



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTOS ANTIMICROBIANOS DE LOS EXTRACTOS DE
SEMILLA Y RAÍZ DE PAPAYA (*CARICA PAPAYA*) SOBRE
BACTERIAS MULTIRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

FLORA LUCIA CARMONA BAÑOS



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Jesús Fernando Montiel Aguirre

VOCAL: Eduardo Bonilla Espinosa

SECRETARIO: Luciano Hernández Gómez

1er. SUPLENTE: Aleida Mina Cetina

2° SUPLENTE: Raquel Ortega Muñoz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Microbiología Molecular, Laboratorio 1-A anexo, edificio A, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

SUPERVISOR TÉCNICO

M. en C. Raquel Ortega Muñoz

SUSTENTANTE

Flora Lucia Carmona Baños

Índice.

	Pág.
Resumen.....	1
Introducción	
1. Antibióticos.....	2
1.1. Clasificación y mecanismo de acción.....	4
1.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	12
1.2.1. Desarrollo de la resistencia.....	14
1.2.2. Elementos genéticos móviles.....	16
1.2.3. Bombas de expulsión.....	22
1.3. Propiedades y usos de <i>Carica papaya</i>	26
1.3.1. Usos medicinales.....	28
1.3.2. Fitoconstituyentes de <i>C. papaya</i>	30
1.3.3. Actividad antibacteriana.....	31
2. Justificación	32
3. Objetivo general.....	33
3.1. Objetivos particulares.....	33
4. Hipótesis.....	33
5. Metodología.....	35
5.1. Aislamiento.....	35
5.2. Selección preliminar de cepas resistentes.....	36
5.3. Purificación y caracterización de cepas.....	36
5.4. Determinación de cepas multirresistentes.....	36
5.5. Tolerancia a Bromuro de Etidio.....	37
5.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	37

5.5.2. Acumulación de bromuro de etidio.....	37
5.6. Obtención de los extractos de <i>C. papaya</i>	38
5.6.1. Extracto metanólico de raíz de <i>C. papaya</i>	38
5.6.2. Extracto acuoso de semillas de <i>C. papaya</i>	38
5.7. Evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos.....	38
6. Resultados y discusión.....	39
7. Conclusiones.....	47
8. Anexo.....	48
9. Referencias.....	49

Resumen.

La existencia de cepas multirresistentes en productos vegetales para consumo humano se ha considerado un riesgo potencial para la salud pública, ya que dichos microorganismos podrían actuar como reservorio de genes de resistencia y favorecer su diseminación en el medio ambiente.

En el presente trabajo se estudió el epicarpio de la papaya (*Carica papaya*) debido a que ésta es una fruta de consumo frecuente en México y además es utilizada en la medicina tradicional ya que se le atribuyen, entre otras muchas cosas, propiedades antimicrobianas. De aquí que surgiera la interrogante sobre la posible presencia de bacterias en ésta fruta y, de encontrarlas, si éstas presentan un fenotipo de multirresistencia a antibióticos, por lo que se realizó un muestreo microbiológico de la fruta lavada y sin lavar. A las cepas aisladas se les realizó un perfil de resistencia a antibióticos por el método microbiológico Bauer-Kirby, encontrando cepas multirresistentes a las cuales se les realizaron experimentos de tolerancia con bromuro de etidio, suponiendo una sobre-expresión de genes que codifican para las bombas de expulsión ocasionando resistencia a antibióticos.

Por último se evaluó el efecto antimicrobiano de extractos de semilla y raíz de papaya frente a bacterias multirresistentes a antibióticos.

Introducción.

1. Antibióticos.

El término antibiótico proviene de la voz griega *anti* (contra) y *bios* (vida) y fue propuesto para definir sustancias con efecto antimicrobiano. Son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) o sintetizados por métodos de laboratorio. Suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden, eventualmente, destruirlos. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Jawetz, E. 1998).

Con frecuencia se han utilizado de manera indistinta los términos antibiótico, antimicrobiano y quimioterapéutico para designar sustancias químicas definidas con actividad contra microorganismos específicos.

Como ya se señaló, el antibiótico es una sustancia producida en la naturaleza por microorganismos vivos, por lo que se considera un producto de la evolución y puede conferir una ventaja selectiva a quienes los producen en un ecosistema específico (Calderwood S. 1988).

Generalmente, su acción se mide en términos de espectro bacteriano, es decir, si un antibiótico actúa en un sector restringido es denominado "de espectro limitado". Por otra parte, si lleva a cabo su acción en diferentes grupos de microorganismos es llamado "de amplio espectro". Existe un grupo llamado "de espectro selectivo" y estos solo actúan frente a un grupo particular de microorganismos (Norby, 1991).

Además, pueden tener un efecto bacteriostático y/o bactericida. El primero, inhibe la proliferación bacteriana y una vez suspendido el tratamiento las bacterias pueden reanudar su crecimiento. El segundo, tiene la propiedad de destruir a las bacterias y su efecto es irreversible (Madigan, 2000).

En 1928 Alexander Fleming (1881-1955) descubre que un moho *Penicillium notatum* produce una sustancia que inhibía la proliferación de bacterias en cultivo. Fleming llamó a dicha sustancia "Penicilina"; sin embargo, ésta fue desarrollada como medicamento hasta los años cuarenta por los científicos británicos Howard Florey (1898-1973) y Ernest Chain (1906-1979). En 1942, el microbiólogo ruso-norteamericano Abraham Selman Waksman (1888-1973) propone el término antibiótico (Bergoglio, 1993).

La "época de oro" de los antibióticos comenzó con la producción de la penicilina en 1941, fecha en que se produjo en mayor proporción dicho compuesto y se le pudo obtener para estudios limitados en seres humanos. De esta manera, cuando menos el 30% de todos los sujetos hospitalizados en la actualidad reciben uno o más ciclos de antibioterapia y los compuestos de esta categoría han curado millones de infecciones que pudieron haber sido letales. Sin embargo, al mismo tiempo, dichos compuestos son utilizados en forma errónea o incluso han sido objeto de abuso. Un resultado de su mal uso, ha sido la aparición de microorganismos patógenos resistentes a ellos, esto a su vez ha sido el punto de partida de la necesidad cada vez mayor de contar con nuevos fármacos (García *et.al.*, 2004; Chambers, 2007).

1.1. Clasificación y mecanismo de acción.

En general, los antibióticos deben su toxicidad selectiva a las diferencias entre las células eucariotas y procariotas. Su eficacia tóxica es la consecuencia de su capacidad de inhibir una reacción bioquímica específica y esencial, bien sea para la célula eucariota o para la célula procariota. Para que el antibiótico ejerza su acción es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre en las bacterias (por difusión o transporte activo) y alcance intracelularmente la concentración necesaria. Una vez dentro de la célula el antibiótico puede ser bacteriostático si inhibe la multiplicación de forma reversible, o bactericida si tiene un efecto letal. En general, cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra (Sussmann, 2011).

Antibióticos bacteriostáticos: macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol.

Antibióticos bactericidas: betalactámicos, aminoglucósidos, polipéptidos, polienos.

En este contexto, los mecanismos moleculares que permiten la acción directa de un antibiótico sobre la estructura bacteriana son muy complejos y se resumen fundamentalmente a cinco (Núñez, B. *et.al.*):

- I. Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- II. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.
- III. Inhibidores de la síntesis proteica.
- IIII. Inactivación funcional de la membrana citoplasmática.
- V. Inhibición de las enzimas inactivadoras de antimicrobianos.

I.- INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.

Los antibióticos actúan inhibiendo cualquiera de los tres mecanismos de la biosíntesis de la pared celular:

a) Inhibición de la fase citoplasmática. Actúan en el citoplasma bacteriano inhibiendo la síntesis de los precursores del pentapéptido N-acetil-murámico. En este proceso actúa la fosfomicina, la daptomicina y la cicloserina.

b) Inhibición de la fase de transporte de precursores. Este mecanismo actúa dentro de la membrana citoplasmática impidiendo la d-fosforilación de sus precursores. La bacitracina es uno de los antibióticos que actúa en esta fase.

c) Inhibición de la organización estructural del péptidoglicano. Mediante este mecanismo se bloquea selectivamente la transferencia del polímero lineal a la pared celular existente, interfiriendo en la organización estructural definitiva del péptidoglicano, evitando su polimerización al ligarse a las Proteínas Fijadoras de Penicilina (PFP), como lo hacen todos los beta-lactámicos. En tanto que los glucopéptidos evitan la polimerización del péptidoglicano en la proximidad de la membrana citoplasmática bacteriana (Allen, 2003).

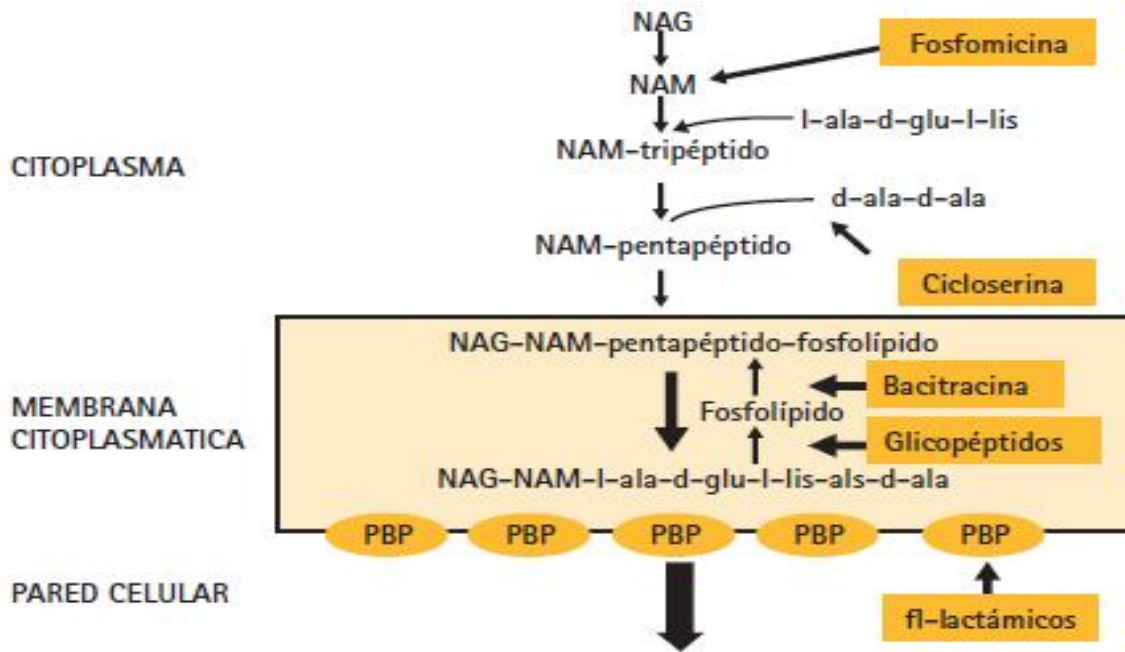


Figura 1. Inhibición de la síntesis de la pared celular. NAG: N-acetil-glucosamina; NAM: N-acetil-murámico; PBP: proteína fijadora de penicilina.

II.- INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.

Los antibióticos que actúan en la transcripción y replicación del ADN, ejecutan su acción en varias fases de los complejos procesos en los que intervienen enzimas, sustratos activados y un molde de ADN sobre el que se originan cadenas complementarias de ARN o ADN. De esta manera tenemos:

a) Inhibidores de la síntesis de precursores. Lo hacen interfiriendo con la síntesis del ácido tetrahidrofólico con la consecuente inhibición de la síntesis de las bases púricas y pirimídicas. Con este mecanismo actúan las sulfonamidas y el trimetoprim.

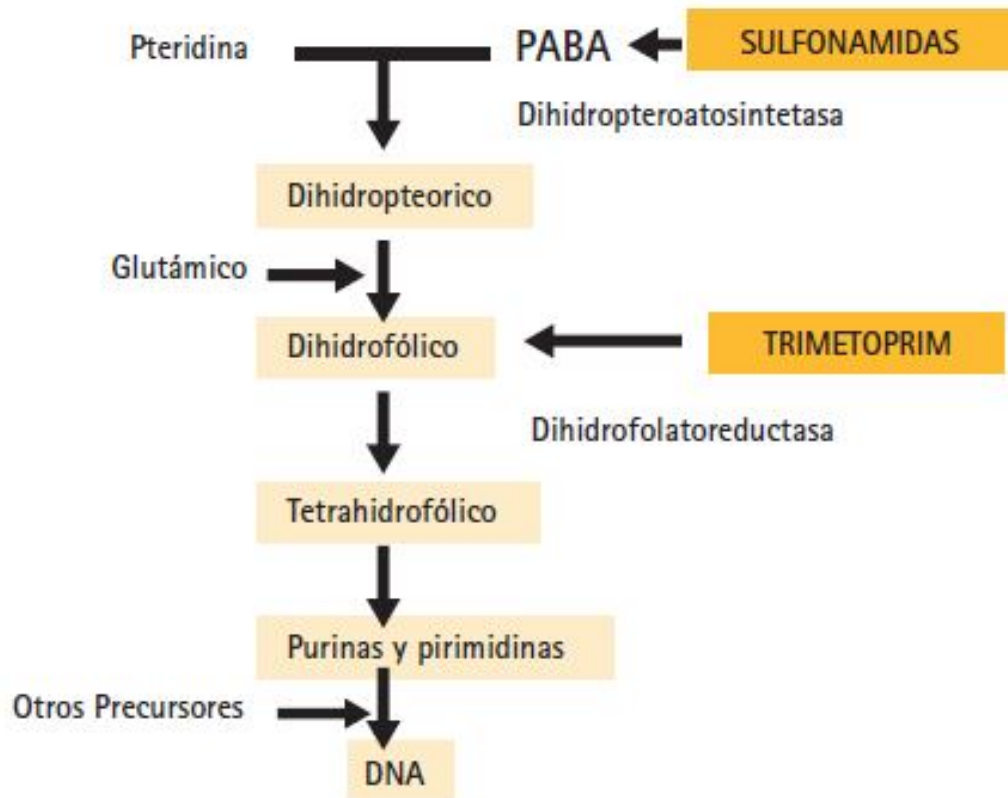


Figura 2. Síntesis de los precursores de ácidos nucleicos y mecanismo de acción de las sulfonamidas y el trimetoprim.

b) Inhibidores de la replicación del ADN bacteriano. Mediante este mecanismo de acción, las quinolonas se fijan con mayor afinidad a la subunidad A de la ADN Girasa o Topoisomerasa II, bloqueando la actividad del complejo ADN-Girasa e inhibiendo por lo tanto la síntesis del ADN bacteriano.

c) Inhibidores de la transcripción del ADN bacteriano. Actúa inhibiendo el crecimiento bacteriano al bloquear la síntesis del RNA mensajero y ribosómico. Las rifamicinas como la rifampicina ejercen su acción mediante este mecanismo.

d) Inhibidores de la polimerización de los ácidos nucleicos. Antibióticos como la actinomicina D se fijan al ADN impidiéndole ejercer su función como molde. Otros, como los nitroimidazoles, alteran la estructura nativa del ADN provocando escisiones, puentes covalentes intercatenarios, o rupturas intracatenarias (Calvo, 2009).

III.- INHIBIDORES DE LA SINTESIS PROTEICA.

La síntesis proteica es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas (Calvo, 2009).

Los antibióticos actúan en cualquiera de las cuatro fases secuenciales de la síntesis proteica bacteriana:

a) Inhibidores de la activación. La mupirocina es un bacteriostático que inhibe la isoleucil-ARN sintetasa. Solo actúan en bacterias Gram positivas.

b) Inhibidores de la activación y formación del complejo inicial.

Para que los aminoglucósidos produzcan su efecto, tienen que ser transportados de manera activa al interior de la célula susceptible; este transporte se inhibe por la presencia de cationes divalentes como Ca^{++} y el Mg^{++} , la hiperosmolaridad, la disminución del pH y la anaerobiosis.

Los aminoglucósidos como son la gentamicina, tobramicina, amikacina, y estreptomycin se unen a la subunidad 30S del ribosoma y pueden

bloquear la síntesis de proteínas de dos maneras diferentes. En primer lugar estos se pueden adherir a la subunidad 30S del ribosoma y prevenir que la subunidad 30S se adhiera al ARN mensajero (ARNm). Segundo, la presencia del aminoglucósido en el ribosoma podría provocar la lectura errada del ARNm. Esto resulta en la inserción de aminoácidos erróneos en la proteína o en la interferencia con la capacidad de los aminoácidos para conectarse unos con otros. Estas actividades por lo general ocurren de manera simultánea y el efecto total es bactericida (Axelsen, 2002).

c) Inhibidores de la fijación del complejo Aminoacil-ARN-t al ribosoma. Por medio de este mecanismo, las tetraciclinas, intervienen con la fijación del aminoacidil-t-ARN sobre el sitio aceptor A para ejercer su efecto bacteriostático. También interactúan con la subunidad 30s en el extremo de la subunidad ribosómica.

d) Inhibidores de transpeptidación. Mediante este mecanismo el cloranfenicol se fija en la subunidad ribosómica 50s e interfiere con la unión de aminoácidos a la proteína en crecimiento. Los agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas de esta forma son bacteriostáticos, tiene un amplio espectro de actividad contra microorganismos Gram positivos, Gram negativos y anaerobios (Calvo, 2009).

e) Inhibidores de la translocación. Por este mecanismo, los macrólidos tales como la eritromicina, azitromicina y claritromicina y las lincosamidas (clindamicina) originan que la cadena peptídica en crecimiento se disocie del ribosoma durante el paso de translocación, lo que evita que aquélla alcance su completa formación. Finalmente, las estreptograminas estrechan el conducto a través del cual el péptido naciente es liberado desde el ribosoma. (Garza *et.al.*, 2004).

IV.- INACTIVACIÓN FUNCIONAL DE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA.

La membrana citoplasmática es fundamental para la regulación del medio extracelular de la bacteria. Esta membrana tiene una estructura particular en las bacterias y puede lesionarse por algunos antibióticos (Patiño, 2003). Los antimicrobianos que actúan en esta estructura se comportan como bactericidas, incluso en bacterias en reposo, y pueden tener alta toxicidad sobre las células humanas, al compartir algunos componentes de la membrana citoplasmática. A este grupo pertenecen las polimixinas, los lipopéptidos, los antibióticos poliénicos (activos frente a hongos) y 2 grupos de escaso interés clínico (ionóforos y formadores de poros).

a) Ionóforos. Los ionóforos son antibióticos polipeptídicos cíclicos como la valinomicina o las tirocidinas A y B. Estos compuestos tienen estructura circular peculiar, hidrofóbica en el exterior e hidrofílica o polar en el interior. Los ionóforos incorporan cationes monovalentes en su interior, y les permite cruzar la bicapa lipídica. La penetración elevada de potasio altera el potencial eléctrico y el gradiente químico existente en la membrana, alterando su función (Calvo, 2009).

b) Formadores de Poros. Los antibióticos de este grupo, como la gramicidina, provocan el paso selectivo de moléculas a través del canal abierto por los mismos antibióticos, que a diferencia de los ionóforos, son cadenas lineales de aminoácidos (polipéptidos acíclicos) con un mecanismo de acción distinto. Se difunden a través de la membrana externa y pared celular de células susceptibles hacia la membrana citoplásmica. Estas se unen a la membrana citoplásmica, la alteran y desestabilizan. Esto causa el derrame del citoplasma hacia el exterior de la célula lo que resulta en muerte celular.

c) Desestructuración de la membrana citoplasmática.

La daptomicina ejerce un efecto sobre la membrana que determina una pérdida de iones K^+ intracelular. Activa contra Gram+, se une a la membrana bacteriana causando despolarización y conduciendo a inhibición rápida de síntesis de proteínas, ADN y ARN.

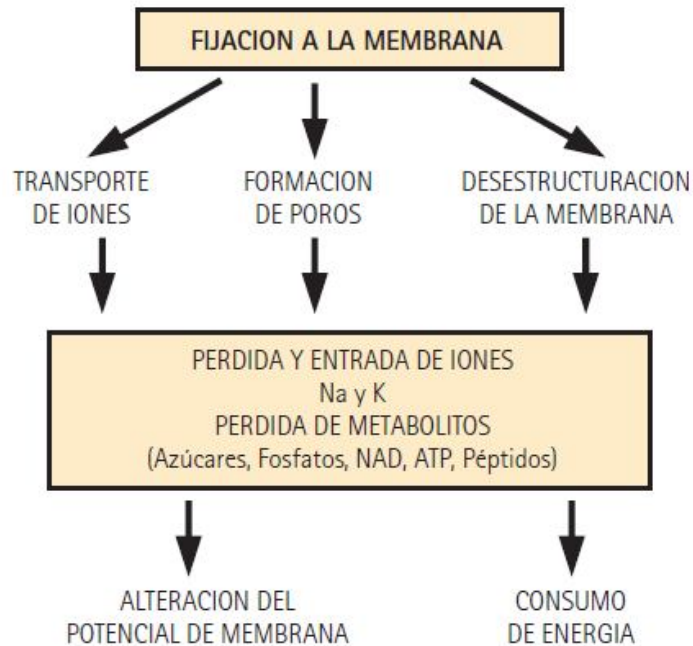


Figura 3. Inactivadores funcionales de la membrana citoplasmática bacteriana.

V.- INHIBICIÓN DE ENZIMAS INACTIVADORAS DE ANTIMICROBIANOS.

Existe un grupo de fármacos que en sí mismo no tiene un efecto antibiótico, estos son los inhibidores de las beta-lactamasas como el sulbactam, el ácido clavulónico y el tazobactam. Estas sustancias actúan como moléculas suicidas que se fijan a las beta-lactamasas formadas por las bacterias, actuando de forma competitiva con los beta-lactámicos por su analogía estructural, permitiendo a éstos ejercer su

mecanismo de acción ligándose a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) y de esta manera inhibiendo la formación de la pared celular.

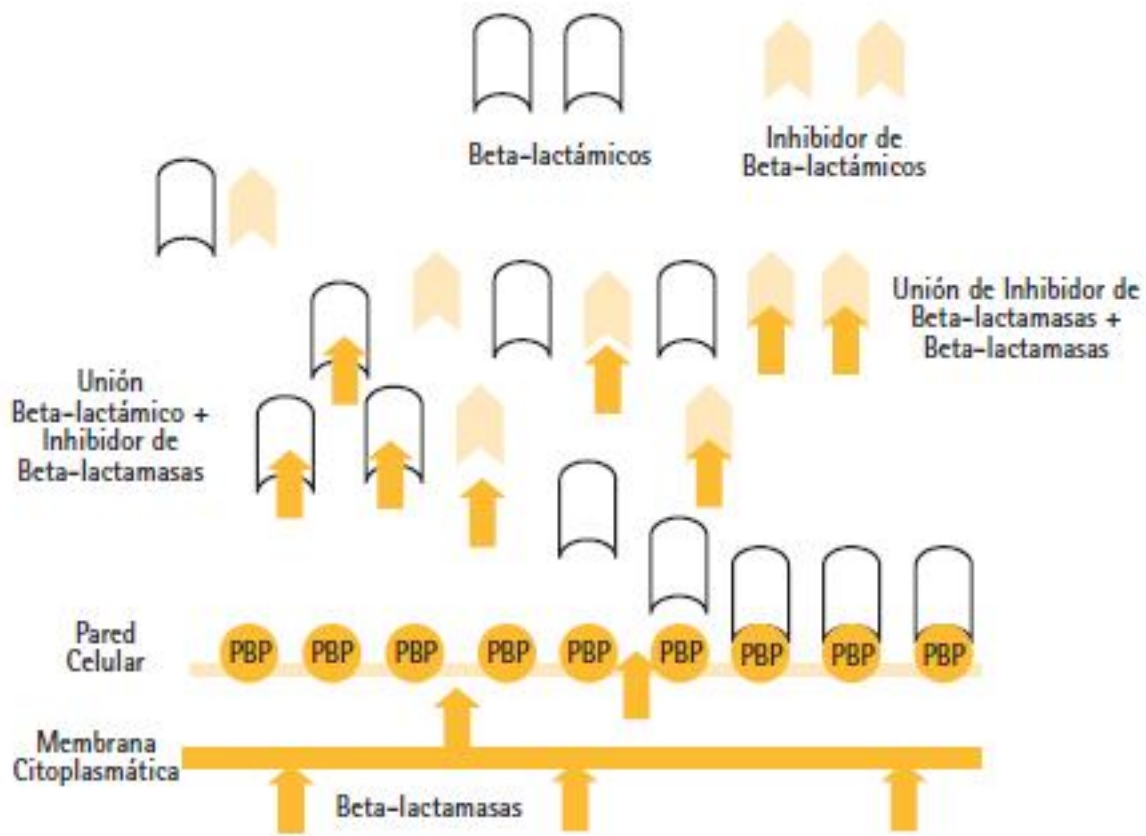


Figura 4. Inhibidores de Beta-lactamasas ligándose a las Beta-lactamasas bacterianas para permitir la acción de los antibióticos beta-lactámicos.

1.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos.

La resistencia antibiótica es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de verse afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Los microorganismos resistentes son inmunes a los efectos de los antimicrobianos, de modo que los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas. La resistencia es una consecuencia del uso de los antimicrobianos y en particular de su abuso, y surge por mutación del

microorganismo o adquisición de genes de resistencia (Cordiés, L., et al., 1998).

El fenómeno de resistencia tiene un sustrato genético intrínseco o adquirido que se expresa fenotípicamente por mecanismos bioquímicos. De esta manera la resistencia puede observarse desde el ambiente biológico y desde el bioquímico.

Se conoce como *resistencia natural* a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionados con el incremento de dosis del antibiótico. Un ejemplo de esto es la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a las bencilpenicilinas y al trimetoprim sulfametoxazol; otro ejemplo es el de los bacilos Gram negativos aeróbicos a clindamicina.

La *resistencia adquirida* aparece por cambios puntuales en el DNA (mutación) o por la adquisición de éste (plásmidos, transposones, integrones).

En el primero se dan casos tales como la transformación de una betalactamasa en una betalactamasa de espectro extendido o como en el caso de mutaciones de los genes que codifican las porinas con el consecuente bloqueo del ingreso del antibiótico al interior del microorganismo (Sussmann, 2011).

Existen otras denominaciones de resistencia como son:

Resistencia relativa o intermedia: ocurre un incremento gradual de la MIC (concentración inhibitoria mínima) a través del tiempo. Para obtener un efecto terapéutico es necesario alcanzar niveles séricos y tisulares adecuados. La susceptibilidad o resistencia del germen es en este caso dependiente de la concentración.

Resistencia absoluta: sucede un incremento súbito en la MIC de un cultivo durante la terapia. Es inefectivo el incremento de la dosis clínica usual. Ejemplo de ello es la de *Pseudomonas spp.* resistente a gentamicina y el *Streptococcus pneumoniae* altamente resistente a penicilina y uso de levofloxacin (Sussmann, 2011).

Seudoresistencia: ocurre una resistencia *in vitro* pero una gran efectividad *in vivo*.

Se denomina *tolerancia antibiótica* al fenómeno en el cual la diferencia entre la MBC (concentración bactericida mínima) y la MIC es muy grande lo cual ocurre con las relaciones MBC/MIC mayores de 8 lo que permite la persistencia del microorganismo (Mazel, 1999).

1.2.1. Desarrollo de la resistencia.

Las poblaciones microbianas desarrollan resistencia a los antibióticos principalmente a través de dos mecanismos genéticos: la mutación y la adquisición de genes.

La velocidad con la que un gen individual muta para expresar un fenotipo de resistencia es un fenómeno complejo en el que, la fisiología, el entorno celular, la genética bacteriana y la dinámica de la población juegan papeles importantes. Además, para que se produzca una resistencia total, las mutaciones deben ocurrir en varios genes, debido a la redundancia genética en los blancos de los antimicrobianos (Roe, M.T., Pillai, S.D., 2003). No es de sorprenderse que el principal proceso

por el cual una bacteria se haga resistente a un determinado antibiótico sea la adquisición de genes (Mazel, D., Davies, J, 1999).

Las bacterias pueden presentar resistencia a antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales o por intercambio de material genético mediante el transporte de genes de resistencia a través de varios mecanismos como:

I. Transformación.

Transferencia de genes desde un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma (Levy SB., 1998).

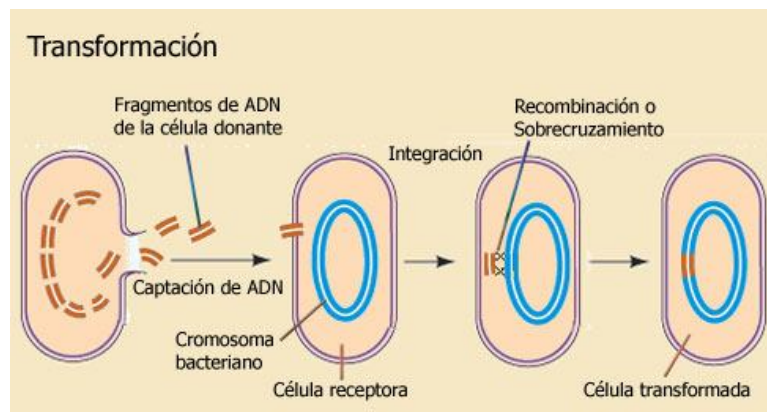


Figura 5. Mecanismo de transformación bacteriano.

II. Transducción.

Se denomina transducción a la introducción de material genético a una bacteria a través de un bacteriófago. Durante este proceso, el virus se adsorbe e inyecta su ácido nucleico a la bacteria y en algunos casos, se facilita la introducción de nuevos genes al genoma bacteriano. Además, este proceso puede ser generalizado o especializado. En el primero, un ADN bacteriano ya sea cromosómico o plasmídico puede formar parte

del ADN de la partícula viral madura en lugar del genoma del virus. En el segundo, el ADN de una región específica del cromosoma bacteriano se integra directamente al genoma del virus. (Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2004).

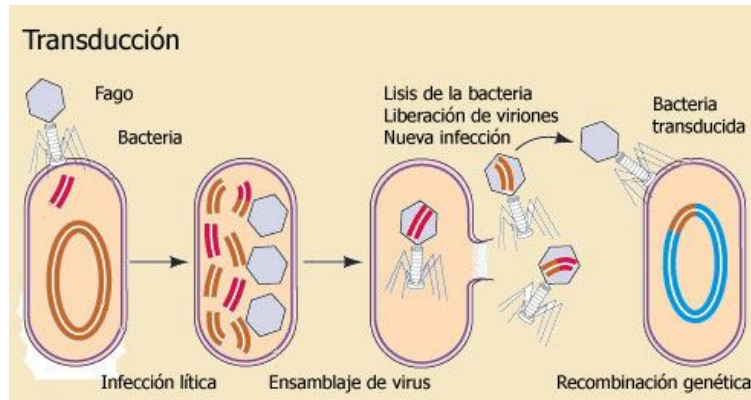


Figura 6. Mecanismo de transducción bacteriano.

III. Conjugación.

Transferencia de material genético contenido en plásmidos de una bacteria a otra a través de un pili F; estos plásmidos usualmente contienen genes que le confieren resistencia a drogas, antisépticos y desinfectantes (Levy SB., 2004).

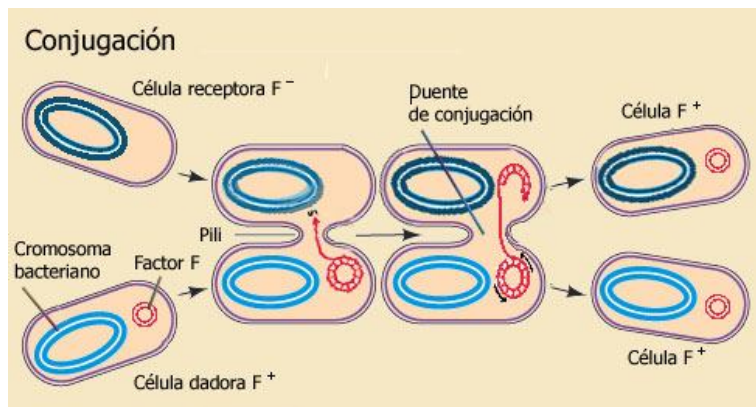


Figura 7. Mecanismo de conjugación bacteriano.

1.2.2. Elementos genéticos móviles.

La mayoría de los genes de resistencia son portados por plásmidos, transposones y otros elementos genéticos con capacidad de movilidad intergenérica e interespecífica (Mazel, D., Davies, J., 1999).

♣ Plásmidos.

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico circular que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. Su tamaño varía desde 1 a 250 KB. El número de plásmidos puede variar dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula (Thomas, C., 2000).

Existen algunos plásmidos llamados integrativos y tienen la capacidad de insertarse en el cromosoma bacteriano. Generalmente, rompen de manera momentánea el cromosoma para poder insertarse. A consecuencia de esta inserción, la maquinaria celular comienza a reproducir la información codificada en el plásmido. Una vez insertado el plásmido en el cromosoma se le denomina *episoma* (Sørensen, 2005).

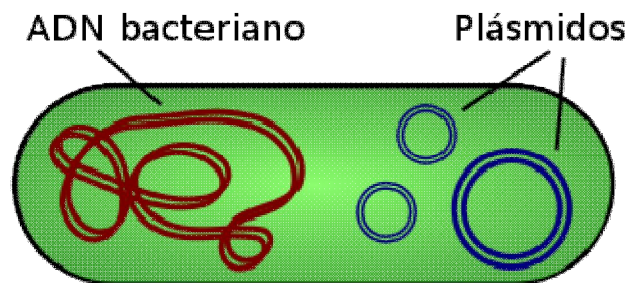


Figura 8. Esquema de ADN plasmídico bacteriano.

♣ Transposones.

Son secuencias de DNA (doble cadena) que pueden ser traslocados entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, gracias a un sistema de recombinación propio; esto, sumado a la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra durante la conjugación, permite la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de la misma especie o especies distintas lo que facilita la expansión epidémica de la resistencia (Sussmann, O. A. 2011).

Cuando cambian de posición y abandonan el lugar en el que estaban, en ese sitio se produce una deleción o pérdida de bases. Si el elemento transponible estaba insertado en el interior de un gen, puede que se recupere la función de dicho gen. De igual forma, si el elemento genético móvil al cambiar de posición se inserta dentro de un gen se produce una adición de una gran cantidad de nucleótidos que tendrá como consecuencia la pérdida de la función de dicho gen. Por consiguiente, los transposones producen mutaciones (Bryan, L.E., 1982).

En el fenómeno de la transposición no se ha encontrado una relación clara entre la secuencia de la sede donadora (lugar en el que está el transposón) y la sede aceptora (lugar al que se incorpora el transposón). Algunos transposones muestran preferencia por una determinada región (zona de 2000 a 3000 pares de bases), pero dentro de ella parecen insertarse al azar (Galun, E., 2003). Los transposones pueden ser simples o compuestos. Desempeñan un papel importante en el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos ya que con frecuencia contienen secuencias de genes llamadas *integrones* que pueden mediar la resistencia a los antibióticos (Pinilla, G., et al., 2006).

♣ Integrones.

Un integrón se puede definir como un elemento genético dinámico, en el que por un mecanismo de recombinación sitio específica se acumula una combinación de genes estructurales organizados como operón. Los genes estructurales presentes en los integrones conocidos son mayoritariamente, pero no exclusivamente, genes de resistencia a antibióticos. El dinamismo de los integrones se refiere a la capacidad de los genes estructurales presentes en el integrón para escindirse en forma de círculos de ADN autónomos (no replicativos llamados *cassettes de genes*) y a la capacidad de estos círculos autónomos para integrarse en un integrón diferente. (García, J.M, 1999).

La estructura mínima de un integrón incluye: 1.- el gen para la integrasa (*intI*), 2.- un sitio adyacente de recombinación (*attI*), y 3.- al menos un promotor (*Pc*, *P2*), orientado para la expresión de los genes capturados. El gen *intI* contiene su propio promotor y, en general, se expresa en forma divergente a los genes capturados. La integrasa, que pertenece a la familia de las tirosina-recombinasas, es la que cataliza la recombinación entre las secuencias específicas. Es por ello que las bacterias que poseen integrones tienen la posibilidad de incorporar genes que se encuentran en el citoplasma bacteriano bajo la forma de genes en casete (Di Conza, J.A, 2010).

Estructuralmente se suele hablar de tres regiones en un integrón: Una región constante 5' que contiene básicamente el gen de la *integrasa* que se transcribe de derecha a izquierda. En el extremo 5' del gen de la *integrasa* se encuentra una región con dos promotores divergentes que controlan respectivamente la transcripción del gen de la *integrasa* y la de los genes estructurales situados a la derecha.

A continuación se encuentra una región central variable en la que se localizan los genes estructurales del integrón (casi siempre genes de resistencia a antibióticos) en número variable. Las regiones constante 5' y central variable están separadas por la secuencia *attI*, uno de los sitios de reconocimiento de la *integrasa*. A continuación de la región central se halla otra región constante 3' en la que se localiza un gen de resistencia a sulfamidas y otros dos marcos abiertos de lectura (García, J.M, 1999).

Los integrones no pueden realizar autotransposición pero se asocian frecuentemente a secuencias de inserción o bien, a transposones y plásmidos conjugativos que les sirven como vehículos para su transmisión inter e intra especie. Se han encontrado integrones de las clases 1 y 2 en plásmidos y transposones, en tanto que aquellos de clase 3 solo han sido observados en plásmidos. (González R., 2004).

Los primeros integrones descritos fueron agrupados en clases (1, 2 y 3) de acuerdo con la secuencia nucleotídica del gen de la integrasa (*intI*) que los caracterizaba.

Sin embargo, este sistema de clases se ha ido desdibujando debido a la gran divergencia de integrasas descritas en los más diversos microorganismos, lo que ha llevado a una clasificación práctica basada en una variedad de criterios, en dos grandes grupos: I- el de los llamados integrones de resistencia a antibióticos (a veces denominados "integrones móviles"), que será el foco de interés en esta revisión dada su relevancia clínica y la cantidad de literatura disponible, y II- el de los integrones presentes en el cromosoma bacteriano (también referidos como "superintegrones"), sólo esporádicamente asociados a determinantes de resistencia (Hall RM, 2004).

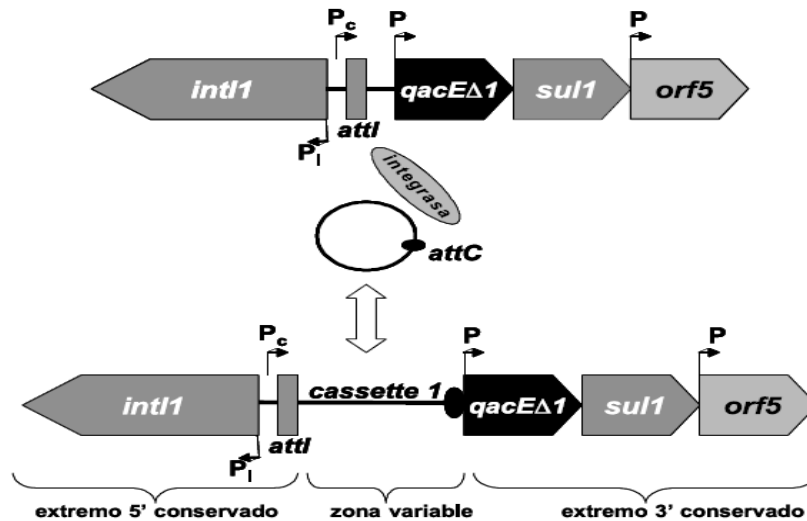


Figura 9. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de cassettes genéticos de resistencia. *int11*: gen que codifica la integrasa clase 1; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los cassettes son integrados; *PI*: promotor que transcribe la integrasa; *PC*: promotor que dirige la transcripción de los cassettes integrados. *attC*: sitio de recombinación del cassette genético.

Los integrones de la clase 1 son los más prevalentes en aislamientos clínicos y se hallan altamente asociados con bacilos Gram negativos multirresistentes. En la actualidad han cobrado gran importancia, no solo por el amplio espectro de bacterias en las que han sido comunicados, sino también por su frecuente nexo con casetes que codifican, por ejemplo, distintas metalcarbapenemasas (Fluit, AC., 2004).

A pesar de que el contenido de casetes suele ser pequeño en este grupo de integrones, a la fecha se encuentran informados más de 100 arreglos diferentes dentro de esta clase, lo cual está directamente relacionado con la variedad de mecanismos de resistencia a casi todas las familias de antibióticos ya encontrados en casetes.

El análisis y la comparación de la secuencia del transposón Tn7 y su familia muestra una organización similar a la de los integrones e indica

la presencia de un posible gen codificante de una integrasa de clase 2 (intI2) localizado en el extremo 5' del primer casete presente en el Tn7. Así, los integrones clase 2 que forman parte del Tn7 (y otros relacionados) portan genes en casete en su estructura y han sido documentados en aislamientos clínicos de bacilos Gram negativos, aunque en menor frecuencia que los anteriores. A menudo el gen intI2 es interrumpido prematuramente por un codón de terminación. Esto lo convierte en un pseudogen, lo que explicaría los pocos arreglos que se encuentran descritos en las bases de datos, en comparación con el número de arreglos de los integrones clases 1 (Dubois, V., 2007).

Los integrones clase 3 presentan en su estructura el gen intI3, que codifica la integrasa de clase 3. La secuencia de aminoácidos deducida para esta integrasa muestra una identidad del 60,9 % con la integrasa IntI1 (Recchia, 1995).

Dichos integrones también portan casetes de resistencia a antibióticos. Sin embargo, son muy pocos los informes encontrados y la mayoría se limitan al continente asiático. En el primer caso descrito, este gen se localizó en el extremo 5' del casete blaIMP-1 (que codifica una carbapenemasa) presente en un aislamiento clínico de *Serratia marcescens* (Arakawa, Y. *et.al.*, 1995).

1.2.3. Bombas de expulsión.

Las bacterias son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia bastante específicos para un antibiótico o alguna familia de antibióticos. Sin embargo, hay otros mecanismos más generales de resistencia, en donde, el acceso del antimicrobiano inalterado hasta su sitio de acción es prevenido por barreras de baja permeabilidad a fin de disminuir la entrada del antimicrobiano a la célula o también mediante el bombeo

del antimicrobiano fuera de la célula en un proceso dependiente de energía (Nikaido, H. 1994).

El "eflujo" en una célula, es el bombeo de un soluto fuera de la misma. Los genes que codifican para las bombas de eflujo o bombas de expulsión se encuentran en todos los organismos y, tanto en bacterias susceptibles, como en bacterias resistentes a antibióticos. En las bacterias, estos genes se pueden encontrar en el cromosoma o en elementos genéticos transmisibles. Algunos de estos sistemas pueden ser inducidos por sus propios sustratos, de modo que una cepa que es aparentemente susceptible podría ser capaz de sobre-producir una bomba de expulsión y adquirir resistencia (Piddock, 2006).

La primera bomba de expulsión descrita fue la glicoproteína P de origen mamífero, una bomba acoplada a la hidrólisis de ATP que confiere resistencia a un amplio espectro de compuestos, incluyendo agentes quimioterapéuticos contra el cáncer (Paulsen, I., 2003).

El mecanismo de expulsión para múltiples agentes antimicrobianos contribuye a la resistencia intrínseca y adquirida contra tales agentes. El análisis del genoma de bacterias Gram positivas y Gram negativas ha confirmado la amplia distribución de estos sistemas. Este modo de resistencia puede llegar a disminuir o inclusive suprimir la susceptibilidad a un amplio rango de antimicrobianos.

La estructura de las bombas de expulsión es mediada por proteínas de transporte, que confieren resistencia a los componentes tóxicos. En las bacterias Gram negativas es necesario un sistema de expulsión tripartita para expulsar el antimicrobiano hacia el medio externo: una proteína localizada en la membrana citoplasmática, otra en el espacio periplasmático (proteína de fusión de membrana MFP) y una tercera en la membrana externa (factor de membrana externa) OMF. Los sistemas

de expulsión particularmente de bacterias Gram negativas se asocian con resistencia a múltiples antimicrobianos de importancia clínica como las fluoroquinolonas (Cabrera, C. E., 2007).

Las bombas de expulsión de multirresistencia a fármacos (bombas de expulsión-MRF) son muy abundantes y ubicuas en la naturaleza, constituyen en promedio más del 10% de los transportadores en un organismo. La mayoría de los sistemas de expulsión descritos se encuentran generalmente en organismos asociados al suelo o plantas (Paulsen, 2003)

Es bien sabido que las bombas de expulsión-MRF codificadas por las bacterias pueden conferir resistencia clínicamente relevante a los antibióticos. Ahora se entiende que estas bombas de expulsión también tienen un papel fisiológico. Estas pueden conferir resistencia a las sustancias naturales producidas por el hospedero, incluyendo hormonas, bilis y moléculas de autodefensa, lo que indica que estos sistemas podrían tener un papel importante al permitir a las bacterias sobrevivir en su nicho ecológico (Piddock, L., 2006).

Es posible que la resistencia a los antibióticos que se utilizan en medicina humana y veterinaria sea un proceso mediado por bombas de expulsión, como subproducto de la función fisiológica de estas bombas que, dado el medio de estrés, resultan benéficas para la bacteria.

Las bombas de expulsión pueden ser específicas para un sustrato, o pueden transportar una amplia gama de estructuras y compuestos diferentes (incluidos los antibióticos de diversas categorías químicas) (Piddock, L., 2006).

Hasta hace algunos años se pensaba que la resistencia a antibióticos solo estaba asociada a la ineficacia de los mismos al tratar de penetrar la pared celular y realizar su acción. Sin embargo, existen estudios que

demuestran la efectividad de los antibióticos para penetrar a los microorganismos. Se observó por acción de las bombas de expulsión que el problema es causado debido a que el fármaco es expulsado fuera del espacio intracelular impidiendo su unión al sitio diana. Las bombas de expulsión que se han estudiado relacionadas con la generación del fenotipo de resistencia son cinco.

RDN (Resistance-Nodulation Cell Division)

MFS (Major Facilitator Super family)

SMR (Staphylococcal/small Multidrug Resistance)

ABC (ATP-Binding Cassette)

MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion)

Cada familia de permeasas en donde se han encontrado miembros que confieren resistencia a antibióticos, posee, por lo menos, una subfamilia con miembros reconocidos que catalizan la expulsión de estos fármacos. Otras subfamilias tienen otras funciones de transporte, generalmente llevando nutrientes al interior de la célula o exportando macromoléculas que han sido sintetizadas (Saier, M., 1998).

Estudios recientes han demostrado que las bombas de expulsión-MRF desempeñan un papel importante en la resistencia intrínseca de bacterias Gram negativas (Nikaido, H., 1996).

1.3. Propiedades y usos de *Carica papaya*.

Carica papaya es nativa de América tropical. Fue encontrado en el sur de México, los Andes y todo el Sur de América. Los españoles la llevaron a Europa y las islas del pacífico. La papaya, *Carica papaya* L., es un miembro de la familia *Caricaceae* (Milind, 2011).

Con frecuencia y erróneamente se refiere como un "árbol" a la planta de naturaleza herbácea, de porte variado de 3 a 10 m. de altura. Es una planta frutal perennifolia, dioica con tallo único raras veces ramificado, frondosa en la parte superior y productora de látex. Es una especie polígama, diferenciando plantas femeninas, masculinas y hermafroditas. De tallo cilíndrico, hueco, desnudo, erecto con un diámetro hasta de 30 cm; en la base adelgazándose hacia arriba; es carnososo, poroso, y jugoso. Las cicatrices foliares grandes que presenta en la superficie del eje de la planta, marcan la ubicación de hojas y frutos que se han desprendido.

Las hojas se agrupan en el extremo superior del tallo, en una especie de roseta espiral formando una corona o sombrilla; son alternas, simples y palmadas sin estipulas, suborbiculadas, con cinco a siete lóbulos irregulares y pecioladas de color verde oscuro, grandes, de hasta 80 cm de longitud, (Morton, J., 1987).



Figura 10. Planta de *C. papaya*.

Tanto el tallo como las hojas contienen abundante látex blanco lechoso, y tóxico en estado natural para el ser humano, pudiendo producir irritaciones alérgicas al contacto con la piel.

La raíz consta de pocas ramificaciones, relativamente gruesas, las mismas que en su extremo distal están provistas de numerosas raicillas.

El fruto es similar al melón, de textura suave y forma variada: esférica, oval a casi redonda, un poco piriforme, la piel es delgada y cerosa, pero bastante dura. Cuando la fruta está verde y dura es rica en látex blanco. A medida que madura, la piel se vuelve amarilla y la pared gruesa de su pulpa se torna succulenta, jugosa y aromática, de color amarillo, naranja o varios tonos de salmón o rojo.

Es una baya grande de 15-40 cm de largo y de 10-20 cm de espesor; pudiendo pesar hasta 9 kg.

La cavidad está casi vacía con las abundantes semillas cubriendo las paredes, las cuales son ovoides de 5 a 7 mm de diámetro; negras y recubiertas por un arilo o envoltura mucilaginosa, gelatinosa que le da a

la semilla una falsa cubierta lisa y brillante y de sabor picante (Anibijuwon, 2009).



Figura 11. Fruto de *C. papaya*

1.3.1. Usos medicinales.

Carica papaya se utiliza tradicionalmente para tratar diversos trastornos de la piel, incluyendo las heridas, su uso en la medicina tradicional se basa en la papaína, enzima proteolítica, principio activo que ejerce un efecto protector además posee actividad antimicrobiana, antioxidante y anti-inflamatoria, que podría ser útil en el tratamiento de úlceras crónicas de la piel para promover la curación. (Emeruwa A. 1982; Dawkins, G., 2003; Gupta, OP., 2000).

Es ampliamente utilizada en los países en desarrollo como un eficaz tratamiento fácilmente disponible para diversas heridas, en particular quemaduras. Una decocción de las semillas de *C. papaya* se ha utilizado para tratar a las úlceras en la piel y la inflamación. Estudios han demostrado que extractos de semillas de *C. papaya* favorece significativamente la cicatrización de heridas en ratas y además tienen actividad antimicrobiana frente *Salmonella choleraesuis* y

Staphylococcus aureus, lo que sugiere podría tener un efecto positivo en humanos (Nayak, 2012).

C. papaya es muy conocida en todo el mundo por sus propiedades nutritivas y medicinales excepcionales. Desde tiempos inmemoriales, toda la planta de la papaya incluyendo sus hojas, semillas, frutas maduras y verdes y sus jugos se utiliza como medicina tradicional. Hoy en día, la *C. papaya* es considerada como una fruta nutracéutica debido a sus propiedades medicinales de múltiples facetas. Las propiedades medicinales importantes de *C. papaya* incluyen efectos como uterotónico, diurético, anti-hipertensivos, fitoquímicamente, toda la planta contiene enzimas (papaína), carotenoides, alcaloides, monoterpenoides, flavonoides, minerales y vitaminas (Milind, P., 2011).

Además de efectos anti-fertilidad (Lohiya, N. K., 2000). Los efectos anti-fertilidad de la *C. papaya* fueron investigados por la alimentación de ratas adultas y embarazadas con diferentes componentes de la fruta. No se trató de forzar la alimentación de los animales y los resultados indicaron que la fruta no madura interrumpió el ciclo estral y el aborto inducido. Este efecto se desvaneció, con forme el fruto hizo viejo o muy maduro. Por otra parte el extracto de cloroformo de semillas de *C. papaya* indujo azoospermia (ausencia de espermatozoides en semen) a largo plazo en el mono langur. El extracto redujo gradualmente la concentración de espermatozoides y la motilidad en el esperma después de 30-60 días de tratamiento. La azoospermia se observó después de 90 días y continuó durante todo el período de tratamiento. La suspensión del tratamiento resultó en una recuperación gradual de estos parámetros y 150 días después se volvió a los valores previos al tratamiento. *C. papaya* también demostró los efectos anti-implantación y abortivos (Pokharkar, 2010; Lohiya, 2002).

También se le atribuyen propiedades como son: amebicida, antibiótica, antiflogística (calma la inflamación), bactericida, cardiotónica (aumenta la tonicidad del músculo cardíaco), carminativa (favorece la expulsión de los gases desarrollados en el tubo digestivo), colagoga (facilitan la expulsión de la bilis), digestiva, diurética, emenagogo (estimula o favorece el flujo menstrual), favorece la digestión, expectorante, fungicida, insecticida, laxante, proteolítica y vermífuga (provoca la eliminación de las lombrices intestinales).

Estudios antibacterianos demuestran que el extracto de semillas, fruto tierno y maduro son activos contra bacterias Gram positivas y en dosis altas contra Gram negativas (Ratnayake, 1992; Milind, P., 2011).

1.3.2. Fitoconstituyentes de C. papaya.

Contiene muchos compuestos biológicamente activos. Dos importantes son papaína y quimopapaína, que ayudan en la digestión. La papaína se utiliza también para tratar la artritis. La concentración de dichos compuestos varía en las frutas, látex, hojas y raíces (Ayoola, 2010).

Además, los fitoquímicos de árboles macho y hembra difieren en la cantidad de los compuestos. Por ejemplo, los compuestos fenólicos tienden a ser mayores en árboles macho que en hembras. La cantidad de látex fresco de papaya y látex seco (papaína cruda) varía con el sexo y la edad del árbol (Ashaye, O. A., 2005).

1.3.3. Actividad antibacteriana.

Se encontró que las semillas de *C. papaya* poseen actividad bacteriostática contra algunos enteropatógenos como *B. subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *S. typhi*, *Staphylococcus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas analizadas las Gram negativas fueron las más susceptibles a los extractos. El hecho que los extractos fueran efectivos contra ambas bacterias analizadas, Gram negativas y Gram positivas indica que posee actividad de amplio espectro (Doughari, J. H., 2007).

2. Justificación.

La papaya (*C. papaya*) ha venido ganando un lugar privilegiado en la demanda de los consumidores del mundo y ello se refleja en las cifras de producción. Hoy en día, la papaya es la tercera fruta tropical mas producida con 11.22 millones de toneladas, equivalente al 15.36% del total de producción de frutas tropicales.

México ocupa el primer lugar en exportación de papaya (*C. papaya*) a escala mundial; sólo en el año 2009 se exportaron 136 mil toneladas del fruto, y durante los primeros cuatro meses de 2010 se incrementaron las exportaciones un 11%, siendo Estados Unidos el principal consumidor con un 84% del mercado (SAGARPA, 2013).

Es una fruta de consumo frecuente en México y además, como ya se mencionó, es conocida en todo el mundo por sus propiedades nutritivas y medicinales excepcionales, ya que es ampliamente utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de varios padecimientos como son: amebicida, insecticida, fungicida, vermífuga, entre otras, además de atribuírsele propiedades antimicrobianas (Ratnayake, 1992; Milind, P., 2011; Doughari, J. H., 2007).

Por otra parte, en México se cuenta con algunos estudios que documentan la presencia de cepas de bacterias multirresistentes a antibióticos aisladas de alimentos para consumo humano. Sin embargo, son escasos los estudios del comportamiento de éste tipo de cepas frente a agentes naturales con actividad antimicrobiana como la papaya (*C. papaya*), los cuales podrían representar una alternativa favorable para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por microorganismos multirresistentes en donde la variedad en la elección del antibiótico se encuentra reducida.

Por las razones antes expuestas, se justifica la elaboración de trabajos como el presente y de otros que busquen explorar nuevas alternativas terapéuticas.

3. Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos de semilla y raíz de papaya (*C. papaya*) frente a bacterias multirresistentes.

3.1. Objetivos particulares.

- ♣ Examinar los perfiles de multirresistencia a antibióticos mediante el método de Bauer- Kirby (antibiograma) de las cepas aisladas.
- ♣ Evaluar la sobre expresión de bombas de expulsión como posible mecanismo de multirresistencia.
- ♣ Evaluar el comportamiento de las cepas multirresistentes frente a diferentes concentraciones de extracto de semillas y de raíz de *C. papaya*.

4. Hipótesis.

Las frutas de consumo en fresco como es el caso de la papaya (*C. papaya*), pueden servir como vehículos de una amplia diversidad de bacterias para el hombre que pueden ser multirresistentes a antibióticos, y que pueden ser sensibles a los extractos de semillas y raíz de *C. papaya*.

5. Metodología.

5.1. Aislamiento.

El aislamiento se realizó a partir de muestras de papayas de supermercado City Market (sucursal Pilaes) y mercado Tlacoquemecatl. Se siguió el método descrito en la NOM-109-SSA1-1994 referente a la toma de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Las muestras fueron transportadas en bolsas cerradas hasta el laboratorio y fueron utilizadas el mismo día de compra. Para la toma de muestra se frotó un hisopo estéril previamente humedecido en solución salina al 0.85% en tres puntos diferentes de la papaya, que fueron: pedúnculo, parte central y el extremo opuesto al pedúnculo (Figura 12). Con el hisopo se frotó la superficie, después se colocó el hisopo en un tubo con 3mL de medio de cultivo líquido (infusión cerebro-corazón BHI), haciendo esto con cada uno de los diferentes puntos para ambas muestras tanto para la de supermercado como la del mercado. Además, se repitió el muestreo pero ahora las muestras tuvieron un enjuague previo con agua corriente de manera que simulara el enjuague casero usual. Las muestras fueron incubadas por 24 horas a 37°C.

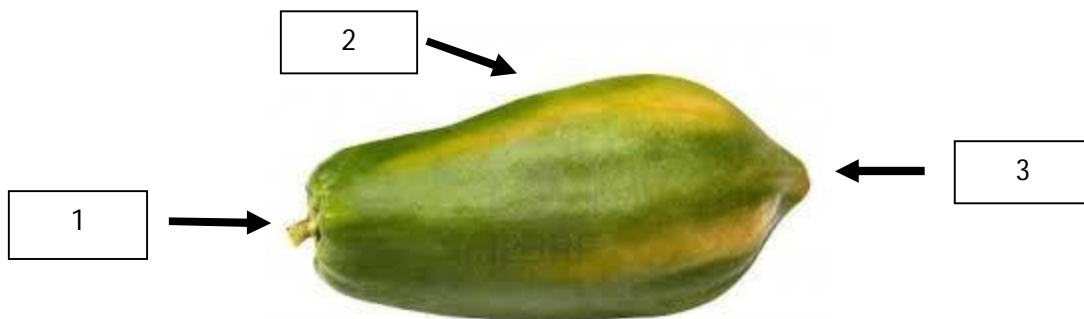


Figura 12. Zonas de muestreo: 1) pedúnculo, 2) parte central y 3) extremo opuesto al pedúnculo.

5.2. Selección preliminar de cepas resistentes.

Las muestras obtenidas se crecieron en medio BHI más antibióticos con la concentración mínima inhibitoria, para descartar de manera inicial a los microorganismos sensibles, limitando el crecimiento bacteriano y seleccionando a los posibles resistentes a otros antibióticos.

En este caso se eligió cefotaxima y ceftriaxona como antibióticos a adicionar en el medio tomando en cuenta que son los antimicrobianos más ampliamente utilizados y de fácil acceso para la población. Las muestras fueron incubadas por 24 horas a 37°C.

5.3. Purificación y caracterización de cepas.

Las muestras que presentaron resistencia en esta primera etapa se purificaron en medios diferenciales, agar sal manitol (MSA) y agar Mc Conkey (McC), obteniendo bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas.

Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas convencionales para determinación de género (Anexo).

5.4. Determinación de cepas multirresistentes.

Al conjunto de cepas puras se les realizó un antibiograma utilizando el método estandarizado de Bauer-Kirby (Lieberman, D., 1975) para determinar la resistencia a antibióticos.

5.5. Tolerancia a Bromuro de Etidio.

5.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Se inocularon tubos de ensayo con 50µL de cepas de 24h de crecimiento ajustadas a 0.5 de turbidez en la escala de McFarland y se adicionaron los volúmenes necesarios en cada caso para obtener las concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 y 200 µg/mL de bromuro de etidio en cada tubo. Se colocaron tubos no inoculados conteniendo únicamente el medio de cultivo adicionado con bromuro de etidio como controles negativos. Se incubaron a 37°C, y se observó su crecimiento (turbidez) a las 24h y 48h de incubación.

La CMI se definió como la menor concentración de bromuro de etidio en la que se observó completamente inhibido el crecimiento microbiano (ausencia de turbidez) después de 48h de incubación como periodo máximo.

5.5.2. Acumulación de bromuro de etidio.

Se hizo una modificación al procedimiento descrito por Kaatz et al. (2000) y Patel et al. (2010), partiendo de cepas con crecimiento de 24h, ajustando a una turbidez de 0.4 en la escala de McFarland. Una vez ajustados se incubaron con una concentración de 10 µg/mL de bromuro de etidio durante 25 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó y decantó el sobrenadante y, posteriormente se resuspendió el pellet o pastilla de células, en 4 mL de medio fresco. Se tomaron lecturas utilizando un espectrofluorómetro (Perkin-Elmer 203) el cual se ajustó a una onda de excitación de 540 nm y una onda de emisión de 545 nm. La evaluación de las muestras se realizó por duplicado. Se utilizó como control negativo para bacterias Gram positivas a *S. aureus* ATCC 6538 y para Gram negativas *E. coli* ATCC 38218, ambas totalmente sensibles a todos los antibióticos.

5.6. Obtención de los extractos de *C. papaya*.

5.6.1. Extracto metanólico de raíz de *C. papaya*.

La raíz fue cortada en trozos pequeños y secada hasta obtener un peso constante, posteriormente fue molida. Se pesaron 200g y para su extracción se añadió metanol al 70%. Se hizo una modificación al procedimiento descrito por Adejuwon, A. O. (2011), ya que no se contaba con roto-vapor se utilizó un desecador calentando la muestra a 40°C, obteniendo una concentración final de 17.5mL.

5.6.2 Extracto acuoso de semillas de *C. papaya*.

Del polvo de semillas de *C. papaya* se pesaron 20g que fueron colocados en un matraz Erlenmeyer de 2L con 1L de agua para la maceración durante 12h a temperatura ambiente. Después, la mezcla se filtró y los restos fueron eliminados, por último se pasó por una membrana Millipore, fue almacenado a 5°C y posteriormente fue usada para la prueba biológica (Figueroa Brito, R., 2011).

Se realizaron pruebas mediante el método de difusión con discos para probar si el extracto presentaba actividad antimicrobiana.

Posteriormente se liofilizó para su posterior utilización de manera concentrada y de esta manera hacer un comparativo con el extracto original.

5.7. Evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos.

Se realizó mediante el método de difusión con discos, con cepas de 24h de crecimiento ajustadas a 0.5 de la escala de McFarland, y se inocularon 100µL de ésta suspensión bacteriana en cajas petri con 20mL de agar Mueller-Hinton. Se incubaron por 24h a 37°C y finalmente se hicieron las mediciones correspondientes.

6. Resultados y discusión.

Se tomaron muestras a partir de papayas de diferentes puntos de venta, tanto de supermercado como de mercado local, además de que unas tenían un enjuague previo con agua. Al realizar el análisis microscópico de ambas muestras se encontraron cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos. Se concluye que el enjuague previo con agua corriente no disminuye la cantidad de bacterias, ya que en ambos casos (sea de supermercado o mercado local), se encontraron una cantidad apreciable de éstas, siendo las de mayor resistencia las aisladas de papayas provenientes del supermercado, posiblemente porque tienen mayor manipulación.

Las muestras obtenidas se sembraron en caldo BHI más antibióticos (cefotaxima y ceftriaxona) a fin de seleccionar a aquellos microorganismos resistentes a al menos un antibiótico. Se obtuvieron 7 cepas resistentes a ambos antibióticos.

Para un mejor aislamiento y purificación se sembró en medios selectivos Mac Conkey para Gram negativos y MSA para Gram positivos.

Después de observar el crecimiento de los microorganismos y analizar la morfología macroscópica y microscópica en cada uno de los medios anteriores, se determinó que las cepas aisladas no estaban contaminadas y se procedió a sembrar las cepas resistentes a ambos antibióticos (cefotaxima y ceftriaxona) en agar Mueller-Hinton, colocando multidiscos de antibiótico (Bio-Rad) para determinar su posible resistencia a otros antibióticos de acuerdo con el método de Bauer-Kirby.

Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2.

Cepa	AK	AM	CB	CF	CFX	CPF	CL	GE	NET	NF	NOF	SXT	PEF
A	S	R	R	R	R	R	R	MR	S	R	MR	R	R
B	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
C	S	R	R	R	R	R	R	MR	MR	R	MR	R	R
D	S	R	R	R	R	R	R	MR	S	R	MR	R	S
E	R	R	R	R	R	R	R	MR	MR	R	MR	R	R

Tabla 1. Resultados de los antibiogramas de las cepas Gram (-)

AK: amikacina, **AM:** ampicilina, **CB:** carbenicilina, **CF:** cefalotina, **CFX:** cefotaxima, **CPF:** ciprofloxacina, **CL:** cloranfenicol, **GE:** gentamicina, **NET:** netilmicina, **NF:** nitrofurantoina, **NOF:** norfloxacina, **SXT:** sulfametoxazol/trimetoprim, **PEF:** defroxacina.

Cepa	AM	CF	CFX	CAZ	CXM	DC	E	GE	PEF	PE	TE	SXT
F	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 2. Resultados de los antibiogramas de las cepas Gram (+).

AM: ampicilina, **CF:** cefalotina, **CFX:** cefotaxima, **CAZ:** ceftazidima, **CXM:** cefuroxima, **DC:** dicloxacilina, **E:** eritromicina, **GE:** gentamicina, **PEF:** pefloxacina, **PE:** penicilina, **TE:** tetraciclina, **SXT:** trimetoprim-sulfametoxazol

Referencias:

MR: Muy resistente. Sin halo de inhibición.

R: Resistente. Se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano (C.M.I.).

S: Sensible. Indica que la posible infección ocasionada por la cepa para la que se ha determinado la C.M.I. o su correspondiente halo de inhibición puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antimicrobiano.

El estudio de multirresistencia se realizó utilizando diversos grupos de antibióticos (tabla 3), lo que indica la capacidad de adaptación de los microorganismos ante diversas sustancias.

Grupo		Antibióticos
Betalactámicos		Ampicilina Penicilina
Cefalosporinas	Primera generación	Cefalotina
	Segunda generación	Cefuraxima
	Tercera generación	Cefotaxima Ceftazidima Ceftriaxona
Aminoglucósidos		Amikacina Estreptomina Gentamicina Kanamicina Neomicina
Anfenicoles		Cloranfenicol
Glicopéptidos		Vancomicina
Lincosaminas		Clindamicina
Macrólidos		Eritromicina
Nitrofuranos		Furazolidona Nitrofuratoína
Sulfonamidas y diaminopiridinas		Sulfametoxazol/trimetoprim
Tetraciclinas		Tetraciclina
Carboxipenicilinas		Carbencilina

Tabla 3. Clasificación de los antibióticos según su composición química.

Para su caracterización se realizaron pruebas bioquímicas convencionales; en el Anexo se presentan los resultados de dichas pruebas. Mediante tablas de identificación bacteriana (MacFaddin, 2003) se determinó que las cepas multirresistentes corresponden a:

A: *Pasteurella multocida*, B: *Pseudomonas aeruginosa*, C: *Actinobacillus sp.*, D: *Alcaligenes latus*, E: *Pasteurella caballi*, F: *Streptococcus downei*, G: *Streptococcus sp.*

Bombas de expulsión.

Tras observar la resistencia de las bacterias en estudio, resulta claro que presentan mecanismos de resistencia muy complejos, por lo que se evaluó por métodos espectrofluorométricos la posible sobre-expresión de bombas de expulsión, utilizando al bromuro de etidio para su evaluación.

El bromuro de etidio emite una fluorescencia débil en soluciones acuosas, en éste caso fuera de la célula; se convierte en una fluorescencia fuerte cuando su concentración dentro del periplasma supera la de la solución acuosa debido a su unión a los componentes celulares, es decir, debido a que se intercala a los ácidos nucleicos presentes en la célula como ADN y RNA. Primero se colocó el control negativo que en el caso de las bacterias Gram negativas fue *E. coli* ATCC 38218, al cual se le realizó previamente antibiogramas para comprobar que fuera sensible a antibióticos; en la figura 13 se observa que a excepción de *Actinobacillos sp.* parece haber sobre-expresión de bombas.

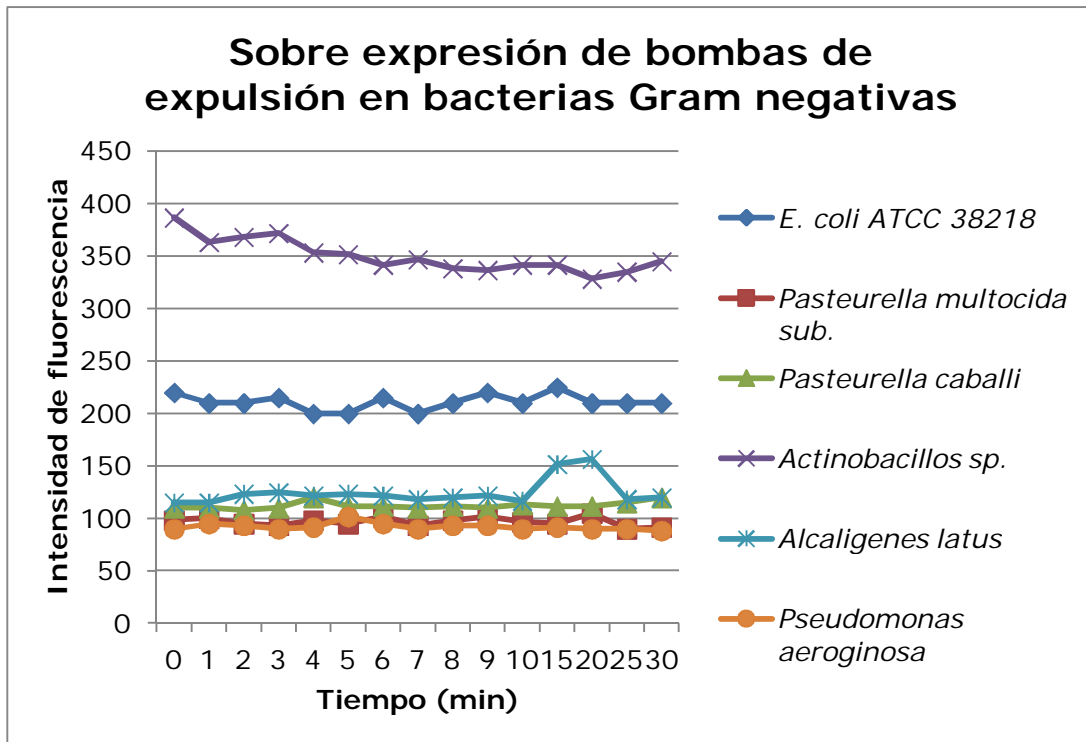


Figura 13. Acumulación de bromuro de etidio.

En la figura 14 se puede apreciar que en las bacterias Gram positivas no parece haber presencia de sobre expresión de bombas, por lo que posiblemente su mecanismo de resistencia involucre plásmidos e integrones. En este caso se utilizó como control negativo a *S. aureus* ATCC 6558.

El tiempo de exposición al bromuro de etidio es muy importante durante el experimento, ya que después de cierto tiempo el funcionamiento del transportador se vuelve errático y puede dar falsos negativos.

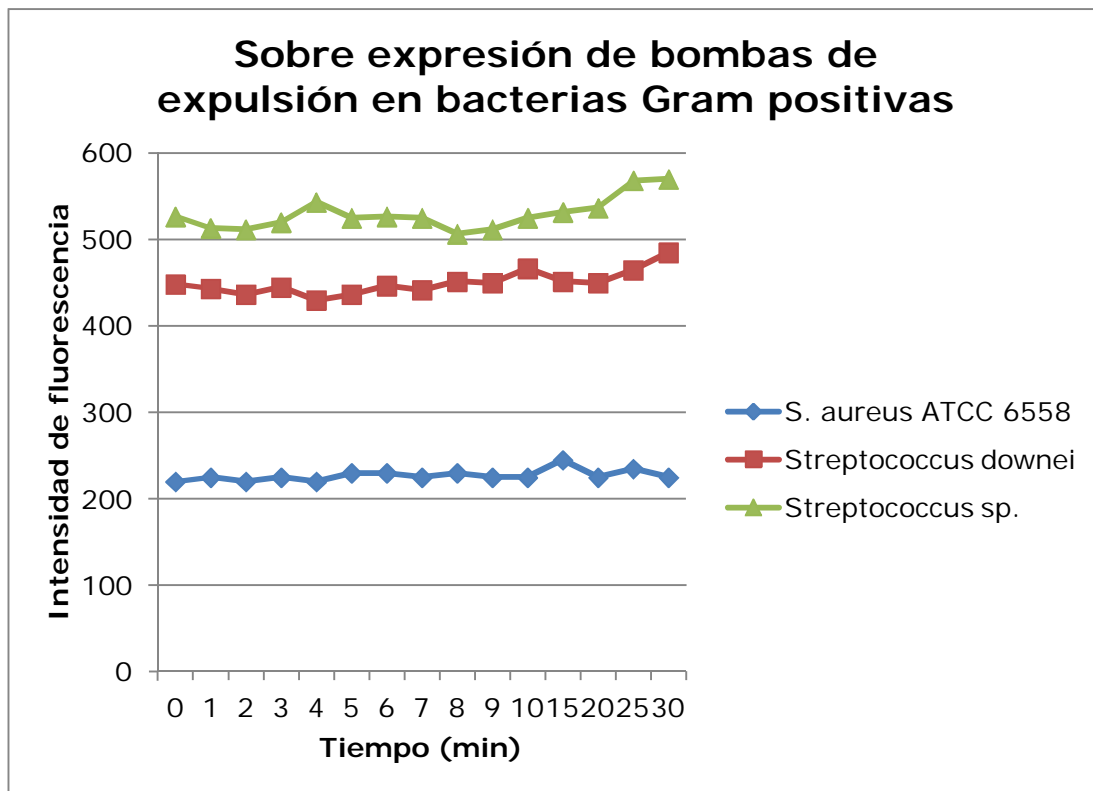


Figura 14. Acumulación de bromuro de etidio.

Debe hacerse notar la relevancia del hallazgo de este tipo de cepas en productos destinados al consumo humano, ya que el consumo de estos alimentos conlleva la ingesta de una diversidad de microorganismos que, aun cuando no sean patógenos, podrían funcionar como reservorio de genes de resistencia en el tracto gastrointestinal del ser humano, contribuyendo además a su diseminación en el medio ambiente.

Sin embargo, los antibióticos son únicos entre las drogas en que su uso precipita su obsolescencia. Paradójicamente, estos tratamientos seleccionan a los organismos que pueden evadirlos, impulsando una “carrera armamentista entre los microbios, los médicos y los descubridores de drogas”. La resistencia que presentan las bacterias a los antimicrobianos es uno de los principales problemas de la terapéutica actual, la cual se ha desarrollado por el uso imprudente y el

abuso de los antibióticos. A pesar de que el uso de antibióticos ha sido foco de variada investigación en México, es poca la información publicada que resuma la situación actual en el país, o bien que describa la respuesta que, desde los sistemas y políticas de salud, se ha dado a esta situación además de que los fármacos disponibles para tratamiento de infecciones son relativamente pocos.

Extractos de *C. papaya*

Una vez elaborados los extractos se realizaron pruebas de sensibilidad mediante la técnica de difusión con discos de 6mm, utilizando a las cepas aisladas caracterizadas anteriormente. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 4.

cepa	Halo de inhibición
A	N
B	7mm
C	N
D	N
E	N
F	7mm
G	N
<i>E. coli</i> ATCC 38218	8mm
<i>S. aureus</i> ATCC 6558.	8mm

Tabla 4. Efecto antimicrobiano del extracto acuoso de semillas de *C. papaya*.

N= Resultado Negativo, sin halo de inhibición.

Posteriormente se concentró el extracto utilizando una unidad de liofilización LABCONCO, del cual se recuperaron 0.930g de polvo con el cual posteriormente se realizó un antibiograma utilizando diferentes concentraciones y obteniendo resultados similares que con el original.

Con el extracto metanólico de raíz de *C. papaya*, los resultados fueron similares y no tienen un efecto antimicrobiano significativo.

Cepa	Halo de inhibición
A	8mm
B	8mm
C	8mm
D	8mm
E	8mm
F	8mm
G	8mm
<i>E. coli</i> ATCC 38218	8mm
<i>S. aureus</i> ATCC 6558.	8mm

Tabla 5. Efecto antimicrobiano del extracto metanólico de raíz de *C. papaya*

7. Conclusiones.

Se logró aislar y caracterizar bacterias multirresistentes a antibióticos de papaya (*C. papaya*), las cuales son *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacillus sp.*, *Alcaligenes latus*, *Pasteurella caballi*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus sp.*

Se demostró que no existe una diferencia significativa en el muestreo de frutas (*el caso de C. papaya*) sin lavar y con un enjuague previo, ya que en ambos casos se encontraron bacterias multirresistentes a antibióticos.

Asimismo, se encontró que la mayoría parece sobre expresar bombas de expulsión.

Por último, se encontró que los extractos de *C. papaya* no tienen un efecto antimicrobiano significativo.

Es importante crear conciencia de la magnitud del problema para evitar que se sigan ampliando los sitios de reservorio de genes de resistencia, ya que la multirresistencia microbiana es un problema mundial que no reconoce límites territoriales y que puede afectar indiscriminadamente a los miembros de todas las clases socioeconómicas; lo cual además representa un riesgo para la salud y un desperdicio de recursos económicos en los servicios de salud.

8. Anexo.

Cepas	A	B	C	D	E	F	G
H ₂ S	-	+	-	-	-	-	-
Bilis	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	+	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	-	-	-	-	-
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+
Urea	+	+	+	+	+	+	+
MRF	-	-	-	-	+	+	-
Citrato	+	+	+	+	+	+	+
RM	+	-	+	-	+	+	+
Voges-Proskauer	+	-	-	+	-	+	+
Bilis esculina	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
fermentación de glucosa	+	-	+	+	+	+	+
Oxidación de glucosa	+	+	+	+	+	+	+
carbohidratos	Glucosa	+	+	+	+	+	+
	Fructosa	+	-	+	+	+	+
	Galactosa	+	+	+	+	+	+
	Lactosa	+	-	+	+	+	+
	Sacarosa	-	-	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	+	+	+	+
	Xilosa	+	+	+	+	+	+
	Sorbitol	-	-	-	-	+	+
	Salicina	+	-	+	-	+	+
	Inositol	-	-	-	-	-	-
	Rafinosa	-	-	-	-	-	-
	Dulcitol	-	-	-	-	-	-
	Arabinosa	-	-	-	-	+	-

Tabla 6. Resultados de pruebas bioquímicas de las cepas A: *Pasteurella multocida*, B: *Pseudomonas aeruginosa*, C: *Actinobacillus sp.*, D: *Alcaligenes latus*, E: *Pasteurella caballi*, F: *Streptococcus downei*, G: *Streptococcus sp.*

9. Referencias.

1. Adejuwon, A. O., Agbaje, E. O., & Idika, N. (2011). ***Antifungal and antibacterial activities of aqueous and methanolic root extracts of Carica papaya linn. (Caricaceae)***. International Research Journal of Microbiology, 2(8), pp. 270-277.
2. Anibijuwon, I. I., & Udeze, A. O. (2009). ***Antimicrobial activity of Carica papaya (Pawpaw Leaf) on some pathogenic organisms of clinical origin from South-Western Nigeria***. Ethnobotanical Leaflets, 2009(7), 4.
3. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, et al. (1995) ***A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene blaIMP***. Antimicrob Agents Chemother. 39: 1612-5.
4. Ashaye, O. A., Babalola, S. O., Babalola, A. O., Aina, J. O., & Fasoyiro, S. B. (2005). ***Chemical and organoleptic characterization of pawpaw and guava leathers***. J Agric Sci, 1(1), pp. 50-51.
5. Ayoola, P. B., & Adeyeye, A. (2010). ***Phytochemical and nutrient evaluation of Carica papaya (pawpaw) leaves***. IJRRAS, 5(3), pp. 325-328.
6. Axelsen, P. H. (Ed.). (2002). ***Essentials of antimicrobial pharmacology: a guide to fundamentals for practice***. Springer.
7. Bergoglio, R. (1993). ***Antibióticos***. Argentina: Ed. Médica Panamericana. Pp. 75-85.
8. Bryan, L. E. (1982). ***Bacterial resistance and susceptibility to chemotherapeutic agents***. Cambridge University, pp. 104-133.

9. Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. (2007). ***La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación.*** Colombia Médica, 38(2), pp. 149-158.
10. Calderwood, S. (1988). ***Principios de tratamiento antiinfeccioso. En: Stein LH. Medicina interna.*** 2ª. Ed. La Habana: Científico-Técnica. pp. 1469-86.
11. Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). ***Mecanismos de acción de los antimicrobianos.*** Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 27(1), pp. 44-52.
12. Chambers, HF. (2007). ***Sulfonamidas, trimetoprim y quinolonas. Capítulo 46 en: Farmacología básica y clínica.*** Katzung, BG. 10ª edición, El Manual Moderno, México
13. Dawkins, G., Hewitt, H., Wint, Y., Obiefuna, P. C., & Wint, B. (2003). ***Antibacterial effects of Carica papaya fruit on common wound organisms.*** The West Indian medical journal, 52(4), p. 290.
14. Di Conza, J. A., & Gutkind, G. O. (2010). ***Integrones: los coleccionistas de genes.*** Revista Argentina de microbiología, 42(1), pp. 63-78.
15. Doughari, J. H., Elmahmood, A. M., & Manzara, S. (2007). ***Studies on the antibacterial activity of root extracts of Carica papaya L.*** Afri. J. Microbiol. Res, pp. 037-041.
16. Dubois, V., Parizano, M. P., Arpin, C., Coulange, L., Bezian, M. C., & Quentin, C. (2007). ***High genetic stability of integrons in clinical isolates of Shigella spp. of worldwide origin.*** Antimicrobial agents and chemotherapy, 51(4), 1333-1340.

17. Emeruwa, A. C. (1982). ***Antibacterial substance from Carica papaya fruit extract***. Journal of natural products, 45(2), pp. 123-127.
18. Figueroa Brito, R. (2011). ***Incidencia del gusano cogollero Spodoptera frugiperda Smit en Ocoyucan, Puebla y actividad bioinsecticida de semillas de Carica papaya L. y Trichilia havanensis Jacq.*** Tesis doctoral. Instituto de enseñanza en investigación en ciencias agrícolas. Campus Puebla.
19. Fluit, A. C., & Schmitz, F. J. (2004). ***Resistance integrons and super-integrons***. Clinical Microbiology and Infection, 10(4), 272-288.
20. Galun, E., (2003). ***Bacterial insertion sequences. In: Transposable elements***. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
21. García, J. M., (1999). ***Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos***. Actualidad, Sociedad Española de Microbiología. 28: 18-22.
22. García, M. P. *et.al.* (1994). ***Microbiología Clínica Práctica***. 2ª edición. Servicio de Publicaciones Universidad de Cádiz, España.
23. Garza R, Vilchis G, Hernández L, Perea L. (2004). ***Streptograminas: un modelo interesante para hacerle frente a la resistencia bacteriana***. Lab-acta. 16:59-65.
24. González R, G., Mella M, S., Zemelman Z, R., Bello T, H., & Domínguez Y, M. (2004). ***Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos***. Revista médica de Chile, 132(5), 619-626.
25. Gupta, O. P., Sing, S., Bani, S., Sharma, N., Malhotra, S., Gupta, B. D., & Handa, S. S. (2000). ***Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of silymarin acting through inhibition of 5-lipoxygenase***. Phytomedicine, 7(1), 21-24.

26. Hall, R. M., & Stokes, H. W. (2004). ***Integrans or super integrans?*** *Microbiology*, 150(1), 3-4.
27. Jawetz E. (1998). ***Manual de microbiología médica***. México D.F.: Editorial El Manual Moderno, 110-153.
28. Kaatz, G. W., Seo, S. M., O'Brien, L., Wahiduzzaman, M., & Foster, T. J. (2000). ***Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in Staphylococcus aureus***. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(5), 1404-1406.
29. Levy, S. B. (1998). ***The challenge of antibiotic resistance***. *Scientific American*, 278: 46-53.
30. Levy, S. B. (2004). ***Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses***. *Nature Med*, 10, 122-129.
31. Liberman, D. F., & Robertson, R. G. (1975). ***Evaluation of a rapid Bauer-Kirby antibiotic susceptibility determination***. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 7(3), 250-255.
32. Lohiya, N. K., Kothari, L. K., Manivannan, B., Mishra, P. K., & Pathak, N. (2000). ***Human sperm immobilization effect of Carica papaya seed extracts: an in vitro study***. *Asian journal of andrology*, 2(2), 103-110.
33. Lohiya, N. K., Manivannan, B., Mishra, P. K., Pathak, N., Sriram, S., Bhande, S. S., & Panneerdoss, S. (2002). ***Chloroform extract of Carica papaya seeds induces long-term reversible azoospermia in langur monkey***. *Asian journal of andrology*, 4(1), 17-26.
34. Madigan, S. (2000). ***Biología de los microorganismos***. Prentice Hall.
35. Mazel, D., Davies, J. (1999). ***Antibiotic resistance in microbes***. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 56: 742-754.

36. Milind, P., (2011). **BASKETFUL BENEFITS OF PAPAYA**. International Research Journal of Pharmacy, 2, 6-12.
37. Morton, J. (1987). **Papaya. Fruits of warm climates**. Julia F. Morton, Miami, FL, 336-346.
38. Nayak, B. S., Ramdeen, R., Adogwa, A., Ramsuhag, A., & Marshall, J. R. (2012). **Wound-healing potential of an ethanol extract of *Carica papaya* (Caricaceae) seeds**. International wound journal, 9(6), 650-655.
39. Nikaido, H. (1994). **Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux**. Science, 264(5157), 382-388.
40. Nikaido, H. (1996). **Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria**. Journal of Bacteriology, 178(20), 5853.
41. Nikaido, H. (2009). **Multidrug resistance in bacteria**. Annual review of biochemistry, pp. 78, 119.
42. Norby, S. (1991). **Treatment Failures with Broad-spectrum Antibiotics**. Scandinavian Journal of Infectious diseases, 78. Pp67-70.
43. Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, **Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico**.
44. Núñez. B., et al. **Programa: Uso racional de antibióticos**, Bristol-Myers Squibb.
45. Patel, D., Kosmidis, C., Seo, S. M., & Kaatz, G. W. (2010). **Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus***. Antimicrobial agents and chemotherapy, 54(12), 5070-5073.

46. Patiño, D. (2003). **¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos?** Umbral Científico, (3), 48-56.
47. Paulsen, I. T. (2003). **Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution.** Current opinion in microbiology, 6(5), 446-451.
48. Piddock, L. J. (2006). **Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance.** Nature Reviews Microbiology, 4(8), 629-636.
49. Pinilla, G., et al. **Presencia de Integrones Clase 1 en Aislamientos de Staphylococcus epidermidis de las unidades de neonatología del Instituto Materno Infantil de Bogotá.** Nova-Publicación científica. 4(6): 55-59.
50. Pokharkar, R. D., Saraswat, R. K., & Kotkar, S. (2010). **Survey of plants having antifertility activity from western ghat area of Maharashtra state.** Journal of Herbal Medicine and Toxicology, 4(2), 71-75.
51. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. (2004). **Microbiología.** Madrid: McGraw Hill Interamericana.
52. Ratnayake, S., RUPPRECHT, K. J., Potter, W. M., & McLAUGHLIN, J. L. (1992). **Evaluation of various parts of the paw paw tree, Asimina triloba (Annonaceae), as commercial sources of the pesticidal annonaceous acetogenins.** Journal of economic entomology, 85(6), 2353-2356.
53. Recchia, G. D., & Hall, R. M. (1995). **Gene cassettes: a new class of mobile element.** Microbiology, 141(12), 3015-3027.
54. Roe, M. T., Pillai, S. D. (2003) **Monitoring and Identifying Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria.** Journal of Poultry Science. 82: 622-626.
55. Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. (2005). **Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review.** Nature Reviews Microbiology, 3(9), 700-710.

56. Sussmann, O., Mattos, L., & Restrepo, A. (2002). **Resistencia bacteriana**. *Universitas Médica*, 43(1), 91-96.

Referencias electrónicas.

1. Página oficial de la secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Recuperado el 22 de abril de 2014. De: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/PapayaMexicana.aspx>
2. Página oficial de la secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Recuperado el 23 de abril de 2014. De: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/PAPAYA2009.pdf
3. Página oficial de la secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Recuperado el 23 de abril de 2014. De: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2013B454.aspx>
4. Centro de información para la industria frutícola latinoamericana. Recuperado el 23 de abril de 2014. De: <http://www.portalfruticola.com/2013/07/05/mexico-planea-expandir-sus-exportaciones-ingresando-papaya-al-mercado-europeo/?pais=otrospaises>