



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS SOBRE *Staphylococcus aureus* ASOCIADOS A MASTITIS BOVINA

Heber Loeza Angeles, Joel Edmundo López Meza y Alejandra Ochoa Zarzosa

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carr. Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria C.P. 58863, Morelia, Mich. ochoaz@umich.mx

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, expresión heteróloga, *Staphylococcus aureus*

Introducción. La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria ocasionada principalmente por *Staphylococcus aureus*. Para el control de esta patología se recurre comúnmente al uso de la terapia con antimicrobianos. Como consecuencia de esto, la frecuencia de estafilococos resistentes se ha incrementado en las últimas décadas (1). Así, la búsqueda de estrategias alternativas para el control de esta enfermedad es una necesidad apremiante. Los péptidos antimicrobianos (PA) producidos por los vegetales representan una alternativa atractiva para el control de microorganismos patógenos, debido a su amplio rango de acción y a que los casos de resistencia hacia ellos son escasos.

El objetivo de este trabajo fue expresar el PA Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* en un sistema heterólogo (células endoteliales de bovino) y evaluar su efecto antibacteriano sobre aislamientos de *S. aureus* asociados a mastitis bovina.

Metodología. Se utilizaron 11 aislamientos de *S. aureus* colectados en el hato lechero de la Posta Veterinaria de la UMSNH. Se determinó la capacidad de los aislamientos para invadir a células de epitelio mamario bovino, además de su susceptibilidad al PA Thi2.1. Para expresar el PA Thi2.1 el ADNc se clonó en el vector pTracer (Invitrogen) para generar la construcción pThi2.1, la cual se utilizó para transfectar la línea celular de endotelio bovino BVE-E6E7. Las células transfectadas se seleccionaron con zeocina y por fluorescencia. La expresión del ADNc de Thi2.1 se corroboró por RT-PCR. Se obtuvo el medio condicionado (MC) creciendo las células en medio Optimem y se ensayó su actividad contra los aislamientos de *S. aureus*. La inhibición de la viabilidad se determinó por el ensayo colorimétrico de MTT (reducción de la sal de tetrazolio). Además, se establecieron los valores para las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM).

Resultados y discusión. La línea celular BVE-E6E7 fue transfectada establemente con pThi2.1 y se obtuvo una población policlonal. La expresión del ADNc se demostró por RT-PCR y secuenciación del producto amplificado. Se seleccionaron 8 clonas mediante dilución limitante y papel filtro. Se obtuvo el MC y se realizó una selección inicial evaluando su efecto sobre la cepa *S. aureus* ATCC

27543. Las clonas inhibieron la viabilidad de la cepa (>95%), este efecto fue superior al mostrado por la población policlonal. La clona C8 mostró la mayor actividad inhibitoria (>99%) y se seleccionó para evaluar su efecto sobre los aislamientos de *S. aureus*. Se realizó una evaluación inicial con 2.5 µg de proteína total del MC, la cual inhibió >40% el crecimiento de los aislamientos, en relación al MC de las células control. A continuación, 5 aislamientos fueron seleccionados en función de su capacidad de invadir células de epitelio mamario bovino y se utilizaron para establecer los valores de las CIM. Se observó un efecto dependiente de la concentración (Fig. 1), con valores de las CIM ≤3.12 µg/ml (2).

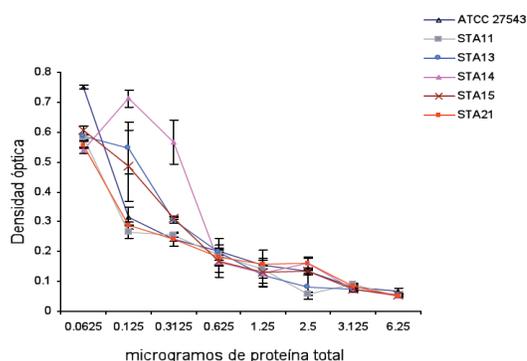


Fig.1. Curva dosis-respuesta de la viabilidad de los aislamientos de *S. aureus* en presencia del MC del PA Thi2.1.

Conclusiones. El PA Thi2.1 tiene actividad antibacteriana contra *S. aureus* asociados a mastitis bovina y puede ser una alternativa para su control.

Agradecimiento. Financiamiento CIC-UMSNH 14.5

Bibliografía. 1) Ochoa-Zarzosa, A, Loeza-Lara, P, Torres-Rodríguez, F, Loeza-Ángeles, H, Mascot-Chiquito, N, Sánchez-Baca, S, López-Meza, J.E. (2008). Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 199–206. 2) Ochoa-Zarzosa, A., Loeza-Angeles, H., Sagrero-Cisneros, E., Villagómez-Gómez, E., Lara-Zárate, L., López-Meza, J.E. (2008). Antibacterial activity of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed by bovine endothelial cells against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 127: 425-430.