



TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE ORIGEN VIRAL EFECTIVO CONTRA BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Zermeño-Cervantes Lina A. & Martínez-Díaz Sergio F. Instituto Politécnico Nacional-Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (Departamento de Desarrollo de Tecnologías). La Paz. C.P.23096. violinrojo_17@hotmail.com

Palabras clave: enzimas antibacterianas, endolisinas, bacterias Gram-negativas

Introducción. A nivel mundial, existe la necesidad del desarrollo de terapias antibacterianas innovadoras en el combate de bacterias patógenas (1). Particularmente tratamientos efectivos contra bacterias Gram-negativas, ya que suelen ser resistentes a gran variedad de compuestos antimicrobianos y antibióticos debido a la impermeabilidad de su membrana externa, y por la adquisición de mecanismos secundarios de resistencia que los vuelven aún más resistentes (2). Las enzimas bacteriolíticas de origen viral (endolisinas) han demostrado ser una excelente alternativa antibacteriana contra patógenos Gram-positivos (3). Su mecanismo de acción es diferente al de los antibióticos y se basa en la hidrólisis de enlaces específicos de la pared celular, su espectro de acción es estrecho y generalmente selectivo a nivel especie-específico, son inocuas para células eucariotas, el efecto bacteriolítico es instantáneo al contacto con el sustrato y no parece generarse resistencia como en el caso de los antibióticos tradicionales (4). Sin embargo la impermeabilidad de las bacterias Gram-negativas impide el acceso de la enzima a su sitio de acción, lo que ha derivado en un campo de investigación dirigido a buscar la inducción de susceptibilidad de este grupo de bacterias al efecto de las endolisinas.

El presente trabajo propone el uso de permeabilizadores de membrana de origen natural como coadyuvantes de la reacción enzimática, utilizando como modelo de estudio *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC-17802) y las endolisinas codificadas por el bacteriófago Vpms1 (5).

Metodología. Se obtuvieron lisados crudos en el que se liberaron las enzimas, luego de la lisis de las bacterias infectadas por el bacteriófago Vpms1. Se retiró el paquete celular, el medio se clarificó con membrana de 0.2µm y se removieron las partículas virales con un filtro Viresolve NFP ® Millipore. Por otro lado se seleccionaron concentraciones de aceite esencial de *Lippia berlandieri*, con efecto inhibitorio (0.08 µL mL⁻¹), moderadamente lítico (0.1 µL mL⁻¹), y fuertemente lítico (0.16 µL mL⁻¹) en suspensiones bacterianas de *V. parahaemolyticus*. Se evaluó el efecto sinérgico de las endolisinas en conjunto con aceite de orégano en suspensiones de bacterias de 1.6 x 10⁹ UFC mL⁻¹. Se incluyeron como controles suspensiones de bacterias tratadas con el lisado crudo y suspensiones de bacterias tratadas con aceite de orégano. El efecto bactericida se determinó después de 1h en incubación a 30°C, mediante la reducción de UFC realizando una cuenta viable en placa.

Resultados. Una concentración de aceite de orégano con efecto inhibitorio permite evidenciar la actividad bactericida de las endolisinas y pone de manifiesto el efecto sinérgico de ambos componentes. Incluso con el lisado crudo sin purificar se registra una considerable reducción en la cuenta de células viables. Al aumentar la concentración de aceite de orégano, el efecto bactericida es resultado de la permeabilización (0.16 µL mL⁻¹).

Tabla 1. Efecto bactericida del lisado crudo Vpms1 en conjunto con aceite esencial de orégano.

Tratamientos	UFC _{final} mL ⁻¹	Actividad bactericida (%)	Efecto sinérgico
Bacteria + C1	1.6 x 10 ⁹	1.8	
Bacteria + C1+ lisado crudo	0.724 x 10 ⁹	55.6	+
Bacteria + C2	1.12 x 10 ⁹	31.3	
Bacteria + C2 + lisado crudo	0.459 x 10 ⁹	71.8	+
Bacteria + C3	0.195 x 10 ⁹	88	
Bacteria + C3 + lisado crudo	0.17 x 10 ⁹	89.6	
Bacteria + lisado crudo	1.78 x 10 ⁹		

Concentraciones de aceite de orégano: C1= 0.08 µL mL⁻¹; C2= 0.1 µL mL⁻¹; C3= 0.16 µL mL⁻¹

Conclusiones. Las endolisinas tienen efecto lítico contra bacterias Gram-negativas al permeabilizar la membrana externa con aceite de orégano. Esta alternativa es útil como tratamiento selectivo por la naturaleza de las endolisinas, pero siempre y cuando se utilice una concentración del permeabilizador de membrana con efecto inhibitorio.

Agradecimiento. El financiamiento fue proporcionado por el proyecto CONAcYT 85033.

Bibliografía. (1) Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., & Lan, C. Q. (2008). # *appl microbiol*, # 04(1), 1-13.
(2) Paterson, D. L. (2006). *The American journal of medicine*, #19(6), S20-S28.
(3) Schuch R, Nelso D, Fischetti V. (2002). *Nature*, 418: 884-889.
(4) Hermoso, J. A., García, J. L., & García, P. (2007). *Curr opin microbiol*, 10 (5), 461-472.
(5) Ramírez-Orozco, M., Serrano-Pinto, V., Ochoa-Álvarez, N., Makarov, R., & Martínez-Díaz, S. F. (2013). # *Arch virol*, # 58(11), 2409-2413.