



U. M. S. N. H.

BIOLÓGICAS, No. 10, pp. 49-59, 2008
Publicado por la Facultad de Biología de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Impreso en Morelia, Michoacán, México

Actividad antibacteriana del medio condicionado de células endoteliales transfectadas con el péptido antimicrobiano tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* sobre aislamientos de *Staphylococcus aureus*

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

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Dirección: Apartado Postal 53, Admón. Chapultepec CP 58262, Morelia, Michoacán, México.

Tel: (443) 2 95 80 29. C. electrónico: ochoaz@zeus.umich.mx y alecho@hotmail.com

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto del péptido antimicrobiano (PA) tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* sobre la viabilidad y capacidad de invasión de células de epitelio mamario bovino (CEMB) de aislamientos de *Staphylococcus aureus* provenientes de casos de mastitis bovina de sistemas de producción de pequeña escala. Se obtuvieron 13 aislamientos de *S. aureus*, de los cuales 5 mostraron capacidad de endocitosis por las CEMB. En presencia del medio condicionado (MC) de células endoteliales bovinas que producen el PA tionina Thi2.1 de *A. thaliana* (CEB-Thi2.1), ninguno de los aislamientos fue capaz de penetrar CEMB. El MC de CEB-Thi2.1 inhibió la viabilidad de los aislamientos de *S. aureus*, determinada por reducción de sales de tetrazolio, de manera dependiente de la concentración, encontrándose un efecto inhibitorio a partir del rango de 125-625 ng/ml de proteína total del MC. En conclusión, el PA tionina Thi2.1 producida por células endoteliales bovinas inhibe la viabilidad de aislamientos de *S. aureus* provenientes de casos de mastitis bovina, y representa una alternativa terapéutica para el control de esta patología.

Palabras clave: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, tioninas, péptidos antimicrobianos, epitelio mamario.

ABSTRACT

In this work, we evaluated the antibacterial activity of antimicrobial peptide (PA) thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* against the viability and invasive ability into bovine mammary epithelial cells (BMEC) of bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from extensive farms. We obtained thirteen *S. aureus* isolates, but only five showed invasive ability into BMEC. In the presence of conditioned media (CM) of bovine endothelial cells that produce thionin Thi2.1 (CEB-Thi2.1) from *A. thaliana* none isolate was able to penetrate BMEC. The CM of CEB-Thi2.1 inhibited bacterial viability in a dose-dependent way measured by reduction of tetrazolium salts, showing an inhibitory effect ranged between 125-625 ng/ml of total protein of CM. In conclusion, thionin Thi2.1 produced by bovine endothelial cells inhibits the viability of bovine mastitis *S. aureus* isolates, and represents a therapeutic alternative for the control of this disease.

Key words: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, thionins, antimicrobial peptides, mammary epithelium.

INTRODUCCIÓN

Los péptidos antimicrobianos (PA) están ampliamente distribuidos en la naturaleza desempeñando una función de protección importante en los seres vivos. Se han aislado y/o detectado en animales, plantas, bacterias, hongos y virus (Hancock y Chapple, 1999; Brogden 2005). Un gran número de estos PA posee actividad de amplio espectro ya que pueden matar bacterias Gram negativas, Gram positivas, hongos, células cancerígenas, e incluso inactivar virus (Sitaram y Nagaraj, 1999; Hancock y Scott, 2000; Riso 2000). En *Arabidopsis thaliana*, una de las plantas modelo para la investigación y el desarrollo genómico, se ha identificado el PA tionina (Thi2.1) que se expresa constitutivamente en flores, silicuas y hojas (Epple et al., 1995). Se ha reportado también que la expresión del PA Thi2.1 se induce en respuesta a infecciones por hongos fitopatógenos, principalmente en infecciones causadas por especies del género *Fusarium* (Epple et al., 1997; Vignutelli et al., 1998; Zasloff 2002).

El desarrollo de la Biotecnología ha permitido explorar el efecto de los PA sobre microorganismos patógenos de animales empleando sistemas alternativos para su expresión, por ejemplo, las células de mamífero. En este sentido se ha evaluado la capacidad antimicrobiana del PA -tionina, una defensina de chile habanero (*Capsicum chinense*), expresada en las células endoteliales bovinas, demostrándosele actividad sobre el hongo *Candida albicans* (Anaya-López et al., 2006a). Evidencias recientes han mostrado que la expresión del PA Thi2.1 por células endoteliales bovinas presenta también actividad en contra de bacterias patógenas Gram negativas, como lo son diversas cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* responsables de diarreas en humanos (Sagrero-Cisneros 2007). Sin embargo, se desconocen los efectos del PA Thi2.1 sobre bacterias patógenas Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, causante de diversas patologías en humanos y animales (ej. síndrome del choque tóxico y mastitis).

Diversos antimicrobianos se emplean rutinariamente para controlar enfermedades en humanos y animales causadas por bacterias del género *Staphylococcus*. El uso inadecuado de este tipo de compuestos ha ocasionado la emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos. Particularmente, en el caso de *S. aureus* patógenos de humanos se ha registrado un incremento en la prevalencia de cepas resistentes a los antibióticos beta-lactámicos (conocidas como cepas meticilina resistentes) (Werckenthin et al., 2001). En animales, *S. aureus* es el patógeno que con mayor frecuencia se aísla de casos de mastitis bovina (> 70%), y su capacidad para infectar el epitelio mamario se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* en cultivos de células de epitelio mamario bovino (Kerro-Dego et al., 2002). Recientemente, en un estudio realizado con aislamientos de *S. aureus* provenientes de casos de mastitis clínica en sistemas lecheros de traspatio en la región de Morelia, Mich., se detectó un 100% de resistencia hacia antibióticos de la familia de beta-lactámicos (Ochoa-Zarzosa et al., 2008a). Dado lo anterior, es necesario el desarrollo de terapias alternativas que controlen infecciones ocasionadas por *S. aureus*, en particular la mastitis. Los PA representan una posibilidad atractiva para tratar infecciones ocasionadas por *S. aureus* debido a que cuentan con un mecanismo de acción inespecífico y con un amplio espectro de actividad.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del medio de cultivo condicionado de células endoteliales bovinas que expresan el ADNc del PA Thi2.1 de *A. thaliana*, sobre aislamientos de *S. aureus* asociados con mastitis bovina clínica. Además, se determinó la capacidad de las bacterias de ser endocitadas por células de epitelio mamario bovino en presencia de este medio de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos de Staphylococcus aureus

Se colectaron 13 muestras de leche de vacas lactantes mantenidas en sistemas de producción intensiva y de traspatio en el Valle Morelia-Queréndaro, Mich., con signos clínicos de mastitis

TABLA 1. Aislamientos de *S. aureus* empleados en este estudio

Aislamiento	Origen
STA1	Sistema tecnificado
STA2	Sistema tecnificado
STA3	Sistema tecnificado
STA6	Sistema tecnificado
STA9	Sistema tecnificado
STA11	Sistema de traspatio
STA13	Sistema de traspatio
STA14	Sistema de traspatio
STA15	Sistema de traspatio
STA16	Sistema de traspatio
STA19	Sistema de traspatio
STA21	Sistema de traspatio
STA22	Sistema de traspatio
ATCC 27543	

(TABLA 1). El diagnóstico de la mastitis se realizó con la prueba de California. La leche se colectó en tubos estériles y se conservó a 4 °C (máximo de 3 días) hasta su procesamiento. Para la obtención de los aislamientos se tomaron alícuotas de 200 µl de la leche y se distribuyeron en cajas de Petri con agar Luria-Bertani (LB). Las cajas se colocaron a 37 °C durante 18-24 h. Los aislamientos bacterianos pertenecientes a *S. aureus* se identificaron mediante la amplificación por PCR del gen de la enzima termonucleasa *nuc*, específica para la especie (Brakstad *et al.*, 1992). Todos los aislamientos resultaron susceptibles a 10 mg de gentamicina (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008a), por lo que este antibiótico se empleó en los posteriores ensayos de infección. La cepa certificada *S. aureus* ATCC 27543 proveniente de un caso de mastitis clínica se incluyó como control positivo. Previo a la realización de los ensayos de infección con las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB), las bacterias se crecieron toda la noche a 37 °C en medio de cultivo LB líquido, y las unidades formadoras de colonias (1×10^6 UFC) de cada aislamiento se ajustaron midiendo la densidad óptica del cultivo a 620 nm.

Cultivos celulares: células endoteliales bovinas (CEB) y células epiteliales mamarias bovinas (CEMB)

La línea celular endotelial bovina BVE-E6E7 inmortalizada con el papilomavirus humano 16 (Cajero-Juárez *et al.*, 2002), se utilizó para expresar el ADNc que codifica para el PA Thi2.1. Las CEB se cultivaron rutinariamente en medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM, Sigma), suplementado con antibióticos y 10% de suero fetal bovino (Equitech-Bio). Las CEMB utilizadas en este trabajo se aislaron y cultivaron como se ha descrito previamente a partir del tejido alveolar de una vaca lactante (Anaya-López *et al.*, 2006b). Para su cultivo, se empleó la mezcla de medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12, Sigma), suplementado con antibióticos, 10% de suero fetal bovino (Equitech-Bio), insulina (Sigma) e hidrocortisona (Sigma) (10 ng/ml de cada una).

Construcción del vector de expresión y transfección de las CEB

El ADNc del PA Thi2.1 de *A. thaliana* clonado en el vector pUC19 fue donado por Klaus Apel (Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland). Para los ensayos de transfección celular, la región codificante del PA Thi2.1 (400 pb) se clonó en el vector de expresión para células de mamífero pTracer-EF/V5-His-B (Invitrogen), para generar una proteína de fusión con el epitope V5 y una cola de 6 histidinas, a esta construcción se le denominó pThi2.1 (FIGURA 1A). La región codificante de *Thi2.1* se obtuvo por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos: directo, 5' TTA GGT ACC GTT ATG AAA GGA AGA ATT 3'; reverso, 5' TT AGA ATT CGA CAA CAG TTT AGG CGG 3'. Se realizaron 25 ciclos con las siguientes condiciones: 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 1 min. El tamaño del producto predicho es de ~ 400 pares de bases. La correcta fusión de la construcción se confirmó mediante secuenciación (datos no mostrados) empleando el paquete BigDye terminator v 3.1 (Applied Biosystems) y el analizador automático de secuencias génicas ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer). Como control negativo de células transfectadas se utilizó una construcción que contiene el ADNc de Thi2.1 clonado en pTracer-EF/V5-His-B en orientación contraria (pThi2.1 AS). Las CEB se transfectaron esta-

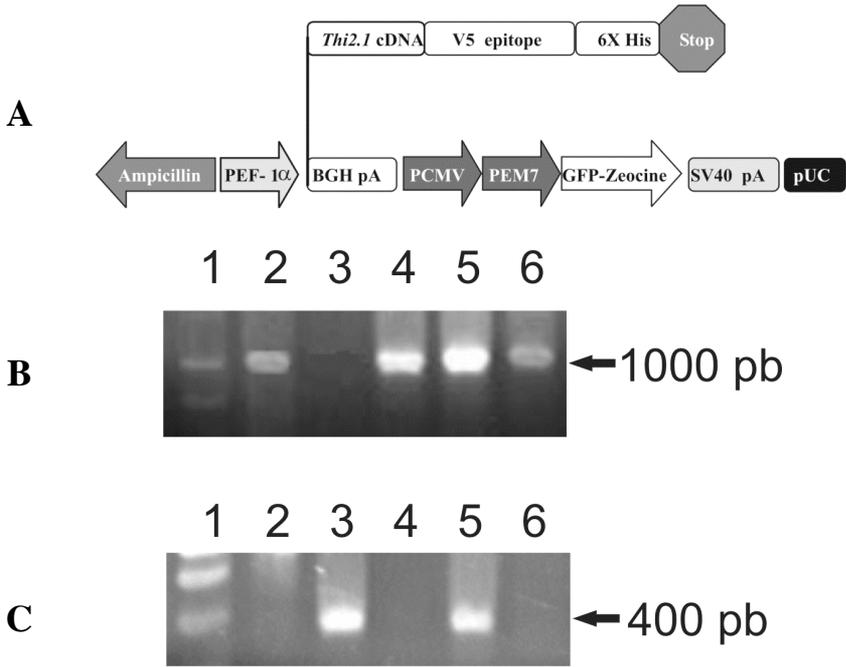


FIGURA 1. CONSTRUCCIÓN pThi2.1 Y EXPRESIÓN DEL ARNm DEL PA TIONINA Thi2.1 EN LAS CÉLULAS ENDOTELIALES TRANSFECTADAS. A) Construcción pThi2.1 utilizada para transfectar las células BVE-E6E7. Esta construcción contiene el promotor EF1- α , el ADNc del PA tionina Thi2.1 (~400 pb), el promotor del CMV, el promotor EM7, el gen de resistencia a zeocina fusionado con el de la proteína verde fluorescente (GFP) y la secuencia de poliadenilación del SV40. La línea indica el sitio en el que se clonó el ADNc. B) Análisis de RT-PCR que muestra la amplificación de β -actina en las CEMB (carril 2), en las CEB no transfectadas (carril 4) y transfectadas con pThi2.1 (carril 5) o pThi2.1 AS (carril 6). La ausencia de amplificación de β -actina se muestra en el control negativo utilizando el ADN de la construcción pThi2.1 AS como molde (carril 3). El marcador de tamaño molecular (1 kb, Invitrogen) se incluyó en el carril 1. C) Análisis de RT-PCR que muestra la expresión del PA tionina Thi2.1 en las células endoteliales. Se muestra la ausencia de expresión del ARNm del PA tionina Thi2.1 en células CEMB (carril 2), en CEB no transfectadas (carril 4) y en CEB transfectadas con pThi2.1 AS (carril 6). La expresión del ARNm del PA tionina Thi2.1 en las células BVE-E6E7 transfectadas con pThi2.1 se muestra en el carril 5. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 1 kb (Invitrogen), y el carril 3 corresponde al control positivo utilizando la construcción pThi2.1 como molde.

blemente con las construcciones pThi2.1 y pThi2.1 AS por lipofección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células transfectadas establemente se seleccionaron en medio de cultivo Optimem (Gibco) con 500 mg/ml de zeocina (Invitrogen) durante dos semanas, de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Invitrogen). Finalmente, las células también se seleccionaron empleando como criterio la expresión de la proteína verde fluorescente, incluida como gen reportero en las construcciones. A partir de esta población policlonal se seleccionaron colonias mediante subclonación empleando discos de papel filtro (Sigma) y dilución limitan-

te. Los resultados mostrados en el presente trabajo se obtuvieron empleando el medio de cultivo condicionado (MC) de una clona seleccionada que expresa el ADNc del PA Thi2.1, la cual se denominó CEB-Thi2.1. La expresión de la proteína Thi2.1 en las células transfectadas se produce como una proteína de fusión unida al epítipo V5 y a una cola de histidinas, por lo que mediante inmunoprecipitación y análisis de Western blot empleando un anticuerpo anti-V5 (Invitrogen), se demostró la expresión de Thi2.1 en el medio condicionado de las células transfectadas (datos no mostrados, Loeza-Ángeles *et al.*, 2008).

Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La expresión del ADNc del PA Thi2.1 por las CEB transfectadas se analizó por RT-PCR. El ARN total de las células transfectadas se extrajo con Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La contaminación con ADN genómico se eliminó mediante tratamiento con la enzima ADNasa (Sigma). La reacción de retrotranscripción (RT) se desarrolló como se ha descrito previamente (Torner *et al.*, 1999). La región codificante del PA Thi2.1 se amplificó con los oligonucleótidos previamente descritos. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar beta actina (b-actina) para verificar la integridad del ARNm, así como la RT (Torner *et al.*, 1999). Los programas de amplificación para cada combinación de oligonucleótidos consistieron en 25 ciclos y una temperatura de alineamiento de 55 °C. Los productos de PCR se secuenciaron para confirmar la amplificación específica del ADNc de Thi2.1. Como controles negativos se utilizaron los ADNc sintetizados a partir del ARNm de las CEB no transfectadas y de cultivos de CEMB.

Medios condicionados (MC)

Para obtener el MC de las CEB transfectadas con las construcciones pThi2.1, pThi2.1 AS y de las CEB no transfectadas, éstas se cultivaron en cajas de Petri p100 (Costar), y al llegar a confluencia se reemplazó el medio de cultivo con 5 ml de medio Optimem (Gibco) sin suero y antibióticos, y se cultivaron durante 24 h. Al cabo de este tiempo, el MC se recuperó, se clarificó por centrifugación (10 min, 1200 x g), y se determinó la concentración de proteína total por el método de Bradford. En todos los experimentos se emplearon 2.5 mg de proteína total (Pt) presente en el MC, con excepción de los experimentos en los que se evaluó la respuesta de manera dependiente de la concentración.

Ensayo de endocitosis de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* por las CEMB

Se utilizaron monocapas confluentes de las CEMB de cultivo primario pasaje 2 en placas de 24 pozos (Corning) y se incubaron con 1×10^6

UFC de los distintos aislamientos de *S. aureus*. La cepa de *S. aureus* ATCC 27543 se empleó como control positivo de la infección. Las CEMB se incubaron con las bacterias durante 2 h a 37 °C en medio F12K (Sigma) sin suero ni antibióticos en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Las bacterias adheridas a la superficie de las células se eliminaron incubando las células infectadas con 50 µg/ml de gentamicina durante 2 h y lavándolas con amortiguador de fosfatos (PBS). Las células infectadas se despegaron mediante tratamiento con Tripsina-EDTA (Sigma), se lisaron con 200 µl de agua desionizada estéril y se distribuyó una dilución 1/100 sobre placas de agar LB, luego se incubaron a 37 °C durante 24 h y se contaron las UFC de *S. aureus* recuperadas correspondientes a cada aislamiento. Los experimentos se realizaron por triplicado. Para evaluar el efecto de los MC sobre la endocitosis de los aislamientos de *S. aureus* por las CEMB, los ensayos se realizaron en presencia de los mismos, se utilizó el medio Optimem como control, y se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

Ensayo de viabilidad de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*

Se incubaron 10×10^6 UFC de *S. aureus* con 2.5 µg de Pt de los MC en platos de fondo plano de 96 pozos (Corning) durante 4 h a 37 °C. Después se agregaron 10 µl (5 mg/ml) de la sal de tetrazolio bromuro 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, Sigma) a cada pozo y se incubó nuevamente por 4 h a 37°C (Satnam *et al.*, 1999). Finalmente, se agregaron 100 µl del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma) al 10% para disolver los cristales de formazan. Se determinó la viabilidad de los microorganismos midiendo la reducción del formazan en un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad) a 595 nm. Para determinar el efecto dosis-respuesta, los aislamientos de *S. aureus* se incubaron con distintas concentraciones de proteína total de los MC: 0.0625, 0.125, 0.625, 1.25, 2.5, 3.125 y 6.25 mg de Pt.

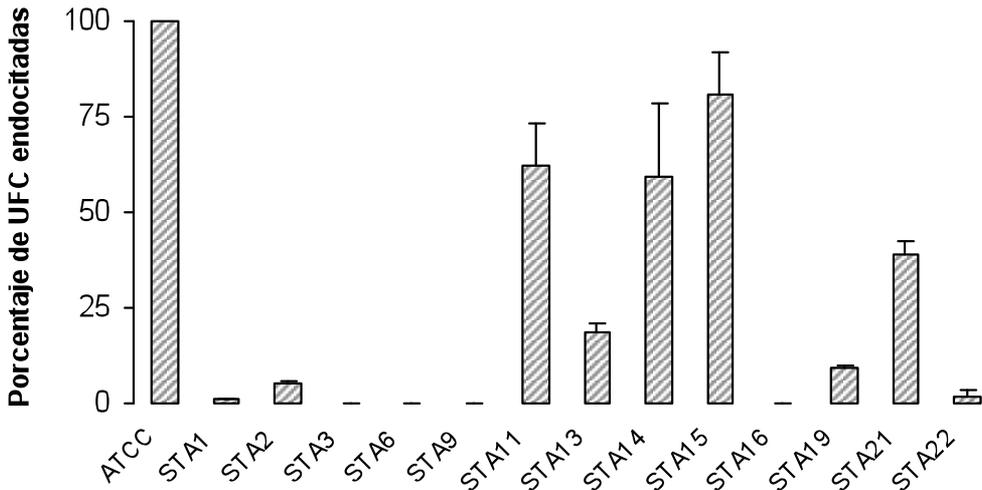


FIGURA 2. ENDOCITOSIS DE AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus* POR CÉLULAS DE EPITELIO MAMARIO BOVINO. Se cuantificó el número de UFC recuperadas a partir de CEMB infectadas y lisadas. En la gráfica se muestra el promedio de triplicados del porcentaje de UFC recuperadas tras lisar las CEMB después de 2 h de infección, con sus respectivos errores estándar. La endocitosis de la cepa ATCC 27543 se consideró el 100%.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces por triplicado. Los resultados de los tratamientos se analizaron mediante la prueba *t* de Student. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

En el presente trabajo se evaluó el efecto antibacteriano del MC de CEB productoras del PA Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* sobre aislamientos de *S. aureus* de casos de mastitis clínica bovina. En la FIGURA 1A se presenta el esquema de la construcción pThi2.1, que contiene el ADNc del PA Thi2.1, utilizada para transfectar establemente las CEB. Las CEB se transfectaron utilizando lipofectamina y las células se seleccionaron en medio de cultivo con zeocina y mediante la expresión de la proteína verde fluorescente. La integridad del ARNm aislado y la eficiencia de la RT se verificó amplificando el ARNm correspondiente a b-actina en las CEMB, en las CEB no transfectadas, y en las CEB transfectadas con las construcciones pThi2.1 y pThi2.1 AS (FIGURA 1B, carriles 2, 4, 5 y 6, res-

pectivamente). El control negativo consistió en utilizar el ADNc de *Thi2.1* como molde (FIGURA 1B, carril 3). La expresión del ARNm del PA Thi2.1 en las CEB transfectadas con la construcción pThi2.1 se muestra en la FIGURA 1C, en la que se observa un producto de amplificación por PCR de ~400 pb (carril 5), correspondiente al tamaño predicho. La amplificación de este producto también se detectó cuando se empleó el ADNc de *Thi2.1* como molde (FIGURA 1B, carril 3). No se detectaron productos de amplificación en los controles que contienen el ADNc sintetizado a partir de CEMB y de CEB transfectadas con la construcción pThi2.1 AS (FIGURA 1C, carriles 2 y 6, respectivamente). De acuerdo con la FIGURA 1A, el PA Thi2.1 puede ser producido como una proteína de fusión acoplada al epítopo V5. Este PA posee un péptido señal de 25 aminoácidos en la región amino terminal, sugiriendo que puede ser excretado por las CEB al medio de cultivo. En un trabajo previo, mediante inmunoprecipitación con anticuerpos anti V5 y análisis de Western blot, se demostró la presencia de la proteína de fusión en el MC de las CEB-Thi2.1 (2% de la proteína total), pero no en las CEB-Thi2.1AS, sugiriendo que las

TABLA 2 Inhibición de la endocitosis de los aislamientos de *S. aureus* por las CEMB en presencia del medio condicionado de las CEB

Aislamiento	Medio condicionado ^a	UFC (± Desv Std) ^b	% de inhibición ^c
<i>S. aureus</i> ATCC 27543	CEB-Thi2.1	259 ± 22	96.5
	CEB-Thi2.1 AS	7400 ± 3100	
STA11	CEB-Thi2.1	0.66 ± 0.57	80.18
	CEB-Thi2.1 AS	3.33 ± 2.08	
STA13	CEB-Thi2.1	33.33 ± 14	96.9
	CEB-Thi2.1 AS	1081.66 ± 32	
STA14	CEB-Thi2.1	21 ± 9	90.74
	CEB-Thi2.1 AS	227 ± 66	
STA15	CEB-Thi2.1	100.66 ± 36	97.32
	CEB-Thi2.1 AS	3766.66 ± 324	
STA21	CEB-Thi2.1	35 ± 8	73.28
	CEB-Thi2.1 AS	131 ± 25	

^a En todos los casos se evaluó el efecto de 2.5 µg de proteína total de los medios condicionados

^b Se muestra el promedio de triplicados

^c Porcentaje calculado considerando 0% de inhibición al efecto del MC de CEB-Thi2.1AS

CEB-Thi2.1 producen la tionina (Loeza-Ángeles *et al.*, 2008). La utilización de CEB como sistema de expresión coincide con reportes previos que señalan que éstas células son un sistema heterólogo útil para la expresión de PA, además de que representan un modelo atractivo para el

estudio de la interacción hospedero-patógeno (Anaya-López *et al.*, 2006b).

Antes de evaluar la actividad antibacteriana del MC de las CEB-Thi2.1, se analizó la capacidad de endocitosis de los aislamientos de *S. aureus* por las CEMB. La invasión de las células epiteliales por *S. aureus* es reconocida

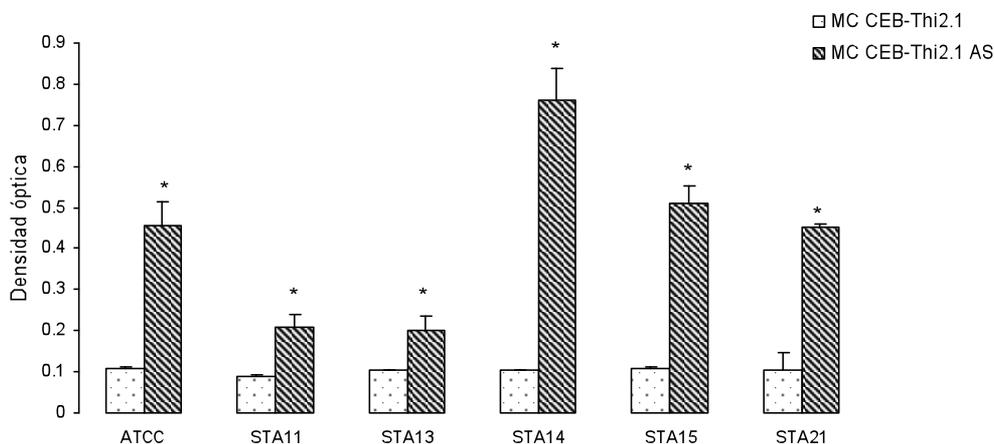


FIGURA 3. VIABILIDAD DE LOS AISLAMIENTOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN PRESENCIA DE 2.5 MG DE PROTEÍNA TOTAL DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS. La viabilidad de las bacterias que mostraron capacidad de endocitosis se cuantificó mediante el ensayo de reducción del MTT. En la gráfica se muestra el promedio de quintuplicados de los diferentes aislamientos después de 4 h de tratamiento con los MC de las CEB-Thi2.1 y CEB Thi2.1 AS (control), con sus respectivos errores estándar. * $P \leq 0.05$ en relación con el efecto del MC CEB Thi2.1 AS.

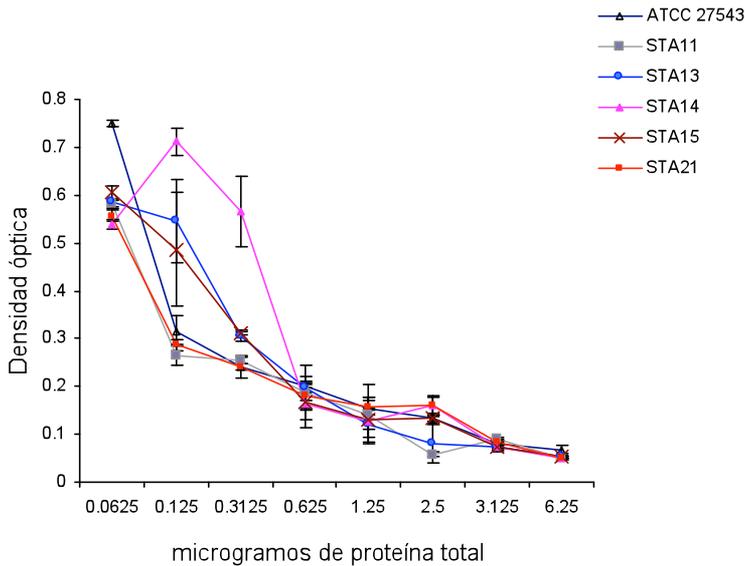


FIGURA 4. CURVA DE DOSIS-RESPUESTA DE LA VIABILIDAD DE LOS AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus* EN PRESENCIA DE 2.5 MG DE PROTEÍNA TOTAL DEL MEDIO CONDICIONADO DE CEB- Thi2.1. Las bacterias que mostraron capacidad de endocitosis se incubaron con diferentes concentraciones de proteína total del MC de las CEB-Thi2.1 (0-62.5 µg/ml). La viabilidad bacteriana se cuantificó mediante el ensayo de reducción del MTT. Cada barra representa el promedio de triplicados con su respectivo error estándar. Se muestra un experimento representativo.

como un mecanismo patogénico importante durante el establecimiento de la mastitis, y se ha determinado que existen diferencias en esta capacidad de invasión entre los diferentes aislamientos (Wanasinghe, 1981; Anaya-López et al., 2006a). Se evaluaron 13 aislamientos (TABLA 1) provenientes de casos de mastitis clínica bovina los cuales fueron identificados como *S. aureus* mediante la amplificación del gen de la termonucleasa *nuc*, específico para la especie (Brakstad et al., 1992). Como control positivo de la endocitosis se empleó la cepa de *S. aureus* ATCC 27543 que tiene capacidad de invadir células epiteliales mamarias bovinas (Anaya-López et al., 2006b). Sólo los aislamientos STA11, STA13, STA14, STA15 y STA21 de *S. aureus* fueron endocitados por las CMEB (FIGURA 2). De acuerdo con los valores de las UFC recuperadas, los 5 aislamientos mostraron valores de endocitosis >15% con respecto a la cepa de ATCC, la cual se consideró como el 100%. Los valores de endocitosis mostrados por los aislamientos de *S. aureus*

evaluados coinciden con reportes previos, en los que se ha demostrado diferencias en la endocitosis de aislamientos de *S. aureus* asociados a mastitis bovina por las CEMB (Hensen et al., 2000; Anaya-López et al., 2006b). Es importante señalar que los aislamientos de *S. aureus* que fueron endocitados por las CEMB provienen de vacas de sistemas lecheros de traspatio (TABLA 1), en este tipo de sistema de producción se ha reportado que existe una mayor variabilidad genética entre los aislamientos de *S. aureus* que aquellos provenientes de sistemas tecnificados (López-Meza et al., 2006). Con base en estos resultados, los 5 aislamientos que mostraron capacidad de endocitosis por las CEMB, fueron empleados en los siguientes experimentos.

La actividad antimicrobiana del PA Thi2.1 de *A. thaliana* se ha evaluado únicamente en contra de hongos y de bacterias fitopatógenas, y se desconocen sus efectos sobre bacterias patógenas de mamíferos (Vignutelli et al., 1998). Dado lo anterior, a continuación se determinó el

efecto del MC de las CEB-Thi2.1 sobre la viabilidad de los 5 aislamientos de *S. aureus* seleccionados. En la FIGURA 3 se muestra que 2.5 mg de proteína total del MC de CEB-Thi2.1 inhibe significativamente la viabilidad de los aislamientos STA11, STA13, STA14, STA15 y STA21, en comparación con la misma concentración de proteína total del MC de las CEB transfectadas con pThi2.1 AS (CEB-Thi2.1AS). Las diferencias de viabilidad observadas entre cada aislamiento posiblemente se deben a la diversidad genética que previamente se ha demostrado en aislamientos colectados en sistemas de traspatio (López-Meza *et al.*, 2006; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008b). Posteriormente, los 5 aislamientos de *S. aureus* se crecieron en presencia de diferentes concentraciones de proteína total del MC y se determinó la viabilidad por reducción del MTT, con el propósito de determinar si se presentaba un efecto inhibitorio dependiente de la concentración de proteína total del MC. Las concentraciones evaluadas de proteína total del MC se encontraron en el rango de 0.0-62.5 µg/ml. La viabilidad de todos los aislamientos de *S. aureus* disminuyó en el rango de 125-625 ng/ml de proteína total del MC de CEB-Thi2.1 (FIGURA 4), observándose un efecto dependiente de la concentración. La actividad antibacteriana dependiente de la concentración se ha reportado previamente para las tioninas de plantas (Stec, 2006).

Para determinar el efecto del PA Thi2.1 sobre la capacidad de endocitosis de *S. aureus* por las CEMB, se realizaron ensayos de endocitosis con los 5 aislamientos de *S. aureus* en presencia de 2.5 mg de proteína total del MC de las CEB-Thi2.1. La TABLA 2 muestra que en presencia del MC de las CEB-Thi2.1, los aislamientos de *S. aureus* y la cepa control mostraron una reducción en su capacidad para penetrar a las CEMB, siendo esta inhibición superior al 75% en relación al MC de las CEB-Thi2.1 AS. El aislamiento de *S. aureus* que mostró la mayor inhibición fue STA15 (>97%) y el que presentó el menor efecto fue el aislamiento STA21 con un valor de inhibición del 73%.

Para determinar que el efecto inhibitorio del MC de las CEB-Thi2.1 sobre la capacidad de invasión de los aislamientos se debía a una acción antibacteriana y no a un efecto citotóxico sobre las CEMB, se determinó la viabilidad de las mismas mediante el ensayo colorimétrico de reducción del MTT. El MC no mostró efecto sobre la viabilidad de las células después de 24 h de exposición de acuerdo con el ensayo realizado (datos no mostrados). Dado lo anterior, la disminución en la endocitosis de los aislamientos de *S. aureus* por las CEMB en presencia del MC CEB-Thi2 presentada en la TABLA 2, puede ser consecuencia de la inhibición de la viabilidad de las bacterias.

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados aquí mostrados abren la posibilidad de utilizar PA de plantas, como la tionina Thi2.1, para el control y tratamiento de enfermedades en animales como lo es la mastitis bovina. Estos datos representan el primer reporte del efecto de una tionina de plantas sobre aislamientos de *S. aureus* obtenidos de casos de mastitis bovina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACyT por el apoyo al proyecto 46400 y al COECyT-UMSNH el apoyo al proyecto CB0702138_1.

REFERENCIAS

- Anaya-López, J. L., J. E. López-Meza, V. M. Baizabal-Aguirre, H. Cano-Camacho y A. Ochoa-Zarzosa (2006b). Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. *Biotech. Lett.* 28:1101-1108.
- Anaya-López, J. L., O. E. Contreras-Guzmán, A. Cárabez-Trejo, V. M. Baizabal-Aguirre, J. E. López-Meza, J. J. Valdez-Alarcón y A. Ochoa-Zarzosa, A. (2006a). Invasive potential of bacterial isolates associated with sub-clinical bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 81: 358-361.

- Brakstad, O. G., K. Aasbakk y J. A. Maeland (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1654-1660.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238-250.
- Cajero-Juárez M., B. Avila, A. Ochoa, E. Garrido-Guerrero, A. Varela-Echavarría, G. Martínez de la Escalera y C. Clapp (2002). Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur. J. Cell Biol.* 81: 1-8.
- Epple, P., K. Apel, K. y H. Bohlmann (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell.* 9: 509-520.
- Hancock, R. E. W. y D. S. Chapple (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1317-1323.
- Hancock, R. E. W. y M. G. Scott (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8856-8861.
- Hensen, S. M., M. J. A. M. P. Pavičić, J. A. C. M. Lohuis y B. Poutrel (2000). Use of a bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Dairy Sci.* 83: 418-429.
- Kerro-Dego, O., J. E. van Dijk y H. Nederbragt (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *A review. Vet. Q.* 24: 181-198.
- Loeza-Ángeles, H., Sagrero-Cisneros, E., Lara-Zárate, L., Villagómez-Gómez, E., López-Meza J. E. y Ochoa-Zarzosa, A. (2008). Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Bio-technol. Lett.* (Aceptado).
- López-Meza, J. E., Higuera-Ramos, J. E., Ochoa-Zarzosa A., Chassin-Noria, O., Valdez-Alarcón, J. J., Bravo-Patiño, A. y Baizabal-Aguirre, V. M. (2006). Caracterización de aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Técnica Pecuaria de México.* 44: 91-106.
- Ochoa-Zarzosa, A., Loeza-Lara, P. D., Torres-Rodríguez, F., Loeza-Ángeles, H., Mascot-Chiquito, N., Sánchez-Baca, S.C. y López-Meza, J. E. (2008a). Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis of dairy extensive systems in México. *Antonie van Leeuwenhoek* (en prensa).
- Ochoa-Zarzosa, A., Loeza-Ángeles, H., Lara-Zárate, L., Sagrero-Cisneros, E., Villagómez-Gómez, E. y López-Meza, J. E. (2008b). Antibacterial activity of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 127: 425-430.
- Risso, A. (2000). Leukocyte antimicrobial peptides: Multifunctional effector molecules of innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 68: 785-792.
- Sagrero-Cisneros, E. (2007). Expresión de la defensiva *Ara Thi2.1* de *Arabidopsis thaliana* en una línea inmortal de células endoteliales bovinas (BVE-E6E7). Tesis de licenciatura, Facultad de Biología, Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 64 pp.
- Satnam, K. K., Bedwell, J., Tyler, P. C., Carter, A. y Corbel, J. M. (1999). Development of a tetrazolium salt assay for rapid determination of viability of BCG vaccines. *Vaccine.* 17: 2423-2428.
- Sitaram, N. y R. Nagaraj (1999). Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462: 29-54.
- Turner, L., G. Nava, Z. Dueñas, A. Corbacho, S. Mejía, F. López, M. Cajero, G. Martínez de la Escalera y C. Clapp (1999). Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *J. Endocrinol.* 161: 423-432.

- Vignutelli, A., C. Wasternack C. K. Apel y H. Bohlmann (1998). Systemic and local induction of an *Arabidopsis thionin* gene by wounding and pathogens. *Plant J.* 14: 285-295.
- Wanasinghe, D. D. (1981). Adherence as a prerequisite for infection of the bovine mammary gland by bacteria. *Acta Vet. Scand.* 22: 109-117.
- Werckenthin, C., M. Cardoso, J. L. Martel y S. Schwarz (2001). Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Res.* 32: 341-362.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature.* 415: 389-395.