



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Coordinación de Estudios de Posgrado
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO CECROPINA A-1 DE *Drosophila melanogaster* EN
CÉLULAS ENDOTELIALES DE BOVINO**

Tesis que presenta

M.V.Z ALEJANDRO HUANTE MENDOZA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción en

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR PECUARIA

TUTOR:

Dr. VÍCTOR MANUEL BAIZABAL AGUIRRE

CO-TUTOR:

DR. ALEJANDRO BRAVO PATIÑO

Morelia, Michoacán, México

Agosto de 2009.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Bravo Patiño por el apoyo y confianza depositada en mi, gracias Dr.

Al Dr. Víctor Baizabal Aguirre por demostrarme en reiteradas ocasiones que la ciencia tiene una perspectiva global. Por su paciencia, gracias.

Al Dr. Marco Cajero Juárez por haber sido parte indispensable en mi formación

Al Dr. Javier Oviedo Boyso por ser el marco de referencia para muchos de nosotros, por demostrar de manera tajante, que las cosas se consiguen en base a constancia. Mil gracias Javier.

A la Dra. María de Lourdes Velázquez Hernández por ser paciente y tolerante.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Leticia Lara Zarate, Iván Cardozo Correa, Heber Ángeles Loeza, Luis Antonio Hernández Bautista, Humberto Contreras Cornejo. Por hacer de esta etapa de mi vida una experiencia de gran calidad humana, a todos ustedes, gracias por su amistad y apoyo incondicional.

A mis casi hermanos, hijos de otra madre; Francisco Ramón García Rodríguez y Ricardo Arroyo Gonzales.

A ti “Diablia” por ser importante en mi vida y compartir grandes momentos que no tendrán comparación.

A todos ustedes gracias por hacer de mi una mejor persona...

RESUMEN

Staphylococcus aureus es el principal agente causal de la mastitis bovina, enfermedad que ocasiona pérdidas económicas considerables en la industria lechera. El tratamiento convencional de la mastitis se basa en la administración de antibióticos de amplio espectro. Debido a que las bacterias desarrollan resistencia a los antibióticos administrados, se ha planteado como alternativa la utilización de péptidos de insecto con actividad antimicrobiana capaces de eliminar a la bacteria que se localiza intracelularmente en células endoteliales y epiteliales de glándula mamaria (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007, 2008). Uno de estos péptidos, producido por *Drosophila melanogaster*, es la Cecropina A-1 (CecA-1), con un peso molecular de 4 kD y estructura secundaria predominante α -helicoidal. Este péptido, con amplio espectro de actividad contra diversos microorganismos (DeLucca *et al.*, 1997; Fallon y Dongxu, 2000), pertenece a una familia de péptidos antimicrobianos que se caracteriza por presentar una región anfipática en N-terminal, mientras que la región C-terminal es rica en residuos hidrofóbicos. Los miembros de esta familia, a excepción de las cecropinas de mosquito, presentan un residuo triptófano en la posición 1 ó 2 (W1-2) del péptido maduro y amidación en la región C-terminal (Lowenberger, 2001). Se ha reportado que la actividad antimicrobiana de CecA-1 de *D. melanogaster* contra bacterias y hongos fue mayor que la actividad de la Cecropina A (CecA) del mosquito *Aedes aegypti* (Lowenberger *et al.*, 1999). Esto sugiere que la presencia de W2 en CecA-1 (Andreu *et al.*, 1983, 1985) y la amidación en C-terminal, contribuyen a la estabilidad y actividad de la molécula (Andreu *et al.*, 1983; Merrifield *et al.*, 1982). De acuerdo con lo anterior, este trabajo pretende establecer la importancia estructural y funcional del residuo W2 de CecA-1 de *D. melanogaster*. Para lograr este objetivo, se generaron cinco mutantes puntuales del péptido, substituyendo W por D, F, G, K ó L. La estrategia experimental consistió en diseñar oligonucleótidos específicos, para extraer el gen de *CecA-1* del plásmido pBCecA-1 y generar al mismo tiempo las secuencias de corte para las enzimas *EcoRI* (en el extremo 5') y *HindIII* (en el extremo 3') del gen. Posteriormente, se realizó la subclonación de este producto de PCR en el plásmido pTrcHisA (pTrcACeca-1), esta construcción fue la plantilla para generar las mutantes W2 mediante mutagénesis dirigida, después de eso, el gen de *CecA-1* y mutantes W2 fueron subclonados en los vectores pcDNA3 (CecA-1, W2D, W2F, W2G, W2K y W2L) y pTracerA (CecA-1 y

W2F). La inserción del gen *CecA-1* y mutantes puntuales se confirmó por secuenciación. Con estas construcciones se transfectaron las células endoteliales de bovino BVE-E6E7. Se obtuvo evidencia de la inserción del gen nativo *CecA-1* y mutación puntual F (W2F) por PCR del ADN de la célula endotelial. Además, la expresión del gen *CecA-1* se detectó por RT-PCR para *CecA-1* y W2F. Por último, los ensayos de inmunodetección con anticuerpos policlonales específicos indicaron que *CecA-1* se secretó al medio. Con estos resultados, se sientan las bases para proceder a la evaluación de la actividad microbicida del péptido *CecA-1* nativo y de las mutantes en W2.

SUMMARY

Staphylococcus aureus is the major causative agent of bovine mastitis, a disease that causes considerable economic losses in the dairy industry. Conventional treatment of mastitis is based on the administration of broad spectrum antibiotics. Because the bacteria develop resistance to antibiotics, it has emerged as an alternative the use of insect peptides with antimicrobial activity that can eliminate the bacteria located intracellularly in endothelial cells and epithelial cells of the mammary gland (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007, 2008). One of these peptides produced by *Drosophila melanogaster* is Cecropin A-1 (CecA-1) with a molecular weight of 4 kD and a secondary structure predominantly composed by α -helical. This peptide with broad spectrum activity against various microorganisms (DeLuca *et al.*, 1997; Fallon y Dongxu, 2000) belongs to a family of antimicrobial peptides that are characterized by an amphipathic region at the N-terminal end, while the C-terminal region is rich in hydrophobic residues. The members of this family, except for mosquito cecropins have a tryptophan residue at position 1 or 2 (W1-2) in the mature peptide and an amidation at the C-terminal region (Lowenberger, 2001). It has been reported that the antimicrobial activity of *CecA-1* of *D. melanogaster* against bacteria and fungi was higher than the activity of the *CecA* of the *Aedes aegypti* mosquito (Lowenberg *et al.*, 1999). This suggests that the presence of W2 in *CecA-1* (Andreu *et al.*, 1983, 1985) and the C-terminal amidation, contribute to the stability and activity of the molecule (Andreu *et al.*, 1983, Merrifield *et al.*, 1982). According to the above mentioned facts, this work attempts to establish the structural and functional importance of the position of W2 residue in the *CecA-1* gene of *D. melanogaster*. To achieve this, five mutants were generated by site-directed mutagenesis, replacing W by D, F, G, K or L. The experimental strategy was to design specific oligonucleotide primers to extract the *CecA-1* gene from plasmid pBCecA-1 while generating restriction site for the enzymes *EcoRI* (in 5') and *HindIII* (in 3') of the gene. The clonation of this PCR product into plasmid pTrcHisA (pTrcACeca-1) was subsequently performed and the presence of the *CecA-1* fragment in the construction was confirmed by sequencing. This construction was the template for generation of the W2 mutants by site-directed mutagenesis, after that the gene *CecA-1* and W2 mutants were subcloned into pcDNA3 vector (*CecA-1*, *W2D*, *W2F*, *W2G*, *W2K* and *W2L*) and pTracerA (*CecA-1* and *W2F*). The insertion of the gene *CecA-1* and W2 mutants was confirmed by

sequencing. With these constructions the bovine endothelial cells (BVE-E6E7) were transfected. We obtained evidence of the insertion of the native gene *CecA-1* and F point mutation (W2F) by PCR from DNA of endothelial cells. Furthermore, the expression of the *CecA-1* gene was detected by RT-PCR for *CecA-1* and W2F. Finally, immunodetection tests with specific polyclonal antibodies showed that *CecA-1* was secreted to the medium. With these results, we set out the stage for the evaluation of the microbicidal activity of the native peptide *CecA-1* and the W2 mutants.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la ubre	1
Figura 2. Mecanismo de acción de los PAMs α -hélice	12
Figura 3. Plásmido pTrcHis2	19
Figura 4. Plásmido pTracerA EF/V5-His	23
Figura 5. Plásmido pcDNA3	24
Figura 6. Plásmido pPur	27
Figura 7. Clonación del gen <i>CecA-1</i>	31
Figura 8. Generación de mutantes del gen <i>CecA-1</i>	32
Figura 9. Productos de digestión enzimática <i>EcoRI-XbaI</i> de pTracerA EF/V5-His y <i>CecA-1</i> y mutantes puntuales en pcDNA3	33
Figura 10. Clonación de <i>CecA-1</i> en pTracerA EF/V5-His	34
Figura 11. Determinación de las condiciones óptimas de transfección en las BVE-E6E7	35
Figura 12. Determinación de la concentración inhibitoria de zeocina	36
Figura 13. Transfección de BVE-E6E7	37
Figura 14. Integridad del ADN genómico extraído de las células endoteliales transfectadas	37
Figura 15. Amplificación del gen de <i>CecA-1</i> y mutante F de transfecciones transitorias	38

Figura 16. Integridad del RNA total extraído de células transfectadas sometidas a selección con Zeocina	39
Figura 17. Amplificación del gen de <i>CecA-1</i> a partir del cDNA correspondiente a el RNA recuperado a las 48hrs post-transfección	39
Figura 18. Titulación del anticuerpo policlonal dirigido contra el péptido <i>CecA-1</i> (SIGMA)	40
Figura 19. Inmunodetección del péptido <i>CecA-1</i>	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de algunos PAMs α -hélice de invertebrados y vertebrados	5
Tabla 2. Características de PAMs tipo láminas β con uno y dos puentes disulfuro de invertebrados y vertebrados	10
Tabla 3. Características de PAMs tipo láminas β con tres y cuatro puentes disulfuro de invertebrados y vertebrados	10
Tabla 4. Oligonucleótidos para generar las mutaciones puntuales en el gen <i>CecA-1</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>	20
Tabla 5. Secuencia de aminoácidos correspondiente a la forma nativa y cinco mutantes generadas por PCR de la <i>CecA-1</i>	33

ÍNDICE

RESUMEN	i
ÍNDICE	ii
SUMMARY	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MASTITIS	1
3. PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	3
3.1 Clasificación de péptidos antimicrobianos	3
3.1.1 Péptidos antimicrobianos con estructura de α -hélice	5
3.1.1.1 Artrópodos	6
3.1.1.2 Procordados	8
3.1.1.3 Peces	8
3.1.1.4 Anfibios	9
3.1.1.5 Mamíferos	9
3.1.2 Características de PAMs que contienen uno o dos puentes disulfuro	10
3.1.3 Características de PAMs que contienen tres o cuatro puentes disulfuro	11
4. MECANISMO DE ACCION	11
5. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS	13

UMSNH	CMEB-FMVZ
6. JUSTIFICACIÓN	13
7. HIPOTESIS	15
8. OBJETIVOS	15
8.1. Objetivo general	15
8.2 Objetivos específicos	15
9. MATERIAL Y MÉTODOS	18
9.1 Amplificación del gen <i>CecA-1</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> y generación de sitios de corte específicos mediante PCR	18
9.2 Características del plásmido pTrcHis2	18
9.3 Subclonación del gen nativo y de las mutantes de <i>CecA-1</i> el plásmido pTrcHis2A	19
9.4 Diseño de oligonucleótidos para generar mutantes puntuales	19
9.5 Transformación de <i>Escherichia coli</i> con las construcciones nativa y mutantes puntuales	21
9.6 Preparación de plásmidos a pequeña escala a partir de cultivos de <i>Escherichia coli</i>	21
9.7 Secuenciación de ADN	22
9.8 Características del plásmido pTracer EF/V5-His para expresión en células animales	22
9.9 Características del plásmido pcDNA3 para expresión en células animales	23
9.10 Subclonación del gen nativo y de las mutantes de <i>CecA-1</i> en pcDNA3 y	

UMSNH	CMEB-FMVZ
pTracerA	24
9.11 Cultivo de células endoteliales de bovino (CEB)	24
9.12 Establecimiento de las condiciones de transfección con fosfato de calcio	24
9.13 Incremento de la eficiencia de transfección	26
9.14 Establecimiento de la línea celular transfectada	26
9.15 Características del plásmido pPur	27
9.16 Extracción del ADN genómico de las BVE- E6E7 transfectadas y sometidas a selección	27
9.17 Extracción de RNA de células endoteliales seleccionadas	28
9.18 Titulación del anticuerpo contra CecA-1	28
9.19 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	29
9.20 Transferencia de péptidos a membrana de nitrocelulosa	30
9.21 Inmunodetección	30
10 RESULTADOS	31
10.1 Amplificación del gen de <i>CecA-1</i> de <i>D. melanogaster</i> y generación de sitios de corte específicos por PCR	31
10.2 Clonación del gen <i>CecA-1</i> nativo en el plásmido pTrcHis2A	31
10.3 Generación de mutaciones puntuales en el gen de <i>CecA-1</i> de <i>D. melanogaster</i>	32
10.4 Clonación del gen <i>CecA-1</i> nativo y mutantes en pTracerA	33
10.5 Determinación de las condiciones de transfección en las células endoteliales	

UMSNH	CMEB-FMVZ
(BVE-E6E7)	34
10.6 Determinación de la concentración inhibitoria de zeocina para seleccionar las BVE-E6E7 a transfectar	35
10.7 Transfección de BVE-E6E7 con pTracer EF/V5-His- <i>CecA-1</i>	36
10.8 Extracción del ADN genómico de las BVE-E6E7 transfectadas	37
10.9 Presencia del gen de <i>CecA-1</i> en el ADN genómico extraído de BVE-E6E7 transfectadas	38
10.10 Extracción de RNA de células endoteliales sometidas a selección con zeocina	38
10.11 Amplificación de <i>CecA-1</i> y mutantes puntuales a partir del cDNA	39
10.12 Titulación del anticuerpo contra <i>CecA-1</i>	39
10.13 Inmunodetección de <i>CecA-1</i>	40
11. DISCUSIÓN	41
12. CONCLUSIONES	48
13. BIBLIORAFÍA	49

1. INTRODUCCIÓN.

La ubre se compone de cuatro glándulas secretoras diferentes denominadas cuartos mamarios. Cada cuarto consiste de tejido secretor-productor de leche, cuya estructura básica es conocida como alveolo, un sistema de conductos para transportar la leche desde el alveolo, dos áreas de almacenamiento denominadas “cisternas” y un pezón (Frandsen, 1995). Un componente importante del pezón es su esfínter (Fig. 1). Cada cuarto es independiente y está separado de los otros por ligamentos gruesos. Los microorganismos no pueden atravesar el tejido que separa los cuartos, pero los antibióticos administrados en un cuarto o por vía sistémica se absorben y se pueden diseminar por toda la ubre (Ruegg, 2001).

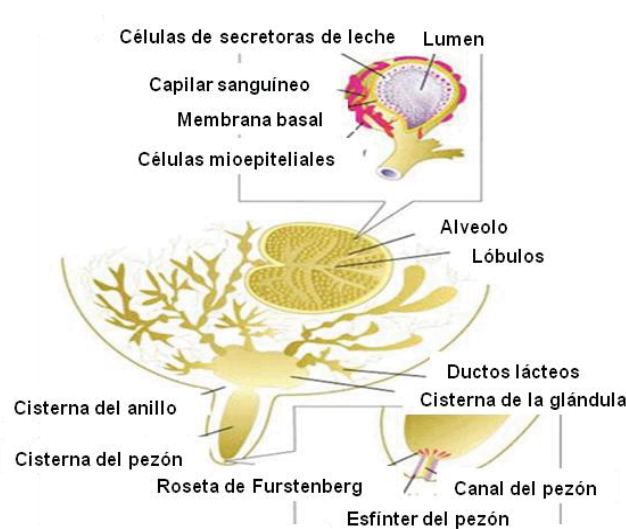


Figura 1. Anatomía de la ubre (tomado de Frandsen, 1995).

La leche producida se almacena como sigue: 60% en los alveolos, 20% en los ductos y 20% en las cisternas. Las células que cubren el alveolo son las que producen la leche. Al llenarse el alveolo, la presión en las células mioepiteliales aumenta. Se estima que para cada mililitro (ml) de leche sintetizada, se requieren ~500 ml de sangre circulando por la ubre, lo cual se logra por el aporte sanguíneo del 8% del volumen total de sangre de la vaca lechera en glándula mamaria. Para extraer la leche, los músculos alrededor del alveolo se deben contraer para mover la leche hacia los ductos y cisternas (Frandsen, 1995). El estímulo mecánico envía señales a la glándula pituitaria en el cerebro para producir oxitocina. La oxitocina secretada se transporta por el torrente sanguíneo hasta la ubre y provoca que las células mioepiteliales

alrededor del alveolo se contraigan y muevan la leche hacia el ducto y sistema de cisterna, donde puede ser extraída mediante el proceso de ordeño. Las estructuras que soportan la ubre son el ligamento suspensorio medio y el ligamento suspensorio lateral (Wattiaux, 2002).

2. MASTITIS.

A la fecha, se considera que las pérdidas económicas en la industria lechera de USA provocadas por la mastitis bovina son de alrededor de 200 dólares por animal/año, lo cual corresponde a un costo aproximado de \$1.7-2.0 mil millones de dólares anuales (Kerr *et al.*, 2001; Smith y Hogan, 1997). Estas pérdidas se deben a que la mastitis del ganado bovino cursa con inflamación de la glándula mamaria, causada por la penetración en la ubre de agentes patógenos bacterianos y/o micóticos a través del canal del pezón (Eberhart, 1990). Entre las principales bacterias causales de la infección se pueden citar: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. zoopidemicus*, *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli* y *Mycoplasma californicum*. Algunos hongos oportunistas como *Actinomyces piogenes*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *Trichosporum cutaneum* y *Cryptococcus neoformans*. (Fraser y Bergeron, 1993; Infante-Martínez *et al.*, 1999). En general, la mastitis causada por microorganismos patógenos se caracteriza por tres etapas que se pueden dividir en invasión del patógeno, infección e inflamación. En la etapa de invasión, los microorganismos se mueven a través del canal de la teta. En la etapa de infección, la bacteria se establece en el interior de la cisterna de la glándula, donde se multiplica y se disemina a toda la glándula mamaria, dependiendo de la susceptibilidad del animal. La infección puede cursar de forma clínica (aguda o sobreaguda), crónica (recurrente) o subclínica (latente), dependiendo de los diversos factores (Fraser y Bergeron, 1993). En la etapa final, el proceso inflamatorio produce un incremento considerable en el conteo de células somáticas (principalmente neutrófilos) y los signos clínicos comienzan a ser aparentes (Crist *et al.*, 1997).

Se ha observado que el ganado bovino afectado por mastitis clínica se caracteriza por una inflamación intensa de la ubre, leche con coágulos gruesos, fibrosis extensa, disminución de la función de secreción y edema subcutáneo. El agente causal frecuentemente asociado a esta patología es *Staphylococcus aureus* (Tollersrud *et al.*, 2000). Esta bacteria es difícil de controlar y puede rápidamente invadir todos los tipos celulares de la glándula mamaria. Este

tipo de mastitis tiende a presentarse de forma subclínica a crónica, y tiene una baja respuesta a la terapia con antibióticos convencionales debido a la localización intracelular de la bacteria en células epiteliales de glándula mamaria (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

En respuesta a la infección, la inmunidad innata predomina en la etapa inicial y está mediada por macrófagos, neutrófilos, células asesinas y citocinas. Estas reconocen y responden a los diferentes patógenos aún si estos invaden por primera vez la glándula mamaria. En particular, las bacterias tienen diferentes estructuras en la pared celular (lipopolisacáridos, peptidoglicanos y ácido lipoteicoico) que son reconocidas por receptores de membrana tipo Toll (TLRs) presentes en la células. La interacción entre las estructuras bacterianas y los TLRs induce la producción de citocinas y otros mediadores endógenos que son esenciales en la protección contra microorganismos patógenos (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Si la bacteria invasora sobrevive a los mecanismos de respuesta inmune innata, la infiltración de neutrófilos activa después de un tiempo los monocitos y los linfocitos T y B; sin embargo, los neutrófilos continúan siendo el tipo celular más importante encontrado en la mastitis crónica. La función de los linfocitos B es producir anticuerpos contra los patógenos invasores, y los linfocitos T tiene la capacidad de destruir las células epiteliales dañadas (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

La baja efectividad tanto de la respuesta inmune de la glándula mamaria para eliminar *S. aureus* como de los antibióticos administrados al animal para eliminar a la bacteria se debe a que este patógeno tiene la capacidad de internalizarse en la célula animal. Esto ha motivado la búsqueda de estrategias nuevas y más efectivas para prevenir y controlar este padecimiento. Una alternativa se fundamenta en la aplicación de la tecnología del ADN recombinante con el fin de generar animales transgénicos que expresen, de forma tejido-específica en glándula mamaria, péptidos con actividad antimicrobiana. Estudios previos han demostrado que una variedad de péptidos con actividad antimicrobiana confieren protección a los insectos frente a una diversidad de agentes patógenos como bacterias, hongos (DeLucca *et al.*, 1997), protozoarios y gusanos helmintos (Fallon y Dongxu, 2000).

3. PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Por más de medio siglo se han empleado los antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias y otros microorganismos patógenos. Sin embargo, el

surgimiento de la resistencia bacteriana a los antibióticos en clínica humana y veterinaria ha reducido su efectividad (Teuber, 2001; Heuer *et al.*, 2006). Esto claramente remarca la necesidad de nuevos agentes antibacterianos con mecanismos de acción diferentes a los antibióticos actuales (Parisien *et al.*, 2007). Entre estos agentes antimicrobianos modernos, los péptidos con actividad microbicida se cuentan entre los candidatos más prometedores.

Para defenderse del ambiente hostil, los seres vivos producen sustancias con actividad antimicrobiana como parte de un potente mecanismo de la inmunidad innata. Estas sustancias antimicrobianas, principalmente péptidos o polipéptidos, frecuentemente contienen menos de 150-200 aminoácidos, y están constitutivamente presentes en células secretorias o son inducidos en el momento de la infección (Hancock, 2000). La mayoría de péptidos antimicrobianos (PAMs) son catiónicos, es decir, tienen carga neta positiva a pH fisiológico debido a la presencia de un alto contenido de arginina y lisina. Este carácter catiónico es reforzado por la amidación en C-terminal y frecuentemente adoptan una estructura anfipática con un lado hidrofóbico en oposición a un lado hidrofílico, Ver tabla 1, (Oren *et al.*, 1998).

Su amplia distribución a través del reino animal y vegetal sugiere que los PAMs han tenido un papel fundamental en el éxito evolutivo de organismos multicelulares complejos. A pesar de su linaje antiguo, los PAMs han permanecido como armas efectivas, limitando la creencia general de que las bacterias, virus y hongos pueden desarrollar resistencia a cualquier sustancia (Zasloff, 2002).

Los PAMs aseguran la protección local o sistémica del organismo frente a patógenos ambientales, debido a que son producidos por diferentes tipos celulares. Estos péptidos son excepcionalmente diversos en secuencia, estructura y función, aun entre especies muy relacionadas (Bowman, 2003; Yeaman, 2003).

3.1 Clasificación de péptidos antimicrobianos

La diversidad de PAMs descubiertos es tan grande que es difícil categorizarlos. Una forma de clasificarlos es con base en su estructura secundaria. Los PAMs están clasificados en tres grupos principales: 1) péptidos que presentan una conformación α -hélice (cecropinas de insecto, magaininas, etc), 2) péptidos con presencia de puentes disulfuro (defensinas,

protegrinas, etc), y 3) péptidos con la presencia mayoritaria de algún aminoácido (ricos en prolina o en histidina). La mayoría de los PAMs muestran propiedades hidrofóbicas y catiónicas, tienen una masa molecular inferior a 25-30 kDa, y adoptan una estructura anfipática (α -hélice, lámina β o una mezcla de ambas) que aparentemente es esencial para su acción antimicrobiana (Zasloff, 2002).

3.1.1 Péptidos antimicrobianos con estructura de α -hélice.

Esta familia incluye moléculas encontradas en una gran variedad de organismos que son evolutivamente distantes, por ejemplo invertebrados (insectos y tunicados) y vertebrados (humanos). En insectos, estos son producidos por diversos tejidos: 1) tejido adiposo (un equivalente funcional del hígado de mamíferos) antes de ser secretados en su fluido corporal (hemolinfa), 2) por células rojas ó 3) por ciertos epitelios.

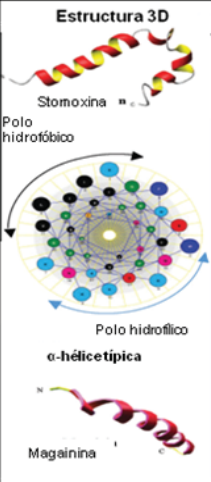
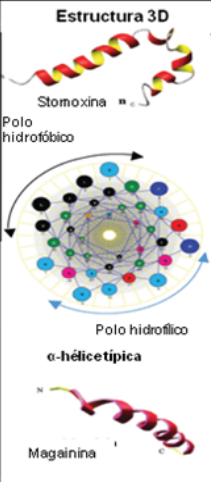
	Origen	Organismo	Nombre	Actividad	Estructura primaria	Estructura 3D	
Invertebrados	Artrópodos	<i>Hyalophora cecropia</i>	Cecropina A	B	KWKLFKKIEVGNIRDGIKAGPAVAVVGOATQIAK*		
		<i>Anopheles gambiae</i>	Cecropina A	B,F,Y	GRLLKLGKKIEGAGKRVFKAEEKALPVVAGVKAL*		
Vertebrados	Peces	<i>Drosophila melanogaster</i>	Cecropina A1	B,F,Y			
		<i>Stomoxys calcitrans</i>	Stomoxina	B,F,Y,T	RGFRKHFNKLVKKVHTISETAHVAKDTAVIAGSGAAVV		
		<i>Pseudacanthotermes spiniger</i>	Spinigerina	B,F,Y	HVDKKVADKVVLLKQLRIMRLTRL		
	Procordados	<i>Cupiennius salei</i>	Cupienina I	B,H,I	GFGALFKFLAKKVAKTVAKQAAKOGAKYVVKOME*		
		<i>Styela clava</i>	Clavanina	B	VFQFLGKIIHVGNFVHGFSHFV*		
	Anfibios	Peces	<i>Pardachirus pavoninus</i>	Pardaxina P-1	B		GFFALIPKIISSPLFKLLSAVGSALSSSGQE
			<i>Pleuronectes americanus</i>	Pleurocidina	B		GWGSFFKAAHVGGKHVGAALHLYL
			<i>Morone chrysops</i>	Moronecidina	B,F,Y		FFHHIFRGMVHVGKTIHKLVGTG
		Anfibios	<i>Xenopus laevis</i>	Magainina 1	B,F		GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
			<i>Rana temporaria</i>	Temporina A	B,F,H		FLPLIGRVLSGIL
Mamíferos		<i>Homo sapiens</i>	Catelicidina LL-37	B,L	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVORIKDFLRNLPRTES		
		<i>Bostaurus</i>	Indolicina	B	ILPWKWPWWPWRR*		

Tabla 1. Características generales de algunos PAMs α -hélice de invertebrados y vertebrados. La actividad que tiene cada molécula son marcadas como: B, antibacterial; C, citotóxico; F, antifúngico; H, hemolítico; I, insecticida; L, tipo lectina; y Y, efecto lítico en levaduras. *, amidación en C-terminal; N, N-terminal; y C, C-terminal. Las imágenes representan las estructuras tridimensionales de stomotoxina de la mosca *Stomoxys calcitrans* y de la maiganina de la rana *Xenopus laevis*. La proyección Schiffer Edmundson (al centro) puntualiza la característica anfipática de la cecropina de *Hyalophora cecropia* (modificado Bulet *et al.*, 2004)

En vertebrados, están localizados en las secreciones de la piel de anfibios, en la mucosa gástrica y en el epitelio intestinal (Simmaco *et al.*, 1998; Zasloff, *et al.*, 2002), así como en

vacuolas fagocíticas de mamíferos, heridas y epitelio (Ganz, 2002). Presentan un amplio espectro antibacterial, que incluye bacterias Gram negativas (G-) y Gram positivas (G+), hongos y protozoarios.

Algunos PAMs α -hélicoidales tienen una tendencia altamente hemolítica, mientras que otros son insecticidas potentes (Maloy *et al.*, 1995). Estos péptidos frecuentemente son menores de 30-40 residuos de longitud, ricos en residuos de lisina y arginina y con un C-terminal amidado. La vasta diversidad en espectro de actividad observado, así como su amplia distribución en tejidos resulta en una marcada variabilidad en su estructura primaria, algunos de los PAMs α -hélice se describen a continuación.

3.1.1.1 Artrópodos

El primer péptido α -hélice aislado de la hemolinfa de pupas estimuladas con bacterias de la mariposa de la seda *Hyalophora cecropia* fue la cecropina por Hans Boman y colaboradores en 1981 (Steiner *et al.*, 1981). Desde entonces, más de 60 cecropinas y moléculas tipo cecropina han sido aisladas principalmente de la hemolinfa de Lepidopteros (*Hyalophora*, *Manduca*, *Bombyx*, *Hyphantria*, *Heliothis*, etc) y Dípteros (*Drosophila*, *Aedes*, *Anopheles*, etc) desafiados con bacterias (Bulet, *et al.*, 2005). El PAM α -hélice más pequeño corresponde a cecatotoxinas, que son péptidos aislados de glándulas reproductivas accesorias de hembras de mosca *Cerratitis capitata*. El más largo es stomoxina, un péptido de 42 residuos aislado del intestino medio de la mosca *Stomoxys calcitrans* (Boulanger, 2002). Con pocas excepciones, las cecropinas de insectos dípteros y lepidópteros tienen dos principales características: 1) la presencia de triptófano en la posición 1 ó 2 y 2) un residuo amidado en C-terminal. La ausencia de triptófano observado en pocas cecropinas (cecropina D de *Bombyx mori* y algunas de mosquito) parecen favorecer la actividad hacia bacterias G+ y levaduras (Bulet, 2005; Bulet *et al.*, 1999), mientras que la amidación en C-terminal contribuye al incremento de estabilidad y carácter catiónico del péptido, resultando en una mejor eficiencia.

Las cecropinas son péptidos de 35-39 aminoácidos, con un peso molecular promedio de 4 kDa y su estructura secundaria predominante es α -helicoidal. En el extremo amino presentan una región anfipática, mientras que el extremo carboxilo es rico en residuos hidrofóbicos. Una característica de las cecropinas de insecto es la presencia de un residuo triptófano (W) en la

posición 1 ó 2 del péptido maduro y la amidación en C-terminal, como ocurre en la CecA-1 de *D. melanogaster* (Lowenberger, 2001). Las cecropinas de mosquito no tienen W en esta posición, y solamente algunas presentan amidación en C-terminal. Al comparar el espectro de actividad antimicrobiana de la CecA del mosquito *Aedes aegypti*, que es una cecropina no amidada y la CecA-1 de *D. melanogaster*, se observó que esta última presentó una mayor actividad contra una variedad de bacterias y hongos (Lowenberger *et al.*, 1999). El motivo de la diferencia en la actividad de estas cecropinas no es conocido, pero se ha observado que la sustitución del W por un residuo aromático en un análogo sintético de CecA-1 de *D. melanogaster* produjo una fuerte disminución de su actividad (Andreu *et al.*, 1983, 1985).

Por otro lado, las cecropinas amidadas, aisladas de *Sarcophaga peregrina* tuvieron 3-4 veces más actividad contra bacterias que las moléculas no amidadas. Datos similares reportados para *Hyalophora cecropia* mostraron disminución en la actividad en cecropinas no amidadas (Andreu *et al.*, 1983; Merrifield *et al.*, 1982) lo que sugiere que dichos factores pueden contribuir a la estabilidad y actividad de la molécula. Así mismo, la estructura y composición de la α -hélice pueden ser importantes, debido a que la sustitución de aminoácidos que alteran dicha estructura causan una reducción en la actividad del péptido (Gazit *et al.*, 1995). Se ha reportado la construcción de quimeras a partir de diferentes genes de péptidos antimicrobianos, como es el caso de CM15, un péptido antimicrobiano sintético compuesto de los primeros 7 residuos de la CecA y los residuos 2-9 del péptido antimicrobiano melitina. Esta quimera tiene una conformación α -hélice y la capacidad de interactuar con la membrana plasmática de bacterias generando poros de 2.2-3.8 nm (Pistolessi *et al.*, 2007).

En el veneno de artrópodos, la melitina es el principal componente del veneno de la abeja y la cabrolina del avispa *Vespa cabrio* (Krishnakumari *et al.*, 1997). Además, un grupo de 15 moléculas (ponericinas), clasificadas por su estructura en tres subfamilias distintas fueron aisladas del veneno de hormigas *Pachycondylas goeldii* (Orivel *et al.*, 2001). La mayoría de las ponericinas tienen un 60% de similitud en la secuencia con las cecropinas, presentan el triptófano característico en la posición 2, pero carecen de amidación en C-terminal. En las arañas, una familia de péptidos anfipáticos α -hélice llamados oxiopepinas (grupo 1 y 2) han sido recientemente aislados del veneno de la araña *Oxyopes kitabensis*. Además, un nuevo péptido α -hélice de araña llamado cupienina fue aislado de glándulas productoras de veneno

de la araña *Cupiennius salei* (Kuhn-Nentwing *et al.*, 2002). Cupienina pertenece a una nueva familia de PAMs altamente básicos. Está formado por 35 aminoácidos con una región N-terminal hidrofóbica, una región C-terminal compuesta de residuos polares y un ácido glutámico amidado. Poseen una elevada actividad antimicrobiana, hemolítica e insecticida.

Otros péptidos que adoptan una conformación α -hélice sin una similitud estructural significativa con las cecropinas que han sido aisladas: 1) Las stomoxinas de la mosca de establo *S. calcitrans* son constitutivamente expresadas y secretadas en el intestino medio y es tóxico para bacterias, hongos y presenta actividad tripanolítica; 2) la spinigerina de la termita *Pseudacanthotermes spiniger* está constitutivamente presente en los hemocitos y exhibe una amplia actividad contra bacterias G⁺ y G⁻ (Lamberty *et al.*, 2001)

3.1.1.2 Procordados

En invertebrados, los PAMs que forman α -hélice no están exclusivamente presentes en artrópodos, sino que han sido también encontrados en procordados. Por ejemplo, las stielinas (péptidos de 31-32 residuos, ricos en fenilalanina) y clavaninas (péptidos de 23 residuos, rico en histidinas) de la ascidia *Styela clava*, aislados de tejido faríngeo y hemocitos respectivamente, presentan amidación en C-terminal (Zhao *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997). A diferencia de la mayoría de PAMs α -hélice estos dos tipos de péptidos mantienen su actividad en presencia de altas concentraciones de sal (Lee *et al.*, 1997).

3.1.1.3 Peces

Varios PAMs con α -hélice han sido aislados de diferentes especies de peces. Las pardaxinas, aislados de la superficie mucosa de piel en glándulas mucosas de la línea dorsal y en la aleta anal del lenguado de Moisés del mar rojo *Pardachirus marmoratus* (Oren *et al.*, 1996), está constituido por dos hélices unidas por una bisagra de prolina, son efectivos contra bacterias G⁺ y G⁻ a concentraciones micromolares y tienen una actividad hemolítica limitada. Misgurina es un péptido de 21 aminoácidos, catiónico sin amidación en C-terminal, que contiene 5 argininas y 4 residuos de lisina, y que no presenta similitud en su estructura primaria ningún otro PAM. Su organización favorece una conformación α -hélice anfipática,

presenta una fuerte actividad antimicrobiana sobre bacterias G⁺ y G⁻, hongos y levaduras. No tiene actividad hemolítica significativa en células sanguíneas de oveja (Park *et al.*, 1997).

Parasina, es un PAM de 19 residuos derivado del procesamiento N-terminal sobre la histona H2A del pez gato. Este péptido ha sido aislado de la superficie mucosa de la piel. Parasina tiende a formar únicamente el 10% de su estructura en α -hélice. Este péptido presenta de 12-100 veces más potencia antimicrobiana que magainina 2 contra una amplia variedad de microorganismos sin evidencia alguna de actividad hemolítica (Park *et al.*, 1998).

3.1.1.4 Anfibios

Un número importante de PAMs con α -hélice han sido aislados de la piel y de la mucosa del estómago de algunas variedades de ranas y sapos (Simmaco *et al.*, 1998; Zasloff *et al.*, 2002). Magaininas, los primeros péptidos aislados de secreciones de la piel de *Xenopus leavi*, son indudablemente el prototipo de péptidos antimicrobianos α -hélice (Zasloff, 1987). Desde entonces, una amplia variedad de péptidos ha sido descubierta, con diferencias importantes en sus secuencias. Comparado con los PAMs de artrópodos, que adoptan una estructura secundaria α -hélice doble, la mayoría de péptidos lineales adoptan una sola α -hélice. Son universalmente sintetizados y almacenados en glándulas granulares neuroendócrinas en la piel, de donde son liberados de una manera holócrina posterior a un estímulo de estrés o lesión. Además, algunos son producidos en la mucosa gástrica. Por ejemplo, la rana asiática *Bufo bufo* produce fragmentos de la histona H2A llamados buforina I y buforina II, que tienen propiedades antibacterianas y se acumulan en el moco que cubre la superficie estomacal (Kim *et al.*, 2000).

3.1.1.5 Mamíferos

Los PAMs más abundantes en mamíferos son indudablemente las α y β -defensinas; sin embargo, los mamíferos son capaces también de producir varios péptidos α -hélice. La familia de las catelicidinas (Huttner, 1999; Gennaro *et al.*, 2000; Bulet *et al.*, 2005) posee una región N-terminal conservada de aproximadamente 100 aminoácidos denominada dominio catelina. Se le ha llamado dominio catelina por su similitud en secuencia con la proteína catelina porcina, un inhibidor de proteasas. La mayoría de las catelicidinas son almacenadas en

gránulos de neutrófilos como pre-propéptidos inactivos. En estos casos el dominio C-terminal activo es liberado después de una maduración extracelular mediada por elastasa (Panyutich *et al.*, 1997). Mientras los neutrófilos de cerdos, ovejas, caballos, vacas, conejos y cabras contienen un gran número de catelicidinas (10 o más), en humanos y en ratón solo se han identificado uno y dos genes, respectivamente. La catelicidina humana LL-37 se encuentra en gránulos secretorios de neutrófilos, y además es expresada en queratinocitos de la piel durante desórdenes inflamatorios (Frohm *et al.*, 1997). CRAMP y CAT 18 son los equivalentes de murino y conejo de la catelicidina de humano y ambas tienen un único dominio α -hélice como las magaininas. Entre las catelicidinas que forman estructuras α -hélice, el péptido de oveja SMAP-39 es uno de los más potentes contra bacterias G⁺ y G⁻, incluyendo aislados clínicos multirresistentes a antibióticos convencionales y a varios hongos. Sin embargo, tiene efecto lítico en eritrocitos de oveja (Morassutti *et al.*, 2005).

3.1.2 Características de PAMs que contienen uno o dos puentes disulfuro.

Un gran número de péptidos antimicrobianos contienen pares de residuos de cisteína que son oxidados para formar puentes disulfuro internos (Tabla 2 y 3) que frecuentemente adquieren una conformación lamina β en solución.



	Origen	Organismo	Nombre	Actividad	Estructura primaria	Estructura 3D
Invertebrados	Artrópodos	<i>Podisus maculiventris</i>	Tanitina	B,F,Y	GSKKPVPPIIYCNRRRTGKCQRM	 Tanitina
		<i>Tachypleus tridentatus</i>	Taquipliesina-I	B,Y,V,H	KWCFRVDCYRGICYRRCR*	
		<i>Limulus polyphemus</i>	Polifemusina	B,Y	RRWCFRVDCYRGFCYRKCR	
		<i>Androctonus australis</i>	Androctonina	B,F	RSVCRQIKICRRRGGGYKCTNRPY	
Vertebrados	Peces	<i>Morone chrysopsxsaxalitis</i>	Hepcidina	B	GCRFCNCNCCPNMSGGVCCRF	 Protegrina
	Anfibios	<i>Rana esculenta</i>	Esculentina-1	B,Y,H	GIFSKLGRKKIKNLLISGLKNVGKEVGM	
		<i>Rana tigerina</i>	Tigerina-1	B,Y	FCTMIPIPRCY*	
	Mamíferos	<i>Bos taurus</i>	Bactenecina	B	RLCRIVVIRVCR	
		<i>Sus scrofa</i>	Protegrina	B,F,Y,V	RGGRLCYCRRRFCVCVGR*	

Tabla 2. Características de PAMs tipo láminas β , con uno y dos puentes disulfuro de invertebrados y vertebrados. Los puentes disulfuro están representados por líneas sobre la estructura primaria. Las actividades son: B, antibacterial; F, antifungal; H, hemolítico; y Y, efecto lítico en levaduras. *, amidación en C-terminal. Las figuras representan a la Tanina del insecto *Podisus maculiventris* y protegrina-1 de leucocitos de porcino incluyendo los puentes disulfuro (modificado Bulet *et al.*, 2004).

Dependiendo del número de residuos de cisteína (comúnmente 2 y 8) y de su apareamiento, estos pueden adoptar una conformación de laminas β , estructura tipo horquilla β o una mezcla de α -hélice y conformación lámina β , como la observada en defensinas de invertebrados y plantas (García-Olmedo, *et al* 1998; Dimarcq *et al.*, 1998; Mandard *et al.*, 2002).

Recientemente se ha acuñado el término cíclico, introducido por el descubrimiento de un péptido antimicrobiano en el mono rhesus que contiene cisteínas que adquieren una conformación perfectamente cíclica, llamada minidefensina o θ -defensina (Tang, *et al* 1999).

3.1.3 Características de PAMs que contienen tres o cuatro puentes disulfuro.

	Origen	Organismo	Nombre	Estructura primaria	Estructura 3D
Invertebrados	Atrópodos	Tres puentes disulfuro			
		<i>Phormina terranova</i>	Defensina A	ATCDLLSGTGINHSACAAHCLLRGNRGGYCNGKGVCCRN	
		<i>Stomoxys calcitrans</i>	Defensina Smd1	AAKPMGITCDLLSLWKVGHAAACAAHCLVLDVGGYCTKEGLCVCKE	
	<i>Heliiothis virescens</i>	Heliomicina	DKLIGSCVWGAVNYSDCNGECKRRRKYGGHCGSFANVNCWCET		
		Cuatro puentes disulfuro			
	Moluscos	<i>Drosophila melanogaster</i>	Drosomicina	DCLSGRYKGFCAVWDNETCRRVCKEEGRSSGHCSPLKCVCEGC	
		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MGD-1	GFGCPNNYQCHRHCKSIPGRCCGGYCGWHRLRCTCYRCG	
Vertebrados	Aves	<i>Aptenodytes patagonicus</i>	pBD-2	SFGLCRLRRGFCARGRCRFFSIPIGRCSRFRVQCCRRVW	
	Mamíferos	Defensinas cíclicas			
		<i>Macaca mulatta</i>	Defensina- θ RTD-1	GFCRCLCRRGVCRICTR	

Tabla 3. Características de PAMs con tres y cuatro puentes disulfuro de invertebrados y vertebrados. Los puentes disulfuro están representados por líneas sobre la estructura primaria. *, amidación en C-terminal. Las figuras representan la defensina-A de *Phormia*, heliomicina de *Heliiothis*, y defensina-1 de *Mytilus* (MGD-1) incluyendo puentes disulfuro (modificado Bulet *et al.*, 2004).

4. MECANISMO DE ACCION

Los PAMs detectan una diferencia fundamental en el diseño de membranas de microorganismos y organismos multicelulares. Las membranas bacterianas están organizadas de tal manera que la capa externa de la bicapa posee lípidos cargados negativamente, a diferencia de la membrana externa de plantas y animales que están compuestas principalmente de lípidos sin carga neta. La mayoría de los lípidos con carga negativa de las membranas de células eucariotas están segregados en la monocapa interna en contacto con el citoplasma (Matsuzaki, 2001).

Un mecanismo que describe la actividad de la mayoría de los PAMs es el modelo propuesto por Shai-Matsuzaki-Huang (Matsuzaki, 2001; Shai, 1999; Ludtke *et al.*, 1996). En este modelo se propone la interacción del péptido con la membrana, seguido por el desplazamiento de lípidos y la alteración de la estructura de la membrana, lo que genera poros que causan la pérdida del contenido celular (Yang *et al.*, 2000).

En ciertos casos la entrada del péptido en el citoplasma de la célula blanco activa procesos como la inducción de hidrolasas que degradan la pared celular (Bierbaum *et al.*, 1985) o la alteración de la distribución usual de lípidos de la bicapa (Matsuzaki, 2001). Se piensa que el incremento de la fuerza iónica reduce la actividad de la mayoría de PAMs, debido al debilitamiento de las interacciones electrostáticas requeridas para la interacción inicial.

Sin embargo, en contacto con membranas cargadas negativamente, la presencia de varios aminoácidos cargados positivamente en la estructura primaria favorece la formación de una estructura anfipática, mientras el contacto e inserción en la membrana permite a las moléculas adoptar una estructura secundaria α -hélice (Shai, 1999).

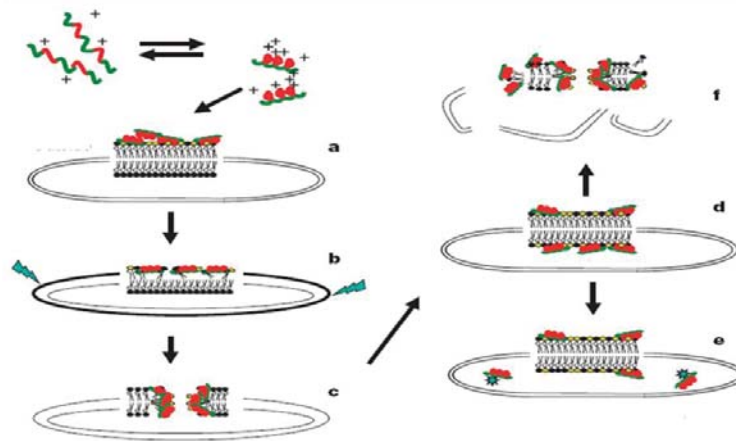


Figura 2. Mecanismo de acción de los PAMs α -hélice. El modelo Shai-Matsuzaki-Huang propone las siguientes etapas: **a.** Recubrimiento de la capa externa con péptidos; **b.** Integración del péptido dentro de la membrana y reducción de la capa fosfolipídica externa. El área de la superficie de la capa externa se expande relativamente con respecto a la capa interna, produciendo un estrangulamiento de la bicapa (flechas dentadas); **c.** Transición de fase y formación de poros transitorios; **d.** Transporte de lípidos y péptidos a la capa fosfolipídica interna; **e.** Difusión de péptidos sobre blancos intracelulares (en algunos casos) y **f.** Colapso de la membrana en fragmentos y destrucción física de la membrana de la célula blanco (Tomado de Zasloff, 2002).

Muchas hipótesis alternativas han sido propuestas para describir la forma en que los péptidos realizan su actividad. Entre las hipótesis más aceptadas están la despolarización de la membrana bacteriana (Westerhoff *et al.*, 1989), la generación de poros que causan la salida del contenido celular (Bierbaum, 1985), la activación de hidrolasas que degradan la pared celular (Bierbaum, 1985), el daño de componentes celulares posterior a la internalización del péptido (Kragol *et al.*, 2001)

Para estudiar la estructura, el mecanismo de acción y el espectro de actividad antimicrobiana de este tipo de péptidos se ha aplicado la tecnología del ADN recombinante, tanto en sistemas procariotas como eucariotas. Muchas proteínas heterólogas son bien toleradas en este tipo de organismos y pueden expresarse en altos niveles.

Contar con un sistema de expresión es de gran importancia ya que permite obtener de manera ilimitada el péptido de interés para posteriores evaluaciones sobre los agentes causales de mastitis.

5. Sistemas de expresión de péptidos antimicrobianos.

Se ha reportado la expresión de diferentes péptidos o proteínas como las puroindolinas, que son PAMs presentes en la semilla de trigo. Para determinar su actividad se generó un sistema de expresión heterólogo de puroindolina A y B en la cepa Origami de *Escherichia coli*. Las puroindolinas recombinantes mostraron actividad contra *Staphylococcus epidermidis* a concentraciones de 125 µg/ml para puroindolina recombinante A y 42 µg/ml para puroindolina recombinante B (Capparelli *et al.*, 2007).

Para evaluar la homología funcional entre las defensinas de diferentes reinos eucarióticos (humano y plantas), se construyó un vector de transformación de plantas conteniendo la secuencia codificante de beta-defensina-2 humana (hBD-2) con el que se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana*, determinándose la actividad antifúngica *in vitro* contra *Botrytis cinerea* (Aerts *et al.*, 2006).

Se generaron vacas transgénicas que secretan lisostafina a concentraciones de 0.9-14 mg/ml en leche. Ensayos *in vitro* demostraron la capacidad de la lisostafina para matar *Staphylococcus aureus*, infusiones intramamarias de *S. aureus* se administraron a tres vacas transgénicas y

diez no transgénicas. El incremento en células somáticas, elevada temperatura corporal característico en la infección fueron observados en las vacas no transgénicas pero en ninguno de los animales transgénicos. Concentraciones de tan solo 3 mg/ml en leche brindan protección contra mastitis producida por *S. aureus* (Wall *et al.*, 2005).

Una técnica de transferencia de genes a través de plásmidos fue usada para posibilitar a las células sintetizar y secretar lactoferrina de bovino (LfcinB) y péptido antimicrobiano traqueal bovino (bTAP), para esto una serie de vectores de expresión tejido específico mamario, conteniendo el gen de péptido antibacteriano (LfcinB o bTAP), la secuencia de regulación de β -caseína de cabra y la secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino en 5', se construyeron usando el vector pIRES1-neo. El vector de expresión tejido-específico conteniendo los genes de LfcinB o bTAP fueron diluidos e inyectados directamente en glándula mamaria de cabras, los niveles de expresión se mantuvieron de 3-6 días mostrando actividad bacteriostática contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Zhang *et al.*, 2007).

Se ha reportado la expresión de cecropina A2 de manera estable en línea celular V79 de pulmón de hámster chino bajo el control del promotor del virus de sarcoma de Rous, no solo se determinó la expresión de a nivel de RNA por análisis Northern blot, además se detectó el péptido sin procesamiento usando un antisuero contra la cecropina de *Hyalophora* (Pore *et al.*, 2000).

Se ha expresado el cDNA de tioniina de *Arabidopsis thaliana* en la línea celular de endotelio bovino BVE-E6E7, su expresión se confirmó por RT-PCR, y fue evaluado el medio condicionado de 8 clonas transfectadas establemente contra *S. aureus*, mostrando una inhibición mayor al 40% (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2007)

6. JUSTIFICACIÓN.

En los casos de mastitis clínica, la administración indiscriminada de antibióticos a largo plazo causa resistencia de los microorganismos al fármaco. Además, los individuos que ingieren leche o sus derivados provenientes de vacas infectadas pueden presentar alergias causadas por los antibióticos o sus productos eliminados en la leche. Otro inconveniente de la aplicación de fármacos es el alto costo que representa al productor. Estas consideraciones llevan a plantear nuevas estrategias biotecnológicas que involucran la tecnología del ADN recombinante para la prevención de la mastitis.

El endotelio vascular y linfático puede ser infectado por diferentes agentes patógenos como virus y bacterias, los cuales provocan que las células endoteliales desarrollen respuestas de defensa similares a las estudiadas en macrófagos (Valbuena y Walker, 2006). Además, desempeñan un papel preponderante en las reacciones inflamatorias como la mastitis de la glándula mamaria, expresando moléculas de adhesión en respuesta a las citocinas pro-inflamatorias (i.e. TNF- α) y facilitando con ello el reclutamiento de neutrófilos del torrente sanguíneo al sitio de la infección para eliminar la bacteria invasora. Por lo tanto, es importante tratar de expresar péptidos con actividad antimicrobiana en este tejido y también analizar los cambios en la respuesta inmune que estas células pudieran establecer para coadyuvar en la eliminación de agentes patógenos.

En la actualidad se conocen genes de insectos que codifican péptidos que les confieren protección contra un amplio espectro de microorganismos patógenos. En este contexto, se ha logrado identificar y caracterizar una batería de péptidos catiónicos potentes, de bajo peso molecular, entre los que se encuentran las cecropinas provenientes de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (Lowenberger, 2001).

El mecanismo de acción de las cecropinas involucra su integración a la membrana celular bacteriana, con lo cual causa lisis y muerte debido a la pérdida de iones causada por un aumento en la permeabilidad de la membrana (Oren y Shai, 1998). En general, los péptidos tienen en común la hidrofobicidad y las cargas positivas que les permiten presentar un mecanismo de acción similar, el cual se puede producir en dos etapas: en la primera, el péptido

se une a la bicapa lipídica mediante una interacción electrostática y en la segunda se produce la formación de un poro sobre la membrana (Shai, 1999; Matsuzaki, 2001).

A nivel estructural el amino ácido W presenta una fuerte habilidad para insertarse y ubicarse en la interface de la bicapa lipídica (Fimland *et al.*, 2002; Killian *et al.*, 2000; Schibli *et al.*, 2002). Por lo tanto para evaluar si la actividad ó potencia antimicrobiana de *CecA-1* y se expresaron en células endoteliales de bovino para determinar la importancia esta posición en la actividad antimicrobiana.

7. HIPÓTESIS.

Las células endoteliales de bovino expresan el gen nativo y los genes mutados de la *CecA-1* de *Drosophila melanogaster*.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo general.

Expresar el gen nativo y los genes con las mutaciones puntuales en W2 de la *CecA-1* de *Drosophila melanogaster* en células endoteliales de bovino.

8.2. Objetivos específicos.

- Generar 5 mutantes puntuales (W2D, W2F, W2G, W2K, W2L) y los sitios de corte *EcoRI* y *Hind III*.
- Generar un sistema de expresión del gen nativo de *CecA-1* y las mutaciones puntuales en células endoteliales de bovino.
- Detectar la expresión del gen *CecA-1* nativo y las mutantes puntuales en células endoteliales de bovino.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 Amplificación del gen *CecA-1* de *Drosophila melanogaster* y generación de sitios de corte específicos mediante PCR.

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos (5'-AAATGAATTCATGAACTTCTACAA-3') y (5'-ATCAAAGCTTTCAACCTCGGGCAG-3') para extraer el gen de *CecA-1* del plásmido pBluescript SK y para generar al mismo tiempo las secuencias de corte para las enzimas *EcoRI* en el extremo 5' y *HindIII* en el extremo 3' del gen. Los productos de PCR se obtuvieron a partir de la mezcla de reacción, que contenía: 500 ng de ADN plasmídico, 2 µl de buffer de reacción 10X, 3 µl MgCl₂ 50 mM, 100 µM de cada oligonucleótido, 1.5 µl de la mezcla de dNTPs y 1 µl de *Taq* polimerasa.

La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94°C por 3 min; 2 ciclos a 94°C por 45 s, 50°C por 45 s, 72°C por 45 s; 30 ciclos a 94°C por 45 s, 53.6°C por 45 s, 72°C por 45 s, 72°C por 45 s; 1 ciclo a 72°C por 3 min; un ciclo sostenido de enfriamiento a 4°C. Estas reacciones se realizaron en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

9.2 Características del plásmido pTrcHis2.

Los plásmidos pTrcHis (Xpress System Protein Expression TrcHis; Invitrogen) son diseñados para la expresión eficiente y la purificación de proteína de los genes clonados en *Escherichia coli* (Fig. 3). Es posible obtener altos niveles de expresión del ADN clonado de los vectores pTrcHis2 debido a la presencia del promotor inducible *trc* (*trp-lac*). Además, el plásmido contiene una copia del gen *lacI^q* que codifica para la proteína represora lac que permite una eficiente represión de la transcripción de estos plásmidos clonados en *E. coli*. Cuando se desea la producción de la proteína, *E. coli* se cultiva a su fase logarítmica de crecimiento y se adiciona IPTG para inducir la expresión. El dominio de unión al metal (Ni) del péptido de fusión permite purificar las proteínas recombinantes en un paso, por cromatografía de afinidad al metal.

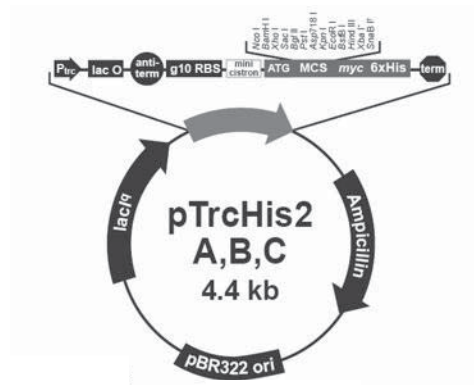


Figura 3. Plásmido pTrcHis2.

9.3 Subclonación del gen nativo y de las mutantes de *CecA-1* en los plásmidos pTrcHis2.

Los plásmidos pTrcHis2 A, B y C, así como el producto de amplificación por PCR, se sometieron a doble digestión enzimática con *EcoRI* y *HindIII* a 37°C por 2 h. Los plásmidos linearizados y el gen de la *CecA-1* digerido se incubaron con la enzima ligasa a 37°C por 2 h. Con esta mezcla de ligación se transformó la cepa de *E. coli* DH5 α . Las bacterias transformadas se sembraron en cajas de Petri con medio LB-agar-ampicilina y se incubaron de 16 a 20 h. Después, las bacterias se transfirieron a medio LB-ampicilina líquido, se incubaron a 37°C por 16 a 20 h y se procedió a recuperar el plásmido.

Las construcciones se sometieron a digestión enzimática con *EcoRI* a 37°C por 2 h y posteriormente se verificó la presencia del gen nativo de *CecA-1* en el plásmido pTrcHis2 mediante secuenciación, en un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

9.4 Diseño de oligonucleótidos.

Se usó la técnica de mutagénesis sitio-dirigida para realizar mutaciones puntuales, cambiando aminoácidos ubicados en una posición específica. Esto se realizó con la ADN polimerasa *Pfu turbo* (Invitrogen), que replicó ambas cadenas del plásmido. Los oligonucleótidos se diseñaron con la mutación deseada y complementarios a la cadena opuesta del vector. Una vez finalizada la reacción, el producto de PCR se restringió con la endonucleasa *Dpn I* (Invitrogen) que se usó para digerir ADN metilado, lo cual es una forma de seleccionar el ADN sintetizado que

contiene la mutación puntual (Fisher y Pei, 1997). Los oligonucleótidos se diseñaron considerando los siguientes aspectos:

- 1.- Ambos oligonucleótidos mutagénicos deben contener la mutación deseada y alinearse en la misma secuencia sobre las cadenas opuestas del plásmido.
- 2.- Los oligonucleótidos deben tener entre 25 y 45 bases de longitud y la T_m debe ser de 78°C.
- 3.- La mutación deseada debe estar ubicada a la mitad del oligonucleótido, con aproximadamente 10-15 bases a ambos lados de la secuencia correcta.
- 4.- Deben contener un mínimo de 40% de GC, y no deben estar fosforilados.

A partir de la construcción *CecA-1* que contiene el gen nativo (pEBHC1) se diseñaron 5 pares de oligonucleótidos (Tabla 1), con el fin de sustituir, mediante PCR, el codón que codifica para triptófano (TGG) en posición 2.

Tabla 4. Oligonucleótidos para generar las mutaciones puntuales en el gen de *CecA-1* de *Drosophila melanogaster*.

Nativa	5'GGAAGCTGGGTGGCTGAAGAAA3'	5'TTTTCTTCAGCCACCCAGCTTCC3'
W2D	5'GGAAGCTGGGGATCTGAAGAAA3'	5'TTTTCTTCAGATCCCCAGCTTCC3'
W2F	5'GGAAGCTGGGTTCTGAAGAAA3'	5'TTTTCTTCAGGAACCCAGCTTCC3'
W2G	5'GGAAGCTGGGGGGCTGAAGAAA3'	5'TTTTCTTCAGCCCCAGCTTCC3'
W2K	5'GGAAGCTGGGAAGCTGAAGAAA3'	5'TTTTCTTCAGCTTCCCAGCTTCC3'
W2L	5'GGAAGCTGGGCTGTGAAGAAA3'	5'TTTTCTTCAGCAGCCCCAGCTTCC3'

Los productos de PCR se obtuvieron a partir de la siguiente mezcla de reacción, que en 50 μ l contenía: 5 μ l de buffer de reacción 10X, 10 ng de ADN del plásmido pTrcHis2, 100 μ M de cada oligonucleótido, 1.5 μ l de la mezcla de dNTPs (10 mM), 3 μ l de MgCl₂ (50mM) y 1 μ l de *Pfu* turbo DNA pol. (2.5 U.) La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: 1

ciclo a 95°C por 1 min; 18 ciclos a 95°C por 50 s, 60°C por 50 s, 68°C por 5 min; 1 ciclo a 68°C por 7 min, 1 ciclo sostenido de enfriamiento a 4°C, en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems). El producto de PCR se sometió a digestión con 1 µl de la enzima *DpnI* a 37°C por una hora para eliminar el gen no mutado.

9.5 Transformación de *Escherichia coli* con las construcciones.

Los tubos con 50 µl de bacterias competentes *E. coli* DH5α se descongelaron en hielo, se les agregó 1 µl del producto de PCR digerido y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente, los tubos se incubaron a 37°C por 3 min y en hielo por otros 3 min. En condiciones de esterilidad se agregó a cada tubo de transformación 550 µl de medio de cultivo líquido LB y se continuó la incubación a 37°C por 30 min. Las bacterias transformadas se sembraron en cajas de Petri con medio LB-agar-ampicilina y se cultivaron toda la noche (aproximadamente 20 h) a 37°C.

9.6 Preparación de plásmidos a pequeña escala a partir de cultivos de *Escherichia coli*.

Las colonias bacterianas resistentes al antibiótico de selección (transformantes) se transfirieron individualmente a tubos con 3 ml de medio LB y 150 µg de ampicilina; posteriormente, los tubos se incubaron en agitación constante a 37°C toda la noche (aprox. 20 h). Al día siguiente, se depositaron 1.5 ml del cultivo bacteriano en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 14,000 rpm (12,600g) Eppendorf 5415C por 30 s. Se desechó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se resuspendió en 200 µl de solución STET (sacarosa 0.8%, tritón X-100 0.5%, EDTA 0.5 M, Tris-HCl 1M) recién preparada, a la cual se la agregaron 200 µg de lisozima (10 µl de un stock 20 mg/ml); se mezcló bien y se incubó 5 min a temperatura ambiente y a 100°C durante 45 s. Después, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min y se eliminó la pastilla. Se agregaron 10 µl de CTAB al 10% al sobrenadante, se mezcló bien y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 300 µl de NaCl 1.2 M. Se agregaron 600 µl de etanol absoluto (previamente enfriado a -20°C) y se mezcló bien. Se centrifugó a 14,000 rpm, durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavó la pastilla de ADN con etanol al 70% y se dejó secar. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM).

9.7 Secuenciación de ADN.

La mezcla de secuenciación se preparó de la manera siguiente: 3-4 pmol del oligonucleótido específico para secuenciación (Applied Biosystems, DNA sequencing Kit; Big Dye Terminator). A la reacción se añadió 8 µl de la mezcla de secuenciación (que incluye dNTPs; Taq DNA pol y buffer) y H₂O cbp 25 µl. Para la reacción se utilizó un termociclador (Perkin Elmer, Gene Amp 2400 programado a 25 ciclos bajo las siguientes condiciones: 96°C 30 s; 54°C 30 s; 54°C 30 s y 60°C 4 min. Una vez terminada la reacción de extensión, se purificaron las mezclas a través de una columna de Bio Gel (Bio Rad). Los productos de extensión se resuspendieron en 25 µl de buffer TSR (buffer para evitar la formación de estructuras secundarias) se mezcló y posteriormente se colocaron a 95°C por 2 min e inmediatamente se transfirieron a hielo. La secuencia se determinó utilizando un equipo de secuenciación automática (Perkin-Elmer, ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER) y se utilizó el software SEQUENCING ANALIZER 3.0. Se utilizaron parámetros de lectura con un tiempo de inyección de 30 s y la electroforesis se realizó a 15 kV, 50°C y 50 min de corrida, utilizando un capilar de secuenciación de 47 cm de longitud.

9.8 Características del plásmido pTracer EF/V5-His para expresión en células animales.

El plásmido pTracer EF/V5-His es un vector de expresión en células animales de 5.9 kb, diseñado para detectar visualmente las bacterias transformadas y las células de mamífero transfectadas. El vector produce elevados niveles de expresión del gen de interés en células de mamífero y puede ser usado para estudios de expresión transitoria y estable. Además, posee tres diferentes marcos de lectura (A, B y C) para facilitar la clonación en fase del gen de interés.

Posee el gen GFP (Green Fluorescent Protein) fusionado al gen de resistencia a Zeocina que posibilita una detección *in vivo* de bacterias y células de mamífero. El promotor del citomegalovirus humano (CMIV) permite un nivel elevado de expresión de la proteína recombinante de interés, y dirige la expresión de la GFP y el gen de resistencia a Zeocina en células de mamífero (Fig. 4). El gen de resistencia a ampicilina posibilita la selección en bacterias. El promotor del factor de elongación humano 1, permite la expresión de la proteína recombinante en un nivel elevado en diferentes tipos celulares de mamífero. El promotor T7 permite la secuenciación del inserto. El epítipo V5 permite la detección de la proteína de

fusión con el anticuerpo Anti-V5. El segmento de poli-histidinas C-terminal permite la purificación de la proteína recombinante al unirse al Ni contenido en las resinas ProBond. Además, esta región es reconocida como el epítipo del anticuerpo Anti-His.

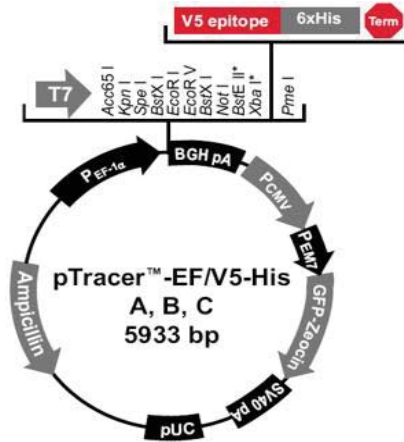


Figura 4. Plásmido pTracerA EF/V5-His.

9.9 Características del plásmido pcDNA3 para expresión en células animales.

El plásmido pcDNA3 posee el promotor CMIV que permite un elevado nivel de expresión de la proteína recombinante de interés (Fig. 5). El promotor T7 permite la transcripción *in vitro* en el sentido y orientación adecuada del inserto. El sitio de clonación TOPO permite la inserción del producto de PCR en fase con el epítipo V5 y la región de poli-histidinas C-terminal.

El epítipo V5 permite la detección de la proteína recombinante con el anticuerpo anti-V5. El segmento de poli-histidinas C-terminal permite la purificación de la proteína recombinante al unirse al Ni contenido en las resinas ProBond. Además, esta región es reconocida como el epítipo del anticuerpo anti-His. El promotor SV40 permite la expresión del gen de resistencia a neomicina. El gen de resistencia a neomicina (G418) será empleado para la selección de células endoteliales transfectadas. El origen pUC permite un elevada replicación y un alto número de copias en *E. coli*. El gen de resistencia a la ampicilina es útil como marcador de selección en *E. coli*.

El plásmido pRSV gal está diseñado como control positivo para monitorear la eficiencia de transfección de células de mamífero. El promotor RSV dirige la transcripción del gen bacteriano *LacZ*, que traduce la enzima β-galactosidasa, que es un excelente enzima reportero, que puede evaluarse rápida y directamente en extractos celulares usando ensayos de espectrofotometría. De esta manera este vector actúa como control de ensayos de expresión transitoria.

Se deben sembrar 130,000 células en una placa Corning-Costar de 6 pozos, 24 h antes de transfectar, para alcanzar una confluencia de aproximadamente 80%. Las células fueron sometidas a un tratamiento por duplicado, transfectando 2 μg, 4 μg y 8 μg del plásmido pRSV gal. La composición de la mezcla de transfección fue: ADN (2, 4 u 8 μg) + 25 μl de CaCl₂ [2.5 M] + H₂O cbp 250 μl; posteriormente, se agitó en vórtex brevemente y se le dio un pulso en la centrifuga DAIGER a 6,000 rpm. Después, se adicionaron 250 μl de HBSS 2X [10 mM KCl, 0.6 mM KH₂PO₄, 276 mM NaCl, 8 mM NaHCO₃, 0.6 mM Na₂HPO₄, 11.2 mM D-glucosa, pH 7.1] a cada tubo gota a gota, se mezcló por inversión, se incubó 5-10 min a temperatura ambiente, y finalmente se depositaron 250 μl de esta mezcla gota a gota a cada pozo.

Las células se mantuvieron en incubación durante 7 h y posteriormente se cambió el medio. Al día siguiente se cambió el medio y finalmente a las 48 h se retiró el medio y se adicionó 1 ml de paraformaldehído al 2% (2% [v/v] formaldehído, 0.2% [v/v] glutaraldehído, 1x PBS). Se incubaron 20 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.1] para retirar residuos de formaldehído. Se adicionó 1 ml de la solución de revelado (5 mM de ferricianuro de potasio (K₃Fe[CN]₆), 5 mM ferrocianuro de potasio (K₄Fe[CN]₆), 2 mM MgCl₂, 1x PBS, 1 mg/ml X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-galactósido) y se incubó durante 48 h (ProFection Mammalian Transfection Systems; promega).

Por último, a las 48 h se retiró el medio y se adicionó 1 ml de paraformaldehído al 2% y se incubó 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con PBS para retirar residuos de formaldehído. Después se agregó 1 ml de la solución de revelado y se incubó durante 48 h. Finalmente, se determinó visualmente la eficiencia de la transfección.

9.13 Incremento de la eficiencia de transfección.

La eficiencia de transfección en muchos tipos celulares puede ser incrementada con tratamientos adicionales después de la exposición inicial al fosfato de calcio-DNA. El agente más efectivo y rutinariamente usado es el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), la cloroquina y el butirato de sodio (Sambrook *et al.*, 1989). Dado que estos compuestos son tóxicos para las células, las condiciones deben ser optimizadas para cada reactivo en concentración y tiempo de exposición.

La adición de glicerol (ProFection Mammalian Transfection Systems; Promega) puede ser realizado a las 4-16 h de exposición con el fosfato de calcio-ADN. En general, las células que son más sensibles al fosfato de calcio pueden responder mejor al glicerol a las 4 h de exposición al ADN. Para esto, se retiró la solución fosfato de calcio-ADN y se lavó una vez con PBS. Posteriormente, se añadieron 2 ml de la solución de glicerol (15% glicerol; 1X HBS [25 mM HEPES, 140mM NaCl, 0.75mM Na₂HPO₄, pH 7.1]), se incubó 2 min a temperatura ambiente, se retiró la solución de glicerol y se lavó 2 veces las células con PBS. Al final, se adicionaron 2 ml de F12K y las células se mantuvieron en incubación a 37°C como se describió anteriormente.

9.14 Establecimiento de la línea celular transfectada.

Las transfecciones se agrupan en dos categorías: expresión de genes transitoria y estable. Por lo tanto, las células se deben seleccionar y estandarizar el tiempo óptimo de selección para obtener una línea estable. Para lograr una selección adecuada se procedió de la manera siguiente:

Las células transfectadas se mantuvieron en incubación en presencia de medio de cultivo y una vez transcurridas 24-48 h se procedió a agregar zeocina a una concentración de 500 µg/ml para pTracerA, o puromicina a una concentración de 5-25 µg/ml para el caso de pcDNA3. En el caso del plásmido pcDNA3 se realizó una co-transfección con el plásmido pPur para conferir resistencia a puromicina en una relación 1:10 construcción, pPur respectivamente. Las colonias resistentes se recuperaron bajo condiciones de esterilidad al día 25 posterior a la transfección.

9.15 Características del plásmido pPur.

pPur es un vector de selección que confiere a células eucariotas resistencia a puromicina (Fig. 6). El gen de resistencia a puromicina de pPUR puede usarse como un marcador de selección dominante para seleccionar líneas celulares de mamífero de manera estable. El gen de resistencia a puromicina se encuentra clonado entre el promotor SV40 y el sitio de poliadenilación. Posee el origen de replicación de pBR322 y el gen de resistencia a ampicilina para su propagación y selección en *E. coli*. pPUR puede ser co-transfectado con otro vector expresando el gen de interés para seleccionar la integración de ambas moléculas de DNA.

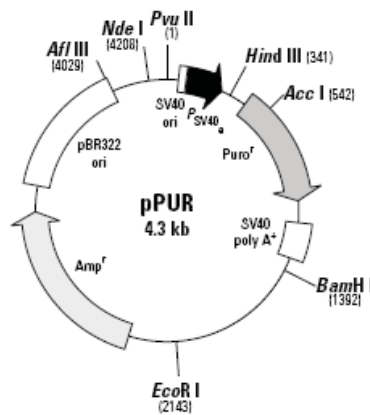


Figura 6. Plásmido pPUR

9.16 Extracción del ADN genómico de células endoteliales transfectadas y sometidas a selección.

Una vez realizada la selección de las células transfectadas, las clonas se recuperaron en una caja nueva hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, se empleó el protocolo para la purificación del ADN genómico, usando el equipo QC-Mini80 Fujifilm. Este protocolo consistió en que las células recuperadas se depositaron en un tubo de 2 ml. Se agregaron 180 μ l de MDT (Tissue Lysis Buffer) y 20 μ l de EDT (Proteinase K) y las células se dejaron incubando en un agitador rotatorio a una temperatura de 55°C durante 3 h. Las células se centrifugaron a 10,000 rpm por 3 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml. A éste se añadieron 20 μ l de RNAasa (Invitrogen cat. No. 12091). Se mezcló perfectamente y se incubó a temperatura ambiente por 2 min. Se agregaron 180 μ l de

LDT (Lysis Buffer), se agitó en vórtex a máxima velocidad por 15 s y se incubó a 70°C por 10 min. Después se agregaron 240µl de etanol absoluto, se agitó en vórtex a máxima velocidad por 15 s y se transfirió el lisado obtenido a un cartucho de extracción de ADN. Se procedió a presurizar, se agregaron 750 µl de WDT (Wash Buffer), se presurizó, se agregaron 750 µl de WDT, se presurizó, se agregó 750 µl de WDT, se presurizó y se movió el cartucho a la posición de elución. Se agregaron 200 µl de CDT (Elution Buffer), se dejó incubar a temperatura ambiente por 90 s y se presurizó. Una vez finalizada la última presurización, se obtuvo ADN genómico.

9.17 Extracción de RNA de células endoteliales seleccionadas.

Una vez realizada la selección de las células transfectadas, las clonas se recuperaron en una caja nueva hasta alcanzar la confluencia. Se empleó el protocolo para la purificación del RNA genómico usando el equipo QC-Mini80 Fujifilm. Este protocolo consistió en que las células recuperadas se depositaron en un tubo de 2 ml (aproximadamente 1×10^6 células), se colectaron las células por centrifugación durante 7 min a 2,500 rpm y se retiró el sobrenadante. El lisado se obtuvo de la manera siguiente: Se agregaron 520 µl de LRC (Lysis Buffer, 1% 2-Mercaptoethanol), se agitó en vórtex durante 1 min a máxima velocidad, se dio un pulso en la centrífuga, se agregaron 100µl de etanol al 99%, se mezcló en vórtex durante 15 s, se dio un pulso en centrífuga y posteriormente se agregaron 180 µl de etanol; se mezcló en vórtex y se dio un pulso en centrífuga. El lisado se transfirió a uno de los cartuchos colocados previamente en el QGMini80 y se procedió a presurizar, se agregaron 500 µl de WRC (Wash Buffer, 30% etanol 99%), se presurizó, se trató con 40 µl (1 U) de DNAsa (cat no. 18068-015 de Invitrogen), se incubó a 37°C durante 30 min, se agregaron 500µl de WRC, se presurizó, se agregaron 500 µl de WRC, se presurizó, se cambió el cartucho a la posición de elución, se agregaron 100 µl de CRC (Elution Buffer), se incubó por 3 min a temperatura ambiente, se presurizó y finalmente se recuperó el RNA total.

9.18 Titulación del anticuerpo contra CecA-1.

Se recortaron fragmentos de nitrocelulosa (NC), se incubaron en TBS [50 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5] durante 10 min. La NC se dejó secar sobre papel filtro 3MM durante 5-

10 min. Se depositó 1 μg del péptido CecA-1 sintetizado por SIGMA (IERVGQHTRDATIQGLGIAQ) sobre la NC y se dejó secar durante 5-10 min. Se colocó la membrana en solución bloqueadora al 2% (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, BIORAD) en 10 ml de TBS por 1 h. Se lavó la membrana con 10 ml de solución bloqueadora al 0.5% en TBS por 2-3 min. Se eliminó la solución anterior, se agregaron 10 ml de la solución bloqueadora al 0.5% en TBS y se añadió el anticuerpo primario (anticuerpo generado por SIGMA contra CecA-1) a una dilución de 1:200 - 1:5000 en un volumen 10 ml. Se agitó suavemente para distribuir el anticuerpo en la solución y se colocó la membrana a 10°C sin agitar durante toda la noche. Al día siguiente, la membrana se equilibró a temperatura ambiente por aproximadamente 1 h. Se lavó 4 veces durante 10 min con 10 ml de TTBS (TBS+Tween-20 al 0.1%) por lavado. Se lavó una vez con 10 ml de la solución bloqueadora al 0.5% en TBS durante 10 min. Se quitó la solución bloqueadora y se añadieron 10 ml de solución bloqueadora al 0.5% en TBS. Después, se agregó el anticuerpo secundario (anti-anticonejo conjugado con fosfatasa alcalina) a una dilución de 1:3000 en 10 ml. Se dejó 30 min en agitación y después 60 min en reposo. Durante este lapso se agitó suavemente y de manera esporádica. La membrana se lavó 4 veces con 10 ml de TTBS durante 15 min. La detección de la CecA-1 se realizó con Luminol (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology, Inc).

9.19 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

La separación de las proteínas se hizo en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS de acuerdo con la técnica de Shagger y von Jaggow [Schägger y von Jaggow, 1987]. El gel se preparó con 1.8 ml de amortiguador (Tris pH 8.9, 0.3% SDS), 1.8 ml de agua destilada desionizada (add), 0.3 ml de glicerol, 15 μl de persulfato de amonio al 10% y 1.5 μl de TEMED concentrado. Sobre el gel de separación se colocó el gel de condensación que tiene una concentración final de acrilamida de 4%. Este gel se preparó con 264.2 μl de amortiguador (Tris pH 8.9, 0.3% SDS), 495.5 μl de add, 16.5 μl de persulfato de amonio al 10% y 1.7 μl de TEMED concentrado.

Las proteínas de las muestras se separaron en una Mini-cámara. La electroforesis se inició a 65 V durante 30 min hasta que las muestras migraron a la interfase entre el gel condensador y el

gel separador; después el voltaje se incrementó a 95 V y se dejó transcurrir la migración por 1 h en el gel de separación. Una vez terminada la electroforesis, el gel se fijó en una solución de 50% metanol/10% ácido acético por 1 h, se tiñó con 0.025% de azul de Coomassie G preparado en 10% de ácido acético durante 0.5 h y se destiñó con 10% de ácido acético el tiempo necesario.

9.20 Transferencia de péptidos a membrana de nitrocelulosa.

La membrana (NC) se incubó en el buffer de transferencia [25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol y 0.1% SDS] por 10-15 min en agitación suave. Para formar el “*sandwich*” se colocaron 3 pedazos de papel filtro Whatman 3 MM, humedecidos en el buffer de transferencia, en contacto tanto con la membrana de NC y del gel (3 por lado). El sandwich así formado se introdujo en la cámara Hoefer y se procedió a la electrotransferencia de las proteínas a 250 A por 45-50 min.

9.21 Inmunodetección del péptido.

La membrana de NC se colocó en la solución bloqueadora (0.5 g de leche descremada Bio-Rad en 10 ml de TBS [Tris buffer salino; 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5] por 1 h. La solución bloqueadora se eliminó y se añadieron 10 ml de TTBS (50 μ l de Tween-20 en 100 ml de TBS) por 10 min/2x; la membrana se colocó en un agitador orbital a baja velocidad. El TTBS se eliminó y se añadió el anticuerpo específico que reconoce a CecA-1 (SIGMA) en 10 ml de TTBS 1:1000; se dejó durante 1-2 h en agitación suave, para después incubarse toda la noche sin agitación. El TTBS + anticuerpo primario se eliminó y se lavó la membrana de NC 2 veces con 10 ml de TTBS (10 min c/u con agitación suave). El TTBS se eliminó y se agregó el segundo anticuerpo (IgG biotinilado de conejo producido en cabra) [Amersham BioScience] en 10 ml de TTBS 1:3000; se procedió a incubar durante 2 h en agitación suave. Se lavó 4 veces con 10ml de TTBS durante 15 min. La detección del péptido CecA-1 se hizo con Luminol (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology, Inc).

10 .RESULTADOS.

10.1 Amplificación del gen de *CecA-1* de *D. melanogaster* y generación de sitios de corte específicos por PCR.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos 5´-AAAT**GAATTC**ATGAACTTCTACAA-3´ y 5´-ATCA**AAGCTT**TCAACCTCGGGCAG-3´ para extraer el ADNc del gen *CecA-1* de *D. melanogaster* del plásmido pBluescript SK y para generar al mismo tiempo las secuencias de corte de las enzimas de restricción *EcoR* I y *Hind* III en los extremos 5´ y 3´, respectivamente.

10.2 Clonación del gen *CecA-1* nativo en el plásmido pTrcHis2A.

El plásmido pTrcHis2 A, así como el producto de amplificación de PCR, se sometieron a doble digestión enzimática con *EcoR* I y *Hind* III. El plásmido linearizado y el gen de *CecA-1* digerido se incubaron con la enzima DNA ligasa a 37°C por 2 h. Con 5 µl de esta mezcla de ligación se transformó la cepa de *E. coli* DH5α.

Posteriormente, la construcción denominada pEBH1 (4.650 Kpb) fue identificada por secuenciación de una de las dos clonas, las cuales mostraron un retraso en la movilidad electroforética en un gel de agarosa al 0.8%, comparada con la movilidad del pTrcHis2A (4.4 Kpb). Este retraso en la migración se debió a la inserción del gen de *CecA-1* de *D. melanogaster* (250 pb). Las muestras que se sometieron a secuenciación son las presentadas en los carriles 1 y 2 de la Figura 7. La secuencia obtenida de la construcción del carril 1 correspondió en un 100% a la del gen nativo de *CecA-1*, sin intrones. Con este resultado ya no fue necesario evaluar la integridad y determinar la secuencia en las demás construcciones. El análisis de la secuencia de aminoácidos, empleando el programa DNASTar, correspondió a *CecA-1* de *D. melanogaster* (Tabla 5).

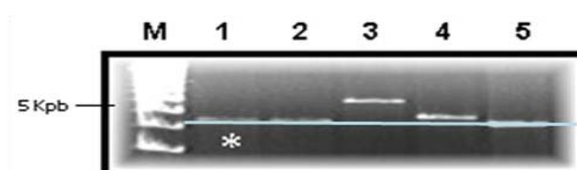


Figura 7. Clonación del gen *CecA-1*. Análisis de los productos de digestión *EcoR* I de cuatro clonas del plásmido pEBHC1 (carriles 1-4) y del vector de clonación pTrcHis2A sin inserto (carril 5). (*) Indica la clona seleccionada para secuenciación. [M] marcador de peso molecular.

10.3 Generación de mutaciones puntuales en el gen de *CecA-1* de *Drosophila melanogaster*.

Con el objetivo de realizar tanto un análisis de restricción como de secuenciación del gen *CecA-1*, se seleccionaron tres clonas independientes de cada una de las cinco mutaciones generadas. El análisis de restricción se llevó a cabo con *EcoR* I. Dado que el ADN aislado de casi todas las cepas de *E. coli* se encuentra en la forma metilada, es posible realizar una digestión específica con la enzima *Dpn* I, la cual degrada el ADN bacteriano metilado y hemimetilado. Esta propiedad de *Dpn* I permite la comparación de los plásmidos pEBHC1 mutantes, obtenidos por PCR, con el plásmido pTrcHis2A.

Con este procedimiento se observó un ligero retardo en la migración de los plásmidos que posiblemente contenían el gen *CecA-1* de *D. melanogaster* mutado (carriles 1-12) (Fig. 8).

Con el fin de determinar si las mutaciones habían sido generadas, se escogieron al azar los plásmidos de los carriles 2, 6, 8 y 10 (Fig. 8). La secuenciación confirmó que los únicos cambios observados en el gen fueron las mutaciones puntuales introducidas, es decir, el cambio en el codón de W por los codones de F (pEBHC2), G (pEBHC4), L (pEBHC7), D (pEBHC6) y K (pEBHC5).

Al realizar la traducción de cada uno de los marcos de lectura, con el programa DNASTar (Tabla 5), se confirmó que en cada caso W fue sustituido por el aminoácido deseado, y fusionado con el epítipo *myc*.

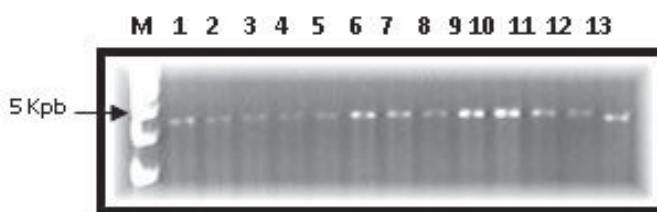


Figura 8. Generación de mutantes del gen *CecA-1*. Análisis de los productos de digestión de los plásmidos pTrcHis2A mutantes puntuales y el pTrcHis2A (carril 13), con *EcoR* I. Carriles 1-3, W2F; carriles 4-6, mutación W2G; carriles 7-9, mutación W2L; y carriles 10-12, mutación W2K. [M] marcador de peso molecular.

Tabla 5. La secuencia de aminoácidos correspondiente a la forma nativa y cinco mutantes generadas por PCR de la *CecA-1*.

	Pre-propéptido	Péptido maduro
A] Nativa	MNFNIFVFVALILAITIGQSEA	G WLKKIGKKIERVQHQHTRDATIQGLGIAQQAANVAATARG
B] W2D	MNFNIFVFVALILAITIGQSEA	GDL KKIGKKIERVQHQHTRDATIQGLGIAQQAANVAATARG
C] W2F	MNFNIFVFVALILAITIGQSEA	GFL KKIGKKIERVQHQHTRDATIQGLGIAQQAANVAATARG
D] W2G	MNFNIFVFVALILAITIGQSEA	GGL KKIGKKIERVQHQHTRDATIQGLGIAQQAANVAATARG
E] W2K	MNFNIFVFVALILAITIGQSEA	GKL KKIGKKIERVQHQHTRDATIQGLGIAQQAANVAATARG
F] W2L	MNFNIFVFVALILAITIGQSEA	GLL KKIGKKIERVQHQHTRDATIQGLGIAQQAANVAATARG

A] Secuencia de aminoácidos nativa correspondiente a *CecA-1* de *D. melanogaster* [Lowenberger *et al.*, 1999].

B] mutación W2D; C] mutación W2F; D] mutación W2G; E] mutación W2K y F] mutación W2L.

10.4 Clonación del gen *CecA-1* nativo y mutante en pTracer EF/V5-His.

El fragmento correspondiente al gen *CecA-1* y mutantes generadas fue extraído del plásmido pTrcHis2A mediante doble digestión enzimática con *EcoR* I y *Xba* I. Los genes de *CecA-1* y mutantes, producto de esta digestión, se mezclaron con el plásmido pTracerA EF/V5-His previamente linearizado con estas mismas enzimas y se sometieron a ligación con la enzima DNA ligasa. Con esta mezcla de ligación se transformó la cepa de *E. coli* DH5 α . Finalmente, las construcciones que al ser digeridas con *EcoRI* y *XbaI* mostraron un tamaño de aproximadamente 250 pb, en un gel de agarosa al 1%, se seleccionaron para secuenciación (Fig. 9).

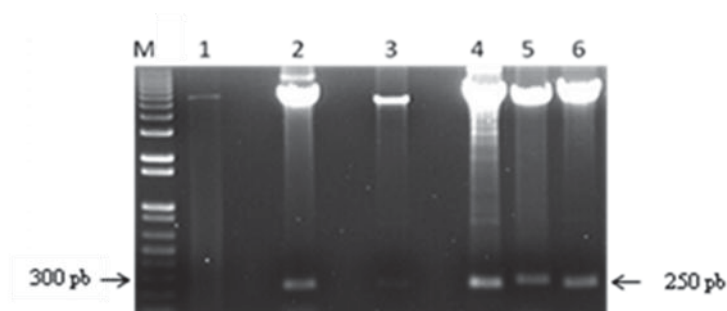


Figura 9. Productos de digestión enzimática *EcoRI-XbaI* de pTracerA EF/V5-His y *CecA-1* y mutantes puntuales en pcDNA3. Carril 1, pTracerA EF/V5-His; Carril 2, *CecA-1*; Carril 3, W2D; Carril 4, W2F; Carril 5, W2K; Carril 6, W2L (banda de 250 pb aproximadamente).

Posteriormente, las bandas correspondientes a *CecA-1* y mutantes puntuales, así como la banda correspondiente a pTracerA EF/V5-His fueron recuperadas, y se realizó una reacción de ligación en una relación de 1:10 (vector-inserto) (Fig. 10).

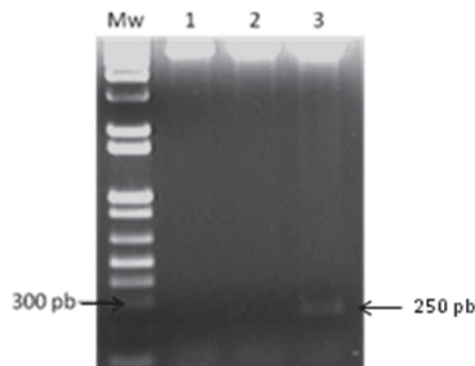


Figura 10. Clonación de *CecA-1* en TracerA EF/V5-His, producto de digestión *EcoRI*- *XbaI*. Carril 1-3 posibles construcciones pTracerAEF/V5-His-*CecA-1*, en el carril se observa la banda de aproximadamente 250 pb correspondiente a *CecA-1*.

10.5 Determinación de las condiciones óptimas de transfección en células endoteliales (BVE-E6E7).

Para realizar la transfección de *CecA-1* y mutantes puntuales, previamente fue necesario determinar las condiciones óptimas de transfección de las BVE-E6E7, para esto se empleó el plásmido pRSV gal y la técnica de fosfato de calcio. Se decidió evaluar 3 tiempos de incubación con los complejos fosfato de calcio-ADN a 4, 10 y 25 h y posteriormente tratadas con glicerol, finalmente se determinó por microscopía óptica la eficiencia de la transfección y se determinó que al realizar el shock con glicerol posteriormente a las 4hrs de incubación con fosfato de calcio-ADN se obtuvo la mayor eficiencia (Fig. 11A).

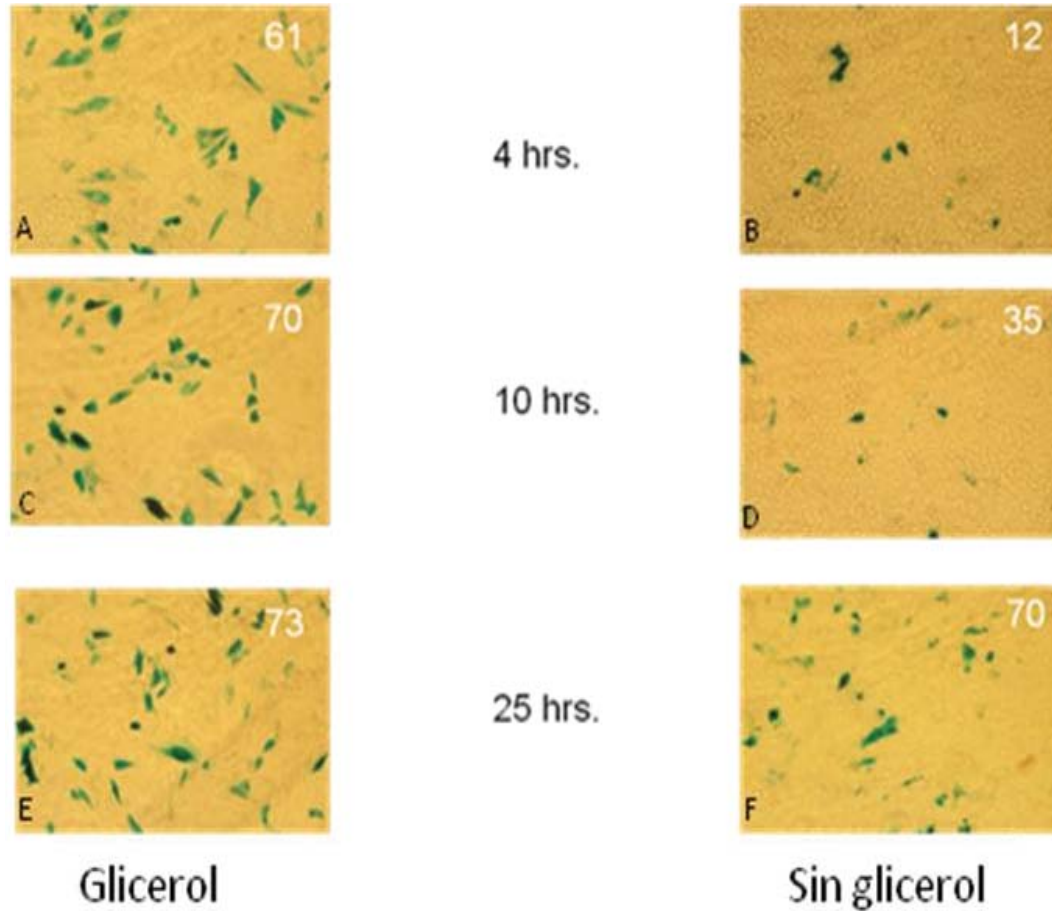


Figura 11. Determinación de las condiciones óptimas de transfección en las BVE-E6E7. Comparación de la eficiencia de transfección de células endoteliales tratadas (A, C y E) y no tratadas con glicerol (B, D y F) posterior a la incubación con calcio-DNA. El número en el extremo superior derecho de cada fotografía indica el número de células que integraron pRSV gal (expresan la enzima β -galactosidasa). Los números en la parte central representan el tiempo al que estuvieron expuestas las células a los complejos fosfato de calcio-DNA.

10.6 Determinación de la concentración inhibitoria de zeocina para seleccionar las BVE-E6E7 a transfectar.

Después de 10 días de prueba, se determinó que la concentración inhibitoria de Zeocina apropiada para la selección de células transfectadas es de 500 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 12 E). De igual manera se determinó la concentración inhibitoria para el antibiótico puomicina, empleando concentraciones variables crecientes de 5 a 25 $\mu\text{g/ml}$. La concentración que resultó adecuada para seleccionar las BVE-E6E7 transfectadas fue 5 $\mu\text{g/ml}$ (Datos no mostrados).

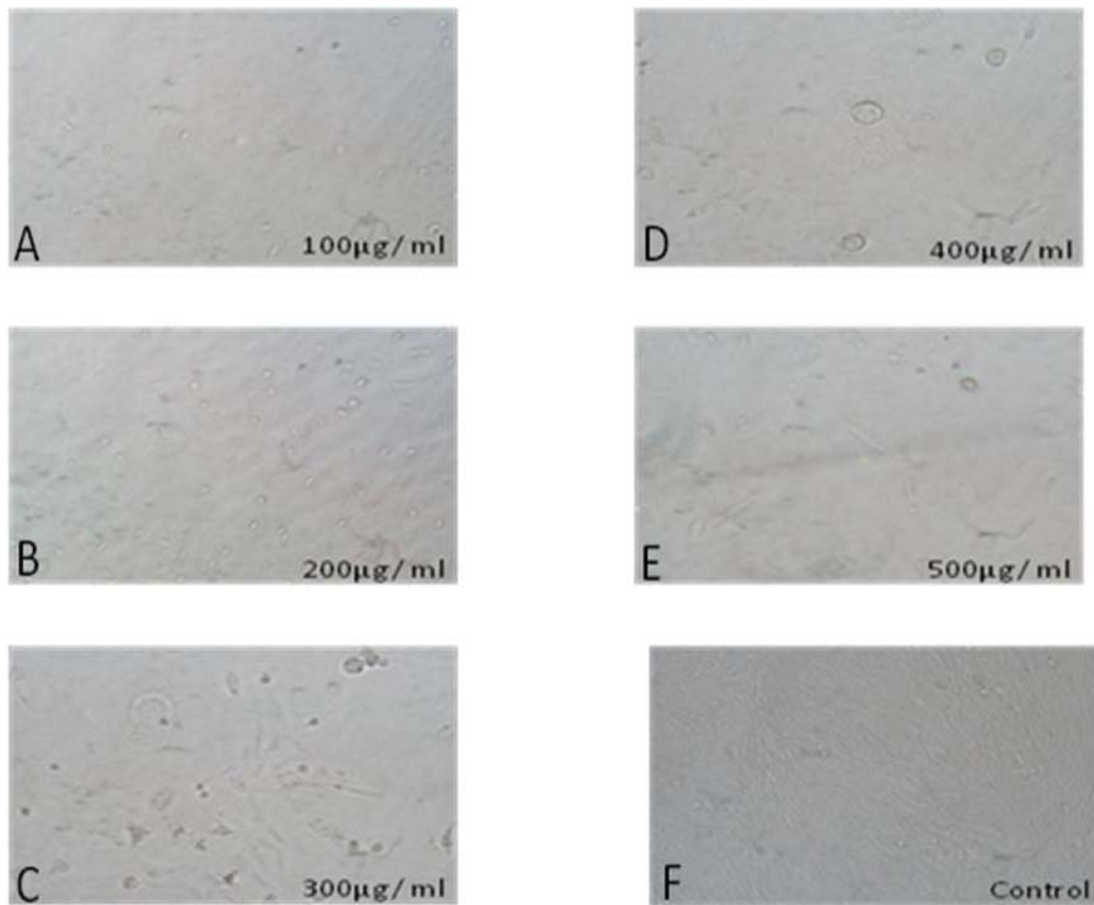


Figura 12. Determinación de la concentración inhibitoria de zeocina. Las BVE-E6E7 se mantuvieron en presencia de 5 concentraciones diferentes de zeocina (100 a 500 µg/ml) por un periodo de 10 días (incisos A a E). En todos los tratamientos las células sometidas a las diferentes concentraciones de zeocina presentan una morfología anormal, mostrando un incremento de tamaño, presencia de vesículas y detritus celular producto de la actividad de zeocina. F, control que muestra la morfología característica de la línea celular. Finalmente se determinó utilizar la concentración de 500 µg/ml como dosis inhibitoria en la selección de las células transfectadas.

10.7 Transfección de BVE-E6E7 con pTracer EF/V5-His-CecA-1.

La transfección de las BVE se realizó con pTracer EF/V5-His-CecA-1 o mutantes puntuales, así como con el plásmido pcDNA3 CecA-1 y W2F. Posteriormente, las células transfectadas se seleccionaron con 500 µg/ml de Zeocina durante aproximadamente 25 días para las construcciones en pTracerA (Fig. 13A). Para la selección con puromicina se añadió 5 µg/ml

cuando las células fueron transfectadas con pcDNA3-*CecA*-1 y pcDNA3-W2F (datos no mostrados).

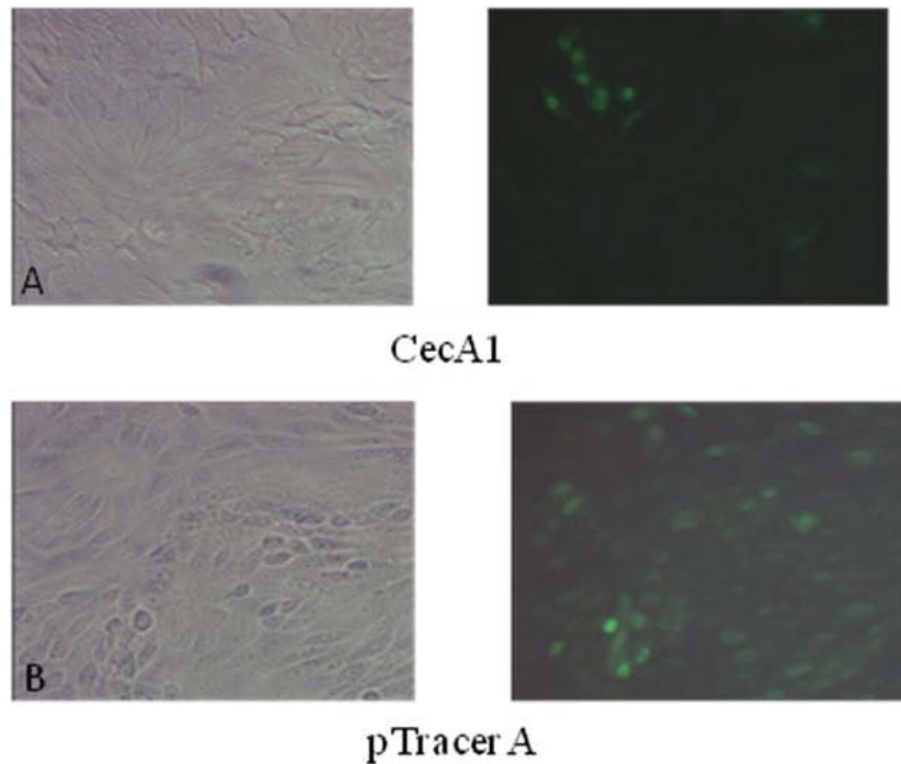


Figura 13. Transfección de BVC-E6E7. Fotografías que muestran la expresión de proteína verde fluorescente (GFP) en las células endoteliales transfectadas. **A.** Transfección con la construcción pTracerA EF/V5-His *CecA*-1 y **B.** pTracerA EF/V5-His sin inserto (pTracer A). Las fotografías del lado izquierdo representan el campo claro y las fotografías del lado derecho representan el campo con fluorescencia que demuestra la expresión del gen reportero GFP.

10.8 Extracción del ADN genómico de BVC-E6E7 transfectadas.

Para evaluar la integración del gen de *CecA*-1 y mutantes puntuales se extrajo ADN genómico (Fig. 14) una vez realizada la selección de las células transfectadas.

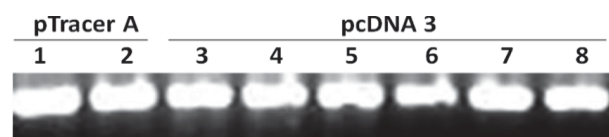


Figura 14. Integridad del ADN genómico extraído de las células endoteliales transfectadas. Se muestra la integridad del ADN genómico extraído de células endoteliales transfectadas y mantenidas selección durante 25 días carril 1, pTracerA W2A; carril 2, pTracerA W2F; carril 3, pcDNA3 W2A; carril 4, pcDNA3 W2D; carril 5, pcDNA3 W2F; carril 6, pcDNA3 W2G; carril 7, pcDNA3 W2K; carril 8, pcDNA3 W2L.

10.9 Presencia del gen de *CecA-1* en el ADN genómico extraído de BCV-E6E7 transfectadas.

La detección del gen de *CecA-1*, tanto silvestre como mutantes, no fue posible en transfecciones estables policlonales y monoclonales para cada una de las construcciones, por lo tanto se evaluó el ADN genómico obtenido de transfecciones transitorias a las 24, 48 y 72hrs. Los mejores resultados en cuanto al tiempo óptimo de expresión del gen, se obtuvieron con la *CecA-1* y la mutante W2F, empleando como vector de transfección al plásmido pTracerA. Se observa que la amplificación del inserto disminuye en sentido proporcional al tiempo post-transfección. Por lo tanto se determino evaluar la expresión de las transfecciones transitorias a las 48 hrs post-transfección

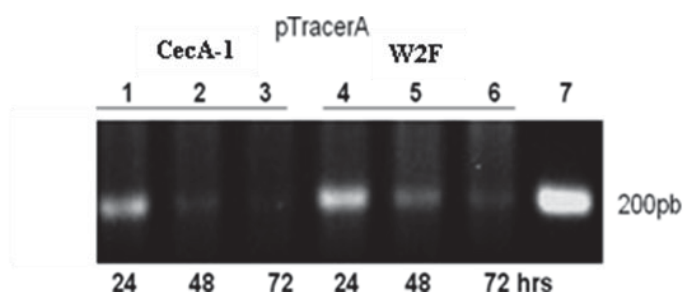


Figura 15. Amplificación del gen de *CecA-1* y mutante F de transfecciones transitorias. Carriles 1, 2 y 3 ADN genómico extraído de transfecciones transitorias con pTracerA *CecA-1* a las 24, 48 y 72 hrs respectivamente; carriles 4, 5 y 6 ADN genómico de células endoteliales transfectadas con pTracerA-W2F a las 24, 48 y 72 hrs respectivamente; carril 7, ADN plasmídico pTracerA *CecA-1* (control positivo).

Para el caso de las transfecciones transitorias a las 48 hrs en pcDNA3 (W2A, W2D, W2F, W2G, W2K, W2L) solo la construcción correspondiente a pcDNA3 W2F mostró la banda esperada (datos no mostrados).

10.10 Extracción de RNA de células endoteliales sometidas a selección con Zeocina.

Para determinar la expresión del RNA mensajero correspondiente a *CecA-1* en las BVE-E6E7, se extrajo RNA total de las transfecciones transitorias a las 48 hrs post-transfección.

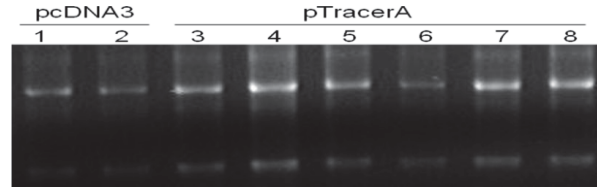


Figura 16. Integridad del RNA total extraído de células transfectadas sometidas a selección con Zeocina. Carril 1, pTracerA *CecA-1*; Carril 2, pTracerA *W2F*; carril 3, pcDNA3 *CecA-1*; carril 4, pcDNA3 *W2D*; carril 5, pcDNA *W2F*; carril 6, pcDNA3 *W2G*; carril 7, pcDNA3 *W2K*; carril 8, pcDNA3 *W2L*

10.11 Amplificación de *CecA-1* y mutantes puntuales a partir del cDNA.

En base al RNA total extraído de las transfecciones transitorias a las 48 hrs. Se obtuvo la amplificación del inserto correspondiente a partir del cDNA de las construcciones pTracerA *CecA-1*, pTracer *W2F*, pcDNA3 *W2F* el resto de las amplificaciones no mostraron el patrón esperado (200 pb).

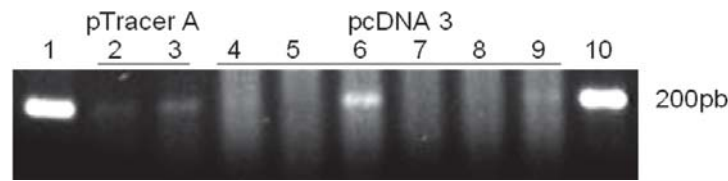


Figura 17. Amplificación del gen de *CecA-1* a partir del cDNA correspondiente a el RNA recuperado a las 48hrs post-transfección. Carril 1, Marcador 1 kb plus; carril 2, pTracerA *CecA-1*; carril 3, pTracerA *W2F*; carril 4, pcDNA3 *CecA-1*; carril 5, pcDNA3 *W2D*, carril 6 pcDNA3 *W2F*; carril 7, pcDNA3 *W2G*; carril 8 pcDNA3 *W2K*; carril 9, pcDNA3 *W2L*; carril 10, DNA plasmídico pTracerA *CecA-1*.

10.12 Titulación del anticuerpo contra *CecA-1*.

Se realizo la titulación del anticuerpo policlonal dirigido contra *CecA-1* (SIGMA), se emplearon 5 títulos en el rango de 1:500-1:10,000. La detección que mostró mayor sensibilidad fue presentada con el titulo 1:500 y 1:1000 (Fig. 18, A y B) por consiguiente se decidió emplear el titulo 1:1000 para los ensayos tipo western, para detectar la presencia del péptido *CecA-1* en las diferentes fracciones celulares obtenidas.

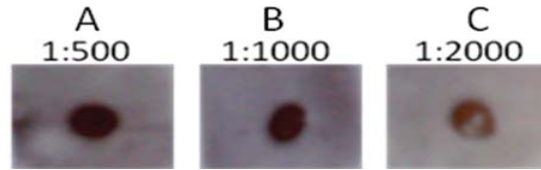


Figura 18. Titulación del anticuerpo policlonal dirigido contra el péptido CecA-1 (SIGMA). La titulación del anticuerpo se evaluó empleando un título de 1:500-1:10,000, en la figura solo se presenta la detección para el título de A, 1:500; B, 1:1000, y C 1:2000 del anticuerpo primario anti-CecA-1, el mayor grado de sensibilidad fue detectado con el título 1:500 y 1:1000 de anti-CecA-1.

10.13 Inmunodetección de CecA-1.

Para determinar la presencia de CecA-1 se evaluaron diferentes fracciones celulares (Fracción nuclear (Fn), fracción citosólica (Fc) y medio condicionado (Mc). Las fracciones y medios condicionados evaluados se recuperaron a las 48 hrs posteriores a la transfección. La expresión del gen de CecA-1 se determinó por inmunodetección con el anticuerpo policlonal dirigido contra CecA-1 presentando un peso molecular aparente de 4 kDa (Fig. 19 panel A, carril 9 y panel B, carril 4).

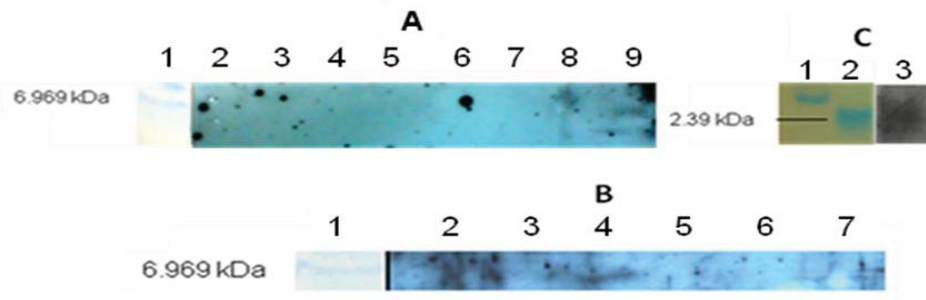


Figura 19. Inmunodetección del péptido CecA-1. Panel A. Carril 1, Marcador de peso molecular; carril 2, fracción citoplásmica (Fc) pTracerA-CecA-1; carril 3, Fc pTracerA-W2F; carril 4, pcDNA3-CecA-1; carril 5, pcDNA3-W2F; carril 6, Fc transfección pTracerA; carril 7, Fc células endoteliales; carril 8, fracción nuclear (Fn) pcDNA3-CecA-1; carril 9, pcDNA3-CecA-1 medio condicionando. **Panel B.** Medios condicionados (Mc) recuperados a las 24 hrs post transfección. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, Mc pTracerA CecA-1; carril 3, Mc pTracerA W2F; carril 4, Mc pcDNA3 CecA-1; carril 5, Mc pcDNA3 W2F; carril 6, Mc células endoteliales, carril 7, Mc pTracerA. **Panel C.** Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, péptido CecA-1 (SIGMA); carril 3, detección del péptido empleando el anticuerpo anti-CecA-1 (SIGMA), se observa la integridad de péptido CecA-1 con un peso de 2.39 kDa.

11. DISCUSIÓN

Aunque la leche de bovinos contiene proteínas de defensa como la lactoferrina, lizozima y lactoperoxidasa, Los tratamientos actuales para aliviar la mastitis se basan en el uso de antibióticos β -lactámicos y derivados de penicilinas (Ayliffe, 1997; Chambers, 2001). Estos antibióticos de naturaleza no proteica tienen un impacto benéfico en la salud del ganado y la producción de leche, aunque tiene algunos inconvenientes como: la estabilidad de sus componentes y la necesidad de un tiempo post-tratamiento prolongado, periodo en el cual la leche debe ser desechada con la consecuente pérdida económica para el ganadero.

Recientemente, han surgido propuestas de investigación para utilizar péptidos e incluso proteínas que posean propiedades contra diferentes patógenos causales de mastitis. Un ejemplo de esto es la generación de ratones transgénicos que secretan en leche lisostafina, una proteína que actúa contra *Staphylococcus aureus*. El potencial antimicrobiano de lisostafina para el control profiláctico y terapéutico de la mastitis ha sido inicialmente demostrado en ratones (Kerr *et al.*, 2001). La generación de ratones y ganado que secretan lizozima humana, lactoferrina humana o péptido antimicrobiano traqueal en la leche a resultado en el aumento de la resistencia de la glándula mamaria a diversas infecciones (Kerr *et al.*, 2001).

Así mismo, y aunque los PAMs muestran un marcado grado de variabilidad, poseen características estructurales que son importantes para su actividad antimicrobiana, entre las cuales destacan su naturaleza catiónica que facilita la interacción con membranas cargadas negativamente, la habilidad de formar estructuras anfipáticas y la estructura tridimensional característica, necesaria para llevar a cabo su actividad antimicrobiana (Zasloff, 2002).

En este trabajo se generaron cinco mutantes puntuales del péptido, substituyendo el amino ácido W por los amino ácidos D, F, G, K ó L. Posteriormente, se realizó la subclonación de estos productos de PCR en el plásmido pcDNA3 y pTracerA y se confirmó la construcción por secuenciación. Se obtuvo evidencia de la inserción del gen nativo *CecA-1* y mutantes puntuales por PCR del ADN en células endoteliales. Además, la expresión del gen *CecA-1* se detectó por RT-PCR. Por último, los ensayos de inmunodetección con anticuerpos policlonales específicos indicaron que *CecA-1* se secretó al medio. Esta aproximación establece las bases para realizar estudios posteriores para determinar la actividad de *CecA-1*

expresada en células endoteliales de bovino y la posibilidad de conferir protección a la glándula mamaria contra patógenos causales de mastitis.

Además, para tratar de establecer la importancia estructural y funcional de la posición W2 en el péptido maduro CecA-1 de *D. melanogaster*, se generaron cinco mutantes puntuales substituyendo el amino ácido W en dicha posición del péptido maduro por los amino ácidos D, F, G, K ó L (Fig. 8, mutantes puntuales generadas por PCR). Las mutaciones puntuales no modificaron el marco de lectura abierto correspondiente. Los aminoácidos seleccionados para sustituir el W en posición 2 se eligieron en base a las diferencias estructurales que presentan cada uno de estos, esperando obtener un patrón de relación estructura-actividad diferente a la forma nativa (tabla 5, secuencia de aminoácidos correspondientes a la forma nativa mutantes puntuales de CecA-1).

A nivel estructural el amino ácido W presenta una fuerte habilidad para insertarse y ubicarse en la interface de la bicapa lipídica (Fimland *et al.*, 2002; Killian *et al.*, 2000; Schibli *et al.*, 2002) y por consecuencia, la presencia de este amino ácido es trascendental para la actividad de algunos péptidos antimicrobianos en cuanto al número de organismos blanco se refiere.

Existen varios reportes que enfatizan la importancia de las mutaciones puntuales como una herramienta para el estudio en diferentes PAMs y para poder inferir algunas de las características que son importantes estructural y funcionalmente. Por ejemplo, con la intención de generar nuevos antibióticos de naturaleza peptídica se evaluaron derivados de diferentes péptidos, como se describe a continuación:

1) Gaegurina 4. Al generar un análogo, eliminando 14 residuos en C-terminal, se perdió la actividad antimicrobiana. Sin embargo, la mutación puntual en posición 16 en esta molécula mutante, cambiando el ácido aspártico (D) por W (D16W), se logró restablecer por completo la actividad antimicrobiana (Won *et al.*, 2002).

2) Maiganina. Al generar la mutación puntual del amino ácido glutamato (E) en posición 19, por el amino ácido alanina (A), se incrementó la actividad antimicrobiana y hemolítica del péptido (Cuervo *et al.*, 1990; Hirsh *et al.*, 1996).

3) La adición de un residuo W en péptidos α -hélice sintetizados químicamente constituidos por residuos arginina (R), valina (V), se observó incremento en actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* (Deslouches *et al.*, 2005).

4) Catelicidina. La sustitución del amino ácido W por el amino ácido A en posición 21, destruyó la α -hélice en C-terminal (Park *et al.*, 2002).

Con lo anterior se puede concluir que la presencia de residuos del amino ácido W está directamente relacionada con la actividad antimicrobiana de la molécula. Lo anterior demuestra la importancia de evaluar la trascendencia de un aminoácido en particular dentro de un péptido antimicrobiano de naturaleza péptica.

Con el fin de explorar si el aminoácido W en posición 2 de la CecA-1 madura es importante para la actividad antimicrobiana del péptido, se realizó la subclonación del gen nativo y mutantes puntuales en los plásmidos pcDNA3 (*CecA-1* nativo, y mutantes puntual W2D, W2F, W2G, W2K y W2L) y pTracerA (*CecA-1* nativo y mutante puntual W2F) (Fig. 10, carril 3) y se confirmó la construcción por secuenciación.

Posteriormente se realizó la transfección de las construcciones en pcDNA3 y pTracerA con la técnica de fosfato de calcio (Fig. 13, A y B), y se generaron las líneas celulares estables de las diferentes construcciones empleando puomicina para construcciones en pcDNA3 y zeocina para pTracerA, sin embargo no fue posible detectar el gen de *CecA-1* y mutantes puntuales correspondientes al evaluar el ADN genómico. Se decidió elegir dos plásmidos para la expresión de *CecA-1* en las BVE-E6E7 para incrementar la posibilidad de generar la expresión del cDNA de *CecA-1* y mutantes puntuales. En este trabajo la secuencia completa del pre-pro péptido de *CecA-1* fue incluida en los plásmidos usados para transfectar las BVE-E6E7 para asegurar la existencia de la información necesaria para procesar de manera correcta el péptido maduro tanto de *CecA-1* como en las cinco mutantes puntuales.

Los resultados anteriores evidenciaron que no era posible detectar ni el gen ni el transcrito y mucho menos el péptido (silvestre o mutante) en transfecciones estables, lo que nos llevó a decidir el trabajar con transfecciones transitorias. La generación de cultivos celulares estables

es una técnica que se basa en la integración al azar de genes dentro de cromosomas de células hospederas, la variación en la expresión puede ser el resultado de efectos posicionales relacionados a los sitios de integración en el cromosoma (Chicas y Macino, 2001). Generalmente los niveles de expresión del material genético introducido son bajos comparados con los niveles de expresión de genes endógenos (Al Shawi *et al.*, 1990), la integración de múltiples copias en sitios de integración pueden ser el motivo de estos bajos niveles de expresión (Andreas *et al.*, 1999). Por lo tanto, para determinar el tiempo óptimo de expresión del gen *CecA-1* en las BVE-E6E7, se realizaron transfecciones transitorias a las 24, 48 y 72 hrs con las construcciones en pTracerA *CecA-1* y pTracerA *W2F*, se obtuvo la amplificación de *CecA-1* y *W2F* a partir del ADN genómico (Fig. 15, pTracerA *CecA-1* carril 1-3 y carril 4-6 pTracer *W2F*.), mostrando que existe una disminución en la expresión del gen de *CecA-1* y *W2F* de manera proporcional al incremento de tiempo post-transfección. Se ha observado que el tiempo óptimo de expresión cuando se emplea el vector pTracer es de 48 a 72 hrs después de la transfección determinándose que el 20-40% de células CHO expresan GFP (Parisien *et al.*, 2007). Por lo tanto se decidió transfectar de manera transitoria durante 48 hrs.

Mediante RT-PCR se evaluaron las diferentes construcciones en pTracerA (*CecA-1* y *W2F*) y pcDNA3 (*CecA-1*, *W2D*, *W2F*, *W2G*, *W2K* y *W2L*) y se obtuvo evidencia de la amplificación únicamente de *CecA-1* y mutación puntual F (*W2F*) a partir del cDNA de las células endoteliales transfectadas (Fig. 17, carril 2 pTracer *CecA-1*; carril 3 pTracerA *W2F* y carril 6 pcDNA3 *W2F*).

Una vez determinado el tiempo óptimo de expresión de *CecA-1* en células transfectadas transitoriamente a partir de la amplificación del cDNA, se procedió a realizar la detección del péptido mediante inmunodetección. Por medio de ensayos tipo Western y empleando el anticuerpo policlonal dirigido contra cecropina (SIGMA), se evaluaron las diferentes fracciones celulares (Fracción nuclear, fracción citosólica y medio condicionado) recuperadas de transfecciones transitorias a las 48 hrs post-transfección de las células transfectadas con los genes nativo y mutantes de *CecA-1* acarreados por dos vectores diferentes: pcDNA3 y pTracerA.

Los resultados obtenidos demuestran que fue posible detectar un péptido con un peso molecular aparente de 4 kDa (que corresponde al peso estimado del péptido maduro de *CecA-1*) presente en el medio de cultivo celular un tiempo de 48 hrs pos-transfección transitoria, obteniéndose señal solo para las construcciones que pertenecen a la construcción pcDNA3 *CecA-1* (Fig. 19. Panel A carril 9; panel B carril 4). Esto aparentemente confirma que las células transfectadas excretan el péptido sintetizado, lo cual va de acuerdo con las observaciones de Faye y Wyatt (1980), quienes reportan que los péptidos antimicrobianos de *Hyalophora cecropia* producidos por células en cultivo *in vitro* son exportados hacia el medio (Samakovlis *et al.*, 1990).

De igual forma la secreción de otros péptidos de la familia de la cecropina han sido reportados en cultivos *in vitro* de líneas celulares de peces (Sarmasik y Chen, 2003), así como también las β -defensinas en líneas celulares humanas (Carretero *et al.*, 2004).

En cuanto a las BVE-E6E7 empleadas en este estudio, parece ser que se presenta una mayor afinidad al promotor del citomegalovirus humano presente en el vector pcDNA3, que al factor de elongación 1- α presente en el vector pTracerA. Esta observación se basa en el hecho de que a pesar de que fue posible amplificar por RT-PCR *CecA-1* y W2F en el cDNA de las BVE-E6E7 transfectadas con las construcciones en pTracerA (Fig. 17, carril 2 y 3) así como W2F en pcDNA3 (Fig. 17, carril 6). Únicamente fue posible detectar la expresión del péptido *CecA-1* en Mc de las BVE-E6E7 transfectadas con la construcción en pcDNA3 (Fig. 19, panel A carril 9 y panel B, carril 4) La mutación en W2 ha generado un patrón diferencial en el nivel de expresión de las mutantes puntuales (D, F, G, K, L) comparando la presencia de expresión de la forma nativa del gen *CecA-1* y ausencia expresión del péptido en mutantes puntuales, como puede observarse en la cantidad de ARNm (Fig. 17) y de péptido producido (Fig. 19). Estudios similares han reportado la detección de cecropina A2, de *Drosophila melanogaster* en su forma inmadura al ser expresadas en la línea celular de pulmón de hámster V79 (Pore *et al.*, 2000) lo cual evidencia la diversidad que pueden presentar algunas líneas celulares en cuanto a la capacidad de procesar cDNA exógenos y generar moléculas activas.

Con lo cual se puede inferir que posiblemente el péptido producto de mutantes puntuales no este siendo procesado de una manera adecuada y por consecuencia, no se esta generando el péptido en su forma madura, o en su defecto este adquiriendo una conformación distinta a la forma nativa y sea susceptible a proteasas presentes en el sistema de expresión.

Con estos resultados, se sientan las bases para proceder a la evaluación de la actividad microbica del péptido CecA-1 nativo y de las mutantes en W2.

La mastitis es la infección de la glándula mamaria más prevalente en ganado bovino. *Staphylococcus aureus* es el patógeno aislado comúnmente, resultando en un incremento del conteo de células somáticas, que disminuye la calidad de la leche así como su producción. Las infecciones producidas por este tipo bacteria han demostrado ser difíciles de controlar por que la resistencia que muestra hacia los antibióticos, generalmente asociadas a infecciones crónicas difíciles de diagnosticar (Brouillette, *et al.*, 2004; Von Eiff, *et al.*, 2006). En vacas altamente productivas, la incidencia de la enfermedad se torna crónica y puede ocurrir como resultado de la persistencia de las bacterias dentro de los fagocitos y otras células (Menzies y Kourteva, 1998; Sanchez *et al.*, 1994). Esta enfermedad se caracteriza por una respuesta inflamatoria en glándula mamaria causada por cambios metabólicos y fisiológicos, traumas o con mayor frecuencia, contagio de microorganismos patogénicos ambientales [Oviedo *et al.*, 2008]. La glándula mamaria esta protegida por una gran variedad de mecanismos de defensa, los cuales pueden ser separados en dos categorías: inmunidad inata e inmunidad específica

Las células endoteliales juegan un papel importante en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. La adhesión de las bacterias así como la interacción de toxinas bacterianas con este tipo celular induce la síntesis de TNF- α , IL-6 y la quimicocina IL-8, la activación de esta quimiocinas y citocinas activan la expresión de moléculas de adhesión como E-selectina, la molécula de adhesión intracelular 1 y la molécula de adhesión vascular 1. Esto propicia la unión de neutrófilos al endotelio, y su migración a través del epitelio y matriz subepitelial, para su localización final en el sitio de infección o en leche (Oviedo-Boyso *et al.*, 2006, Valbuena and Walker, 2006).

Los neutrófilos reclutados al sitio de infección fagocitan a las bacterias, si las bacterias invasoras sobreviven, la infiltración de neutrófilos es reemplazada por un breve periodo por

linfocitos T, B y monocitos, sin embargo los neutrófilos continúan siendo el tipo celular más importante que se encuentra en mastitis crónica (Oviedo-Boyso *et al.*, 2006, Valbuena and Walker, 2006).

Por la importancia de las células endoteliales en la activación de la respuesta inmune, su estudio representa un modelo de expresión interesante para PAMs pues este tipo celular esta presente en una alta proporción en glándula mamaria y posibilita inferir el comportamiento que mostraría CecA-1 de manera tejido específico.

12. CONCLUSIONES.

Se obtuvo evidencia de la presencia del péptido CecA-1 con el anticuerpo dirigido contra cecropina (SIGMA), presenta un peso aparente de 4 kDa, que corresponde al peso esperado para forma madura de CecA-1 de *Drosophila melanogaster*.

Las mutantes puntuales del gen de CecA-1, generadas al sustituir el triptófano en posición 2 (W2) por A, D, F, G, K, L respectivamente, mostraron diferentes niveles de expresión tanto en DNA, RNA que no se relaciona de manera directa con la detección del péptido, con lo que se puede inferir que la sustitución en la posición 2 del péptido CecA-1 es de gran importancia y la mutación producida puede estar afectado la estructura tridimensional y por consecuencia los dominios que presenta el péptido.

Con estos resultados, se sientan las bases para proceder a la evaluación de la actividad microbicida del péptido CecA-1 nativo y de las mutantes en W2.

13. BIBLIOGRAFÍA

Al Shawi, R., Kinnaird, J., Burke, J. and Bishop, J.O. 1990. **Expression of a foreign gene in a line of transgenic mice is modulated by a chromosomal position effect.** Mol. Cell. Biol. 10:1192-1198.

Andreas, F. K., Ansell, R., McWhir, J. and Siddell, S. G. 1999. **Insertion of a foreign gene into the β -casein locus by Cre-mediated site-specific recombination.** Gene 227:21-31.

Andreu, D., Merrifield, R. B., Steiner, H. and Boman, H. G. 1983. **Solid-phase synthesis of cecropin A and related peptides.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6475-6479.

Andreu, D., Merrifield, R. B., Steiner, H. and Boman, H. G. 1985. **N-terminal analogues of cecropin A: synthesis, antibacterial activity and conformational properties.** Biochem. 24:1683-1688.

Ayliffe, G. A. 1997. **The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Clin. Infect. Dis. 24:S74-S79.

Bierbaum, G. and Sahl, H. G. 1985. **Induction of autolysis of Staphylococci by the basic peptide antibiotics pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes.** Arch. Microbiol. 141:249-254.

Boulanger N. 2002. **Epithelial innate immunity. A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*.** J. Biol. Chem. 277:49921-49926.

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L. and Hoffmann, D. 1999. **Antimicrobial peptides in insects; structure and function.** Dev. Comp. Immunol. 23:329-344.

Bulet, P. and Stöcklin, R. 2005. **Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation.** Protein. Pept. Lett. 2005, 12, 3-11.

Bulet, P. and Stöcklin, R., Menin, L. 2004. **Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates.** Immunol. 198: 169–184.

Cajero-Juárez, M., Ávila, B., Ochoa, A., Garrido-Guerrero, E., Varela-Echavarría, A., Martínez de la Escalera, G. and Clapp, C. 2002. **Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium.** Eur. J. Cell Biol. 81:1-8.

Capparelli, R., Ventimiglia, I., Palumbo, D., Nicodemo, D., Salvatore, P., Amoroso, M. G. and Iannaccone, M. 2007. **Expression of recombinant puroindolines for the treatment of staphylococcal skin infections (*acne vulgaris*).** J. Biotech. 128:606-614.

Carretero, M., Del Rio, M., Garcia, M., Escamez, M. J., Mirones, I., Rivas, L., Balague, C., Jorcano, J. L and Larcher, F. 2004. **A cutaneous gene therapy approach to treat infection through keratinocyte targeted overexpression of antimicrobial peptides.** FASEB J 18:1931–1933.

Chambers, H. F. 2001. **The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?** Emerg. Infect. Dis. 7:178-182.

Chicas, A. and Macino, G. 2001. **Characteristics of post-transcriptional gene silencing.** EMBO Rep. 2:992-996.

Crist, W. L., Harmon, R. J., O'Leary, J. and McAllister, A. J. 1997. **Mastitis and control.** University of Kentucky Cooperative Extension Service.

Cuervo, J. H., Rodriguez, B, and Houghten, R. A. 1990. **Synthesis and antimicrobial activity of magainin alanine substitution analogs.** 124-126 *In* J. E. Rivier and G. R. Marshall (ed.), Peptides. ESCOM, Leiden. The Netherlands.

DeLucca, A. J., Bland, J. M., Jacks, T. J., Grimm, T. E. and Walsh, T. J. 1997. **Fungicidal activity of Cecropin A.** Antimicrob. Agents. Chemother. 41:481-483.

Deslouches, B., Phadke, S. M., Lazarevic, V., Cascio, M., Islam, K., Montelaro, R. C. and Mietzner, T. A. 2005. **De novo generation of cationic antimicrobial peptides: Influence of length and tryptophan substitution on antimicrobial activity.** Antimicrob. Agents and chemother. 49: 316-322.

Dimarcq, J. L., Bulet, P., Hetru, C. and Hoffmann, J. 1998. **Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates.** Biopolymers. 47:465-477.

Eberhart, T. **Conceptos actuales de mastitis bovina.** 1990. 3rd. Ed. Babson BROS. Co. Surge International.

Fallon, A. M. and Dongxu, S. 2000. **Exploration of immunity using cells in culture.** Insect. Biochem. Mol. Biol. 31:263-278.

Fimland, G., Eijsink, V. G. and Nissen-Meyer, J. 2002. **Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide.** Biochem. 41:95508-9515.

Fisher, C. L. and Pei, G. K. 1997. **Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method.** Biotech. 23:570-574.

Frandsen, R. D and Spurgeon, T. L. 1995. **Anatomía y fisiología de los animales domésticos.** Interamericana-McGraw-Hill. Mex.

Fraser, C. M. y Bergeron, J. A. 1993. **Manual Merk de Veterinaria.** 4^a Ed. Océano/Centrum. Barcelona, España.

Frohman, M. 1997. **The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders.** J. Biol. Chem. 272:15258-15263.

Ganz, T. 2002. **Epithelia: not just physical barriers.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:3357-3358.

García-Olmedo, F., Molina. A., Alamillo, J. M. and Rodriguez-Palenzuela, P. 1998. **Plant defense peptides.** Biopolymers. 47: 479-491.

Gazit, E., Boman, H. G. and Shai, Y. 1995. **Interaction of mammalian antibacterial cecropin P1 with phospholipid vesicles.** Biochem. 34:11479-11488.

Gennaro, R. and Zanetti, M. 2000. **Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides.** Biopolymers. 55:31-49

Hancock, R. E. W and Diamond, G. 2000. **The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses.** Trends Microbiol. 8:402-410.

Heuer, O. E., Hammerum, A. M., Collignon, P. and Wegener, H. C. 2006. **Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food.** Clin. Inf. Dis. 43: 911-916.

Hirsh, D. J., Hammer, J., Maloy, W., Blazyk, J. and Schaefer, J. 1996. **Secondary structure and location of a magainin analogue in synthetic phospholipid bilayers.** Biochem. 35:12733–12741.

Huttner, K. M. and Bevins, C. L. 1999. **Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense.** Pediatric Res. 45:785-794.

Infante-Martínez, F., Aguado, J. and Eduard-Jasper, D. 1999. **Mastitis outbreak due to Mycoplasma californicum and Mycoplasma canadense in a commercial dairy herd in the state of Jalisco, México.** Rev. Latinoam. Microbiol. 41(3):117-20.

Kerr, D. E., Plaut, K., Bramley, J., Williamson, C. M., Lax, A.J., Moore, K., Welle, K. D. and Wall, R. J. 2001. **Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice.** Nature Biotech. 19:66-70.

Killian, J. A. and von Heijne, G. 2000. **How proteins adapt a membrane-water interface.** Trends Biochem. Sci. 25:429-434.

Kim, H. S. 2000. **Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I.** J. Immunol. 165:3268-3274.

Kragol, G. 2001. **The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding.** Biochem. 40: 3016-3026.

Krishnakumari, V. and Nagaraj, R. 1997. **Antimicrobial and hemolytic activities of cabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs.** J. Pept. Res. 50:88-93.

Kuhn-Nentwig, L., Muller, J., Schaller, J., Walz, A., Dathe, M. and Nentwig, W. 2002. **Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei*.** J. Biol. Chem. 277:11208-11216.

Lamberty, M. 2001. **Insect immunity. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect.** J. Biol. Chem. 276: 4085-4092.

Lamberty, M. 2001. **Solution structures of the antifungal heliomicin and selected variant with both antibacterial and antifungal activities.** Biochem. 40:11995-12003.

Lee, I. H., Lehrer, R. and Cho Y. 1997. **Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins.** Infect. Immun. 65: 2898-2903.

Lee, I. H., Zhao, C., Cho, Y., Harwig, S. S., Cooper, E. L. and Lehrer, R. I. 1997. **Clavanins, α -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes.** FEBS Lett. 400:158-162.

Lowenberger, C., Charlet, M., Vizioli, J., Kamal, S., Richman, A., Christensen, B. M. and Bulet, P. 1999. **Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito *Aedes aegypti*.** J. Biol. Chem. 274:20092-20097.

Lowenberger, C. 2001. **Innate immune response of *Aedes aegypti*.** Insect Biochem. Mol. Biol. 31:219-29.

Ludtke, S.J., He, K., Heller, W.T., Harroun, T.A., Yang, L. and Huang, H.W. 1996. **Membrane pores induced by magainin.** Biochem. 35(43):13723-8.

Maloy, W. L. and Kari, U. P. 1995. **Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides.** Biopolymers. 37:105-122.

Mandard, N., Bulet, P., Hetru, C., Landon, C. and Vovelle, F. 2002. **Solution structure of antimicrobial peptides with a β -hairpin fold. Structure-activity relationships.** Research signpost. 17:155-171.

Matsuzaki, K. 2001. **Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defence?** Biochem. Soc. Trans. 29:598-601.

Merrefield, R. B., Vizioli, L. D. and Boman, H. G. 1982. **Synthesis of the antibacterial peptide cecropin A.** Biochem. 21:5020-5031.

Morassutti, C., De Amicis, F., Bandiera, A. and Marchetti, S. 2005. **Expression of SMAP-29 cathelicidin-like peptide in bacterial cells by intein-mediated system.** Protein Expr. Purif. 39(2): 160-168.

Ochoa-Zarzosa, A., Loeza-Angeles, H., Sagrero-Cisneros, E. Villagómez-Gómez, E., Lara-Zárate, L. and López-Meza, J.E. 2007. **Antibacterial activity of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed by bovine endothelial cells against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis.** Vet. Microbiol. 127(3-4):425-30.

Oren, Z. and Shai, Y. 1996. **A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*.** Eur. J. Biochem. 237:303-310.

Oren, Z. and Shai, Y. 1998. **Model of action of linear amphipatic α -helical antimicrobial peptides.** Biopolymers. 47:451-463.

Orivel, J. 2001. **Ponericsins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*.** J. Biol. Chem. 276: 17823-17829.

Oviedo-Boyso J., Valdez-Alarcon, J. J., Cajero-Juarez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A. and Baizabal-Aguirre, V. M. 2007. **Innate response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis.** J. Infect. 54:399-409.

Oviedo-Boyso, J., Barriga-Rivera, J. G., Valdez-Alarcón, J. J., Bravo-Patiño, A., Cárabez-Trejo, A., Cajero-Juárez, M. and Baizabal-Aguirre, V. M. 2008. **Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of nf- κ b and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β .** Scand. J. Immunol. 67: 169-176.

Panyutich, A., Shi, J., Boutz, P. L., Zhao, C and Ganz, T. 1997. **Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted propegrins.** Infect. Immun. 65:978-985.

Parisien, A., Allain, B., Zhang, J. A, Mandeville, R. and AIn, C. Q. 2007. **Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides.** J. of App. Microbiol. 104: 1–13.

Park, I. Y., Park, C. B. and Kim, M. S. 1998. **Parisin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*.** FEBS Lett. 437:258-262.

Park, C. B., Lee, J. H., Park, I. Y., Kim M. S. and Kim, S. C. 1997. **A novel antimicrobial peptide from the laoch, *Misgumus anguilicaudatus*.** FEBS Lett. 411:173-178.

Park, K., Oh, D., Shin, S. Y., Hahm, K. S. and Kim, Y. 2002. **Structural studies of porcinemyeloid antibacterial peptide PMAP-23 and its analogues in DPC micelles by NMR spectroscopy.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 290: 204–212.

Pistolesi, S., Pogni, R. and Feix, J. B. 2007. **Membrane insertion and bilayer perturbation by antimicrobial peptide CM15.** Biophys. J. [doi: 10.1529/biophysj.107.104034](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104034).

Pore, N and Pal, S. 2000. **Expression of the antibacterial peptide, cecropin, in culture mammalian cells.** Biotech. Lett. 22:151-155.

Ruegg, L. P. 2001. **Secreción de leche y estándares de calidad.** Universidad de Wisconsin, Madison, USA.

Samakovlis, C., Kimbrell, D. A., Kylsten, P., Engström, A. and Hultmark, D. 1990. **The immune response in *Drosophila* pattern of cecropin expression and biological activity.** EMBO J. 9:2969-2976.

Sarmasik, A and Chen, T. T. 2003. **Bactericidal activity of cecropin B and cecropin P1 expressed in fish cells (CHSE-214): application in controlling fish bacterial pathogens.** Aquaculture 220:183–194.

Schägger, H. and von Jagow G. 1987. **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.** Anal. Biochem. 166:368-379.

Schibli, D. J., Epanand R. F., Vogel, H. J. and Epanand, R. M. 2002. **Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions.** Biochem. Cell Biol. 80:667-677.

Shai, Y. 1999. **Mechanisms of the binding, insertion, and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides.** Biochem. Biophys. Acta. 1462:55-70.

Simmaco, M., Mignogna, G. and Barra, D. 1998. **Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us?** Biopolymers. 47: 435-450.

Smith, A. and Hogan, H. 1997. **Proceedings of symposium on Udder Health Management for environmental Streptococci.** University of Guelph. Ontario, Canada. June 22.

Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H and Boman, H. G. 1981. **Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity.** Nature. 292: 246-248.

Tang, Y. Q. 1999. **A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins.** Science. 286: 498-502.

Teuber, M. 2001. **Veterinary use and antibiotic resistance.** Curr. Opin. Microbiol. 4:493-499.

Tollersrud, T., Kenny, K., Reitz, Jr. A. J. and Lee, J. C. 2000. **Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolate of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and United States.** J. Clin. Microbiol. 38:2998-3003.

Valbuena, G. and Walker, D. H. 2006. **The endothelium as a target for infections.** Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 1:171-198.

Wall, R. J., Powell, A. M., Paape, M. J., Kerr, D. E., Bennerman, D. D., Pursel, V. G., Wells, K. D., Talbot, N. and Hawk, H. W. 2005. **Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection.** Nature. 23:445-51.

Wattiaux, M. A. 2002. **Reproducción y selección genética**. Cap. 20. Universidad de Wisconsin. Secreción de leche por la ubre de una vaca lechera. Babcock.cals.wisc.edu/edu/spanish/del/html/ch20/repro_spn_ch20.html-(8 de septiembre 2002).

Westerhoff, H. V., Juretic, D., Hendler, R. W. and Zasloff, M. 1989. **Magainins and the disruption of membrane-linked free energy transduction**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6597-6601.

Won, H. S., Park, S. H., Kim, H. E., Hyun, B., Kim, M., Lee, B. J. and Lee, B. J. 2002. **Effects of a tryptophanyl substitution on the structure and antimicrobial activity of C-terminally truncated gaegurin 4**. Eur. J. Biochem. 269:4367-4374.

Yang, L., Weiss, T. M., Lehrer, R. I. and Huang, H. W. 2000. **Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin**. Biophys. J. 79:2002-2009.

Zasloff, M. 2002. **Antimicrobial peptides of multicellular organisms**. Nature 415:389-395.

Zasloff, M. 1987. **Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:5449-5453.

Zhao, C., Liaw, L., Lee, I. H. and Lehrer, R. I. 1997. **cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Syela clava***. FEBS Lett. 412:144-148.

Zhang, J. X., Zhang, S. F., Wang, X. J., Guo, X. J. and Hu, R. L. 2007. **Mammary gland expression of antibacterial peptide genes to inhibit bacterial pathogens causing mastitis**. 2007. J. Dairy Sci. 90:5218-5225.