



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

ITM

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS MIELES APIS,
MELIPONA Y TRIGONA EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
DE VIRULENCIA DE *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311”**

OPCIÓN
TÉSIS PROFESIONAL

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
IBQ. GABRIEL OSWALDO VÁRGUEZ CRUZ

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO

Instituto Tecnológico de Mérida

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-259/19

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Mérida, Yucatán, 04/junio/2019

C. VÁRGUEZ CRUZ GABRIEL OSWALDO
Pasante de la Maestría en Ciencias de los
Alimentos y Biotecnología
PRESENTE

De acuerdo al fallo emitido por su asesor el **Dr. Denis Israel Magaña Ortíz** co-asesorado por la **Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez**, y la comisión revisora integrada por el M.C. Jesús Manuel Ramón Sierra, el Dr. Jesús Alejandro Yam Puc y la Dra. Marianne Soledad Luna Rivero, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

"EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS MIELES DE APIS, MELIPONA Y TRIGONA EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA DE *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311"

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica

M.C. DANIEL ARCÁNGEL LÓPEZ SAURI
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
DALs/fja



S.E.P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MERIDA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION



SEP Instituto Tecnológico de Mérida, Km.5 Carretera Mérida-Progreso A.P 911
C.P 97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-50-00, Ext. 10001, 10401
10601, 10201 e-mail:itm@itmerida.mx http://www.itmerida.mx



DEDICATORIAS

Esta tesis va dedicada con mucho amor y cariño.

A mi familia, mis padres Gabriel de Jesús y María Guadalupe que me pudieron guiar y ayudar en todo lo que estuvo a su disposición, que hoy pueden ver en mi todos sus esfuerzos logrados, gracias a ustedes soy lo que soy.

A mi hermanita Melissa Imelda que siempre me apoyo en todo este proceso y que siempre será mi compañera y amiga.

A mi sobrina Melissa Estefanía que a pesar de su corta edad me ayudo en los momentos difíciles alegrándome esos días, y que también me ayudo a ser más paciente y tolerante en muchos aspectos.

A mis amigos y familia que hasta el día de hoy sigo contando con ellos en las buenas y malas.

A mi abuelito † Alfredo Rubén Vázquez que me supo enseñar el verdadero valor de la vida y que siempre supo darme un buen consejo cuando más lo necesitaba.

Esta tesis es para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO:

A la Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez por aceptarme en el laboratorio para realizar la tesis de licenciatura y maestría y cada uno de los objetivos que me he planteado desde que entre al laboratorio, por su inigualable apoyo, asesoría y la confianza que me otorgo en el trabajo realizado, y sobre todo le agradezco por creer en mí para la realización de esta tesis.

Al Dr. Denis Magaña Ortiz que me dio la oportunidad de realizar un proyecto diferente, en el cual supo guiarme y canalizarme, así como en la resolución de las dudas que se me presentaron a lo largo de la maestría.

Al Dr. Jesús Alejandro Yam Puc por formar parte de mi comité y por sus aportaciones en la revisión y corrección de mi trabajo, de igual manera agradezco toda la atención y amistad brindada durante el proceso de realización de la tesis.

A la Dra. Marianne Luna Rivero por las revisiones y observaciones dadas a esta tesis.

Al M.C. Jesús Ramón Sierra, al M.C. Ezequiel López Baños y M.C. Enrique Peraza que supieron apoyarme y guiarme en los momentos más difíciles de la realización de este proyecto, así como sus valiosas aportaciones al mismo, son de las pocas personas a las cuales las considero mis amigos.

Al CONACYT por la beca número 816225, con la cual se pudo terminar los estudios pertenecientes a la maestría.

A mis compañeros de laboratorio de microbiología aplicada y molecular por haberme hecho mena mi estancia en el laboratorio que con disgustos y alegrías la pasamos bien. A Jesús, Ezequiel, Enrique, Daniel, Alfredo, Erik, Nalliely, Roberto, Elva, Erika, Gloria, Pamela, Myriam, Isela, Aaron, Jessica, Rubiel.

A mis nuevos amigos que por asares del destino los conocí y que a pesar de la distancia aun me saben brindar su amistad y apoyo Celia, Alejandra, Deyanira, Mónica, Alexis, Jessica, Claudia, Magdalena, Marcos, Dinora y como siempre especialmente a Iván Martínez que no solo me ha brindado su amistad si no que sigue siendo como un hermano para mí.

Al Dr. Víctor Bustamante, por la estancia realizada en su laboratorio donde pude aprender mucho y así poder enriquecer esta tesis.

A mis padres Gabriel de Jesús y María Guadalupe por darme la vida, y que sin ellos y su apoyo incondicional no hubiese podido conseguir lo que hasta ahora he logrado, la tenacidad y la lucha que siempre han tenido con la vida para poder solventar mis gastos, han hecho de ellos un gran ejemplo a seguir. Solo me quedan palabras de agradecimiento hacia ustedes papás.

A mi hermanita Melissa Imelda que a lo largo de mi vida ha creído siempre en mí, sin dudar de mis habilidades.

A mi sobrina Melissa Estefanía que es una gran motivación que siempre me impulsa para llegar lejos.

A mis familiares que me ayudaron, tanto con consejos como económicamente y por los buenos momentos que vivimos gracias!!! abuelos, tíos y primos.

Especialmente agradezco a mi abuelito †Rubén Vázquez que por desgracia nos dejó en el camino, pero que ya sabía de lo que yo hacía y que siempre me apoyo y siempre me inspiro a llegar a lo más alto, fue una de las personas que marco mi vida con grandes enseñanzas y es una de las personas a la que va dedicada esta tesis con todo el amor, cariño y respeto que merece.

A todos de todo corazón. !!!!Muchas gracias!!!!

ÍNDICE GENERAL	PÁGINAS
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	VIII
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	3
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	3
2.1 Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA).....	3
2.2 Género salmonella y su clasificación.	4
2.3. Casos a nivel mundial.....	5
2.4 Enfermedades causadas <i>por Salmonella spp.</i>	7
2.5 Factores de virulencia de <i>Salmonella Typhimurium</i>	9
2.5.1 Adhesión.....	9
2.5.2 Invasión.....	10
2.5.3 Infección sistémica.....	12
2.6 Islas de patogenicidad.....	13
2.6.1. Regulación de las islas de patogenicidad.....	16
2.6.2. Sistema de secreción de tipo III.....	17
2.7 Resistencia a los antibióticos por parte de <i>Salmonella Typhimurium</i> .	20
2.8. Búsqueda de nuevas alternativas para el control de patógenos.....	21

2.9 La miel.....	22
2.9.1 Características de la miel.....	22
2.9.2 Componentes de la miel con actividad antimicrobiana.....	24
2.9.2.1 Osmolaridad.....	24
2.9.2.2 Peróxido de hidrogeno	25
2.9.2.3 Compuestos fenólicos	25
2.9.2.4 Proteínas y aminoácidos.....	26
2.2.5 Otros compuestos con actividad.....	28
CAPÍTULO III.....	30
JUSTIFICACIÓN.....	30
CAPÍTULO IV.....	30
HIPÓTESIS.....	30
CAPÍTULO V.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
CAPITULO VI	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1 Materia prima.....	32
6.2 Determinación de los parámetros fisicoquímicos	33
6.2.1. Grados brix.....	33
6.2.2 pH y acidez libre.....	33
6.3. Determinación de la actividad antimicrobiana, concentración mínima inhibitoria y bactericida(CMI y CMB) por el método de microdilución.....	33

6.4.Determinación de la actividad antibacteriana de la miel tratada con catalasa.....	35
6.5 Extracción de ADN <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 1331	36
6.5.1 Electroforesis	37
6.6 Diseño de primers	37
6.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en ingles)	38
6.7 Extracción de ARN de <i>Salmonella</i> Typhimurium	39
6.7.1 Síntesis de ADNc	41
6.7.2 Evaluación de la expresión génica de <i>Salmonella</i> Typhimurium	41
6.8 Evaluación del perfil de sobrevivencia bacteriana en presencia de las mieles de Apis, Melipona y Trigona.....	42
CAPÍTULO VII.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
7.1. Determinación de los parámetros fisicoquímicos de acuerdo a la norma.....	43
7.2 Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	44
7.3. Actividad antimicrobiana, CMI y CMB de las mieles en contra de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	45
7.4. Determinación de la actividad antibacteriana de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI´S) con catalasa.....	49
7.5. Extracción de ADN de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311 y la evaluación de los genes housekeeping y virulencia por PCR.....	51

7.6 Extracción de ARN de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	55
7.7 Análisis de la expresión génica por qRT-PCR	56
7.8 Evaluación del perfil de sobrevivencia bacteriana en presencia de las mieles de Apis, Melipona y Trigona.....	61
CAPÍTULO VIII.....	63
CONCLUSIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	66
ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE TABLAS	PÁGINAS
Tabla 1. Variedades de <i>Salmonella entérica</i>	9
Tabla 2. Péptidos identificados en la miel.....	28
Tabla 3. Genes housekeeping para <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311.....	38
Tabla 4. Genes de virulencia para <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311.....	39
Tabla 5. Comparación de los parámetros fisicoquímicos de las 3 mieles con la norma.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINAS
Figura 1. <i>Salmonella</i> Typhimurium vista a través de una microscopia de barrido electrónico (S.E.M.)	5
Figura 2. Principal vía de infección de <i>salmonella</i> en el ser humano	6
Figura 3. Proceso de invasión y respuesta del cuerpo a <i>Salmonella</i>	13
Figura 4. Agrupación de genes y factores de virulencia (islas de patogenicidad)	16
Figura 5. Comparación de la estructura del flagelo con el sistema de secreción de tipo 3 (SSTIII)	19
Figura 6. Diferentes especies de abejas; A) <i>Apis mellífera</i> , B) <i>Melipona beecheii</i> , C) <i>Trigona nigra</i>	23
Figura 7. Compuestos fenólicos reportados en las mieles de Apis y Melipona	26
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	45
Figura 9. Rango de la CMB de la miel de Apis en contra de <i>Salmonella</i> Typhimurium.	47
Figura 10. Rango de la CMB de la miel de Melipona en contra de <i>Salmonella</i> Typhimurium	47
Figura 11. Rango de la CMB de la miel de Trigona en contra de <i>Salmonella</i> Typhimurium	48

Figura 12. Rango de la CMB de la miel sintética contra <i>Salmonella</i> Typhimurium	48
Figura 13. Comparación de las CMI de cada una de las mieles con el tratamiento con catalasa A) miel de Trigona, B) miel de Apis, C) miel de Melipona	50
Figura 14. Visualización del gel de agarosa 0.8% de ADN bacteriano	51
Figura 15. Validación de los oligos por PCR y visualizados en gel de agarosa 0.8% los genes housekeeping: A) Acek, B) GapA, C) Gnd, D) Mdh, E) Putp en gradiente de temperatura.	52
Figura 16. Validación de los oligos por PCR y visualizados en gel de agarosa 0.8% con los genes de virulencia A) InvA, B) OrgA, C) SseF, D) SthB, E) FimA, F) InvH en gradiente de temperatura	53
Figura 17. Validación por PCR de los oligos y visualizados en gel de agarosa 0.8% housekeeping para el análisis de la expresión génica A) Acek, B) GapA, C) Gnd, D) Mdh, E) Putp	53
Figura 18. Validación de los oligos por PCR y visualizados en gel de agarosa 0.8%, con los genes de virulencia para la prueba expresión génica A) InvA, B) InvH, C) Sthb, D) FimA, E) OrgA, F) SseF	54
Figura 19. Extracción de ARN de <i>Salmonella</i> Typhimurium y en concentración subletales del 3% de miel 1) Control, 2) tratamiento con la miel de Apis, 3) tratamiento con la miel de Melipona, 4) tratamiento con la miel de Trigona	56
Figura 20. Curva de temperatura de fusión de los genes housekeeping y	58

de virulencia, cada color corresponde a un gen respectivamente, se muestra una sola amplificación, demostrando que los oligos son específicos y que los resultados son confiables

Figura 21. Comparación de la expresión génica de *Salmonella* 59

Typhimurium en presencia de la miel de Apis de los genes de InvA, FimA, OrgA

Figura 22. Comparación de la expresión génica de *Salmonella* 59

Typhimurium en presencia de la miel de Melipona de los genes de InvA, FimA, OrgA

Figura 23. Comparación de la expresión génica de *Salmonella* 60

Typhimurium en presencia de la miel de Trigona de los genes de InvA, FimA, OrgA

Figura 24. Perfil de sobrevivencia bacteriana en presencia de los 63

diferentes antibióticos (ampicilina, ciprofloxacino y trimetropin/sulfametazaxol) y las mieles (Apis, Melipona, Trigona)

RESUMEN

Los patógenos transmitidos por alimentos son una preocupación creciente a nivel mundial debido a que muchas especies bacterianas han mostrado resistencia a los antibióticos disponibles. Recientemente se ha revalorizado el uso de productos naturales con actividad antimicrobiana en contra de estos patógenos, y uno de estos productos es la miel de abeja que alrededor del mundo ha demostrado tener actividad contra diferentes microorganismos. En el presente trabajo se determinó la actividad antimicrobiana de tres mieles de diferentes especies de abejas (*Apis mellífera*, *Melipona beecheii*, *Trigona (Frieseomelitta) nigra*) usando como control una miel sintética (complejo de azúcares mayoritarios), así como la evaluación de la expresión génica de genes de virulencia en contra de *Salmonella* Typhimurium, con la finalidad de determinar, si el complejo de azúcares presentes en la miel es el responsable de la actividad antibacteriana. La actividad antibacteriana se evaluó por el método de microdilución para la obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Obteniendo los siguientes resultados: una misma concentración en la CMI y CMB para las tres mieles: Trigona 7% V/V, Apis 9% V/V, Melipona 8% V/V. La miel sintética tuvo 32% una CMI y 55% de CMB.

Se realizó un tratamiento con catalasa a dos de las mieles, las cuales no demostraron actividad, en comparación con la miel de Trigona la cual mantuvo un ligero efecto en el crecimiento bacteriano. De igual manera, se evaluó si la miel a concentraciones que no modificaran el crecimiento afectaba la expresión génica de los genes de virulencia de *S. Typhimurium*, obteniendo que la expresión de los genes de Fim y InvA son afectados por las tres mieles en diferentes niveles.

Las tres mieles mostraron tener un efecto antibacteriano a bajas concentraciones contra de *Salmonella* Typhimurium, sin embargo se pudo observar que la miel de Trigona pudo inhibir completamente al microorganismo y disminuir su crecimiento en el tratamiento con catalasa, también obtuvo la mejor represión de los genes de virulencia en cuanto a las dos mieles probadas.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es causada por bacterias del género *Salmonella* teniendo una relevancia importante a nivel mundial, sobre todo en países tercermundistas, debido a las condiciones de higiene que se presentan principalmente en los niños, los cuales son los más afectados. Dicha enfermedad comúnmente es transmitida por alimentos de origen animal, como carne, huevo y pollo, especialmente en países en vías de desarrollo, colocándola así como un problema de salud pública. Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que cada año afecta anualmente a miles de personas de todo el mundo, provocando más de cien mil defunciones cada año (OMS, 2005). Esta enfermedad es generada por la especie *Salmonella enterica*, que se divide en alrededor de 2500 serotipos, entre los cuales se encuentra *S. Typhimurium*, que ha sido aislado frecuentemente de pacientes con salmonelosis y cuadros de diarrea aguda. Se han encontrado cepas de *S. Typhimurium* resistentes a estreptomycin, cefalosporinas, entre otros antibióticos (McCkelland y colaboradores., 2001).

La miel de abeja ha sido usada mundialmente como edulcorante y alimento, pero también se ha empleado para tratar diferentes enfermedades ocasionadas por microorganismos. Actualmente, Yucatán es el principal productor a nivel nacional, esta miel es proveniente de la abeja *Apis mellifera*. Aunque existen otras especies productoras de miel en la región que son poco conocidas y en menor instancia

cultivadas, que son las abejas sin aguijón, como *Melipona beecheii* y *Trigona (Frieseomelitta) nigra*.

En la península de Yucatán se ha utilizado la miel de abeja sin aguijón desde tiempos ancestrales en la medicina tradicional, debido a sus propiedades cicatrizantes y antimicrobianas que ayudan en el tratamiento de heridas provocadas por cortaduras, de igual manera para el tratamiento de enfermedades de vías respiratorias, gastrointestinales y oculares (Michener, 2007; González Acereto & Quezada Euan, 2010)..

Actualmente, la resistencia bacteriana a fármacos es un grave problema en todo el mundo, lo que ha orillado a los científicos a la búsqueda de nuevas alternativas, como el uso de productos naturales, como la miel; es por eso que el presente trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto antimicrobiano de las mieles de Apis, Melipona y Trigona, así como su efecto en la expresión de genes de virulencia de *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA)

Las ETA son aquellas enfermedades que se transmiten por la ingestión de alimentos infectados con microorganismos en concentraciones suficientes para afectar la salud del ser humano. Existen numerosos tipos de ETA que presentan diferentes cuadros clínicos, dependiendo del tipo de contaminación y de la cantidad de alimento contaminado consumido. Los síntomas más comunes que se presentan son vómitos y diarreas y en menor instancia dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, mareos entre otros. Además, ciertas ETA pueden generar enfermedades crónicas a largo plazo tales como daños renales, artritis, meningitis, aborto y en casos extremos, la muerte (Butzby & Roberts, 1996; Rocourt y col., 2003).

Algunos ejemplos de infecciones alimentarias son: la toxoplasmosis, la listeriosis, la triquinosis, la hepatitis A, la salmonelosis, etc. (Butzby & Roberts, 1996; Jay, 2002), todas estas enfermedades tienen en común que son producidas por microorganismos patógenos como es el caso de *Salmonella spp.* que produce la salmonelosis.

2.2 Genero *Salmonella* y su clasificación

Salmonella es un bacilo Gram negativo que se comporta como patógeno intracelular facultativo, que se divide en dos especies predominantes *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, esta división se basa tomando en cuenta sus características bioquímicas generales. Esta última especie se subdivide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*; las salmonelas de mayor importancia médica pertenecen a las subespecies *enterica* y *arizonae* de las cuales se desprenden varias serovariedades. Por lo que la nomenclatura con la que se maneja estas subespecie quedaría de la siguiente manera *Salmonella enterica* serovar Typhi, *S. entérica* serovar Paratyphi, *S. entérica* serovar Typhimurium (figura 1) nombradas así generalmente con un nombre relacionado a al lugar de donde se aisló (Lucas y col., 2000; McCKelland y col., 2001), siendo estas serovariedades de las mas estudiadas debido a la infección que causa al ser humano. En el caso, de las serovariedades pertenecientes a las subespecies restantes de *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori* (escasas en patología humana y animal) se designan con el nombre de la subespecie, seguido de la formula antigénica, como por ejemplo *Salmonella* IV 50:b:- o *Salmonella* IV 44:a:-. (Grimont & Weill, 2007; Tindall y col., 2005).

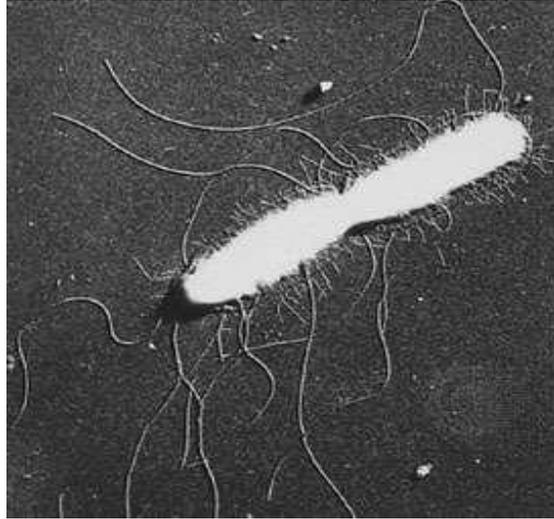


Figura 1. *Salmonella* Typhimurium vista a través de una microscopia de barrido electrónico (S.E.M.)

Según la clasificación del esquema de Kauffman-White basado en antígenos somáticos, flagelares y ocasionalmente capsular, las salmonelas se clasifican en más de 2,500 serotipos, que pueden ser móviles o inmóviles. Hay situaciones en las que es preciso realizar más estudios en la diferenciación dentro del serotipo correspondiente, para tal fin se utiliza la fagotipificación, sobre todo para las cepas causantes de epidemias en el hombre (Rabsch y col., 2002).

2.3 Casos a nivel mundial

Se estima que se presentan más de 16 millones de casos de fiebre tifoidea por año con aproximadamente 6 millones de casos fatales y 1,300 millones de casos de gastroenteritis con una mortalidad que alcanza los 3 millones. En México en 1998 se notificaron 215,155 casos de salmonelosis siendo los estados más afectados Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo, siendo el año con más casos reportados hasta el momento. Anualmente se reportan alrededor de 68,000 casos de salmonelosis en donde *Salmonella* es el género bacteriano que ocasiona mayores pérdidas a la industria avícola, así como problemas de salud pública para el consumidor (figura 2). En un estudio realizado por (Zaidi y colaboradores en 2006) se colectaron 2,893 muestras fecales de niños con diarrea, 5334 muestras de carne de pollo, puerco y res, y 1,882 muestras de intestinos de pollo, cerdo y bovino. Lograron aislar bacterias del género *Salmonella* no-Typhi en 12,8% de los pacientes con diarrea. Ellos también encontraron 2 serovariedades que se presentaron con frecuencia siendo Typhimurium (22,2%) y Enteritidis (14,5%). La primera se encontró en las carnes crudas de los tres tipos de animales analizados, siendo el cerdo el reservorio principal (10,2%), seguido por bovino (6,8%) y por último el pollo (4,6%) mientras *Salmonella* Enteritidis se aisló casi exclusivamente de pollo. De tal manera que *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis fueron las serovariedades más frecuentemente aisladas de niños con diarrea; además, junto con *Salmonella* Typhi, han sido causa de sepsis y meningitis fatales (Salyers & Whitt, 2002).

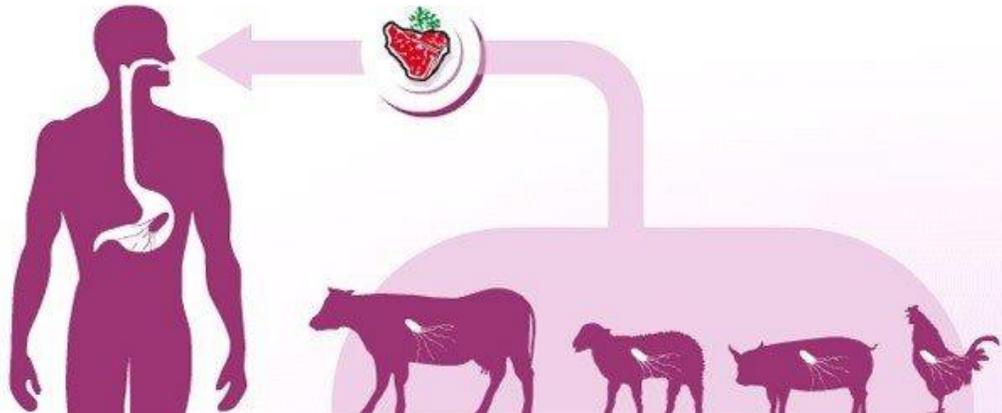


Figura 2. Principal vía de infección de salmonella al ser humano

2.4 Enfermedades causadas por *Salmonella spp.*

Uno de los patógenos entéricos más frecuentes tanto en países desarrollados como subdesarrollados es *Salmonella spp.*, la cual dependiendo de su especie, tamaño del inóculo, factores de virulencia expresados por la cepa bacteriana, hospedero involucrado, estado inmunológico del paciente e intervención médica puede ocasionar desde una infección gastrointestinal media a severa hasta una infección sistémica que compromete la vida del paciente.

Las cepas de salmonella entérica que causan infección en humanos pueden subdividirse en 2 grupos:

Por un lado, las denominadas salmonelas tifoideas las cuales son altamente invasivas en humanos y producen generalmente una infección sistémica severa denominada fiebre entérica o fiebre tifoidea. Los serotipos de *Salmonella* asociados con la fiebre entérica son Typhi y Paratyphi A, que son patógenos exclusivos del hombre, aunque Paratyphi B, Paratyphi C y Sendai también pueden causarla pero en menor proporción. Los aislamientos pertenecientes a estos últimos serotipos son muy poco frecuentes. El mecanismo por el cual infectan al ser humano es ingresando por la boca y posteriormente llegando al intestino delgado y multiplicándose durante un periodo de incubación de 3 a 4 días, para después adherirse a las vellosidades del íleon. *Salmonella* a través de las placas de Peyer llega al epitelio intestinal, a continuación se desplaza e invade los folículos linfoides intestinales reproduciéndose en su interior. A través de los monocitos llega a los vasos linfáticos mesentéricos, desplazándose hasta el torrente sanguíneo (Romero, 2007). Existe una alta probabilidad de adquirir la infección con inóculos (cantidad de bacterias requeridas para la infección), superiores a 10^6 y especialmente con 10^9 bacterias.

Por otra parte, el grupo de las denominadas salmonelas no tifoideas (SNT) son aquellas que producen cuadros de gastroenteritis y raramente atraviesan la barrera intestinal. Este grupo está integrado por cientos de serotipos distintos de los cuales prevalecen claramente unos pocos. Algunos de estos serotipos se presentan en varias partes del mundo, y poseen un amplio rango de hospedadores posibles, como es el caso de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* que han sido aisladas de aves, ratones, ganado bovino,

ganado ovino, perros y muchas otras especies animales, además del hombre. Un grupo más pequeño de serotipos, poseen una cantidad más restringida de hospedadores. Este es el caso de *S. Choleraesuis* y *S. Dublin*, que generalmente causan infección sistémica en los cerdos y el ganado bovino respectivamente, pero que ocasionalmente pueden infectar otras especies, incluyendo al hombre.

Las bacterias invaden la mucosa y se replican en la submucosa. En este caso, la enfermedad gastrointestinal puede avanzar a un cuadro más severo que involucra la infección sistémica. Durante el curso de las bacteriemias puede producirse infección en cualquier órgano: endocardio, endotelio vascular previamente dañado, tracto urinario, pulmón (neumonía o empiema), hígado y bazo (abscesos), vesícula (colecistitis), articulaciones, médula ósea, meninges (especialmente en niños), cerebro. Sin embargo, los mecanismo por los cuales *Salmonella* induce la diarrea y la septicemia no se han detallado completamente, pero parece ser un fenómeno complejo que involucra varios factores de virulencia (Haraga y col., 2008), en la tabla 1 se muestran las diferentes variedades de *Salmonella enterica* de acuerdo a (Grimont P. , 2013).

Tabla 1. VARIEDADES DE <i>Salmonella enterica</i>			
Especie	Sub-especie	Grupo	Serotipo
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	A	<i>S. paratyphoid</i> A,B,C
		B	<i>S. schottmuelleri</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S.heldelberg</i>
		C	<i>S. hirschfeldii</i> <i>S. newport</i> <i>S. montevideo</i>
		D	<i>S. typhi</i> <i>S.enteritidis</i> <i>S. dublin</i> <i>S. sendai</i>
		E	<i>S. anatum</i>
			<i>salamae</i> (II) <i>arizonae</i> (III) <i>diarizonae</i> (IV) <i>houtonae</i> (V) <i>indica</i> (VI)

2.5 Factores de virulencia de *Salmonella* Typhimurium

Desde que *Salmonella* está presente en los alimentos requiere mecanismos genéticos que le permitan adaptarse y sobrevivir a las condiciones que encuentra, cuando estos alimentos son consumidos por el ser humano, esta bacteria se encuentra en condiciones adversas para su crecimiento por lo que es capaz de inducir ciertos mecanismos que le ayudan a su sobrevivencia e internalización dentro del intestino.

2.5.1 Adhesión

El primer evento que ocurre es la adherencia, para esto *Salmonella* requiere adherirse a uno o más tipos de células del tejido intestinal, utilizando diferentes tipos de fimbrias, las cuales están definidas genéticamente en operones, como la fimbria tipo 1 (*Fim*), tipo 3 (*Mrk*) y *lpf*, cada uno de estos genes actúa dependiendo de las condiciones en que el microorganismo esté expuesto, con la finalidad de poder realizar la adhesión en los diferentes tipos celulares. El operón *Lpf*ABCDE se encuentra localizado en el centisoma 80 de *S. entérica* serovar Typhimurium y está rodeado por secuencias similares a las descritas en *E. coli* K12 y O157:H7, sugiriendo que dicho operón pudo haber sido adquirido por transferencia horizontal durante la evolución, éste codifica para factores de adherencia que interactúan con las células M, dichas células son enterocitos especializados en la captación de antígenos lumbinales, carecen de recubrimiento de

proteínas glicosiladas y en la superficie luminal presentan pliegues en lugar de las microvellosidades características del resto de enterocitos (Baumler y col., 1997).

2.5.2 Invasión

Muchos microorganismos patógenos son capaces de entrar y sobrevivir dentro de las células eucarióticas. *Salmonella* dirige su arribo a células del hospedero que normalmente no son fagocíticas como la superficie de la mucosa de las células epiteliales. Posiblemente, esta técnica de invasión asegura un nicho celular protegido para que la bacteria se replique o persista.

Salmonella invade las células del hospedero por un mecanismo conocido como jeringa molecular. La bacteria envía señales a las células epiteliales que inducen los rearrreglos del citoesqueleto dando lugar a la formación de ondulamientos en la superficie del epitelio, esto como respuesta al contacto del microorganismo. Se reconocen varias proteínas efectoras de SPI-1 (isla de patogenicidad 1), involucradas en los rearrreglos del citoesqueleto: *SipA*, *SopE*, *SopE2* y *SopB*. (Finlay & Cossart, 1997; Goosney y col., 1999). *SipA* es una proteína de unión a actina, que inhibe la despolimerización de F-actina y activa T-plasmina (Galan & Collmer, 1999); *SopE* se comporta como GEF (factor de intercambio de guanina) en las proteínas RhoGTPasas (*CDC42* y *Rac*) induciendo deformación en la membrana, que permite la internalización de *Salmonella* además estimula MAP cinasas (proteína activa Mitogen) (Fu & Galan, 1999). La proteína *SopE2* muestra un 69 % de homología con la secuencia de *SopE*, que activa a

CDC42, la cual actúa con la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) para activar al complejo *Arp2/3*. A su vez este complejo inicia la polimerización de actina y ramifica filamentos de actina (Bakshi y col., 2000). El gen responsable de codificar dicha proteína se encuentra localizado en el centisoma 40-42.

Las proteínas efectoras *SigB*, *SipC* y *sipD* comparten dominio hidrofóbico presente en la familia RTX (toxina formadora de poro), las cuales se comportan como translocasas y son las responsables de formar poros en la membrana de las células eucarióticas. *SipC* se transloca junto con *SipB* de manera dependiente. La proteína *SipD* además regula el sistema de secreción tipo III (SSTIII) de manera similar a *YopN /LcrE* de *Yersinia spp.*, ya que su mutación produce un aumento en la secreción de proteínas efectoras (Collazo & Galan, 1997).

Las proteínas efectoras pudieran ser consideradas toxinas como es el caso de algunas bacterias como *E. coli*, debido a que de alguna manera afectan a la célula huésped, sin embargo a diferencia de éstas, carecen de receptores que las ayudan a la unión con la célula, por lo que son incapaces de tener acceso directo a su sitio de acción, no obstante el SSTIII las ayuda a alcanzar su objetivo. Como es el caso de la penetración de *Salmonella* a la mucosa intestinal la cual, es esencial para causar una infección letal, el hecho de bloquear la penetración a la mucosa intestinal al mutar genes involucrados en invasión, permite obtener cepas atenuadas que pudieran ser utilizados como posibles inmunógenos, lo que ayudaría al cuerpo para poder realizar una respuesta inmune al contagio con esta bacteria.

2.5.3 Infección sistémica

Salmonella produce efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de las células M y la invasión de enterocitos adyacentes, tanto por la cara apical como por la basolateral, de igual manera induciendo apoptosis a macrófagos activados mediante la proteína efectora *SipB* y también una fagocitosis inducida a macrófagos no activados, para así poder ser transportada a hígado y bazo. *SipB* se asocia con la proteasa caspasa I (ICE) que activa a las citocinas proinflamatorias (IL-1 β e IL-18) como se muestra en la figura 3 (Chen y col., 1996; Cotter & Di Rita, 2000).

En el caso particular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se ha reportado que puede llegar al hígado y bazo por una ruta alterna, que no requiere colonización intestinal o invasión de células epiteliales intestinales, la bacteria es llevada directamente del lumen intestinal a circulación, solo en los casos en que los fagocitos expresan CD18 (Vazquez-Torres, y col., 1999).

Los modelos de cultivos celulares *in vitro*, han sido de gran ayuda para poder comprender la interacción entre *Salmonella* y las células huésped, para la identificación de los genes involucrados en el proceso de infección, así como todo el proceso de regulación de dichos genes.

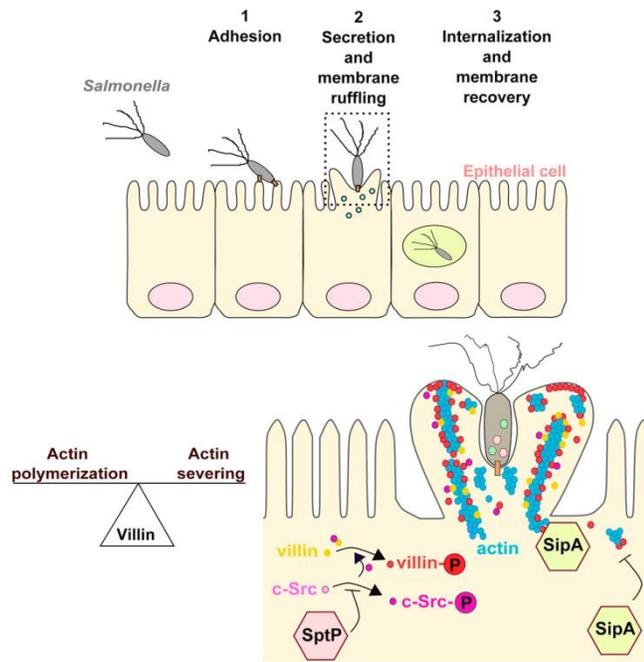


Figura 3. Proceso de invasión y respuesta del cuerpo a Salmonella.

2.6 Islas de patogenicidad

Hasta el momento se han secuenciado varios genomas completos del género *Salmonella*: *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18 (4,809,037 pb), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 (4,857,000 pb) y *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A cepa ATCC 9150 (4,585,229 pb) lo que ha sido de gran ayuda en estudios basados en infección y especificidad que estas bacterias tienen por el hospedero, así como la patogénesis que presentan generalmente dadas por islas de patogenicidad (McCkelland y col., 2001).

Las islas de patogenicidad son un grupo de genes involucrados en codificar factores específicos de virulencia, su porcentaje de G-C difiere del promedio del genoma bacteriano, se presentan repeticiones directas en sus extremos, portan genes que codifican factores de movilidad como integrasas, transposasas o secuencias de inserción y además se encuentran frecuentemente adyacentes a genes de ARNt.

Actualmente se sabe que *Salmonella* cuenta con cinco islas de patogenicidad: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5 (figura 4). La SPI-1 se encuentra presente en *S. bongori* y todas las serovariedades de *S. enterica*, probablemente fue adquirida en la evolución temprana que tuvo *S. entérica*, por transferencia de genes, manera horizontal; lo que se propone al determinar su porcentaje de G-C que va del 42 % al 47 %, mientras que el cromosoma de *Salmonella* tiene un intervalo de 52 % al 54 %, además el tamaño, orden y la orientación de SPI-1 es similar a los genes de invasión del plásmido de *Shigella*. Se ha reportado que la SPI-1 codifica mecanismos que median: la invasión en células del hospedero, produciendo apoptosis en macrófagos, activación de inhibidores de MAP cinasas y factores de transcripción (Hardt y col., 1998).

La SPI-2 también codifica para un SSTIII que se activa cuando la bacteria se encuentra intracelularmente dentro de una vacuola. Se localiza en el centisoma 31, situada inmediatamente adyacente al gen ARNt *VaIV*, su tamaño es de 40 kb y tiene un porcentaje de G-C del 44.6 %. Consta de 32 genes que regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de fagocitos y células epiteliales (Hensel y col., 1998).

Las funciones moleculares de la SPI-2 no han sido caracterizadas con tanto detalle como las de la SPI-1. Las mutantes en dicha isla son severamente atenuadas en la infección sistémica, al ser inoculadas oral o intraperitonealmente.

Los genes que conforman la SPI-2 se pueden dividir de la siguiente manera: *ssa* (aparato del sistema de secreción): representados por *SsaB-E* y *SsaG-V*, cuyos productos conforman el SSTIII (Hensel, y col., 1998) y junto con SPI-1 se encargan de la invasión de *Salmonella* en las células huésped.

La SPI-3 también es requerida para la supervivencia intracelular en macrófagos, provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitadas de Mg^{2+} . Su tamaño es 17 kb y tiene un porcentaje de G-C del 39.8 % - 49.3 %, está localizada en el centisoma 82 inmediatamente adyacente al gen ARNt *selC*.

La SPI-4 codifica un supuesto sistema de secreción tipo I (SSTI) que media la secreción de toxinas y se cree que participa en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular en los macrófagos, es de 27 kb y está compuesta por 18 genes localizados en el centisoma 92.

La SPI-5 es de 7.5 kb se encuentra localizada en el gen ARNt *serT*, centisoma 20; su porcentaje de GC es de 43.6 %. Codifica proteínas efectoras involucradas en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal, como *sopB* (*sigD*) que además de estimular la secreción de cloro, se encuentra involucrada en el flujo de macrófagos. Para su secreción utiliza el SSTIII de la SPI-1 (Marcuy col., 2000).

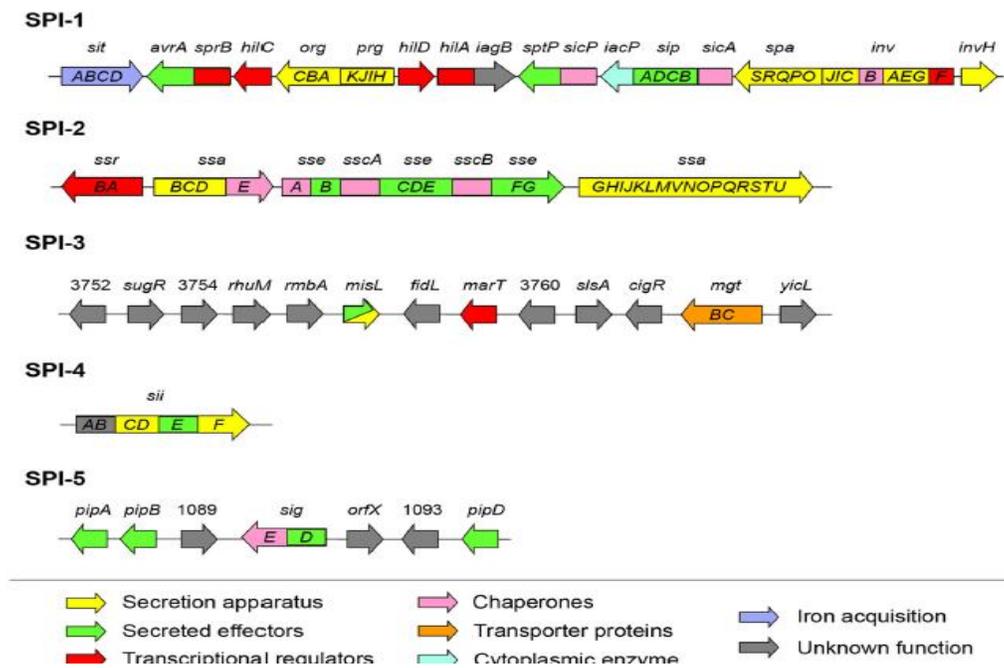


Figura 4. Agrupación de genes y factores de virulencia (islas de patogenicidad)

2.6.1 Regulación de las islas de patogenicidad

Las bacterias se tienen que adaptar a cambios drásticos al entrar al hospedero, viajando a lo largo del aparato digestivo y cambiando de un medio extracelular a uno intracelular, esto lo logran debido a una regulación coordinada y precisa de sus genes. Para lograr dicho control, *Salmonella* utiliza sistemas reguladores de dos componentes

que incluyen un sensor de histidina cinasa (proteína transmembranal) y un regulador de respuesta que se activa por fosforilación, el cual activa o reprime a nivel transcripcional la expresión de un grupo de genes. Los genes *PhoQ/PhoP*, *PmrA/PmrB*, *SsrA/SsrB*, *EnvZ/OmpR* y *BarA/SirA* regulan la invasión bacteriana y la supervivencia intracelular.

La regulación específica de los genes de la SPI-1 está mediada por HilA, un regulador transcripcional de la familia de activadores transcripcionales *OmpR*, el gen responsable de su síntesis está codificado dentro de la SPI-1.

El factor transcripcional *HilA* controla la expresión de los genes que codifican las proteínas del SSTIII, es activador transcripcional del promotor de *InvF*, *SipC*, *SipA*, y *PrgH*, a su vez el promotor de *PrgH* controla la expresión de *OrgA-B* (oxigen regulated genes) y *PrgK* (Kleiny col., 2000).

Una situación menos compleja se ha observado para la regulación de la SPI-2, en este caso un sistema regulador de dos componentes *SsrA/SsrB*, que codifican dentro de la isla de patogenicidad, este componente es requerido para la expresión de los genes de proteínas efectoras, chaperonas y el SSTIII. El gen *SsrA*, está a su vez regulado por el complejo *OmpR/EnvZ*, responsable también de la regulación de *SifA* (Beuzon y col., 2001).

2.6.3 Sistema de secreción de tipo III

El SSTIII de *Salmonella* es muy parecido a la estructura del flagelo (figura 5), este sistema de secreción presenta características notorias que lo hacen único: la proteína secretada no presenta una secuencia señal amino-terminal para que sea liberada, varias de las proteínas efectoras requieren de chaperonas específicas para su secreción. Para la activación completa del sistema, se requiere de una señal inductora que generalmente es el contacto con la célula del hospedero, lo cual permite la translocación de las proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula huésped.

Los componentes estructurales del SSTIII pueden ser divididos en categorías que incluyen: ATPasa de membrana interna, como *InvC*, que posee secuencias similares a la subunidad β de F₀F₁; (Eichelberg y col., 1994) proteínas de membrana interna, ejemplificadas por *InvA*, *SpaP/InvL*, *SpaQ/InvM* y *SpaR/InvN*; proteínas de membrana externa, donde se incluye *InvG* que es una proteína con secuencia similar a la familia de secretinas formadoras de poro y lipoproteínas como *PrgK* y *PrgH*. *InvG*, *PrgK* y *PrgH* forman la base de una estructura supramolecular llamada complejo aguja, la cual consiste en 4 anillos conectados por un bastón, los anillos inferiores interactúan con la membrana interna, los cuales tienen un diámetro de 40 nm y un ancho de 20 nm cada uno; los anillos superiores interactúan con la membrana externa y el peptidoglicano, teniendo un diámetro de 20 nm y un ancho de 18 nm, el cual se extiende a la superficie formando una estructura que se asemeja a una aguja de 80 nm de largo y 13 nm de ancho cuyo componente principal es la proteína *PrgI*. De igual manera la proteína reguladora *PrgJ* controla la longitud de la jeringuilla molecular (Galan, 2001; Kubori y

col., 2000). El gen *InvE* permite el correcto ensamblaje del complejo aguja e interviene en la regulación del proceso de secreción, disparando los eventos intracelulares que permiten la invasión (Ginocchio & Galan, 1995). La proteína *InvH* se requiere para la correcta localización de *InvG* en el SSTIII.

El gen *InvA* es el primer gen de un operón que contiene también los genes *InvB* e *InvC* los cuales codifican para proteínas estructurales del SSTIII. En estudios recientes se ha observado que al ser mutado el gen *InvB*, no se afecta el proceso de invasión, sugiriendo que no se requiere para la entrada de la bacteria a la célula del huésped. La proteína *InvA* es considerada como una de las más importantes para el ensamblaje del SSTIII y exportación de proteínas efectoras, *InvA* es una proteína de membrana interna, su porción amino-terminal es hidrofóbica, con ocho dominios transmembranales, de por lo menos 20 aminoácidos, mientras que su porción carboxi-terminal hidrofílica, se localiza en el citoplasma y puede interactuar con otros componentes del sistema (Galan & Curtiss, 1991).

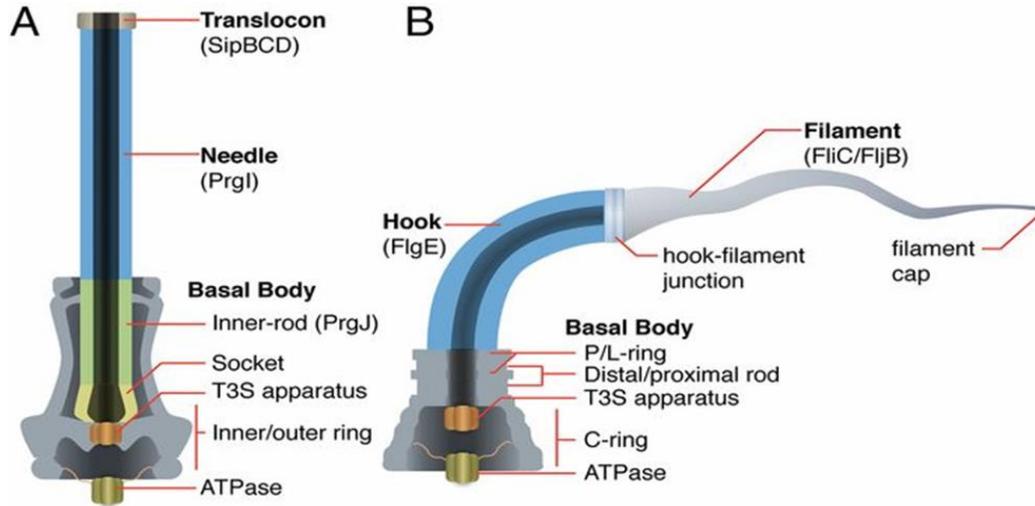


Figura 5. Comparación entre las estructuras A) sistema de secreción de tipo 3 (SSTIII), B) Flagelo

2.7 Resistencia a los antibióticos por parte de *Salmonella Typhimurium*

Al igual que otras bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, las diferentes serovariedades de *Salmonella* también han presentado resistencia a los antibióticos. Para el caso de *Salmonella Typhimurium*, algunas cepas han desarrollado multiresistencia a los diferentes tratamientos con antibióticos, específicamente a cinco agentes: ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina. De igual

manera se han encontrado cepas resistentes a quinolonas (Glynn y col., 1998; Molbak y col., 1999; Zaidi y col., 2006).

Entre los mecanismos de resistencia que utiliza *Salmonella spp.*, podemos encontrar la producción de enzimas que inactivan a las moléculas que tienen efectos bacteriostáticos y bactericidas. Las betalactamasas son capaces de hidrolizar antibióticos betalactámicos, que son aquellos que forman parte del grupo de las penicilinas como, por ejemplo, ampicilina, amoxicilina, oxacilina, metilcilina, entre otros. Estos antibióticos inhiben la síntesis de peptidoglicano, afectando la integridad de la pared celular bacteriano (Suárez y Gudíol, 2009).

Se han encontrado resistencia a los aminoglucósidos que son un grupo de moléculas que actúan a nivel ribosomal, inhibiendo la síntesis de proteínas y produciendo una lectura errónea de la información del ARN mensajero, determinando la incorporación de algunos aminoácidos incorrectos en la cadena peptídica. La resistencia a estos antibióticos puede darse por diversos mecanismos, entre ellos la inactivación de los compuestos por enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA). Estas enzimas catalizan la modificación covalente de grupos aminos e hidroxilos de la molécula, generando modificaciones químicas que llevan al aminoglucósido a unirse débilmente a los ribosomas bacterianos. La estreptomina y la gentamicina son ejemplos de este grupo a los que ha presentado resistencia *Salmonella spp.*(Mella y col., 2009).

También en esta bacteria se ha reportado la presencia de cloranfenicol acetil transferasas, que inhiben los antibióticos pertenecientes al grupo de los fenicoles (Gallardo et al, 1999).

2.8 Búsqueda de nuevas alternativas para el control de patógenos.

Las bacterias patógenas como *salmonella spp.* logran tener resistencia a los antibióticos, han evolucionado a medida que ellos mismo crean las condiciones idóneas para su proliferación y su multiplicación, manipulando los componentes presentes en medio donde se presenten, creando diferentes mecanismos de acción. El ser humano utilizando herramientas que le permiten bloquear el avance de este tipo de bacterias, ha generado medicamentos para eliminarlos o simplemente inhibirlos, se han utilizado probióticos, infusiones en agua y etanol de diferentes plantas medicinales, así de igual manera la miel la cual se ha estudiado y se ha demostrado tener actividad microbiana frente a diversos patógenos así como actividad antioxidante, antihipertensiva etc. (Wahdan, 1998; Bertoncelej y col., 2007; Majtan y col., 2009).

2.9 La miel

El concepto general de la miel está restringido para el producto de las abejas de la especie *Apis mellifera* (subfamilia *Apidae*) y se define de acuerdo al *Codex Alimentarius* como una sustancia natural dulce producida a partir del néctar de las plantas, de secreciones de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos chupadores en partes vivas de las plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que se madure (*Codex Alimentarius*, 2001).

El producto obtenido de las especies de abejas sin aguijón no puede ser denominado miel, ya que este término sólo se aplica para la miel hecha por abejas *Apis mellifera* (figura 6A), existen varios reportes donde se han estudiado las mieles abejas *Apis mellifera*, así como la miel de abejas sin aguijón (*Melipona beecheii*, *Trigona (Frieseomelitta) nigra* (figura 6B y 6C), *Scaptotrigona pectoralis*). Esto debido a las propiedades que presenta la miel en contra de diferentes microorganismos (Vit y col., 2006; Vit, 2008).

2.9.1 Características de la miel

En general, la miel se compone principalmente de agua (10-20%) y azúcares (70-80%), predominantemente glucosa y fructosa, además de otras sustancias como ácidos orgánicos, enzimas, flavonoides, compuestos fenólicos, minerales, productos de la reacción de Maillard y partículas sólidas derivadas de la recolección. Presenta una coloración que varía de casi incolora a pardo oscuro debido a la presencia de pequeñas cantidades de pigmentos como carotenoides, clorofila y xantofila. Muestra una densidad entre 1.39 y 1.44 kg/L. Su consistencia puede ser fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada dependiendo del grado de humedad y de la temperatura de almacenamiento. La cantidad de la presencia de estos componentes así como de sus características físicas y organolépticas tales como su aroma y sabor, varían de acuerdo

al origen floral y geográfico de la miel así como de su procesamiento, manipulación y tiempo de almacenamiento (*Codex Alimentarius*, 2001; Erejuwa y col., 2012; Moniruzzaman y col., 2014; Stephens y col., 2015).

La miel de la abeja en general, sin importar si es de la abeja *Apis mellifera* o de abejas sin aguijón, se ha empleado para tratar afecciones de los ojos, oídos, problemas respiratorios, digestivos y de la piel, además las mujeres reciben este tipo de miel después del parto (González-Acereto & Quezada-Euán, 2010). No obstante, estos conocimientos permanecen en la medicina etnográfica y las propiedades bioactivas de la miel y otros productos de la colmena, apenas se han empezado a estudiar de manera específica aislando sus componentes. Con respecto a lo anterior se han realizado estudios in vitro con distintos microorganismos patógenos como la levadura *Candida albicans* (Hau-Yama, 2015) y las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Chan-Rodriguez & col., 2012).



Figura 6. Diferentes especies de abejas; A) *Apis mellifera*, B) *Melipona beecheii*, C) *Trigona nigra*

2.9.2 Componentes de la miel con actividad antimicrobiana

Se conocen diversos tipos de miel de abeja y su composición es bastante variable y depende principalmente de su fuente floral y el tipo de abeja que la produjo, los factores estacionales y ambientales también pueden influir en su composición y sus efectos biológicos. En general, 100 gramos de miel de abeja contienen aproximadamente 20 gramos de agua y 80 gramos de azúcares aproximadamente (tales como fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa etc.). Además, contiene componentes minoritarios como ácidos orgánicos (ácido cítrico y ácido acético), compuestos fenólicos, enzimas, vitaminas, minerales, cenizas, proteínas, aminoácidos y residuos de polen (Bogdanov & col., 2008).

2.9.2.1 Osmolaridad

La miel está compuesta entre 75 y un 79% de azúcares de los que destacan la fructosa y la glucosa, aunque también contiene maltosa, sacarosa y otros azúcares complejos. Estos componentes generan en la miel una alta osmolaridad lo cual inhibe el crecimiento bacteriano, esto es porque la glucosa enlaza moléculas de agua y esto hace que la bacteria pierda agua y muera por deshidratación. Cuando la miel es diluida pierde esta propiedad, sin embargo, esta sigue siendo capaz de inhibir el crecimiento

de bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas, hongos y levaduras, lo que indica que existen otros factores que contribuyen a la actividad antimicrobiana de la miel (Al-Nahari y col., 2015; Bogdanov, 1984).

2.9.2.2 Peróxido de hidrógeno

La miel también contiene en menores cantidades peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un compuesto que contribuye a la actividad antimicrobiana ya que es un compuesto químico con características de un líquido polar. Este compuesto se produce en la miel debido a la conversión de glucosa en ácido glucónico por la glucosa oxidasa, una enzima producida por la glándula de la hipofaríngea de las abejas. En la literatura se menciona el uso de este compuesto como un antimicrobiano en contra de diferentes microorganismos, como lo reportó Bansal y colaboradores en 2005, donde menciona que el microorganismo *Helicobacter pylori* es sensible con 20% de peróxido de hidrógeno.

2.9.2.3 Compuestos fenólicos

Varios estudios han demostrado que el potencial antioxidante de la miel está fuertemente correlacionado, no sólo con la concentración de compuestos fenólicos totales presentes, sino también con el color, con mieles de color oscuro que se informa a tener contenidos fenólicos totales más altos y, en consecuencia, mayores capacidades antioxidantes. Los componentes de la miel responsables de su efecto

antioxidante son flavonoides (crisina, pinocembrina, pinobanksina, quercetina, kaempferol, luteolina, galangina apigenina, hesperetina, miricetina, catequina), ácidos fenólicos (ácido cafeíco, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido elágico, ácido clorogénico), ácido ascórbico, carotenoides estos reportados en la miel de *Apis mellífera* (figura 7).

Con respecto a la miel de Melipona se han identificado y reportado 3 ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido cafeíco y ácido elágico) y 4 flavonoides (catequina, miricetina, quercitina y apigenina) (Ramón-Sierra & colaboradores, 2016). Esto a su vez está ligado gracias a la capacidad que estos tienen al interactuar con enzimas y quelar metales.

Con respecto a la actividad antibacteriana se ha reportado que compuestos como los flavonoides y las saponinas tienen actividad antibacteriana contra *S. aureus* lo cual le atribuyen que al ser una bacteria gram positiva la estructura de la pared celular permite que los componentes antibacterianos tengan mayor facilidad de poder entrar. Se menciona que los compuestos fenólicos en general actúan por diversos mecanismos como la interacción con receptores, enzimas y formando hasta uniones con otros compuestos como es el caso de las proteínas (Avello Lorca y col., 2013).

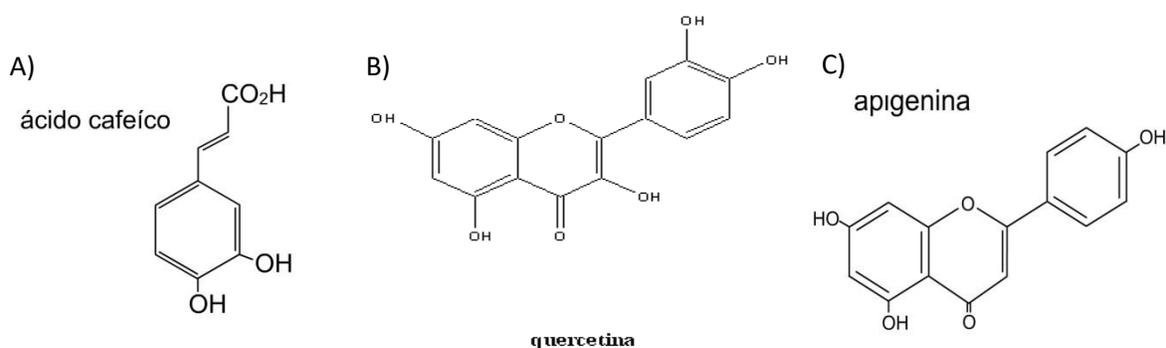


Figura 7. Algunos compuestos fenólicos reportados en las mieles de Apis y Melipona: A) Ácido cafeíco, B) Quercetina, C) Apigenina

2.9.2.4 Proteínas y aminoácidos

Las proteínas y aminoácidos al igual que los compuestos fenólicos se han reportado como compuestos antioxidantes ya que algunos aminoácidos en las proteínas pueden reaccionar con radicales libres si la energía de éstos es alta (por ejemplo radicales hidroxilo). Los más reactivos incluyen los azufrados Metionina y Cisteína, los aromáticos Triptófano, Tirosina, Fenilalanina y los que contienen anillo imidazol como la Histidina. La mayor actividad de los péptidos comparada con los aminoácidos libres se debe a las propiedades fisicoquímicas únicas conferidas por las secuencias de aminoácidos. La mayoría de los péptidos antioxidantes derivados de alimentos de origen natural presentan intervalos de peso molecular de 500 a 1800 Da, asimismo, a menudo incluyen restos de aminoácidos hidrofóbicos como Valina o Leucina en el amino terminal así como Prolina, Histidina, Tirosina, Triptofano, Metionina y Cisteína en sus secuencias. Las proteínas y péptidos de igual manera presentan actividad

antimicrobiana como lo mencionan algunos autores a continuación. (Bucekova & Majtan, 2016)

Según Brudzynski y Sjaarda en 2015 mencionan que las proteínas presentes en la miel específicamente las glicoproteínas causaron daños en la membrana bacteriana de *E. coli* y *B. subtilis*, este efecto fue visualizado por microscopia de barrido (S.E.M.), el daño causado a la membrana dependió de la concentración y el tiempo con la cual se realizó el tratamiento con las glicoproteínas.

En la miel de Melipona se han identificado y reportado por Ramón-Sierra y colaboradores en 2015, 7 fracciones proteicas con los siguientes pesos moleculares: 7.6, 11.6, 14.6, 27.3, 49.7, 55.4, y 95 kDa. Actualmente se han reportado proteínas con actividad antimicrobiana en la miel (Tabla 2). Este es el caso de las amilasas, proteasas y glucoxidasas, provenientes de las glándulas salivales de las abejas, también se han reportado péptidos con actividad antimicrobiana como es el caso de las defensinas presentas en las plantas, estos péptidos se presentan cuando la planta entra en estrés por invasión de microorganismos los cuales pudieran provocarle una enfermedad y causarle la muerte.

Tabla 2. Péptidos identificados en la miel (Hancock, 2007)

Nombre del péptido	Masa molecular (kDa)
Lisozima	14-23
Defensina	4
Royalisina	5.5
Himenoptaecina	10.5
Apideacina	2.1
Abaecina	3.9

2.9.2.5 Otros compuestos con actividad

Se reporta que la miel tiene actividad antibacteriana y antifúngica debido a la reacción de Maillard, la cual consiste en la unión de un azúcar simple y un grupo amino generalmente dado por un aminoácido simple, esto desencadena varias reacciones las cuales dan como resultado una composición llamada melanoidinas, éstas llevan a cabo cambios en la coloración que van desde el amarillo claro hasta el color café oscuro (Maillard & col., 2003). Otros constituyentes de interés que se han reportado en la miel son: diferentes compuestos de 1,2-dicarbonilo, tales como glioxal (GO), 3-deoxyglucosulosa (3-DG) y metilglioxal (MGO). Estos compuestos se forman típicamente durante la reacción de caramelización o reacciones de Maillard como

productos de degradación de la reducción de los hidratos de carbono, y que han sido identificados como importantes contribuyentes de actividad antibacteriana (Álvarez-Suárez y col., 2014)

Desde el punto de vista nutricional, la importancia fisiológica que resulta de la absorción de MGO y otros compuestos de 1,2-dicarbonilo debe ser un tema de nuevas investigaciones. Los compuestos de glicosilación resultantes de la reacción de MGO con cadenas laterales de aminoácidos de lisina o arginina, respectivamente, se han identificado *in vivo* y están asociados con complicaciones de la diabetes y algunas enfermedades neurodegenerativas, aunque el papel de estos compuestos en la patogénesis de diferentes enfermedades todavía no se ha comprendido plenamente (Saxena & col., 2010).

Por todos los componentes mencionados con anterioridad, es que la miel no suele presentar crecimiento de hongos, levaduras o bacterias en forma apreciable. Hasta el momento existen reportes de la miel de *Apis* en contra del género *Salmonella spp.* como lo mencionan (Toarmina y col., 2001; Badawy y col., 2004; Alnaqdy y col., 2005). En la actualidad, no existen reportes de la miel de *Melipona beecheii* y *Trigona nigra* en contra de este patógeno, pero si hay reportes de la actividad antibacteriana de la miel de *Melipona beecheii* en contra de otros patógenos como *H. pylori*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, etc. (Vázquez-Cruz, 2018; Choudhari y col, 2012; Chanchao, 2009; Temaru y col. 2007; Boorn, y col., 2010), en el caso de la miel del género *Trigona* se reportado tener actividad antimicrobiana en contra de diferentes patógenos (Boorn y col., 2010; Garedew y col., 2004; Chanchao, 2009; Persano y col., 2008).

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el problema de la generación de resistencia a los microorganismos como *Salmonella* Typhimurium a los antibióticos de uso clínico y las enfermedades transmitidas por alimentos, ha dado auge a la investigación de nuevos compuestos naturales (compuestos fenólicos, proteínas, aceites esenciales, probióticos etc.). La miel recientemente ha generado varios reportes alrededor del mundo sobre su efecto inhibitorio en contra de diferentes patógenos debido a que tiene un complejo de varios componentes que le otorgan esta actividad.

Por lo anteriormente mencionado, el presente trabajo tiene como finalidad determinar la actividad antimicrobiana de las mieles de Apis, Melipona y Trigona del estado de Yucatán frente a *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y su efecto en la expresión de genes relacionados con la virulencia.

CAPÍTULO IV

HIPÓTESIS

Las mieles de las abejas *Apis mellifera*, *Melipona beecheii* y *Trigona nigra* presentan actividad antimicrobiana y tienen un efecto en la expresión de los genes de virulencia de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311.

CAPÍTULO V

OBJETIVO GENERAL

-Evaluar la actividad antimicrobiana de tres diferentes tipos de mieles (Apis, Melipona y Trigona) contra *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y determinar su efecto en la expresión de genes de virulencia de este patógeno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Evaluación comparativa de la actividad antimicrobiana de tres diferentes tipos de mieles (Apis, Melipona, Trigona), estableciendo la CMI (concentración mínima inhibitoria) y CMB (concentración mínima bactericida) para cada tipo de miel.

- Establecer los genes housekeeping para el estudio de las variaciones en la expresión génica de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311.
- Evaluar el efecto en la expresión de los genes de virulencia (*InvA*, *Fim*, *OrgA*) de *Salmonella* Typhimurium en presencia de tres tipos diferentes de miel (Apis, Melipona, Trigona).
- Evaluación comparativa de las cinéticas de sobrevivencia bacteriana con tres diferentes tipos de miel.

CAPÍTULO VI

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materia prima

Las mieles de *Apis mellifera*, *Melipona beecheii* y *Trigona (Frieseomelitta) nigra* que se utilizaron en el presente trabajo se obtuvieron de la comisaria de Komchen localizada en el municipio de Mérida (Apis); del municipio de Maní (Melipona) y del municipio de Tizimin (Trigona). Todas las mieles fueron colectadas de manera tradicional, es decir, fueron tomadas directamente de la caja en el caso de Apis y Trigona y del jobón (tronco hueco) en el caso de Melipona, de tal manera que no tuviese ningún contacto con algún químico o material que pudiera afectar sus cualidades y propiedades. La miel fue guardada a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su posterior análisis.

La miel sintética utilizada como control, se preparó usando los azúcares mayoritarios presentes en la miel: 40 g de Fructosa, 30 g de Glucosa, 8 g de Maltosa y 2 g de Sacarosa en 100 mL de agua destilada estéril, se mezcló añadiendo los azúcares poco a poco, hasta que se disolvieran.

La cepa bacteriana empleada en el presente estudio es una cepa de colección de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, la cual fue crecida en medio de cultivo Luria Bertani con agar (LB agar) a 37 °C durante 8 h y almacenadas a 4 °C para las pruebas posteriores.

6.2 Determinación de los parámetros fisicoquímicos.

6.2.1 Grados brix

Los grados brix se midieron con un refractómetro de mano de la marca ATAGO, añadiendo una gota para poder visualizar a contra luz el porcentaje de grados brix (solutos solubles).

6.2.2 pH y acidez libre

Para la determinación del pH y acidez libre, se utilizaron los métodos reportados en la norma NMX-F-036-1997.

La medición del pH se realizó empleando un potenciómetro de la marca SCHOTT, en el que previamente en un vaso de precipitado se pesaron 10 g de miel y posteriormente se le añadió 75 mL de agua destilada, se tituló con NaOH 0.05 N hasta alcanzar un pH de 8.5.

6.3 Determinación de la actividad antimicrobiana, CMI y CMB por el método de microdilución.

La determinación de la actividad antibacteriana de las mieles de Apis, Melipona y Trigona, se realizó por el método de microdilución descrito por Schwalbe y col., 2007, utilizando la cepa *S. Typhimurium* ATCC 13311. La cepa fue previamente sembrada en

medio sólido Luria Bertani (LB) por el método de estría cruzada, la cual fue incubada por un periodo de 8 horas a 37 °C.

Posteriormente a la incubación, se tomó una asada de las colonias crecidas y se diluyó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con solución salina (0.85 %) estéril, hasta ajustar el inóculo a una concentración de 0.5 en la escala McFarland, lo equivalente a 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) para su posterior empleo.

Se utilizaron tubos de 1.5 mL, con 125 μ L de medio líquido Mueller-Hinton a una concentración cuadruplicada (4X) y posteriormente se le agregó la miel cuya cantidad adicionada dependió de la concentración final deseada, se tomó en cuenta que el volumen final para cada tubo fue de 500 μ L. Con las mieles de 3 especies de abejas y el control con miel sintética se evaluaron concentraciones de 5, 10, 20, 30, 60 % V/V, utilizando Ampicilina como control positivo a una concentración de 4 μ g/mL, todos los tubos se incubaron en agitación a 37 °C y posteriormente se tomó la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (Biofotómetro 6131 Eppendorf) a 600 nm a las 24 y 48 horas.

La concentración mínima inhibitoria de la miel se determinó por el método de microdilución (Schwalbe y col., 2007), utilizando nuevamente la cepa *S. Typhimurium*. Las concentraciones evaluadas de la miel de *Trigona* fueron de 3 % hasta 10 % V/V de miel y concentraciones de 30 a 60 % V/V para la miel sintética.

Todas las muestras anteriormente mencionadas, se hicieron por triplicado con su respectivo blanco para cada concentración evaluada, las muestras se incubaron a 37 °C por 24 horas y posteriormente se tomó la lectura de la absorbancia en un

espectrofotómetro (Biofotómetro 6131 Eppendorf) a 600 nm, tomando 100 µL de muestra a las 24 y 48 horas, posteriormente dosificándola en cajas Petri con Mueller-Hinton agar e incubándolas a 37 °C por 24 horas.

6.4 Determinación de la actividad antibacteriana de la miel tratada con catalasa.

Una vez obtenida las CMI, se realizó un tratamiento con la enzima catalasa (catalase from *Aspegillus niger*, 4000 U/mg) de la marca Sigma, esto con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de peróxido de hidrogeno presente en las mieles, para dicho tratamiento se evaluaron las CMI de cada miel de abeja, de igual manera se le añadió catalasa al control (*Salmonella* Typhimurium), lo equivalente a 1000 U/mL de la enzima (Brudzynski, 2006), las mieles tratadas se dejaron incubar por 2 horas a temperatura ambiente, esto con la finalidad de que todo el peróxido de hidrogeno se haya eliminado. Posterior a esto, se añadió medio Mueller-Hinton 4X tubos Eppendorf y agregaron el volumen correspondiente a las CMI de las mieles, hasta llegar a un volumen final de 500 µL, se incubo a 37 °C y se leyó la absorbancia a las 24 y 48 horas en un espectrofotómetro (Biofotómetro 6131 Eppendorf) a 600 nm, tomando 100 µL de la muestra, como controles se usaron los CMI de cada una de las mieles.

6.5 Extracción de ADN de *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311.

Para la extracción de ADN se utilizó el método descrito por Tapia-Tussell y colaboradores en 2006, modificándolo para bacterias, se tomaron las colonias de un cultivo previamente crecido en medio LB a 37 °C por 24 horas.

Se añadió una asada del cultivo bacteriano a 1000 µL de agua estéril anteriormente vertida en un tubo Eppendorf de 2 mL, se agitó por 2 minutos, y luego se incubó a -20°C por 15 minutos, y después dándole un choque térmico a 65 °C por 3 minutos, seguidamente se agitó en un vórtex por 3 minutos.

Se dosificó lo obtenido en volúmenes de 300 µL en tubos Eppendorf, posteriormente se le añadió 500 µL de buffer de lisis (Tris base 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM, pH 8.0), añadiéndole a la suspensión 5 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y 10 µL de Rnasa (10 mg/mL), se mezcló por inversión del tubo y se dejó reposar por 5 minutos.

Se incubó la mezcla a 65 °C por 30 minutos con inversión del tubo ocasional, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, pasado el tiempo, se añadió 500µL de cloroformo se mezcló por inversión del tubo por 10 minutos.

Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le adiciono 700µL de isopropanol frio, se mezcló por inversión del tubo y se incubo a -20 °C por 15 minutos.

Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla obtenida con 500 μ L de etanol al 70 %, se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones, se descartó nuevamente el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente, posteriormente se resuspendió en 20 μ L de agua destilada estéril.

6.5.1 Electroforesis

Para la visualización de la integridad del ADN genómico bacteriano se preparó un gel de agarosa con buffer TAE 1x (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8.3) en concentración del 0.8%. Se calentó hasta que la agarosa se disolvió en el buffer y a la mezcla se le añadió 2 μ L de bromuro de etidio.

Las muestras se prepararon con 4 μ L del ADN genómico y se añadió 2 μ L de buffer de carga (azul de bromofenol); se mezcló homogéneamente y se colocaron las muestras en los pocillos del gel, se corrió la muestra a 80 V por 1 hora. Transcurrido el tiempo el gel se colocó sobre un transluminador de luz UV, para la visualización del material genómico.

6.6 Diseño de primers

Los primers utilizados en este trabajo, se diseñaron con el programa software Pickprimer® del Genbank, luego las secuencias que mostró dicha plataforma, fueron

evaluadas con el programa Oligo Evaluator® de SIGMA-ALDRICH, con la finalidad de ver si las secuencias no formaban estructuras secundarias o dímeros, para así poder utilizarlos en pruebas posteriores.

6.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés).

Con el ADN genómico obtenido de *S. Typhimurium* se realizaron reacciones de PCR para verificar si los genes a evaluar estaban presentes en la bacteria utilizando un gradiente de temperatura (50, 53, 56, 59, 62 y 65 °C); en la tabla 3 y 4 se muestra el listado de los genes a evaluar y el tamaño de fragmento esperado. Los genes housekeeping evaluados fueron *GapA*, *PutP*, *Mdh*, *AceK*, *FBP* y los genes de virulencia *InvA*, *Fim*, *Orga*, *InvH*, *SthB*, *SseF*, *SipB*, *RpgH*, en todos los genes se diseñaron primers forward y reverse.

Tabla 3. genes housekeeping para <i>Salmonella</i> Typhimurim ATCC 13311			
Nombre del oligo	Secuencia 5'=>3'	Longitud	Tamaño esperado(pb)
StGapAForw	AGCAGCTTTGATCTGCTCGT	20	513
StGapARev	GGTGTGACGTAGTGGCTGA	20	513
StGapAForwRT	CGGTAGTCGCGTGAACAGTA	20	100
StGapARevRT	GCTTCCTGCACCACAACTG	20	100
StPutPForw	CAATGCCAAAGAAGCCCACC	20	524
StPutPRev	GGATAAGAGCCGAGTCCTGC	20	524
StPutPForwRT	CGTAATCGCGCTGGAGCATA	20	100
StPutPRevRT	GTTTAACCCGTGGATTGCCG	20	100
StMdhForw	ACCGGCGTTCTGAATACGTT	20	543
StMdhRev	CTCTCCCTGTACGACATCGC	20	543
StMdhForwRT	GACTTCAGTACCGGCGTTCT	20	100
StMdhRevRT	GACGATTCTGCCGCTGCTAT	20	100
StGndForw	GACACAATCCGTCGCAATCG	20	772
StGndRev	AGCCCGCACGGAAAATCTTA	20	772
StGndForwRT	GATGAAGCCGCCAACAAAGG	20	100
StGndRevRT	AACGCGCAAAGACGGATTC	19	100
StAceKForw	GCTGCCAGAAACATGCGAAA	20	542
StAceKRev	ATGACGGGTAACGCCAAAGT	20	542
StAceKForwRT	CCGCTCAATATCTGGCTGGA	20	100
StAceKRevRT	AAATATTAGCGGCGGCAAGC	20	100
StFbpForwRT	TTGAGGAGACAGGGTGCGA	19	100
StFbpRevRT	GCGATGCGTTGTAATAGCGG	20	100
StFbpForw	CGGGCCGGATTTACCTCAG	19	500
StFbpRev	TTTGCGTTCGCCATGACAC	19	500

Tabla 4. Genes de virulencia para <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311			
Nombre del oligo	Secuencia 5'=>3'	Longitud	Tamaño esperado(pb)
StInvAForw	ACCGCCAGACAGTGGTAAAG	20	908
StInvARev	TCCTTTGACGGTGCATGAA	20	908
StInvAForwRT	CCGGCAGAGTTCCCATGAA	20	100
StInvARevRT	AGCGATAATATGGGGCGGAAT	21	100
StInvHForw	GCAACTGGCCAACGCAAATA	20	311
StInvHRev	GGGCAGCAAGTAACGTCTGA	20	311
StInvHForwRT	GCGCAATCAGCTCAAGCATT	20	100
StInvHRevRT	TCTTTCGAACGCATGTATTGTGG	23	100
StFimAForw	CGGTAGTGCTATTGTCCGCA	20	302
StFimARev	GGTTGCGGCTGATCCTACTC	20	302
StFimAForwRT	AGAATCTCAATCCCAGCGCC	20	100
StFimARevRT	TGGCTTTCTCTGGTCAGGC	19	100
StOrgAForw	ATCTGATCGCCGCAACTCAT	20	511
StOrgARev	ATATCCCAATTCCGTCCCGG	20	511
StOrgAForwRT	CTCCGGCTTATCGAAATCCCT	21	100
StOrgARevRT	ACAGATTTATGCCCGCGAGT	20	100
StSseFForw	GGCAGCAGAGGGATTATGCT	20	534

StSseFRev	CACTGGGATCGGCATGAAGT	20	534
StSseFForwRT	GGGATGCTTGCTGTGCGTA	19	100
StSseFRevRT	AGCGCACTGACCACAAGAG	19	100
StSthBForw	TGTTAAGCGTCACACTGGCA	20	303
StSthBRev	TTGATGCCGGGCAAAGAAGAAC	20	303
StSthBForwRT	CGCGGAGGCATTATCATCAATAG	23	100
StSthBRevRT	TCGGGTTATTCGCTCTGGC	19	100
StSipBForw	CGCCGCCTTCACAATTCAT	20	500
StSipBRev	AAGCGACAGAGGCGAAAGAG	20	500
StSipBForwRT	CCCCCTTATGATTCCTGCGG	20	100
StSipBRevRT	GACTGTGGGGACGTTATGGA	20	100
StRpgHForw	GCATAAAATCAGCAAGCGCC	20	500
StRpgHRev	TTGGGCATGGAAGTCACGAA	20	500
StRpgHForwRT	GGCAACACCTGAAAACGCTC	20	100
StRpgHRevRT	GGACTGTGGGGACGTTATGG	20	100

6.7 Extracción de ARN de *Salmonella Typhimurium*

Para la extracción de ARN se empleó el método propuesto por Chomczynski y col., (1987), para lo cual se tomó 1000 µL de un cultivo de bacterias con 8 horas de incubación colocándolo en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min, posteriormente se decantó el sobrenadante y se añadieron 400 µL de una solución de lisis (Acetato de sodio 320 mM a pH 4.6, SDS al 8% y EDTA a 16 mM). Se agitó con un vórtex durante 2 minutos para lisar las células, Después se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos.

El sobrenadante se colocó en un tubo estéril y se añadieron 400 µL del reactivo de Trizol, se agitó con vórtex durante un minuto y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, y se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril y se añadieron 200 µL de cloroformo, homogenizando la mezcla e incubando a temperatura ambiente por 10 minutos.

Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante de la fase acuosa y se mezcló con 200 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) en un tubo estéril. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante de la fase acuosa y se colocó en un tubo estéril, al cual se le añadieron 800 µL de etanol absoluto y se incubó a -20°C por 12 horas

Transcurridas las 12 horas se centrifugó a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se añadieron 500 µL de etanol absoluto, de nuevo se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet para posteriormente resuspenderlo en 20 µL de agua MiliQ estéril.

Para visualizar la integridad del ARN se preparó un gel de agarosa con buffer TAE 1x (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8.3) en concentración del 0.8 %. A la mezcla de agarosa con TAE se le añadieron 2 µL de bromuro de etidio como agente intercalante.

Las muestras se prepararon con 1 µL del ARN y se añadió 1 µL de buffer de carga (azul de bromofenol); se mezcló homogéneamente y se colocaron las muestras en los pocillos del gel y se corrió la muestra a 80 V por 60 minutos. Transcurrido el tiempo el gel se colocó sobre un transluminador UV para visualizar el material genético.

6.7.1 Síntesis de ADNc

Una vez visualizadas las bandas características del ARN se utilizó un kit de la marca de Thermo Scientific para realizar la síntesis de la cadena de ADN (ADNc).

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 2 µL de ARN, seguido por 8 µl de agua libre de ARNasa; posteriormente se añadieron 4 µL de buffer de reacción, seguido por 1

μl de la enzima RiboLock, 2 μL de dNTP's y 1 μl de la enzima Revert Aid RT, se incubó en baño maría a 42 °C durante 1 hora; posteriormente para desactivar la enzima se incubó en un termoblock a 70 °C durante 5 minutos, inmediatamente se dejó enfriar en hielo. Las muestras se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

6.7.2 Evaluación de la expresión génica de *Salmonella Typhimurium*

El ADNc empleado para los ensayos de qRT-PCR fue preparado tomando una muestra del ARN total. Se realizó una dilución 4:125 en agua MiliQ estéril.

Las reacciones fueron preparadas en un volumen conocido conformado por ADNc, oligonucleótidos (2 μM), IQ SYBR Green Super Mix (Biorad, Hercules, CA, USA) y agua MiliQ estéril. Las amplificaciones fueron realizadas por cuadruplicado en placas de reacción de 48 pozos, empleando el equipo StepOne Real Time-PCR (Applied Biosystem, Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), a una temperatura de alineamiento de 61°C. Se utilizó el fluoróforo SYBR Green para detectar las amplificaciones.

También se realizó una curva de temperatura de fusión (curva Melt), esto con la finalidad de observar que los primers sean específicos para los genes a evaluar.

6.8 Evaluación del Perfil de sobrevivencia bacteriana en presencia de las mieles de Apis, Melipona y Trigona.

Para determinar el perfil de sobrevivencia bacteriana frente a las mieles del estado de Yucatán se utilizó la cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC13311. Para la realización de esta prueba se utilizaron tubos de 1.5 mL, con 250 µL de medio MH a doble de concentración (2X) esterilizados previamente, posteriormente a cada tubo con medio MH 2X se le agregó la cantidad de las mieles adicionada dependió de la concentración final deseada teniendo en cuenta que el volumen final en cada tubo que fue de 500 µL. Los tubos se incubaron en agitación a 150 rpm a 37 °C y se realizaron la lecturas cada hora hasta las 8 horas en un biofotómetro Eppendorf 6131, posteriormente se realizaron diluciones seriadas, se inocularon 100 µl por triplicado en placas de agar LB y se homogenizaron con ayuda de una hisopo estéril. Las placas de agar LB se incubaron a 37 °C y a las 24 horas se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias.

CAPÍTULO VII

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Determinación de los parámetros fisicoquímicos de acuerdo a la norma.

Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos se realizó de acuerdo a la norma mexicana NMX-F-036-1997, donde se obtuvieron los resultados reportados en la Tabla 5:

TABLA 5.Comparación de los Parámetros fisicoquímicos de las 3 mieles con la Norma					
	NMX-F-036-1997		<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona beecheii</i>	<i>Trigona (Freseomelitta) nigra</i>
	Min.	Max.			
Ph	3.1	4.2	3.82	3.39	3.5
Grados brix (%)	83%	-----	84%	77%	79%
Acidez libre	-----	40 meq/kg de miel	27.5 meq/kg de miel	10 meq/kg de miel	19.5 meq/kg de miel

En los resultados de los parámetros fisicoquímicos evaluados, se pudo observar que las mieles se encuentran en el rango establecido en la norma para los parámetros de pH y acidez libre, en cuanto a los grados Brix solo la miel de *Apis mellifera* se encuentra en el rango establecido, las mieles de Melipona y Trigona presentaron un porcentaje menor a lo establecido por la norma lo que nos indica que estas mieles contienen más humedad, lo que concuerda con lo mencionado por (Castañon-Chavarría, 2009), algunos autores han propuesto la realización de una norma para la miel producida por abejas sin aguijón, ya que estas mieles de acuerdo a la norma no se puede considerar miel, de igual manera pudiera tener diversas variaciones en cuanto algunos parámetros, probablemente esto se deba a que estas mieles son de floración endémica la cual es pecoreada por la abeja, otra de las razones para la implementación de esta norma es que son cosechadas una vez al año, no como en el caso de la miel de Apis que se cosecha de 4 a 5 veces al año dependiendo de las condiciones climáticas que favorezcan la generación de miel por parte de las abejas.

7.2 Curva de crecimiento de *Salmonella Typhimurium*

Se realizó la curva de crecimiento de la cepa *S. Typhimurium* ATCC 13311 en medio líquido Mueller-Hinton, este experimento permitió conocer el comportamiento que presenta este microorganismo con base al tiempo y las condiciones de incubación adecuadas para su manejo, como se puede observar en la figura 8, la fase exponencial

del microorganismo se encuentra en el intervalo de 6 a 12 horas, en esta fase la bacteria se encuentra en crecimiento con el mayor número de células viables, esto con el fin de poder utilizar el microorganismo para la realización de las pruebas antimicrobianas en las mejores condiciones.

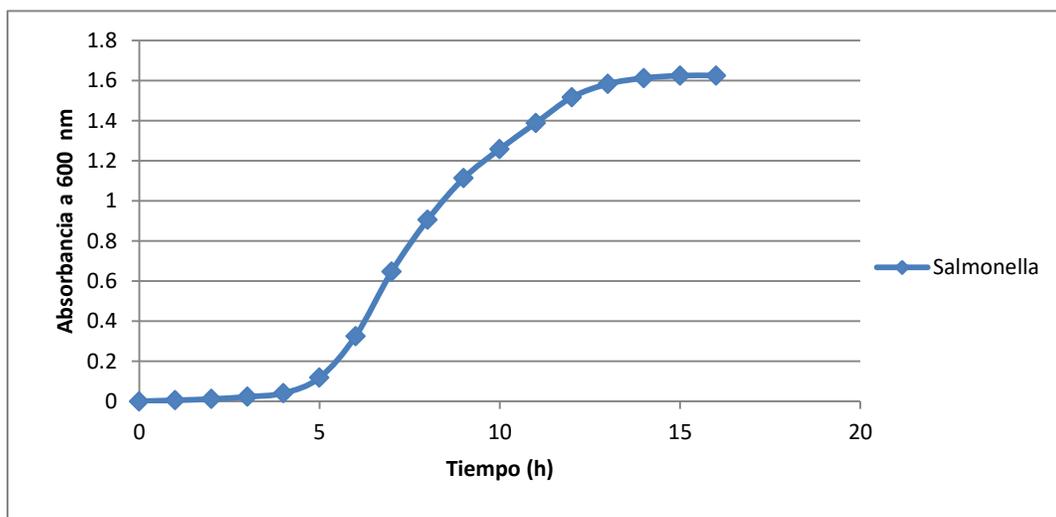


Figura 8. Curva de crecimiento de *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311

7.3 Actividad antimicrobiana, CMI Y CMB de las mieles contra *S. Typhimurium*

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó por el método de microdilución, en el cual se evaluaron tres diferentes mieles (Apis, Melipona, Trigona), utilizando como control miel sintética; el cual es el conjunto de los azúcares mayoritarios presentes en la miel, se usaron concentraciones de 5 % 10 %, 20 %, 30 % y 60 % (V/V). Las mieles demostraron tener actividad antibacteriana a partir de una concentración de 10 % V/V para Apis, Melipona, Trigona, y 60 % V/V para el control de miel sintética.

En cuanto a la CMI y la CMB, se evaluaron concentraciones de 3 a 10 % V/V para las mieles de las 3 diferentes abejas y concentraciones de 30 a 60 % V/V para la miel sintética, de acuerdo al protocolo se tomaron lecturas a las 24 y 48 horas con el fin de observar si se mantenía el efecto de la miel en contra del patógeno. La concentración mínima inhibitoria y bactericida obtenidas para el microorganismo fue de 7 % V/V para Trigona (figura 11), 8 % V/V para Apis (figura 9) y 9 % V/V para Melipona (figura 10), en contraste con la miel sintética, se obtuvieron concentraciones mayores a partir de 32 % V/V para inhibir y un rango de 50 a 60 % V/V para matar a la bacteria (figura 12).

Las mieles evaluadas en este estudio tuvieron mayor capacidad de inhibición en comparación con lo reportado por otros autores, como Boorn y col. en donde se reportó que la miel de *Trigona carbonaria* obtuvo un CMI promedio de 10 % P/V para *Salmonella Typhimurium* en comparación con la miel de Apis que obtuvo 8 % que usaron como control. En este sentido, Zamora-Fallas en 2018 reportó que

concentraciones a partir del 50 % de las mieles de *Melipona beecheii* y *Tetragonisca angustula* son capaces de inhibir a *Salmonella* Enteritidis en contraste la miel de Apis que con un 25 % logró inhibir a este microorganismo. Varios reportes mencionan que la actividad antimicrobiana de la miel en contra de diferentes microorganismos es debida a diversos componentes presentes en la miel como: las proteínas, las cuales provienen principalmente de la abeja; compuestos fenólicos, principalmente otorgados por la floración predominante de la región; peróxido de hidrogeno, el cual es obtenido cuando la glucosa es catalizada por la enzima glucosa oxidasa; azúcares, lo cual le da a la miel una alta densidad y alta osmolaridad (Ramón-Sierra y col., 2016; Souza, y col., 2016; Nweze y col., 2016). En este trabajo se demostró que mieles diluidas de Apis, Melipona y Trigona, presentaron actividad antibacteriana en contra de Salmonella, con respecto al control de miel sintética se necesitó de concentraciones mayores para poder inhibir el crecimiento de la bacteria, por lo que se puede concluir que el tipo y concentración de azucares presentes en la miel no son los únicos responsables de la actividad antibacteriana, esta actividad está dada por otros componentes como los mencionados anteriormente.

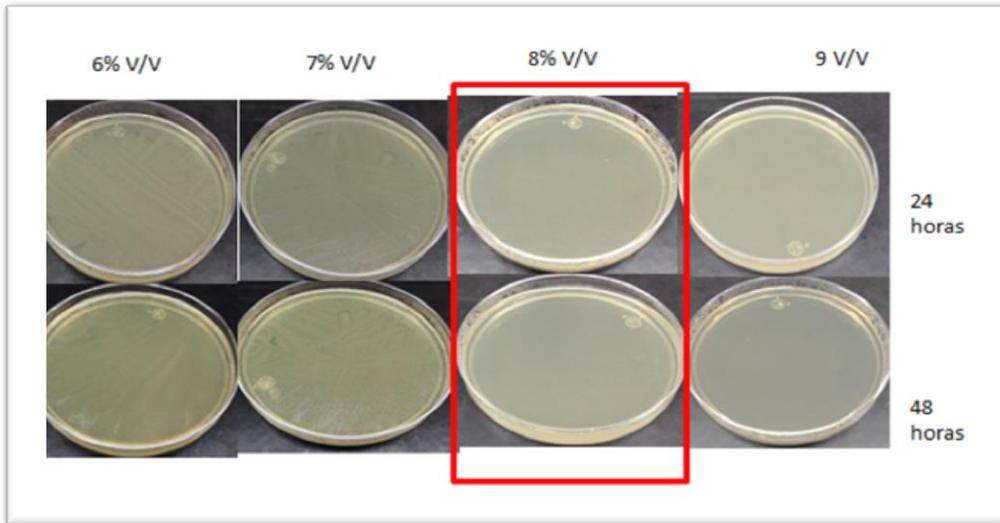


Figura 9. Rango de la CMB de la miel de Apis en contra de *Salmonella Typhimurium*.

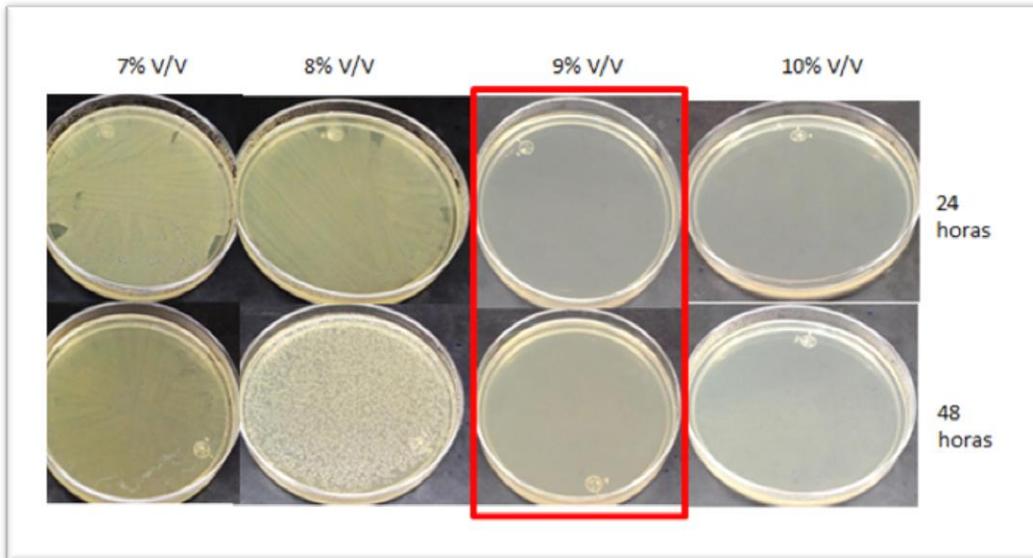


Figura 10. Rango de la CMB de la miel de Melipona en contra de *Salmonella Typhimurium*.

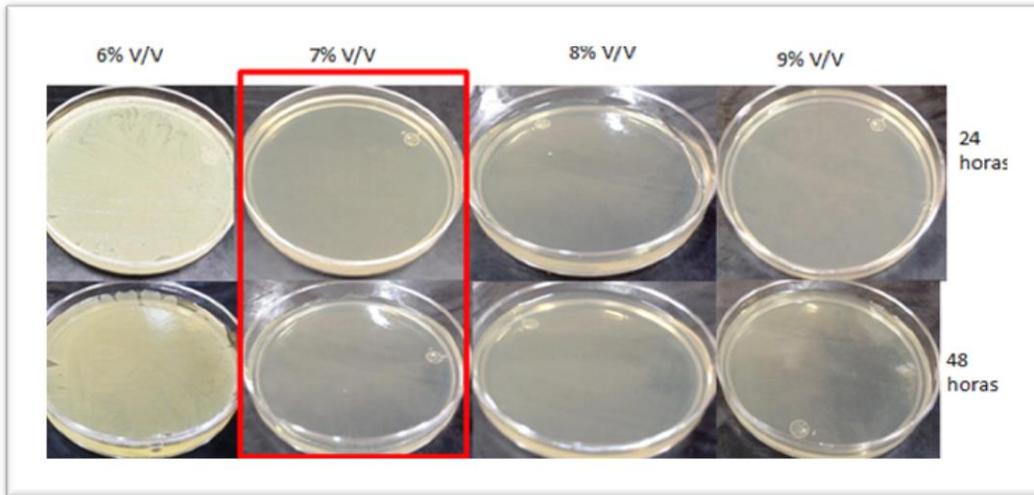


Figura 11. Rango de la CMB de la miel de Triglona en contra de *Salmonella Typhimurium*.

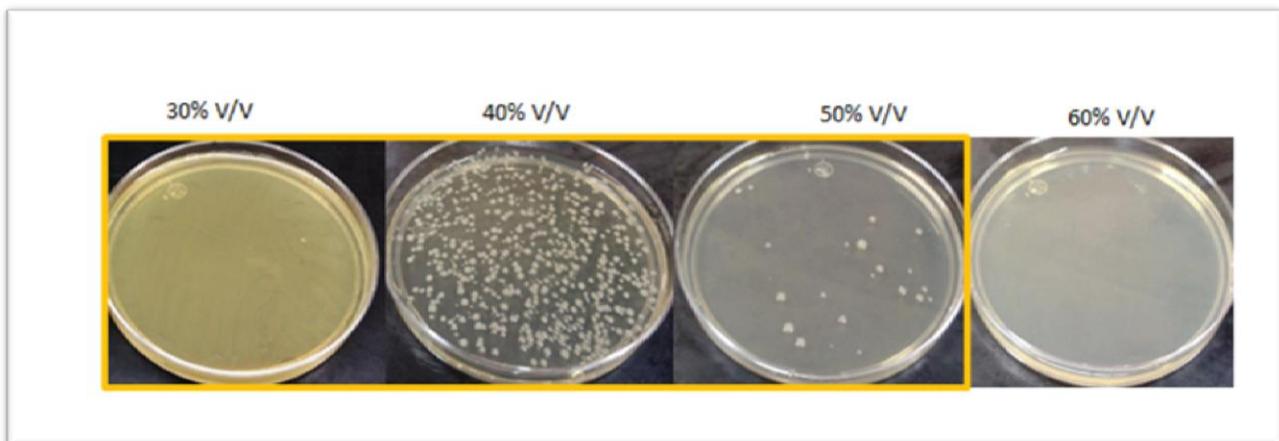


Figura 12. Rango de la CMB de la miel sintética contra *Salmonella Typhimurium*

7.4 Determinación de la actividad antibacteriana de las Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI'S) con catalasa.

En los resultados del tratamiento con catalasa de las CMI de cada una de las mieles, se observó que la actividad antibacteriana no era detectable en las mieles de Apis y Melipona (figura 13 A,B), ya que al tomar una alícuota de 100 μ L e inmediatamente leerla en el espectrofotómetro dio una absorbancia similar al blanco el cual es la CMI de la miel, para descartar que no fueran bacterias muertas, se procedió a inocular una caja petri con medio Agar Mueller-Hinton; sin embargo en el caso de Trigona (figura 13) cuando se inoculó en el medio Agar MH se pudo observar que el crecimiento bacteriano disminuía ligeramente, por lo que en este caso la actividad de la miel pudiera estar dada por el peróxido de hidrógeno. En cuanto a este compuesto, se sabe que es un fuerte antiséptico, que se usa en el tratamiento de heridas en la piel para eliminar bacterias, se pudo observar en este trabajo que el tratamiento con la enzima catalasa, eliminaba la actividad de la miel, ya que esta enzima elimina el peróxido, convirtiéndolo en agua y oxígeno. En la literatura se ha reportado esta prueba como es el caso de Nishio, y col., 2016 para comprobar que los componentes no-peróxido son los responsables de la actividad antibacteriana en contra de *Salmonella* Typhimurium, estos autores mencionan que al realizar un tratamiento con catalasa a las mieles de *Scaptotrigona bipunctata* y *Scaptotrigona postica*, el porcentaje necesario para inhibir a esta bacteria aumenta hasta 4 y 2 veces su CMI, siendo el CMI sin tratamiento de 5 % y 10 % respectivamente.

En otro trabajo realizado por Nweze y col., 2016 se realizó el tratamiento con catalasa a las mieles provenientes de las abejas *Apis mellifera*, *Hypotrigena spp.*, *Melipona spp.* en el que se pudo observar que las diferentes mieles también necesita en promedio hasta 2 veces más su CMI. En este estudio se pudo corroborar que las mieles al someterlas al tratamiento con catalasa pierden la actividad antibacteriana lo que concuerda por lo mencionado con los autores anteriormente citados, pero posteriormente con concentraciones más altas de miel logran inhibir con los componentes no-peróxidos.

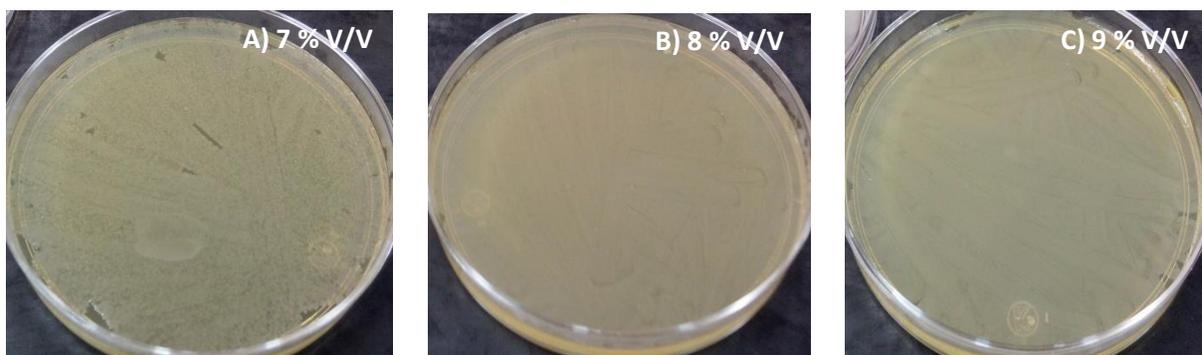


Figura 13. Comparación de las CMI de cada una de las mieles con el tratamiento con catalasa A) miel de *Trigona*, B) miel de *Apis*, C) miel de *Melipona*

De igual manera, la actividad de la miel depende de factores climáticos (calor, humedad, temporada) afectando la consistencia y la cantidad de agua en la miel, del mismo modo influye la diversidad de la flora perteneciente a cada región del mundo, ya que en varios reportes se menciona que las abejas sin aguijón son más selectivas en cuanto a su pecoreo, en comparación con la abeja *Apis* que puede pecorear casi cualquier tipo de flor, esto también podría influir en la actividad antimicrobiana que la

miel pudiera presentar. Los resultados obtenidos en este trabajo son los primeros que determinan la capacidad de inhibición de tres mieles producidas por abejas cultivadas en la península de Yucatán en contra de *Salmonella* Typhimurium.

7.5 Extracción de ADN de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y la evaluación de los genes housekeeping y virulencia por PCR

Con el fin de validar los primers para los genes y que estos se encontraran presentes en el microorganismo (genes housekeeping y de virulencia), se realizó la extracción del ADN genómico de *S. Typhimurium* ATCC 13311, el cual se observa en la figura 14, siendo una banda de alto peso molecular, limpia, íntegra, nítida, que indica que la muestra no presenta degradación; además de que el protocolo de extracción se pudo estandarizar para esta bacteria, ya que no hay presencia de bandas de menor peso molecular, que pudieran ser perjudiciales para pruebas posteriores.

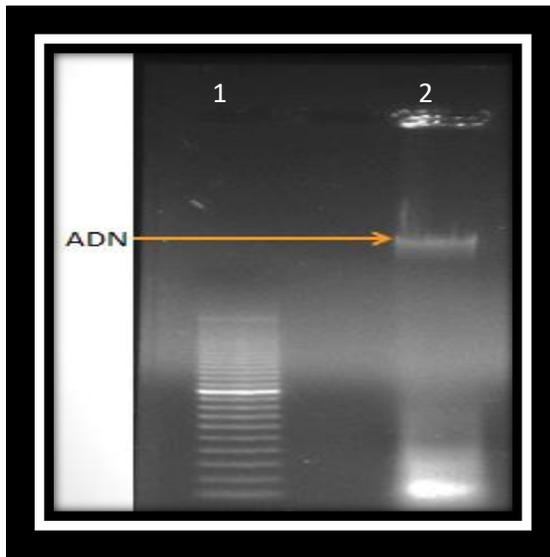
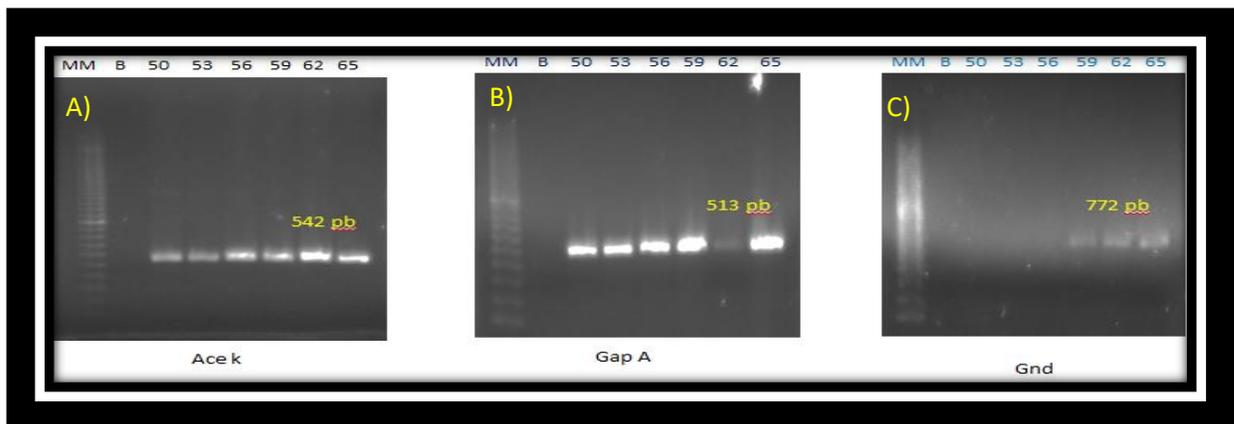


Figura 14. Visualización del gel de agarosa 0.8% de ADN genómico de *Salmonella* Typhimurium
 1) Marcador de peso molecular, 2) Muestra de ADN de *Salmonella* Typhimurium

También se realizó la PCR, logrando amplificar todos los genes en las diferentes temperaturas a los que fueron expuestos:



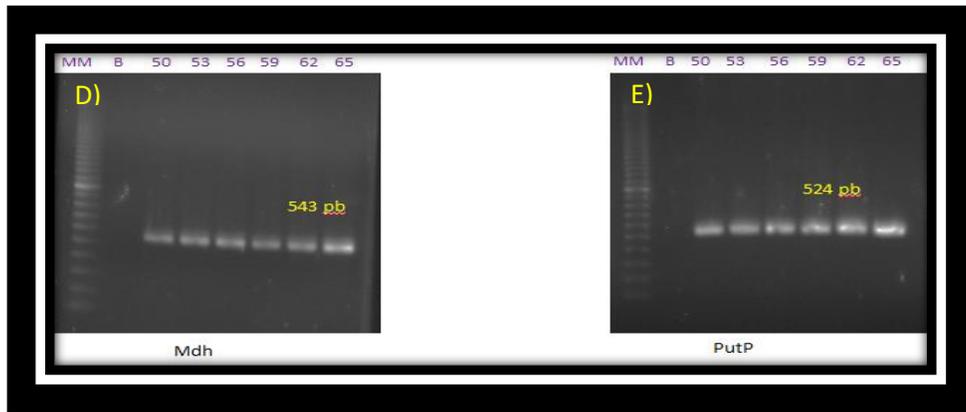


Figura 15. Validación de los oligos por PCR y visualizados en gel de agarosa 0.8% los genes housekeeping: A) *Acek*, B) *GapA*, C) *Gnd*, D) *Mdh*, E) *Putp* en gradiente de temperatura.

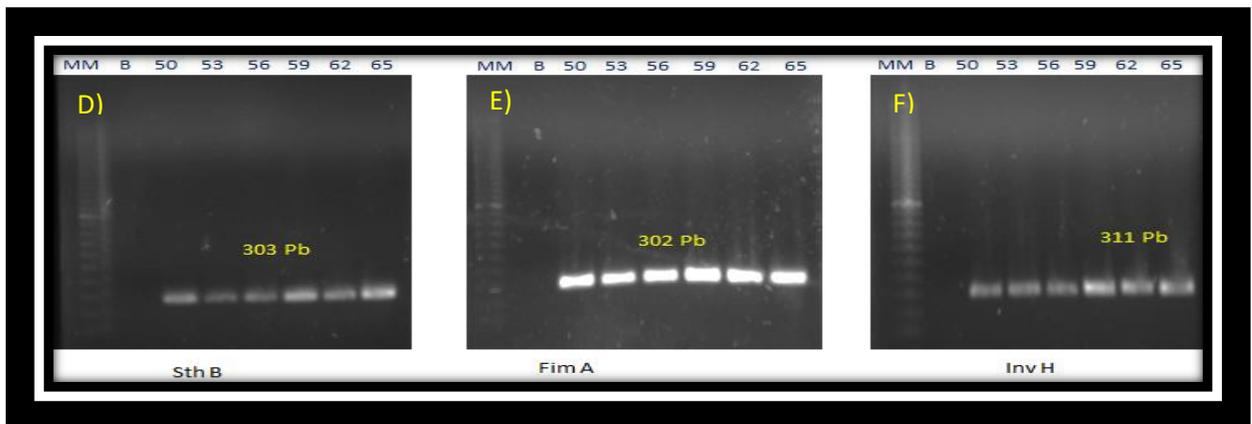
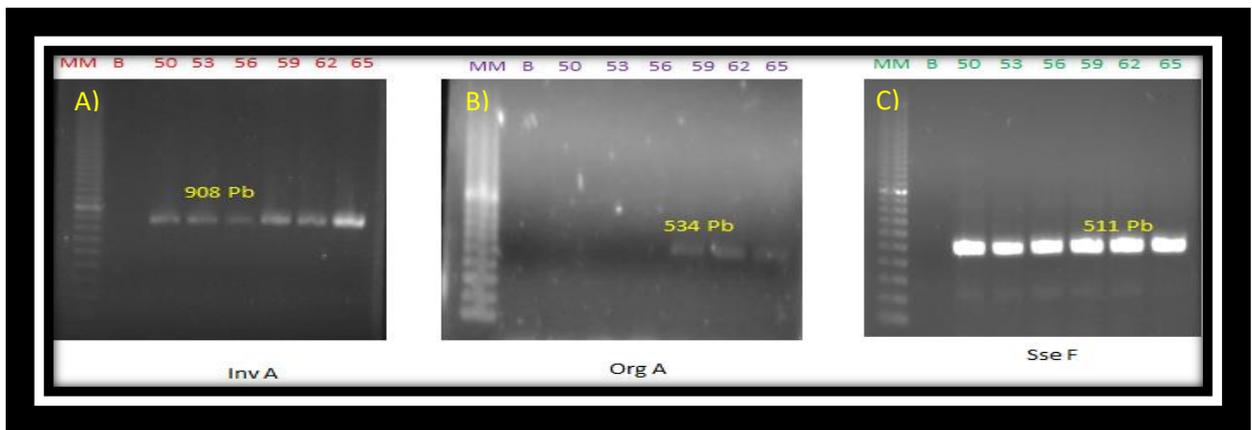


Figura 16. Validación de los oligos por PCR y visualizados en gel de agarosa 0.8% con los genes de virulencia A) *InvA*, B) *OrgA*, C) *SseF*, D) *SthB*, E) *FimA*, F) *InvH* en gradiente de temperatura

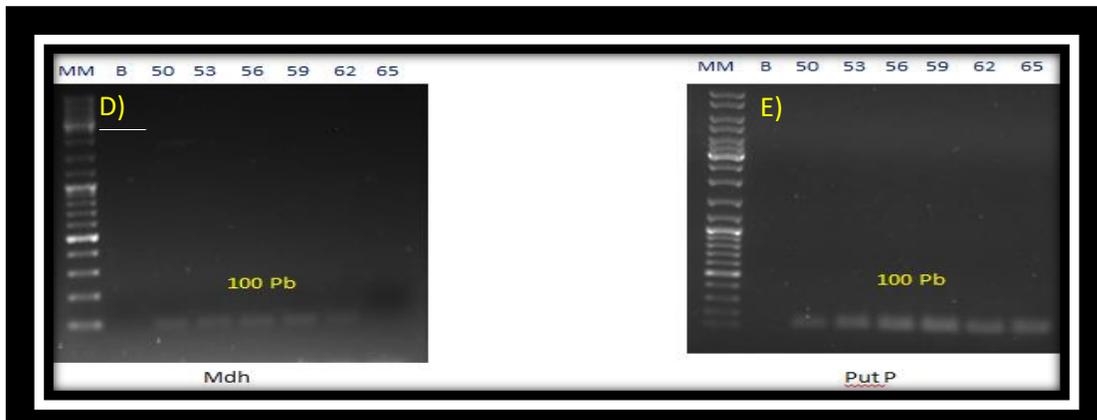
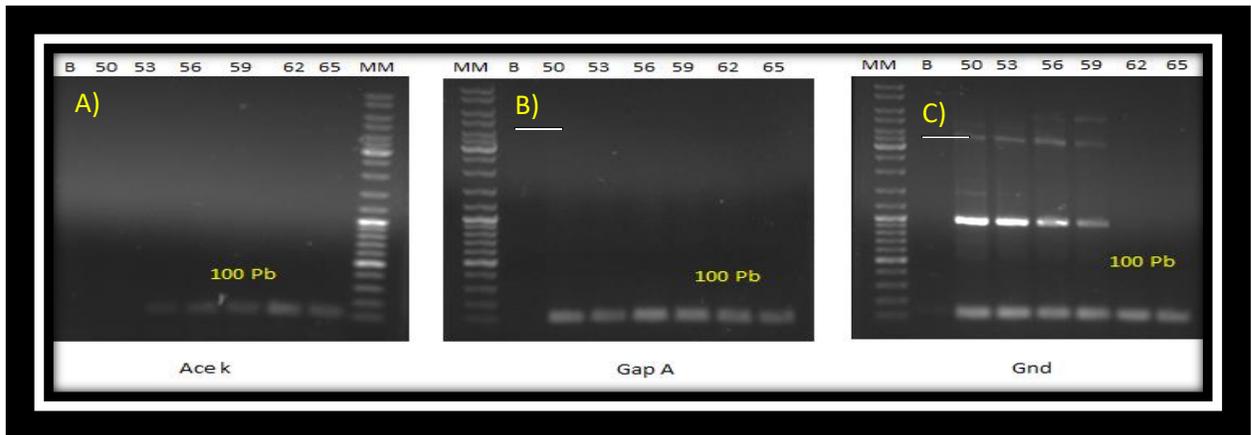
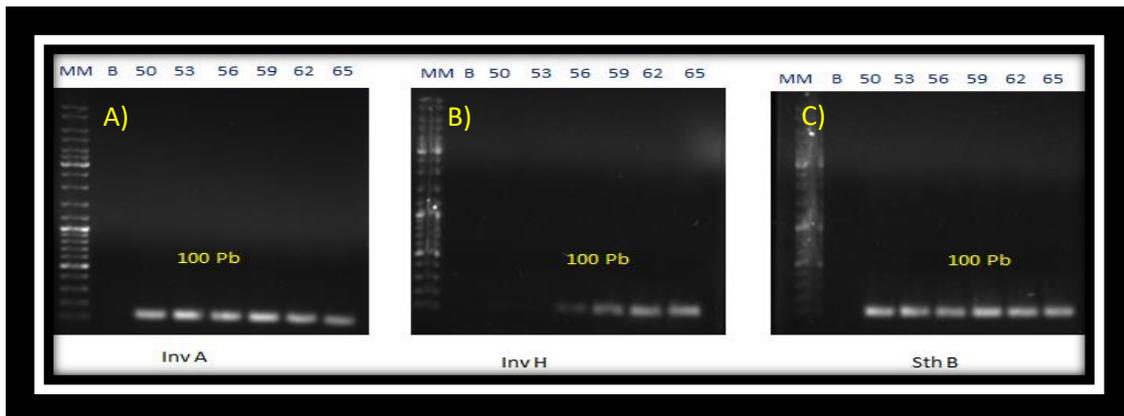


Figura 17. Validación por PCR de los oligos y visualizados en gel de agarosa 0.8% housekeeping para el análisis de la expresión génica A) *Acek* ,B)*GapA* ,C) *Gnd*,D) *Mdh* ,E) *Putp*



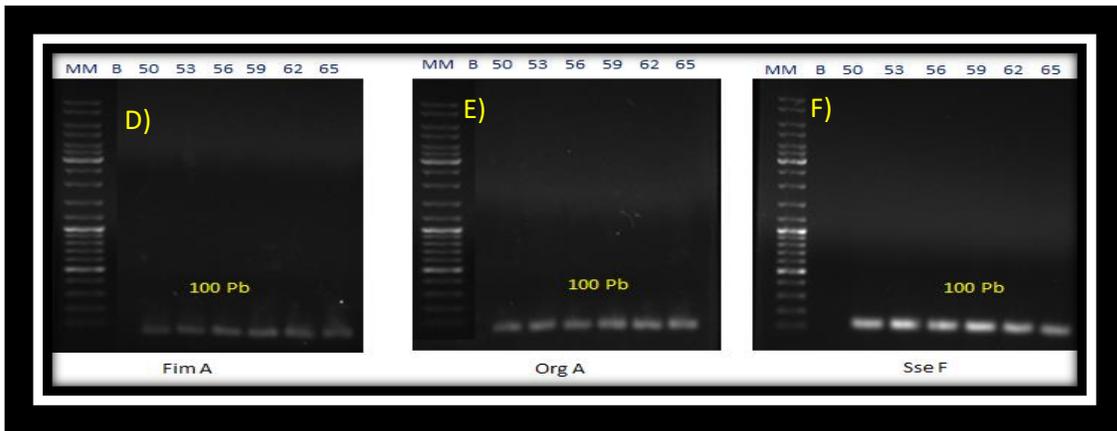


Figura 18. Validación de los oligos por PCR y visualizados en gel de agarosa 0.8%, con los genes de virulencia para la prueba expresión génica A) *InvA* ,B) *InvH* ,C) *SthB* ,D) *FimA* ,E) *OrgA* ,F) *SseF*

Como se puede observar en las figuras (15, 16, 17, 18) se logró la validación de los genes housekeeping y de virulencia para la detección de dichos genes, de igual manera se logró validar los genes para la prueba de expresión génica por qRT-PCR con excepción de *SseF* y *Gnd* que presentaron inespecificidad en algunas temperaturas, ya que se observó más de una banda en el carril donde se colocó la muestra, por lo tanto no se utilizaron para pruebas posteriores, en cuanto a los demás genes todos lograron ser específicos para *Salmonella Typhimurium* ya que lograron amplificar en el tamaño de fragmento esperado.

7.6 Extracción de ARN de *Salmonella Typhimurium*

Se realizó la extracción de ARN de *Salmonella Typhimurium* con el objetivo de obtener material genético de buena calidad para la visualización de los ARN provenientes del ribosomas, así como los ARN de menor tamaño como los mensajeros presentes para la detección de los genes a evaluar. En la figura 19 se observa un gel de agarosa en el cual se corrió una muestra de ARN, en la cual se puede observar bandas integras, y en el cual no se observa degradación del material genético; estas bandas corresponden al ARN ribosomal y micro ARN; durante la tinción del gel no se observó bandas de mayor peso molecular, lo cual indica que no hay presencia de ADN y la muestra es un material genético adecuado para la realización de pruebas posteriores.

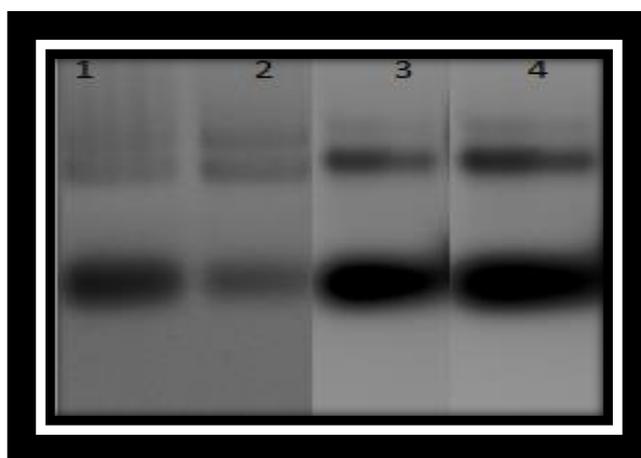


Figura 19. Extracción de ARN del control y del tratamiento con concentraciones subletales de miel al 3% . 1) Control 2) ARN del tratamiento con la miel de Apis, 3) ARN del tratamiento con la miel de Melipona, 4) ARN del tratamiento con la miel de Trigona

Una vez obtenido el ARN se procedió a realizar la síntesis de ADNc por medio de un kit de Thermo scientific, ya que el ADNc es más estable y así se evitó la degradación del material genético para luego usarlo en técnica qRT-PCR la cual cuantifica los niveles de transcritos convertidos a ADNc.

7.7 Análisis de la expresión génica por qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)

Las células regulan sus acciones mediante la inducción o represión de los genes. La expresión génica se encuentra dada por el número de copias de ARN mensajero (ARNm) de un gen específico. Este material genético es esencial para identificar la presencia de productos celulares debido a que el ARNm es traducido en los ribosomas para dar lugar a las proteínas. Por lo que se pueden determinar valores referentes a la producción de elementos biológicos si la expresión de los genes de una célula es conocida (McPherson y col., 2008).

En el presente trabajo se determinó una curva de fusión para los genes a estudiar (Housekeeping: *Gap*, *Gnd*, *Fbp*; Virulencia: *InvA*, *OrgA*, *Fim*) esto con el fin de validar que cada juego de oligos sean específicos para cada gen, debido a la gran sensibilidad que esta prueba tiene. Como se observa en la figura 20, se muestra una sola amplificación para cada gen representado por colores diferentes con sus respectivas repeticiones; demostrando que los oligos diseñados son adecuados.

Los resultados de la PCR en tiempo real se basan en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes (SYBR GREEN) a lo largo de la reacción de la PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde dicha fluorescencia se correlaciona con un aumento del producto de la PCR en base a la cantidad inicial de ADN o ADNc dependiendo del tipo de técnica implementada (Walker, 2002).

Para obtener estos resultados, los valores umbral de cada ciclo (Ct por sus siglas en inglés) deben ser obtenidos. Los valores Ct son determinados con la identificación de cada ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se intensifica por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido, sin embargo para el cálculo de la Ct se debe realizar una regresión lineal, lo cual ya hace el programa Step One (Bustin, 2005).

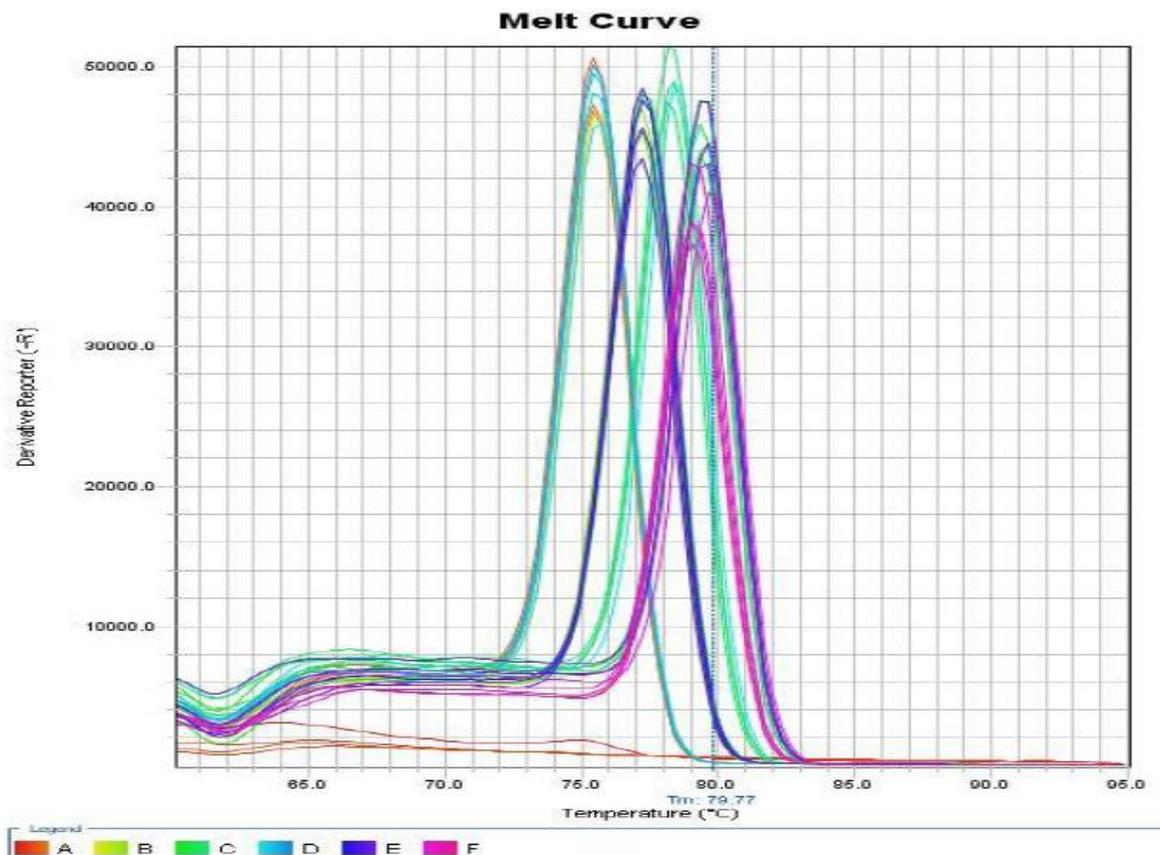


Figura 20. Curva de temperatura de fusión de los genes housekeeping y de virulencia, cada color corresponde a un gen respectivamente, se muestra una sola amplificación, demostrando que los oligos son específicos y que los resultados son confiables

Bajo el tratamiento de dosis sub letal de las mieles al 3 %, se realizó la cuantificación relativa de expresión génica basándose en la comparación de los valores Ct utilizando un modelo matemático que no requiere la eficiencia de la reacción para acceder a un factor de corrección. Este modelo supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100 %) en la eficiencia de reacción en las PCR en tiempo real tanto del gen en estudio como del gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001). Este es el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que sólo es aplicable para una estimación rápida de la proporción

relativa de la expresión génica en estudio. El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control.

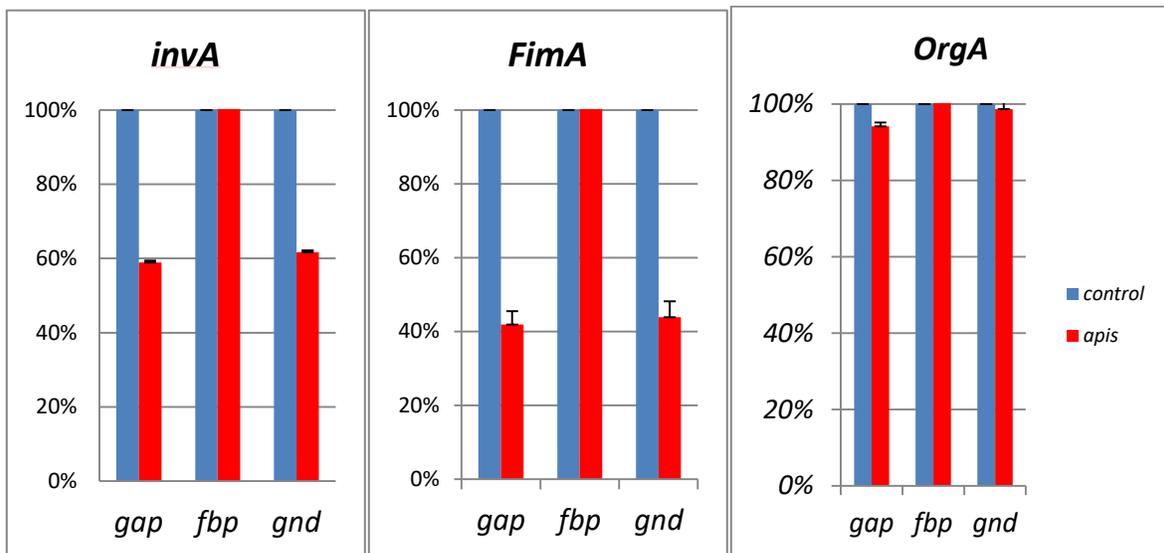


Figura 21. Comparación de la expresión génica de *Salmonella Typhimurium* en presencia de la miel de Apis de los genes de *InvA*, *FimA*, *OrgA*

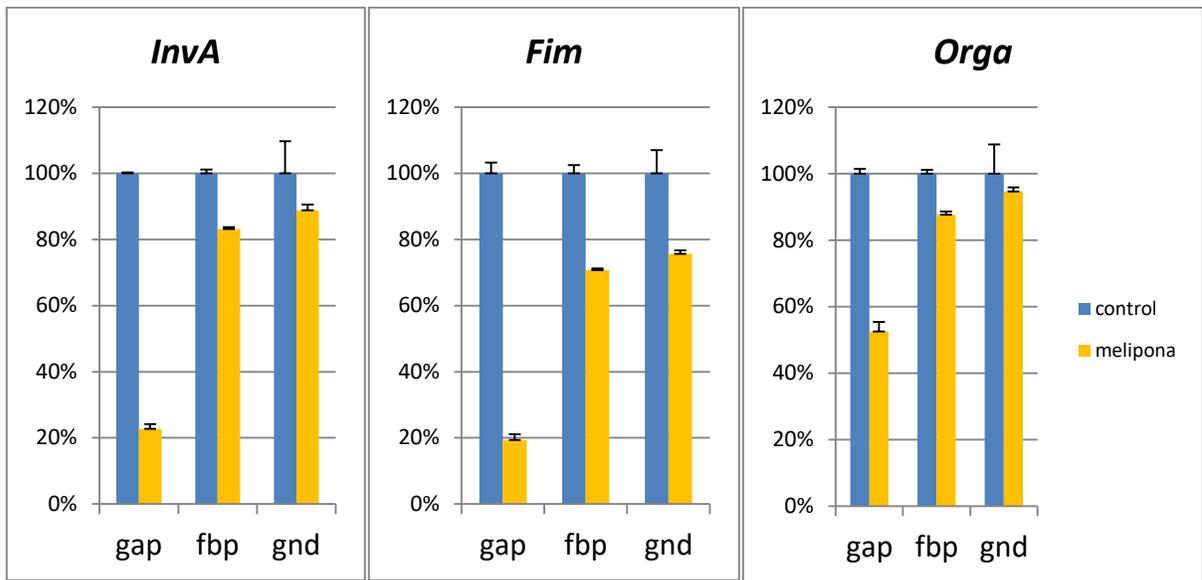


Figura 22. Comparación de la expresión génica de *Salmonella* Typhimurium en presencia de la miel de Melipona de los genes de *InvA*, *FimA*, *OrgA*

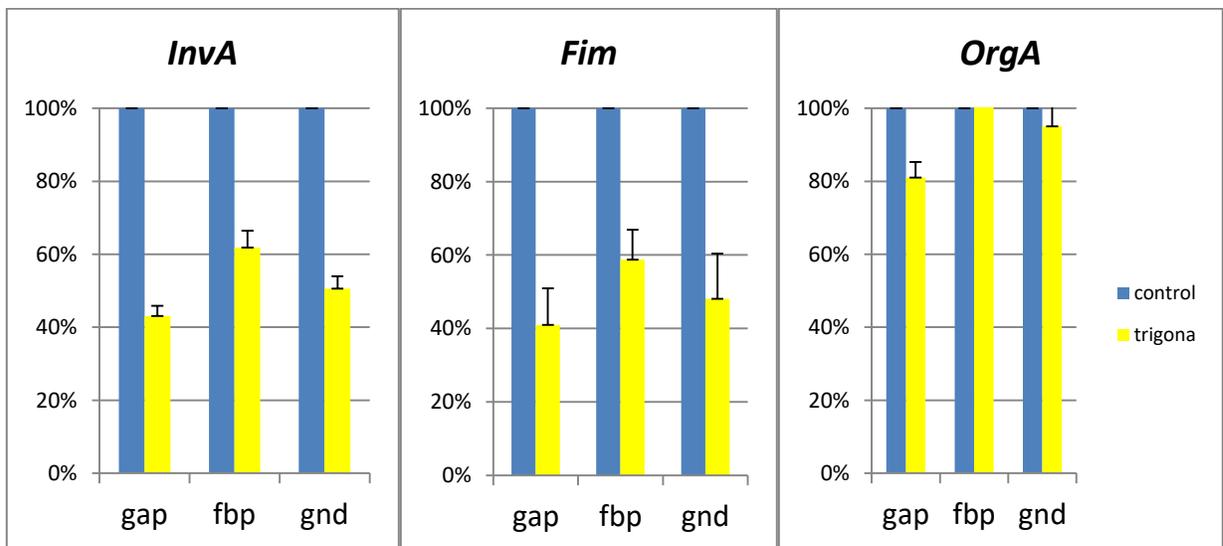


Figura 23. Comparación de la expresión génica de *Salmonella* Typhimurium en presencia de la miel de Trigona de los genes de *InvA*, *FimA*, *OrgA*

Por otra parte en el análisis de la expresión génica bajo el tratamiento de dosis sub letal de la miel de Apis (figura 21), se pudo observar que la miel logró reprimir la expresión de los genes *InvA* y *Fim* con respecto a los genes housekeeping *gap* y *gnd*, en el caso de la miel de Melipona (figura 22) se pudo observar que también tuvo represión de los genes *InvA* y *Fim*. En comparación con las otras mieles; la miel de Trigona (figura 23) fue la más efectiva ya que afectó la expresión génica de los genes *InvA* y *Fim*, siendo la miel que tuvo una mayor represión en los genes de virulencia, esto puede deberse a que la miel de Trigona presenta características diferentes (diferente perfil proteico y de compuestos fenólicos), como lo reportan diferentes autores (Ramon-Sierra y col., 2015; Biluca y col., 2016; Siok y col., 2014) en comparación con la miel de Melipona y Apis.

Las proteínas y los compuestos fenólicos pueden estar afectando la expresión de estos genes, anteriormente ya se han reportados que compuestos fenólicos como el eugenol y el trans-cinamaldehído fueron capaces de matar a *Salmonella enteritidis* y posteriormente a concentraciones sub-letales fueron capaces de reprimir la expresión de genes de virulencia (Kollanoor y col., 2008a; Kallanoor y col., 2010b; Kollanoor y col., 2011c). En contraste a los resultados obtenidos se pudo observar que ninguna de las mieles afectó la expresión génica del gen *OrgA*, esto puede ser debido a que la miel no afectó ninguno de sus factores transcripcionales o alguna vía que regule su

expresión directa o indirectamente. En el caso de gen Fbp se tomó como housekeeping ya que pertenece a la vía de la gluconeogénesis de la cual se tomó como referencia para poder evaluar la expresión génica de los genes de virulencia ya que no debería haber una variación en su expresión, esto es porque se debería estar expresando normalmente debido a las condiciones que presenta el medio con miel.

7.8 Evaluación del perfil de sobrevivencia bacteriana en presencia de las mieles de Apis, Melipona y Trigona

Con el fin de demostrar el efecto de las mieles frente a *Salmonella* Typhimurium, se determinó el perfil de sobrevivencia bacteriana utilizando como controles antibióticos con diferentes mecanismos de acción. El perfil de sobrevivencia obtenido demostró claramente que las tres mieles exhiben un comportamiento similar al antibiótico ampicilina, el mecanismo de este antibiótico es actuar a nivel de la pared celular inhibiendo una enzima la cual se encarga de la formación de la pared celular, en la figura 16 se puede observar cada uno de los perfiles de los diferentes antibióticos empleados, así como los perfiles de las tres mieles utilizadas, todas las mieles lograron matar al microorganismo siendo Apis a las 6 horas, Melipona a las 4 y la miel de Trigona a las tres horas, de estas mieles la miel de Trigona resultó ser la más efectiva ya que logró matar al microorganismo en menos tiempo con respecto al control de ampicilina.

En estudios realizados de cinéticas de sobrevivencia de la miel de abejas sin aguijón en contra de patógenos hay uno realizado por Nishio y col. en 2016 y otro de Boorn y col. en 2010, en el primer reporte se evaluaron las mieles de las abejas *Scaptotrigona bipunctata* y *Scaptotrigona postica*, así como su sinergismo entre ellas, probando las CMI obtenidas previamente, en sus resultados ellos obtuvieron que el sinergismo de las mieles fue más afectivo matando completamente a *S. aureus* a las 7 horas, mientras que las mieles por sí solas logran matar a este microorganismo a las 24 horas; en el segundo reporte se evaluaron muestras de mieles de la especie *Trigona carbonaria*, donde se observó que las muestras de miel afectaba la viabilidad de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* después de 60 minutos de incubación, en comparación con la miel medicinal de la marca Medihoney es producida por la especie *Apis mellifera*.

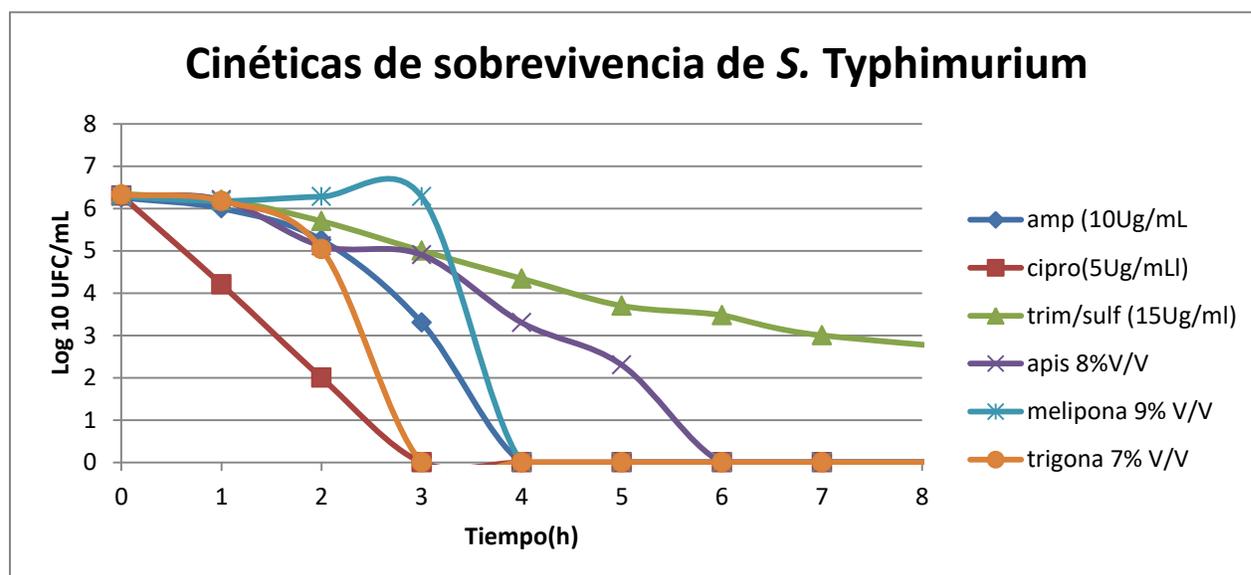


Figura 24. Perfil de sobrevivencia bacteriana en presencia de los diferentes antibióticos (ampicilina, ciprofloxacina y trimetropin/sulfametazaxol) y las mieles (Apis, Melipona, Trigona)

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

- Los parámetros establecidos de acidez libre, grados brix y pH concuerdan con los reportados por Vit y col., 2006; Rodríguez, 2014, Moo-Huchim y col., 2015 para las mieles de abejas sin aguijón, de igual manera los parámetros para la miel de Apis concuerdan con lo establecido en la norma mexicana.
- Se determinó la CMI para cada miel siendo 7 % Trigona, 8 % Apis y 9 % Melipona
- Cada una de las CMI de las mieles con el tratamiento con catalasa no mostraron actividad en contra de *S. Typhimurium* con respecto al control.
- Se determinó el efecto de la miel en la expresión génica donde se pudo observar que la miel si reprime la expresión génica de los genes *Fim e InvA*
- Se determinó el perfil de sobrevivencia bacteriana para cada una de las mieles, siendo la miel de Trigona la más efectiva para matar este microorganismo, esta miel demostró un perfil similar al antibiótico Ampicilina.

PERSPECTIVAS

- Se propone la separación y evaluación de los componentes no-peróxido de las diferentes mieles en contra de otras especies de *Salmonella* Typhimurium.
- Evaluar el efecto de la miel en los diferentes factores de virulencia de *Salmonella* Typhimurium (islas de patogenicidad), así como sus factores transcripcionales.
- Determinar el mecanismo de acción de cada uno de los componentes no-peróxido de la miel en los diferentes sistemas de secreción.
- Determinar si la miel tiene un efecto en las proteínas secretadas.
- Determinar si la miel afecta la invasión de *Salmonella* Typhimurium en células.

Bibliografía.

- Avello Lorca, M., Bittner Berner, M., & Becerra Allende, J. (2013). Antibacterial effects of extracts of species of the genus *Ugni* that grow in Chile. *Revista cubana de plantas medicinales*, 247-257.
- Bakshi, C. S., Singh, V. P., Wood, M. W., Jones, P. W., Wallis, T. S., & Galyov, E. E. (2000). Identification of SOPE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SOPE and involved in bacterial invasion of hepitelial cells. *Journal of Bacteriology*(182), 2341-2344.
- Baumler, A., Gilde, A., Tsohis, R., Velden, A., Ahmer, B., & Heffron, F. (1997). Contribution of horizontal genes tranfer and deletion events to development of distintive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *Journal of Bacteriology*(179), 317-322.
- Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, 105, 822-828.
- Beuzon, C. R., Unsworth, K. E., & Holden, D. W. (2001). In vivo genetic analysis indicates that PhoP-PhoQ and the *Salmonella* pathogenicity islands 2 type III secretion system contribute indepently to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. *infection and immunity*(69), 7254-7261.
- Biluca, F. C., Braghini, F., Vldemiro Gonzaga, L., Oliveira Costa, A., & Fett, R. (2016). Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey(Meliponinae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 61-69.
- Boorn, K. L., Khor, Y. Y., Sweetman, E., Tan, F., Heard, T. A., & Hammer, K. A. (2010). Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by

- agar diffusion, agar dilution, brth microdilution and time-kill methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1534-1543.
- Brudzynski, K. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 1228-1237.
- Bucekova, M., & Majtan, J. (2016). The MRJP1 honey glycoproteins does not contribute to the over antibacterial activity of natural honey. *European Food Research and Technology*, 625-629.
- Butzby, J. C., & Roberts, T. (1996). Foodborne disease costs for seven pathogens. *U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service*, 3(19), 20-25.
- Castañon-Chavarría, L. E. (2009). Mielles diferenciadas de la Península de Yucatán y su mercadp. *Comision Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*, 157.
- Chan Rodriguez, D., Ramon-Sierra, J., Lope-Ayora, J., Sauri-Duch, E., Cuevas-Glory, L., & Ortiz-Vazquez, E. (2012). Antibacterial properties of honey produced by *Melipona beecheii*. *Food Science and Technology*, 21(3), 905-909.
- Chanchao, C. (2009). Antimicrobial activity by *Trigona laeviceps* (Stingless bee) honey from thailand. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 25(3), 364-369.
- Chen, L. M., Kaniga, K., & Galan, J. E. (1996). *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Molecular Microbiology*(21), 1105-1115.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Collazo, C. M., & Galan, J. (1997). The invasion- associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Molecular Microbiology*(24), 746-756.
- Cotter, P. A., & DiRita, V. J. (2000). Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annual Review Microbiology*(54), 519-565.

- Eichelberg, K., Ginocchio, C. C., & Galan, J. E. (1994). Molecular and functional characterization of the *S. typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of *invC* to the F₀F₁ ATPase family of proteins. *Journal of Bacteriology*(176), 4501-4506.
- Finlay, B. B., & Cossart, P. (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*(276), 718-725.
- Fu, Y., & Galan, J. E. (1999). A Salmonella protein antagonize Rac-1 y CDC42 to mediant host-cell recovery after bacteria invasion. *Nature*(401), 193-197.
- Galan, J. E. (2001). Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work. *Annual Review of Cell adn Development biology*(17), 53-86.
- Galan, J. E., & Collmer, A. (1999). Type III secretion machines bacterial device for protein delivery into host cells. *Science*(284), 1322-1328.
- Galan, J. E., & Curtiss, R. (1991). Distribution of the *invA-B-C* and-*D* genes of Salmonella typhimurium among other Salmonella serovars: *invA* mutants of Salmonella typhi are deficient for entry into mammalian cells. *Infection and Immunity*(59), 2901-2908.
- Garedew, A., Schmolz, E., & Lamprecht, I. (2004). Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bb *Trigona* spp. and comparasion of some parameters with those obtained with standar methods. *Thermochimica Acta*, 415, 99-106.
- Ginocchio, C. C., & Galan, J. E. (1995). Functional conservation among members of the Salmonella typhimurium *InvA* family of proteins. *Infection and immunity*(63), 729-732.
- González Acereto, J. Á., & Quezada Euan, J. J. (2010). Producción tradicional de miel: abejas nativas sin aguijón(*Trigona* y *Melipona*s). *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán*, 382-384.
- Goosney, D. L., Knoechel, D. G., & Finlay, B. B. (1999). Enteropathogenic *E. coli*, Salmonella and Shigella: Master of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerging Infectious Diseases*(5), 216-233.

- Grimont, P. (2013). Antigenic formulae of the Salmonella serovars. *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*.
- Grimont, P. A., & Weill, F. X. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella.
- Hancock, H. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacterial. *Expert review of anti-infective therapy*, 5, 951-959.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*(6), 53-66.
- Hardt, W. D., Henning, U., & Galan, J. E. (1998). A substrate of the centisoma 63 type III protein secretion system of Salmonella typhimurium is encoded by cryptic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2574-2579.
- Hau-Yama, N. E. (2015). *Evaluacion de la actividad antifungica(Candida albicans), de la miel de Melipona beecheii del estado de Yucatan*. Mérida, Yucatán, México: INSTITUTO TECNOLOGICO DE MERIDA.
- Hensel, M., Shea, J. E., Waterman, S. R., Mundy, R., Banks, G., Vazquez-Torres, A., . . . Holden, D. W. (1998). Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Molecular Microbiology*, 1, 163-174.
- Jay, J. M. (2002). Taxonomy, Role, and Significance of Microorganisms in Foods. En *Modern Food Microbiology* (pág. Capítulo 1). Estados Unidos de America: Aspen publishers.
- Kallanoor, J. A., Darre, M., Hoagland, T., Schreiber, D., Donoghue, A., Donoghue, D., & Venkitanarayanan, K. (2008). Antibacterial Effect of Tran-Cinnamaldehyde on Salmonella Enteritidis and Campilobacter jejuni in Chicken Drinking Water. *The Journal of Applied Poultry Research*, 17(4), 490-497.
- Klein, J. R., Fahlen, T. F., & Jones, B. D. (2000). Transcriptional organization and function of invasion genes within Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 1,

including the prgH, prgI, prgJ, prgK, orgA, orgB and orgC genes. *infection and immunity*(68), 3368-3376.

Kollanoor, J. A., Darre, M. J., Donoghue, A., Donoghue, D., & Venkitanarayanan, K. (2010). Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol on Salmonella Enteritidis and Campilobacter jejuni in chicken cecal contents in vitro. *The Journal of Applied Poultry Research*, 237-244.

Kollanoor, J. A., Mattson, T., Baskaran, S. A., Amalaradjou, M. A., Badapoor, S., March, B., . . . Venkitanarayanan, K. (2011). Reduction of Salmonella enterica Serovar Enteritidis Colonization in 20 Days Old Broiler Chicken by the Plant-Derived Compunds trans-Cinnamaldehyde an Eugenol. *Applied and Eviromental Microbiology* , 2981-2987.

Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I., & Galan, J. E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Microbiology*(97), 10225-10230.

Lucas, L. R., Lostroh, C. P., Diruso, C. C., Spector, M. P., Waner, B. L., & Lee, C. A. (2000). Multiple factors independently regulate hilA and invasion gene expression in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Journal of Bacterology*(182), 1872-1882.

Majtan, J., Kumar , P., Majtan, T., Walls, A., & Klaudiny, J. (2009). Effect of honey and its major royal jelly protein1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. *Experimiental Dermatology*, 73-79.

Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., & Finlay, B. B. (2000). Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and infection*(2), 145-156.

McCkelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latrielle, P., Courtney, L., . . . Wilson, R. K. (2001). Complete genoma sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. *Nature*(413), 852-856.

Michener, C. D. (2007). *The Bees of the World*. United States of America: The Johns Hopkins University Press.

- Nishio, E. K., Ribeiro, J. M., Oliveira, A. G., Andrade, C. G., Proni, E. A., Kobayashi, R. K., & Nakazato, G. (2016). Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807. *Nature: Scientific Reports*, 6(21641).
- Nweze, J. A., Okafor, J. I., Nweze, E. I., & Nweze, J. E. (2016). Comparison of antimicrobial potential of honey samples from *Apis mellifera* and two stingless bees from Nsukka, Nigeria. *Journal of Pharmacognosy and Natural Products*, 4(2).
- OMS. (19 de 2 de 2018). *WHO Media centre*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Persano, L., Heard, T., Rodriguez-Malaver, A., Perez, A., Fernandez-Muiño, M., Sancho, M., . . . Vit, P. (2008). Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. *Journal of Medical Food*, 11(4), 789-794.
- Rabsch, W., Andrews, H. L., Kingsley, L. A., Prager, R., Tschape, H., Adams, L. G., & Baulmer, A. J. (2002). *Salmonella enterica* serotype typhimurium and its host-adapted variants. *Infection and Immunity*(70), 2249-2255.
- Ramón-Sierra, J., Martínez-Guevara, J. L., Magaña-Ortiz, D. I., Ruiz-Ruiz, J., & Ortiz-Vázquez, E. (2016). Non-peroxide antibacterial activity of *Melipona beecheii* honey against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Science of Food and Agriculture*, 34.
- Ramon-Sierra, J., Ruiz-Ruiz, J., & Ortiz-Vazquez, E. (2015). Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. *Food Chemistry*, 183, 43-48.
- Rocourt, J., Moy, G., Vierk, K., & Schlundt, J. (2003). *The present state of foodborne disease in OECD countries*. Genova, Suiza: Food Safety Department, World Health Organization.
- Romero, R. (2007). *Salmonella*. En *Microbiología y Parasitología humana*.

- Salyers, A., & Whitt, D. (2002). *Bacterial Patogenesis: a molecular approach* (2 ed.). Washington: ASM press.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (2007). *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Crc Press.
- Siok, P. K., Nyuk, L. C., Yus, A. Y., Shea, W. T., & Lee, S. C. (2014). Total Phenolic Contents and Colour Intensity of Malaysian Honeys from *Apis* spp. and *Trigona* spp. Bees. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 150-155.
- Souza, J. M., De souza, E. L., Marques, G., Meireles, B., De Magalhaes Cordeiro, A. T., Guillon, B., . . . Magnani, M. (2016). Polifenolic profile and antioxidant and bacterial activities of monofloral honeys produced by *Meliponini* in the Brazilian semiarid region. *Food Research International*, 61-68.
- Tapia-Tussell, R., Lappe, P., Ulloa, M., Quijano-Ramayo, A., Caceres-Farfan, M., Larque-Saavedra, A., & Perez-Brito, D. (2006). A rapid and simple method for DNA extraction from yeast and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology*, 1, 67-70.
- Temaru, E. (2007). Antibacterial activity of honey from stingless honey bees (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae). *Polish Journal of Microbiology*, 56(4), 281-285.
- Tindall, B. J., Grimont, P. D., Garrity, G. M., & Euzéby, J. P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*(55), 521-524.
- Vázquez-Cruz, G. (2018). Actividad antibacteriana de la miel de abeja sin aguijón *Melipona beecheii* y su efecto en las actividades enzimáticas del patógeno *Helicobacter pylori*. En *Avances y perspectivas de la biotecnología en la península de Yucatán*.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A. J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., . . . Fang, F. C. (1999). Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*(401), 804-808.

Wahdan, H. (1998). Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*, 26, 26-31.

Zaidi, M. B., Lopez, M. C., & Calva, E. (2006). Estudios mexicanos sobre Salmonella: epidemiologia, vacunas y biologia molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 2(48), 121-125.

Zamora- Fallas, L. G. (2018). *Characterization of bioactive constituents from honey produced by costa rican stingless bees*. Costa rica: Faculty of Science, Utrech University, Department of Pharmaceutical Sciences.

ANEXOS

ANEXO 1. Composición del medio Mueller-Hinton

MUELLER HINTON	
Mueller-Hinton broth	22 g
Agua destilada	1000 mL

ANEXO 2. Composición del medio Luria Bertani agar

Luria Bertani agar	
Extractura de levadura	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Triptona	5 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 mL

ANEXO 3. Composición de los medios para la actividad antimicrobiana de miel

	5%	10%	20%	30%	60%
Medio M-H 4x	125µL	125µL	125µL	125µL	125µL
Stock (miel 80%)	31.25 µL	62.5 µL	125 µL	187.5 µL	375 µL
Agua destilada estéril	343.75 µL	262.5 µL	150 µL	137.5 µL	—
Inóculo	50 µL	50 µL	50µL	50 µL	50 µL
Total	500 µL				

ANEXO 4. Composición de la miel sintética

Azúcares mayoritarios	
Sacarosa	2 g
Fructosa	40 g
Glucosa	30 g
Maltosa	8 g
Agua destilada	100 mL