA* y/o *flaB* presentan reducción en movilidad y adherencia (Guerry, 2007; Monteville et al., 2003; Dasti et al., 2010).

Debido a la importancia que este factor de virulencia tiene en la patogenicidad de *C. jejuni*, la movilidad de la misma fue analizada antes y después de la adición de extractos de cítricos y compuestos naturales comerciales. Al realizar las pruebas de movilidad de *C. jejuni* sin tratamiento, se pudo apreciar una migración de aproximadamente 6 cm variando entre cepas, siendo las cepas NCTC11168 y NADC 5653 las más móviles, mientras que la 238ip mostró una reducida movilidad y la 180ip no presentó movilidad. Esta variabilidad en la movilidad de cada cepa se ha relacionado con su virulencia (a mayor movilidad, mayor virulencia). Estas diferencias en comportamiento se han atribuido a la co-regulación de genes que son requeridos para la movilidad, aunque no para el ensamble del flagelo y en los que varía la expresión dependiendo de las cepas (Carrillo et al. 2004). Cuando agregamos concentraciones del 50 y 75% de la CMB de los extractos al medio, se apreció una disminución en movilidad en todos los casos, la cual fluctuó entre 59-14% dependiendo de la cepa. Cuando adicionamos concentraciones del 25%, la movilidad se vio disminuida solo por los compuestos naturales comerciales (en todos los casos) y el limón únicamente en el caso de la cepa 238ip. Al analizar la expresión de genes *flaA-B* relacionados con el flagelo y que son genes cruciales para la movilidad, al adicionar concentraciones de extractos correspondientes al 75% de la CMB, pudimos observar una correlación con la reducción de la expresión del gen, siendo significativa en todos los casos, mientras que en la cepa NCTC 11168 y 180ip disminuyó a niveles indetectables. Estos resultados van de acuerdo a lo encontrado por algunos investigadores como Lee et al. (2009), quienes encontraron una disminución en la expresión de genes de *E. coli* O157H:7 que derivó en reducción de la movilidad al ser sometida a tratamientos subinhibitorios de EGCG.

Al realizar las pruebas de formación de biopelícula, se pudo observar una disminución ( $P \leq 0.05$ ) en la formación de biopelícula en aquellas cepas que fueron sometidas a los diferentes tratamientos con extractos. De acuerdo a los estudios

realizados por Kalmokoff *et al.* (2006), en donde se demostró que los niveles de expresión de *flaA* y *flaB* eran cruciales para la patogénesis y jugaban un papel importante en la formación de biopelícula, podemos relacionar esta disminución de la biopelícula con la disminución en los niveles de expresión de *flaA-B*, evidenciados con los ensayos de qRT-PCR tiempo real realizado en este trabajo

La severidad de la infección por *Campylobacter*, ha sido correlacionada con el grado de adherencia *in vitro*. Una gran variedad de estudios han demostrado la importancia de la adherencia y sus factores de adhesión en el proceso de colonización de *Campylobacter* (Dasti *et al.* 2010). Uno de los factores de adhesión más importantes es CadF (proteína de unión a fibronectina) que junto con otros factores como *ciaB*, median la adhesión e invasión a células epiteliales. Es por ello que se considera a la adhesión e invasión como factores importantes asociados a la patogenicidad y por lo cual en el presente estudio se realizaron las pruebas pertinentes para determinar si los tratamientos con extractos de cítricos tenían alguna influencia en la capacidad de adhesión e invasión a células HeLa. Al analizar los resultados obtenidos, se encontró variabilidad en la adhesión de la cepa 180ip presentando muy baja capacidad de adhesión. Según Dasti *et al.* (2010), esto se puede atribuir a la variación en la habilidad de adhesión e invasión que presentan algunas cepas de *Campylobacter*, además de que se ha comprobado que cepas no móviles, son incapaces de colonizar células epiteliales o presentan una capacidad muy reducida en colonización (Guerry, 2007).

Según los resultados obtenidos, no hubo diferencia significativa en la capacidad de adherencia para las bacterias tratadas con los extractos naturales y no tratadas, a excepción de la cepa 238ip, que en los tratamientos de naranja y cidra, presentó una disminución significativa en la capacidad de adhesión. Sin embargo y a pesar de que en la mayoría de los casos la adherencia no se vio afectada por la influencia de los extractos de cítricos, al realizar el ensayo de invasión, se pudo observar una disminución significativa en todos los tratamientos comparados con el control no tratado, a excepción de la cepa 180ip que presentó niveles muy bajos de invasión sin presentar diferencias significativas en los tratamientos.

Al realizar la correlación de la expresión de genes *cadF* y *ciaB* relacionados a la adhesión e invasión, se encontraron resultados muy variados, observando disminuciones

significativas en la expresión de los mismos en todos los tratamientos en las cepas 238ip y 180ip. Lo mismo fue observado en casi todos los tratamientos con excepción del tratamiento con extracto de cidra, al analizar la cepa 5653 y para la cepa NCTC 11168 la excepción fue en el caso de la naranja agria. A pesar de que *cadF* mostró baja expresión en la mayoría de los casos, la adhesión no se afectó. Esto podría atribuirse a la gran variedad de genes co-regulados, involucrados en la adhesión y que también juegan un papel crucial en el primer contacto con la célula como es el caso de CapA (autotransportador), PEB1 (proteína periplásmica de adhesión, y JLPa (lipoproteína de membrana) que pudiesen haber permanecido en niveles normales de expresión y de esta manera contribuir en la capacidad de adhesión de las cepas evitando una disminución en la adhesión. Para el caso de *ciaB* se observó el caso contrario, ya que la capacidad de invasión disminuyó en los tratamientos y aunque en la mayoría de los casos se presentó una disminución significativa en la expresión de este gen hubo algunos casos en los que no.

La invasión esta mediada también por otros factores como LOS (lipooligosacarido), y CPS (polisacárido capsular) que pudieron haber sido afectados por los extractos y de esta forma derivar en una disminución en la invasión a células HeLa. Incluso, la disminución de ambos genes *ciaB* y *cadF* observada en la mayoría de los casos pudiesen representar un factor determinante en la disminución de la invasión encontrada en este estudio.

Es por ello que se requieren más estudios moleculares en donde se establezcan patrones de expresión genética antes y después de los tratamientos con extractos que nos ayuden a elucidar el modo exacto de acción de los mismos.

## 9. CONCLUSIONES

- 1.- Los extractos de *C. medica*, *C. aurantium*, *C. limon* y los compuestos naturales comerciales citrol<sup>®</sup>K ultra, EGCG y 2(5H) furanona, mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento de las cepas de *Campylobacter jejuni*.
- 2.- Las CMB encontradas fueron 1.5-2.5 mg/ml para cidra, 2.75-3.25 mg/ml para naranja, 1.3-2.25 mg/ml para limón, 87-125 µg/ml para EGCG, 150-310 µg/ml para furanona y 0.3 -0.35 µg/ml para el citrol<sup>®</sup>K ultra.
- 3.- Los extractos de *C. medica*, *C. aurantium*, *C. limon* y los compuestos naturales comerciales citrol<sup>®</sup>K ultra, EGCG y 2(5H) furanona reducen la movilidad de todas las cepas de *Campylobacter* variando de 14-59%.
- 4.- Los extractos de *C. medica*, *C. aurantium*, *C. limon* y los compuestos naturales comerciales citrol<sup>®</sup>K ultra, EGCG y 2(5H) furanona disminuyeron significativamente la formación de biopelículas.
5. Los extractos de *C. medica*, *C. aurantium*, *C. limon* y los compuestos naturales comerciales citrol<sup>®</sup>K ultra, EGCG y 2(5H) furanona afectaron la actividad AI-2.
- 6.- Los extractos de *C. medica*, *C. aurantium*, *C. limon* no afectaron la capacidad de adhesión a células HeLa pero sí disminuyeron la capacidad de invasión.
- 7.- Los extractos de *C. medica*, *C. aurantium*, *C. limon*, disminuyen la expresión de los genes *flaA-B*, *ciaB*, *cadF* en la mayoría de los casos.



## 10. LITERATURA CITADA

1. Alarcón G. 2002. Actividad de extractos de plantas en el crecimiento, la producción de toxina y la unión de *Vibrio cholerae*. Tesis Maestría. UANL, FCB.
2. Allos B. 2001. *Campylobacter jejuni* infection: update on emerging issues and trends. *Clinical Infection Disease*. 32:1201- 1206.
3. Asakura H, Yamasaki M, Yamamoto S, Igimi S. (2007). Deletion of *peb4* gene impairs cell adhesion and biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiology Letters*, 275: 278–285
4. Austin J, Sanders G, Kay W, Collinson S. 1998. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters* 162:295–30.
5. Aqeel A, Khursheed AK, Viqaruddin A, Sabiha Q. 1989. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. *Arzneimittelforschung*. 39: 652-655.
6. Bassler B, Wright M, Silverman M. 1994. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology* 13:273-286.
7. Bessell PR, Rotariu O, Innocent GT, Smith-Palmer A, Strachan NJ, Forbes KJ, Cowden JM, Reid SW, Matthews L. 2012. Using sequence data to identify alternative routes and risk of infection: a case-study of *Campylobacter* in Scotland. *BMC infectious diseases* 12:80.
8. Bendinger B, Rijnaarts H, Altendorf K, and Zehnder A. 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the

- presence and chain length of mycolic acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:3973–3977.
9. Black R, Levine M, Clements M, Hughes T, and Blasser M. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* in humans. *Journal of Infectious Diseases*. 157:472-479.
  10. Byeonghwa J, Kikuji I, Misawa N, Sangryeol R. 2003. Effects of quorum sensing on *flaA* transcription and autoagglutination in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology and Immunology* 47(11):833-839.
  11. Byeonghwa J, Kikuji I, Sangryeol R. 2005. Promoter analysis of cytolethal distending toxin genes (*cdtA*, *B*, and *C*) and effect of a *luxS* mutation on CDT production in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology and Immunology* 49(7):599-603.
  12. Boyle E, Brown N, Brumell J, Brett F. 2007. *Src* homology domain 2 adaptors affect adherence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to nonphagocytic cells. *Microbiology*. 153:3517–3526
  13. Carrillo C, Taboada E, Nash J, Lanthier P. 2004. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. *Journal of Biological Chemistry*. 279:20327-20338.
  14. Castillo, S. L., Heredia, N., Contreras, J. F., García, S. (2011). Extracts of edible and medicinal plants in inhibition of growth, adherence, and cytotoxin production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Food Science*. 76: M421-M426.
  15. Chansiripornchai N, Sasipreeyajan J. (2009). PCR detection of four virulence-associated genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Thai broilers and their abilities of adhesion to and invasion of INT-407 cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(6), 839-844.

16. Choi J, Shin D, Ryu S. 2007. Implication of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence: the *luxS* gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island. *Infection and Immunity*. 75(10):4885–4890
17. Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Natural Chemistry and Biology* 3: 541-548.
18. Cloak OM, Solow BT, Briggs CE, Chen CY, Fratamico PM. (2002). Quorum sensing and production of autoinducer-2 in *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in foods. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4666-4671.
19. Costerton J, Lewandowski Z, Caldwell D, Korber D, Lappin S. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 49:711–745.
20. Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582
21. Dadalioglu I, Akademir G. 2004. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish Oregano (*Oreganum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.) and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:8255-8260.
22. Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Groß U. 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology* 300:205-211.
23. Deep A, Chaudhary U, Gupta V. 2011. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. *Journal of Laboratory Physicians* 3:4.

24. Donlan, R. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease*. 8:881–890.
25. Elvers K, Simon F. 2002. Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection of a *luxS* encoded signaling molecule. *Microbiology*. (148):1475–1481.
26. Fernández D, Gonzalez P, Garcia O, Carbonero P. 1972. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*. *Applied Microbiology*. 23:998–1000.
27. Fields P, Swerdlow M. 1999. *Campylobacter jejuni*. *Clin Lab Med*. 19:489-504.
28. Fitzgerald D, Narbad A. 2004. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*. 97:104-113.
29. Friedman M, Henika P, Mandrell R. 2000. Bacterial activities of plants essential oils and some of their constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 65:1545-1560.
30. Fuqua W, Winans S, Greenberg E. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*. 176:269–275.
31. Fuqua W, Parsek M, Greenberg E. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*. 35:439–468.
32. Galloway WR, Hodgkinson JT, Bowden S, Welch M, Spring DR. 2012. Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology* 20:449-458.

33. Ganan M, Silván JM, Carrascosa AV, Martínez-Rodríguez AJ. 2012. Alternative strategies to use antibiotics or chemical products for controlling *Campylobacter* in the food chain. *Food Control* 24:6-14.
34. García S, Alarcón G, Gómez M, Heredia N. 2005. *Haematoxylon brasiletto* extracts inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. *Food Biotechnology*. 19: 15-26
35. García S, Heredia N. 2009. Foodborne pathogens and toxins: an overview. In: *Microbiologically Safe Foods*. García S, Heredia N, Wesley I (eds). John Wiley and Sons. New Jersey. pp. 20-22.
36. Garo E, Gary R, Goering M, DeLancey E, Pulcini M, Hamilton A, Costerton J, Garth J. 2007. Asiatic acid and corosolic acid enhance the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(5):1813–1817.
37. Gilbert P, McBain A, Rickard A. 2003. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 51: 245-248.
38. Girenavar B, Cepeda M, Kamlesh A, Soni A, Vikram A, Jesudhasan P, Jayaprakasha G, Suresh D, Bhimanagouda P, Patil S. 2008. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibit autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 125:204–208
39. Gobbetti M, Angelis M, Di-Cagno R, Minervini F, Limitote A. 2007. Cell–cell communication in food related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 34–45
40. Guerry P, Logan S, Thornton S, Trust T. 1990. Genomic organization and expression of *Campylobacter* flagellin genes. *Journal of Bacteriology*. 172:1853-1860.

41. Guerry, P. (2007). *Campylobacter* flagella: not just for motility. Trends in Microbiology. 15: 456-461.
42. Hjelmgaard T, Persson T, Rasmussen TB, Givskov M, and Nielsen J. 2003. Synthesis of furanone-based natural product analogues with Quorum Sensing antagonist activity. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 11:3261-3271
43. Hentzer M, Givskov M. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. Journal Clinical Investigation. 112 (9):1300-1307.
44. Hong B, Jiang L, Hu J, Fang D, Guo H. 2004. Application of oligonucleotide array technology for the rapid detection of pathogenic bacteria of foodborne infections. J. Microbiol Meth. 58: 403–411.
45. Hu J, Garo E., Goering M, Pasmore M, Yoo H, Esser T, Sestrich J, Cremin P, Hough G, Perrone P, Lee Y, Johnson M, Costerton J, Eldridge G. 2006. Bacterial biofilm inhibitors from *Diospyros dendo*. J Nat Prod. 69:118-120
46. Hwang S, Jeon B, Yun J, Ryu S. 2011. Roles of RpoN in the resistance of *Campylobacter jejuni* under various stress conditions. BMC microbiology 11:207.
47. Iovine NM. 2013. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. Virulence 4:230-240
48. Jain S, Chen J. 2007 Attachment and biofilm formation by various serotypes of *Salmonella* as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis. J Food Prot. 70(11):2473–2479
49. Jones N, Shabib S, Sherman P. 1997. Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett. 146: 223–227.

50. Joost C, Janssens A, Hans S, Stijn R, Edith G, Jeremy L, Hui Z, Kim H, David D, Tine L, Kathleen M, Vanderleyden J, Dirk E, Sigrid C. 2008. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ. Microbiol.* (74)21:6639–6648.
51. Kalmokoff M, Lanthier P, Tremblay T-L, Foss M, Lau PC, Sanders G, Austin J, Kelly J, Szymanski CM. (2006). Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *Journal of Bacteriology.* 188: 4312-4320.
52. Klančnik, A, Piskernik S, Jeršek B, and Možina SS. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 121-126.
53. Konkel M, Hayes S, Joens L, Cieplak W. 1992. Characteristics of the internalization and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human epithelial cells cultures. *Microbial Pathogenesis.* 13:357-360.
54. Konkel M, Monteville M, Rivera V, Joens L. 2001. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni* mediated enteritis. *Current Issues in Intestinal Microbiology.* 2(2):55-71.
55. Khan M, Zahin M, Hasan S, Husain F, Ahmad I. 2009. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Letters in Applied Microbiology.* 49:354–360
56. Kisko G, Roller S. 2005. Carvacrol and p-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *MBC Microbiology.* 5(36):1471-2180.
57. Krause-Gruszczynska M, Van Alphen LB, Oyarzabal OA, Alter T, Hänel I, Schliephake A, König W, Van Putten JP, Konkel ME, Backert S. (2007). Expression patterns and role of the CadF protein in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 274: 9–16.

58. Lambert R, Nychas J. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal in Applied Microbiology*. 91:453-462.
59. Lee K, Wan S, Jeesun L, Sunyoung N, Min Y, Seong W, Youngh K, Sae H, Woojun P, and Sungsu P. 2009. Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*. 72(2):325-331
60. Lewis HA, Furlong EB, Laubert B, Eroshkina GA, Batiyenko Y, Adams JM, Bergseid MG, Marsh CD, Peat TS, Sanderson WE. (2001). A structural genomics approach to the study of quorum sensing: crystal structures of three LuxS orthologs. *Structure*. 9: 527-537.
61. Logan S, Trust T. 1984. Structural and antigenic heterogeneity of lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infection and Immunity*. 45: 210-216.
62. Lu L, Hume M, Pillai S. 2004. Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with food additives. *Journal of Food Protection* 67(7):1457–62.
63. Manssouri S, Foroumadi A, Ghaneie T, Najar A. 2001. Antibacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of *Myrtus communis*. *Pharmaceut Biol*. 39(5): 399-401.
64. McDevitt D, Payne D, Holmes D, Rosemberg M. 2002. Novel targets for the future development of antibacterial agents. *Journal of Applied Microbiology*. Symposium supplement. 92:28-34.
65. McSweegan E, Walker R. 1986. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infection and Immunity* 53 (1):141-148.



66. Milton, DL. (2006). Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology*. 296: 61-71
67. Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME. (2003). Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology*. 149:153-165.
68. Moretro T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S. (2003). Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among Staphylococci from food and food processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 5648-5655.
69. Morooka T, Umeda A, Amako K. 1985. Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*. *Journal of General Microbiology*. 131:1973-1980.
70. Nachamkin I, Allos B, Ho T. 1998. *Campylobacter* species and Guillian Barré syndrome. *Clinical Microbiology Reviews*. 11:555-567.
71. Nachamkin I. 2002. Chronic effects of *Campylobacter* infection. *Microbes and Infection*. 4(4):399-403.
72. Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Izumi H, Nakamura T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 50:889-893.
73. Nannapaneni, R., Chalova, V. I., Crandall, P. G., Ricke, S. C., Johnson, M. G., O'Bryan, C. A. (2009). *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. *International Journal of Food Microbiology*. 129: 43-49.

74. Negi, PS. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*. 156: 7-17.
75. Orla M, Barbara T, Connie E, Chin Y, Pina M. 2002. Quorum sensing and production of autoinducer-2 in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(9):4666–4671.
76. Paulo A, Pimentel M, Viegas S, Pires I, Duarte A, Cabrita J, Gomes E. 1994. *Cryptolepis sanguinolenta* activity against diarrheal bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 44(2):73-76.
77. Pearson J, Passador L, Iglewski, B, Greenberg E. 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92:1490–1494.
78. Peixoto JS, Comar JF, Moreira CT, Soares AA, de Oliveira A, Bracht A, Peralta RM. 2012. Effects of *Citrus aurantium* (bitter orange) fruit extracts and p-synephrine on metabolic fluxes in the rat liver. *Molecules*. 17(5), 5854-5869.
79. Persson T, Thomas H, Thomas B, Mette E, Michael G, John N. 2005. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Organic Biomolecular Chemistry*. 3:253-262
80. Preeti M, Craig T, Konkel M. 2009. Culture of *Campylobacter jejuni* with sodium deoxycholate induces virulence gene expression. *Journal of Bacteriology*. 10:1128
81. Ravishankar S, Libin Z, Law B, Joens L, and Mendel F. 2008. Plant derived compounds Inactivate Antibiotic-Resistant *Campylobacter jejuni* strains. *Journal of Food Protection*. Vol. 71, 6:1145-1149.

82. Ren D, Zuo R, Gonzalez B, Bedzyk L, Eldrige G, Pasmore M, Wood T. 2005. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 4022–4034
83. Reeser R, Robert T, Stephen J, Helen J, Lynn A. 2007. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied Environmental Microbiology*. 76 (6):1908–1913
84. Richards J, Catherine S, Christian M. 2009. Effects of N-pyrrole substitution on the anti-biofilm activities of oroidin derivatives against *Acinetobacter baumannii*. *Bioorganic Medical Chemistry Letters* 18:4325–4327
85. Ripabelli G, Tamburro M, Minelli F, Leone A, Sammarco ML. 2010. Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 33:355-364.
86. Roy, V, Adams BL, Bentley WE. (2011). Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. *Enzyme and Microbiological Thecnology*. 49: 113-123.
87. Ryu J, Kim H, Frank J, Beuchat L. 2004. Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. *Letters in Applied Microbiology*. 39:359–362.
88. Sánchez E, García S and Heredia N. 2010 Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (20): 6888-6894.
89. Shauder S, Bassler B. 2001. The languages of bacteria. *Gene and Development*.15:1468-1480.

90. Smith J, Fratamico P, Novak J. 2004. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection*. 67:1053–70.
91. Smith –Palmer A, Stewart J, Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 26: 118-122.
92. Soni K, Lu L, Jesudhasan P, Hume M, Pillai S. 2008. Influence of autoinducer-2 (AI-2) and beef sample extracts on *E. coli* O157:H7. Survival and gene expression of virulence genes *yadK* and *hha*. *Food Microbiology and Safety*. 73(3):135-139.
93. Sun J, Daniel R., Wagner-Döbler I, Zeng AP. (2004). Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evolutionary Biology*. 4: 36.
94. Surette M, Blesser B. 1998. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella thypimurium*. *Proceedings of the National Academy of Science*. 95:7046-7050.
95. Surette M, Miller M, Blesser B. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella ser.Thypimurium* and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Science*. 96:1639-1644.
96. Szymanski C, King M, Haardt M, Armstrong G. 1995. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infection and Immunity*. 63: 4295-4300.
97. Tassou C, Drosinos E, Nychas G. 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4° and 10°C. *Journal of Applied Bacteriology*. 78:593-600.

98. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T, Linuma M. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 50: 27-34.
99. Valtierra R, Heredia N, García S, Sánchez E. 2009. Reduction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry skin by fruit extracts. *Journal of Food Protection*. 73(3):477-82.
100. Vanhoff R, Gordts B, Dierickx R, Coignau H, Butzler J. 1980. Bacteriostatic and bactericidal activities of 24 antimicrobial agents against *Campylobacter fetus* sbsp. *jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 18(1):118-121.
101. Van-Vliet A, Keteley J. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology*. 90: 45- 56.
102. Vikram, A., Jesudhasan, P. R., Jayaprakasha, G., Pillai, S. D., Patil, B. S. (2011). Citrus limonoids interfere with *Vibrio harveyi* cell–cell signalling and biofilm formation by modulating the response regulator LuxO. *Microbiology*. 157: 99-110.
103. Wassenaar T. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clinical Microbiology Reviews*. 10(3):466-476
104. Wassenaar T, Newel D. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:1-9.
105. Waters C, Bassler B. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 21:319–46.
106. Widmer K, Soni K, Hume M, Beier R, Jesudhasan P, Pillai S. 2007. Identification of Poultry meat-derived fatty acids functioning as quorum sensing

- signal inhibitors to autoinducer-2 (AI-2). *Journal of Food Science*. 72(9):363-368
107. Xavier K, Bassler B. 2005. Regulation of uptake and processing of the quorum sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187:238–48.
108. Yoon Y, Sofos J. 2008. Autoinducer -2 activity of gram-negative foodborne pathogenic bacteria and its influence on biofilm formation. 2008. *Journal of Food Science*. 73(3)140-145.
109. Ziwei L, Gauri M. 2003. Inactivation of microorganisms in apple cider using spice powders, extracts and oils as antimicrobials with and without low-energy electric field. *Food Agricultural and Environmental*. 1(2):28-33.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

SANDRA LORUHAMA CASTILLO HERNÁNDEZ

CANDIDATO PARA EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA.

TESIS: Extractos de cítricos como inhibidores del “quórum sensing” en *Campylobacter jejuni* y su efecto sobre algunos factores de virulencia relacionados.

CAMPO DE ESTUDIO: Fisiología de Microorganismos.

Datos personales: Nacida el 21 de Enero de 1972, hija de Alejandro Castillo Sanchez y Sandra Hernandez Leal.

EDUCACIÓN: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Obtuvo el grado de Maestro en ciencias con especialidad en Microbiología en el año de 2008 en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

EXPERIENCIA PROFESIONAL: Investigador de Tiempo Completo desde 2005 y Maestro por Horas desde 2011, en la Facultad de Ciencias Biológicas UANL.