

EXPRESIÓN DE ABAECINA DE *APIS MELLIFERA* EN *E. COLI* BL21 (DE3) Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *B. SUBTILIS*

Ana Laura Ortega-Ceniceros, Anna Karen Aguilar-Núñez, César Ibrahim Rodríguez-Fernández, Daniela Oloño-Fierro, Edmundo Noel Valenzuela-Peralta, José Pablo Rascón-Pérez, Michelle Alejandra Parada-Guillermo, Sayuri Fabiola Sandoval-Estrada, Viana Isabel Pérez-Domínguez; Cynthia Lizeth González-Trevizo, Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias. Chihuahua, C.P. 31300. annaaguilar0.0@gmail.com

Palabras clave: péptido antimicrobiano, abaecina, inhibición

Introducción. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son componentes del sistema inmune innato humoral de *Apis mellifera* (1), uno de ellos es la abaecina. Dicho AMP presenta actividad contra bacterias Gram-negativas y positivas, inhibiendo la biosíntesis de proteínas (2,3). En el presente estudio se busca producir abaecina por medio de *Escherichia coli* BL21(DE3) modificada genéticamente y evaluar su efectividad para inhibir el crecimiento de *Bacillus subtilis*.

El objetivo fue realizar una prueba de concepto respecto a la inhibición que presentaría el AMP contra los patógenos de *Apis mellifera*, *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius* en búsqueda de una alternativa a los antibióticos convencionales de uso veterinario.

Metodología. El gen codificante para el péptido abaecina (NM_001011617) fue sintetizado por Integrated DNA Technologies y subclonado en el vector pSB1C3. Las células de *E.coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con el vector resultante por medio de choque térmico y se realizó un gel de electroforesis para evaluar la efectividad de la transformación. Para obtener expresión proteica se indujo la cepa transformada con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (4). Con extracto crudo de proteínas obtenido a partir de choque térmico se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por dilución en caldo Luria-Bertani (LB); se trataron inóculos de 100 μ L de *Bacillus subtilis* a una D.O.₆₀₀ de 0.4, utilizando dos concentraciones (29.74 y 148.7 μ g/mL) de proteínas totales de *E.coli* BL21 (DE3) transformada. Se empleó un control de la bacteria Gram-positiva sin adición alguna y dos controles con adición de extracto crudo de proteínas de *E.coli* BL21 (DE3) no transformada en dos concentraciones distintas (29.565 y 147.825 μ g/mL). Para evaluar la actividad antimicrobiana se midió la D.O.₆₀₀ a las 3,6,9 y 21 horas después de la inoculación.

Resultados. El gen codificante para el péptido abaecina se subclonó en el vector pSB1C3 y las células *E. coli* BL21(DE3) se transformaron exitosamente. Lo cual se comprobó en un gel de electroforesis donde se comparó el peso molecular del gen sintetizado, que

ligado al vector medía 2442 pb, con la banda obtenida en el gel.

La capacidad inhibitoria del péptido se evaluó al realizar la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por dilución en caldo cuyos resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de inhibición de *B. subtilis* por abaecina. Lecturas hechas con un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible.

Tiempo de incubación (horas)	Control de <i>B. subtilis</i> (D.O. ₆₀₀)	BL21 (29.565 μ g/mL) (O.D. ₆₀₀)	Abaecina (29.74 μ g/mL) (O.D. ₆₀₀)
3	0.074	0.05	0.022
6	0.357	0.325	0.332
9	0.537	0.502	0.516
21	1.215	1.194	1.002
Tiempo de incubación (horas)	Control de <i>B. subtilis</i> (D.O. ₆₀₀)	BL21 (147.825 μ g/mL) (O.D. ₆₀₀)	Abaecina (148.7 μ g/mL) (O.D. ₆₀₀)
3	0.074	0.046	0.034
6	0.357	0.323	0.345
9	0.537	0.467	0.418
21	1.215	1.136	0.941

A las 21 horas ambas concentraciones de abaecina produjeron una disminución en la OD₆₀₀ en comparación con el control de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar. Con la concentración más baja de proteínas totales la OD₆₀₀ disminuyó en 16.08% y con la concentración más alta disminuyó en 17.16%.

Conclusiones. Fue posible la expresión del péptido antimicrobiano abaecina en *E. coli* BL21 (DE3) y demostrar su capacidad inhibitoria contra la bacteria Gram positiva *B. subtilis*. Se comprobó así, el posible uso del AMP como alternativa ante los agentes antimicrobianos de uso veterinario existentes.

Agradecimientos. Agradecemos a la escuela de Ingeniería y Ciencias del Tecnológico de Monterrey campus Chihuahua, al Centro de Investigación en Materiales Avanzados y a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Bibliografía.

1. Poppinga L, Genersch E. (2015). *Curr Opin Insect Sci*, 10: 29-36.
2. Shen X, et al. (2010). *J Invertebr Pathol*. 105:24-29.
3. Mishra A, et al. (2018). *Molecules*. 23:81.
4. Pérez-Trujillo JJ. Clonación y expresión de una proteína recombinante del Gen M del virus del Dengue Derotipo 2 [Tesis de maestría]. México: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2011.