



EXPRESIÓN DE LA TIONINA Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* EN CÉLULAS ENDOTELIALES Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Eduardo Sagrero Cisneros, Heber Loeza Ángeles, Erik Villagómez Gómez, Joel E. López Meza y Alejandra Ochoa Zarzosa.

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. AP 53, Admón Chapultepec Ote, CP 58262. Morelia, Mich. Tel/FAX 443 2958029. ochoaz@zeus.umich.mx

Palabras clave: péptidos antimicrobianos, tioninas, endotelio

Introducción. Los péptidos antimicrobianos (PA) son parte importante de la inmunidad innata de los organismos eucariotes. Con base en su mecanismo de acción inespecífico, los PA representan una alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones ocasionadas por patógenos resistentes a los antibióticos convencionales. Las tioninas de las plantas se caracterizan por presentar actividad antimicrobiana contra organismos fitopatógenos. La tionina Thi2.1 se expresa constitutivamente en *Arabidopsis thaliana* y es inducible en el tallo cuando se desarrollan infecciones secundarias. Hasta el momento, no se ha reportado el efecto de Thi2.1 sobre microorganismos patógenos de mamíferos. En un trabajo previo, reportamos que la expresión de un PA de *Capsicum chinense* por endotelio bovino presenta efectos antimicóticos y citotóxicos contra *Candida albicans* y la línea tumoral humana HeLa (1), respectivamente.

El objetivo del presente trabajo fue expresar el ADNc de Thi2.1 en las células endoteliales bovinas (CEB) BVE-E6E7 y evaluar el efecto del medio condicionado (MC) de las células transfectadas sobre el crecimiento de distintas cepas enteropatógenas de humano de *Escherichia coli* y sobre aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados con mastitis bovina.

Metodología. Las CEB se transfectaron establemente con el ADNc de Thi2.1 clonado en el vector de expresión pTracer (Invitrogen), para producir este PA como una proteína de fusión. Como control negativo se utilizó Thi2.1 clonado en antisentido (CEB AS). La expresión de Thi2.1 se analizó mediante RT-PCR y por inmunodot. Los MC se obtuvieron creciendo las células durante 24 h en medio sin suero. Los efectos antimicrobianos se evaluaron sobre las cepas patógenas (INRE) de *E. coli*: H10407, 25611, E11 y O111, y de *S. aureus*: ATCC 27543 y los aislamientos asociados a mastitis bovina: 3-2, 3-3, 4-2, 4-3 y 5-1. La viabilidad microbiana se determinó en cultivos líquidos por reducción de sales de tetrazolio o por conteo de UFC en medio sólido.

Resultados y Discusión. Mediante RT-PCR se demostró que las células BVE-E6E7 transfectadas expresan el ARNm de Thi2.1 (CEB Thi2.1). Se aislaron 9 clonas de las células transfectadas, y se evaluó el efecto de sus MC sobre la viabilidad de las cepas bacterianas mediante reducción del MTT. De estas, se seleccionó la que presentaba mayor actividad antibacteriana, en cuyo MC y lisado celular se

detectó la producción de una proteína de fusión por inmunodot. En el Cuadro 1 se muestra el efecto de distintos MC sobre el crecimiento de *E. coli* en medio sólido. En todas las cepas evaluadas se observó que el número de UFC disminuyó ~100% en presencia del MC de la clona de CEB Thi2.1. Se observó un efecto inhibitorio del ~100% del MC de CEB Thi2.1 sobre el crecimiento de distintos aislamientos de *S. aureus* evaluado por MTT (Fig. 1). En este caso se empleó como control negativo el MC de CEB AS.

Cuadro 1. Efecto de diferentes MC sobre el crecimiento en medio sólido de distintas cepas de *Escherichia coli*

CEPA	MEDIO CONDICIONADO	UFC* (\pm Error Std)
<i>E. coli</i> E11	No transfectadas	402 \pm 108.7
	CEB Thi2.1 policlonal	37.5 \pm 33.5
	CEB Thi2.1 clona	0 \pm 0 ^b
	CEB AS	94 \pm 9
<i>E. coli</i> 25611	No transfectadas	1743 \pm 427
	CEB Thi2.1 policlonal	763 \pm 139
	CEB Thi2.1 clona	0 \pm 0 ^b
	CEB AS	690 \pm 110
<i>E. coli</i> H10407	No transfectadas	3743 \pm 427
	CEB Thi2.1 policlonal	5825 \pm 825
	CEB Thi2.1 clona	33 \pm 12 ^b
	CEB AS	1354 \pm 216
<i>E. coli</i> O111	No transfectadas	536 \pm 185
	CEB Thi2.1 policlonal	1130 \pm 158
	CEB Thi2.1 clona	0 \pm 0 ^b
	CEB AS	900 \pm 144

* Se muestra el promedio de triplicados de un experimento representativo con su respectivo error Std.

En todos los casos se utilizaron 2.5 μ g de proteína total del MC.

^b $p < 0.001$, con respecto al efecto del MC de las células sin transfectar.

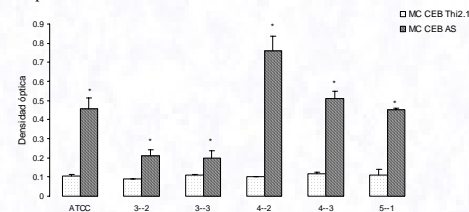


Figura 1. Viabilidad de los distintos aislamientos de *S. aureus* en presencia de 2.5 μ g de proteína de los MC. * $p < 0.01$ con respecto al control para el mismo aislamiento.

Conclusiones. El MC de CEB que expresan el PA Thi2.1 presenta efectos antibacterianos en contra de *E. coli* y *S. aureus*.

Agradecimiento. CONACyT proyecto J-46400 y CIC 14.1

Bibliografía

1. Anaya-López, JL, López-Meza, JL, Baizabal-Aguirre, VM, Cano-Camacho, H y Ochoa-Zarzosa, A. 2006. Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. *Biotech Lett.* 28:1101-1108.