



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**Efecto de los péptidos antimicrobianos γ -tionina de *Capsicum chinense*
y Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* producidos por células endoteliales
bovinas sobre patógenos intracelulares: *Escherichia coli*,
Staphylococcus aureus y *Candida albicans***

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA:

BIOL. HEBER LOEZA ÁNGELES

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

Directora de Tesis: Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa

Co-Asesor de Tesis: Dr. Joel Edmundo López Meza

Morelia, Michoacán, México

Abril, 2010

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y la co-asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza. Para su realización se contó con el financiamiento del CONACYT (CB 2007-83895, FOMIX MICH-2009-C05-115926 y Beca 215489)

*“No estaré de acuerdo con lo que dices, pero daría mi vida por defender
tu libertad de expresión”*

François Marie Arouet, *Voltaire*

(1694 – 1778)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y al Dr. Joel Edmundo López Meza, por su asesoría en la realización de éste proyecto, pero sobre todo por su amistad y apoyo en todos estos años.

A los miembros del comité tutorial; Dr. José Eleazar Barboza Corona, Dr. Horacio Cano Camacho y al Dr. Gerardo Vázquez Marrufo por sus comentarios, sugerencias y confianza para la realización del proyecto.

A mis profesores de la Maestría en general, pero en particular a los docentes del CMEB; Dr. Marcos Cajero Juárez, Dr. Alejandro Bravo Patiño, Dr. Victor Manuel Baizabal Aguirre, Dr. Juan José Valdez Alarcón, Dra. María Guadalupe Zavala Páramo y al Dr. Omar Chassin Noria por compartirme sus valiosos conocimientos.

A mis compañeros y amigos del CMEB; Lety, Naye, Ely, Huante y Ana por brindarme su amistad y apoyo dentro y fuera del laboratorio, siendo vital para el desarrollo de éste proyecto.

Le agradezco a mi distinguido amigo y proveedor “Luigüi”, por su apoyo con materiales y conocimientos, logrando culminar a tiempo éste proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (215489) para la realización de este proyecto.

¡Muchas gracias!

A mis padres, Ma. Luisa y Leodegario, que me han sabido guiar por el camino de la rectitud, de la moral, la perseverancia y honradez, lo que me ha ayudado a alcanzar una meta más en vida, mil gracias.

A mis hermanos, Iram y Mayra Gpe., que han sido mi fuerza e inspiración para seguir adelante.

A mi sobrino, Iram Eduardo, por iluminar mi vida día a día con su inocencia y alegría.

A mis abuelos, por darles la vida a mis padres y haberlos encausado a la enseñanza de firmes valores que serán transmitidos por generaciones.

A Angélica, por brindarme su apoyo y confianza, pero sobre todo, por acrecentar la familia como un miembro más.

A Isaac, por brindarme su amistad incondicional y ser un aliciente en el desarrollo de éste proyecto.

A todas las personas que están o han estado a mi alrededor que han creído en mí.

¡Muchas gracias!

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEORICO	5
3.1 Generalidades de los PA	5
3.2 Diversidad de los PA	5
3.3 Mecanismos de acción	7
3.4 Mecanismos intracelulares de los PA	10
3.5 PA de plantas	12
3.6 Tioninas	13
3.6.1 Tionina 2.1	14
3.7 Defensinas de plantas	14
3.7.1 γ -tionina de <i>Capsicum chinense</i>	15
3.8 Inmunidad innata	15
3.9 Mecanismos de acción y evasión del sistema inmune de patógenos intracelulares	16
3.10 Producción de óxido nítrico	17
3.10.1 Producción de óxido nítrico en células endoteliales	19
3.10.2 Producción de óxido nítrico en células epiteliales de glandula mamaria	20
3.10.3 Inducción de la producción de óxido nítrico por péptidos antimicrobianos catiónicos	20
3.11 Patógenos intracelulares	21
3.11.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.11.1.1 Internalización de <i>Staphylococcus aureus</i> en células fagocíticas no profesionales	22
3.11.2 <i>Escherichia coli</i>	24
3.11.2.1 Internalización de <i>Escherichia coli</i> en epitelio mamario bovino (células fagocíticas no profesionales)	24

3.11.2.2 Invasión de <i>Escherichia. coli</i> en células intestinales epiteliales (Caco-2)	25
3.11.3 <i>Candida albicans</i>	26
3.11.3.1 Internalización de <i>Candida albicans</i> en células fagocíticas no profesionales	27
4. ANTECEDENTES	28
5. JUSTIFICACIÓN	28
6. HIPÓTESIS	30
7. OBJETIVO GENERAL	30
7.1 OBJETIVOS PARTICULARES	30
8. EXTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
9. MATERIALES Y METODOS	32
9.1 Diagrama general de la estrategia metodológica	32
9.2 Aislamientos de <i>Escherichia coli</i> de casos de mastitis	33
9.3 Caracterización de los aislamientos de <i>Escherichia coli</i>	33
9.4 Microorganismos	33
9.5 Líneas celulares	34
9.6 Ensayo de endocitosis de las cepas de <i>Escherichia coli</i> y de coliformes sobre CEMB y Caco-2	34
9.7 Obtención del MC de las células endoteliales productoras de la defensina γ -tionina de <i>C. chinense</i> y de la tionina Thi2.1 de <i>A.</i> <i>thaliana</i>	35
9.8 Cuantificación del óxido nítrico (NO) producido por las CEMB y BVE-E6E7	36
9.9 Actividad antimicrobiana intracelular de los medios condicionados de las células endoteliales productoras de la defensina γ -tionina de <i>C.</i> <i>chinense</i> y de la tionina Thi2.1 de <i>A. thaliana</i>	36
9.10 Análisis estadístico	36
10. RESULTADOS	38
10.1 Capacidad de endocitosis de los aislamientos de bacterias coliformes de casos de mastitis bovina en CEMB	38
10.2 Capacidad de endocitosis de los aislamientos de bacterias coliformes	39

de los casos de mastitis bovina en la línea intestinal humana CaCo-2	
10.3 Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de <i>Staphylococcus aureus</i> en CEMB	40
10.4 Producción de óxido nítrico en las CEMB sin infectar (basal) e infectadas con <i>Staphylococcus aureus</i> en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1	41
10.5 Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de <i>Staphylococcus aureus</i> en BVE-E6E7	43
10.6 Producción de óxido nítrico en las BVE-E6E7 sin infectar (basal) e infectadas con <i>Staphylococcus aureus</i> en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1	44
10.7 Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de <i>Candida albicans</i> en BVE-E6E7	44
10.8 Producción de óxido nítrico en las BVE-E6E7 sin infectar (basal) e infectadas con <i>Candida albicans</i> en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1	46
11. DISCUSIÓN	48
12. CONCLUSIONES	52
13. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo electrostático de los péptidos antimicrobianos sobre la superficie de las bacterias Gram negativas y Gram positivas.	7
Figura 2. Mecanismo de acción probable del péptido antimicrobiano Rs AFP2.	8
Figura 3. Inducción de las defensinas en respuesta a la infección viral en células de mucosa epitelial.	9
Figura 4. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos sobre las células tumorales.	10
Figura 5. Acción intracelular de algunos péptidos antimicrobianos.	11
Figura 6. Dominios de la tionina Thi2.1.	14
Figura 7. Secuencia putativa de aminoácidos de la γ -tionina de <i>Capsicum chinense</i> predicha a partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc.	15
Figura 8. Sintetasa de óxido nítrico	18
Figura 9. Capacidad de endocitosis de los aislamientos de bacterias coliformes de los casos de mastitis bovina en CEMB.	38
Figura 10. Capacidad de endocitosis de los aislamientos de bacterias coliformes de los casos de mastitis en la línea CaCo-2.	39
Figura 11. Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la	40

defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 en CEMB.

- Figura 12. Producción de óxido nítrico en CEMB sin infectar e infectadas con *Staphylococcus aureus* en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1. 42
- Figura 13. Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 en BVE-E6E7. 43
- Figuras 14. Producción de óxido nítrico en las BVE-E6E7 sin infectar e infectadas con *Staphylococcus aureus* en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1. 45
- Figura 15. Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de *Candida albicans* ATCC 10230 en BVE-E6E7. 46
- Figuras 16. Producción de óxido nítrico en las BVE-E6E7 sin infectar e infectadas con *Candida albicans* en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1. 47
- Figura 17. Mecanismos de acción de manera directa e indirecta de la tionina Thi2.1 (a) y de la defensina γ -tionina (b) sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* endocitados en CEMB y BVE-E6E7. 51
-
-

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla1. Clasificación de los péptidos antimicrobianos basada en los aminoácidos que los componen, la carga neta y la estructura secundaria.	6
Tabla 2. Péptidos antimicrobianos de plantas.	13
Tabla 3. Microorganismos que se utilizaron en este trabajo.	34
Tabla 4. Líneas celulares de mamífero que se utilizaron en este trabajo.	35

1. RESUMEN

Los péptidos antimicrobianos (PA) están ampliamente distribuidos en los cinco reinos, su función es proteger a los seres vivos contra organismos patógenos. El desarrollo de la Biotecnología ha permitido explorar el efecto de los PA sobre microorganismos patógenos de animales empleando sistemas alternativos heterólogos para su expresión. Reportes previos en el laboratorio han mostrado que el empleo del endotelio bovino es un modelo adecuado de expresión de PA de plantas. Se ha evaluado la capacidad antimicrobiana de la γ -tionina de *Capsicum chinense*, expresada por las células endoteliales bovinas, demostrándose su actividad sobre el hongo *Candida albicans* y la línea tumoral HeLa (Anaya-López *et al.*, 2006a), así como la actividad antimicrobiana de la tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* expresada también por células endoteliales, la cual presenta actividad contra bacterias patógenas Gram positivas, como lo son diversos aislamientos de *Staphylococcus aureus* de casos de mastitis bovina (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008a), bacterias patógenas Gram negativas como *Escherichia coli* enteropatogénica (responsables de diarreas en humanos), contra hongos como *C. albicans* y hacia células tumorales de humano (Loeza-Ángeles *et al.*, 2008). En este sentido, el empleo de los PA representa una nueva estrategia de tratamiento de las enfermedades infecciosas, como alternativa al uso indiscriminado de antibióticos y en consecuencia a la selección de cepas resistentes a los mismos (Brogden, 2005). Recientemente se ha reportado que los PA como las puroindolinas del trigo, la magainina-2 de rana y la buforina de sapo, tienen capacidad antibacteriana en contra de patógenos intracelulares (Takeshima *et al.*, 2003; Capparelli *et al.*, 2007; Imura *et al.*, 2008). En base a lo mencionado anteriormente y debido a los efectos antifúngicos, bacterianos y citotóxicos del péptido Thi2.1 y antifúngico y citotóxico de la γ -tionina que han demostrado en contra de patógenos de plantas, animales y humanos (Anaya-López *et al.*, 2006a; Loeza-Ángeles *et al.*, 2008) se abre la posibilidad de probar su efecto sobre los patógenos intracelulares *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Para la realización de este trabajo se utilizó la cepa de *C. albicans*, la cual puede invadir células endoteliales bovinas (Anaya-López *et al.*, 2006b), la cepa de *S. aureus*, la cual puede invadir células de epitelio mamario bovino y células endoteliales bovinas (Anaya-López *et al.*, 2006b; Oviedo-Boyso *et al.*, 2008) y las cepas de *E. coli* que se emplearon presentan algunas capacidad invasiva en células epiteliales humanas (Boudeau *et al.*, 1999). Adicionalmente, se colectaron aislamientos de *E. coli* de

casos de mastitis bovina, y se evaluó su capacidad de invasión en las CEMB y en células intestinales humanas (Caco-2). Los aislamientos que demostraron propiedades invasivas se seleccionaron para evaluar las propiedades antibacterianas de los PA γ -tionina y tionina Thi2.1 producidos por las células endoteliales. Desafortunadamente en este trabajo no se encontró ningún aislamiento o cepa de *E. coli* capaz de internalizarse considerablemente en las células Caco-2, probablemente por la producción inmediata de iNOS o NO después de la infección del patógeno (Witthöft *et al.*, 1998) o por la producción de PA como las β -defensinas 1 y 2 (O'Neil *et al.*, 1999; Shelee *et al.*, 2007; Vora *et al.*, 2004), α y β - defensinas 5 y 6 (Wehkamp *et al.*, 2002) los cuales eliminan a patógenos ajenos a la microflora intestinal. En cuanto a los PA γ -tionina y la tionina Thi2.1 evaluados sobre patógenos intracelulares se demostró que la tionina Thi2.1 presenta actividad antimicrobiana en contra de los patógenos *S. aureus* y *C. albicans* una vez endocitados en CEMB y BVE-E6E7; mientras que la γ -tionina muestra actividad antibacteriana en contra de *S. aureus*, a través de regular la producción de NO en células CEMB y BVE-E6E7 como una característica de los PA. En cuanto a los efectos antifúngicos que presenta la γ -tionina en contra de *C. albicans* endocitado en las BVE-E6E7, éstos son efectos directos no mediados por la producción de NO.

2. INTRODUCCIÓN

Los péptidos antimicrobianos (PA) están ampliamente distribuidos en la naturaleza, desempeñando una función de protección importante en los seres vivos. Se han aislado y/o detectado en animales, plantas, bacterias, hongos y virus, y han mostrado tener una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos e incluso virus (Thevissen *et al.*, 1996).

El principal mecanismo de acción de los PA es la lisis directa de la membrana plasmática de los microorganismos; sin embargo, a la fecha también se han descrito propiedades quimiotácticas, que les permiten modular al sistema inmune, y de esta forma constituir un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Ganz, 2003). En los organismos eucariotes forman parte importante de la inmunidad innata contra los patógenos, mientras que en los procariotes desempeñan funciones de defensa contra otros microorganismos (Hancock y Chapple, 1999; Brogden, 2005).

Los PA se han identificado principalmente en las zonas de los organismos que están expuestas al contacto con los patógenos. Por ejemplo, en los vertebrados se producen principalmente en la piel y el epitelio del tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, algunos son almacenados en vesículas y células fagocíticas móviles que pueden ser liberados en los sitios de la infección (Kamysz *et al.*, 2003). En las plantas se producen en los primordios foliares, las células colindantes a la cavidad subestomal, la epidermis y los estomas (García *et al.*, 1998).

Las plantas producen diversos tipos de PA entre los que destacan las defensinas y las tioninas (Lay y Anderson, 2005). Por ejemplo, en Chile (*Capsicum chinense*) se ha reportado la expresión de la defensina γ -tionina, detectándose sus transcritos en las raíces, el tallo, las hojas, las flores y las semillas. Los niveles del transcrito son relativamente bajos en las hojas y no han sido detectados en las paredes del fruto (Aluru *et al.*, 1999). Por otra parte, en *Arabidopsis thaliana*, una de las plantas modelo para la investigación y el desarrollo genómico, se ha identificado el PA tionina Thi2.1 (Thi2.1) que se expresa constitutivamente en flores, silicuas y hojas (Epple *et al.*, 1995). Se ha reportado también la expresión inducida de Thi2.1 en respuesta a infecciones por hongos fitopatógenos, principalmente por especies del género *Fusarium* (Epple *et al.*, 1997; Vignutelli *et al.*, 1998; Zasloff, 2002).

Algunos PA tienen actividad de amplio espectro, y pueden actuar de manera indistinta sobre los microorganismos y las células eucariotas, mientras que otros son selectivos y afectan únicamente a los microorganismos o a células cancerígenas por ejemplo, sin dañar a las células normales. En base a su actividad, selectividad, rápida acción y a que la generación de resistencia por parte de los microorganismos patógenos hacia los PA no es un evento común, algunos de ellos ya están siendo utilizados como agentes terapéuticos, clínica y comercialmente (Lupetti *et al.*, 2002; Papo y Shai, 2005).

Diversos patógenos de mamíferos tienen la capacidad de sobrevivir en el interior de las células del hospedero, lo que genera que el sistema inmune no tenga acceso a los mismos, y que el tratamiento con antibióticos o antimicóticos convencionales no tenga resultados favorables (Mitchell, 1998; Alonso y García del Portillo, 2004). Recientemente se ha reportado que los PA puroindolinas del trigo, tienen capacidad bactericida en contra de *Staphylococcus epidermidis* intracelular, causante de infecciones en la piel (Capparelli *et al.*, 2007). Con base en lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la capacidad antibacteriana y fungicida de los PA γ -tionina de *C. chinense* y Thi2.1 de *A. thaliana* producidos por endotelio bovino, sobre patógenos bacterianos y fúngicos intracelulares de mamíferos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de los PA

Se cree que los PA existen desde el inicio de la evolución de la respuesta inmune. Se encuentran distribuidos en todos los reinos, lo que indica que constituyen una parte esencial de la inmunidad de los organismos multicelulares ya que son producidos por casi todos los seres vivos. Los PA generalmente contienen de 15 a 50 residuos de aminoácidos (aa) y en su gran mayoría poseen una carga neta positiva (catiónicos), además de que tienen la propiedad de ser anfipáticos (Hancock y Lehrer, 1998; Kaiser y Diamond, 2000; Zasloff, 2002).

Se utiliza el término de PA debido a que la mayoría posee actividad antimicrobiana de amplio espectro como la indolicina de neutrófilos de bovino, la cual puede matar bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, hongos como *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, linfocitos T de rata y de humano, células cancerígenas, e incluso inactivar virus como el de la inmunodeficiencia humana (VIH) y del herpes simple. Sin embargo, no todos los PA presentan este espectro amplio de actividad ya que algunos de ellos solo son activos contra un tipo de microorganismo (Sitaram y Nagaraj, 1999; Hancock y Scott, 2000; Risso, 2000).

El mecanismo de acción de los PA se basa principalmente en interacciones electrostáticas con los fosfolípidos de las membranas de las células blanco (Zasloff, 2002), en la permeabilización de la membrana, o en la formación de poros en la membrana plasmática y como consecuencia se presenta lisis celular por choque osmótico (Ogata *et al.*, 1992; Boman, 1995, 2003).

3.2 Diversidad de los PA

En base a la secuencia de sus ácidos nucleicos, hasta el año 2005 se conocían alrededor de 900 PA producidos en distintos tejidos y tipos celulares de una gran variedad de especies de plantas y animales (Brogden, 2005). Los PA se agrupan en familias de acuerdo con su tamaño (número de aa), su estructura (lineales, α -helicoidales, β -laminales, y β -circulares o cíclicos) y la organización de los aa que los conforman (que proporcionan la carga neta). La mayoría de los PA tienen carga positiva debido a la presencia de un gran número de aa básicos (en su mayoría lisina y arginina). Aproximadamente el 50% de los aa que los constituyen son

hidrofóbicos. Los PA también establecen puentes de disulfuro, que les proporcionan estabilidad a las estructuras α y β (Kamysz *et al.*, 2003). Sin embargo, la conformación de los PA puede cambiar de acuerdo al medio en el que se encuentre, por ejemplo; en soluciones acuosas, los péptidos helicoidales son generalmente muy flexibles para mostrar sus propiedades anfipáticas que requieren para ejercer su actividad antimicrobiana (Bradshaw, 2003).

También existen PA aniónicos (cargados negativamente) que son ricos en ácidos aspártico y glutámico. Los péptidos aniónicos que contienen zinc o péptidos catiónicos muy cargados, son más activos que los péptidos con menor carga o neutros (Kamysz *et al.*, 2003).

Los PA conocidos hasta ahora, se clasifican en cinco grupos de acuerdo a su composición de aa, carga y estructura (Tabla 1).

Tabla1. Clasificación de los péptidos antimicrobianos basada en los aminoácidos que los componen, la carga neta y la estructura secundaria.

Grupo	Péptido representativo	Origen
Péptidos aniónicos	Dermacidina	Glándulas sudoríparas humanas
Péptidos catiónicos lineales con estructura de hélice α	Melitina Magainina 2 Cecropina A Dermaseptina	Veneno de abeja Piel de anfibios Insectos Piel de anfibios
Péptidos catiónicos ricos en ciertos aa	Histatina-5 (ricos en histidina) PR-39 (ricos en prolina y arginina)	Saliva humana Neutrófilos de cerdo
Péptidos aniónicos y catiónicos que contienen cisteína y forman puentes disulfuro	Defensinas Tioninas Péptido antimicrobiano de tráquea (TAP) Defensina humana- β 2 (hBD-2) Drosomicina β defensina HNP-1	Epitelios de mamíferos e insectos Plantas Mucosa respiratoria de bovino Mucosa oral y glándulas salivales humanas Mosca Neutrófilos humanos
Péptidos catiónicos y aniónicos (fragmentos de proteínas más grandes)	Lactoferricina	Leche bovina

Epand y Vogel, 1999; Bradshaw, 2003; Brogden, 2005.

3.3 Mecanismos de acción

El mecanismo exacto por el cual los PA rompen la membrana plasmática puede variar entre los distintos tipos de péptidos, el organismo con el cual interacciona o la concentración del mismo (Bradshaw, 2003).

En el caso de bacterias, la interacción entre los PA catiónicos y los fosfolípidos aniónicos de la membrana (fosfatidilglicerol y cardiolipina) y los grupos fosfatos del lipopolisacárido (LPS) en bacterias Gram negativas, y ácidos teicoicos en bacterias Gram positivas se presenta a través de mecanismos electrostáticos, constituyendo el primer paso de acción. Posteriormente, el o los péptidos que se encuentran en estrecho contacto con la célula bacteriana, deben atravesar el polisacárido capsular o los ácidos teicoico y lipoteicoico para poder interactuar con la membrana plasmática. Una vez que los péptidos han contactado con ésta, pueden interactuar con la bicapa lipídica. El segundo paso es la permeabilización de la membrana. Este mecanismo se da por la formación de poros en la membrana debido a las interacciones y arreglos de los PA (Figura 1). Como resultado se lleva a cabo la lisis celular por choque osmótico (Ogata *et al.*, 1992; Boman, 1995, 2003).

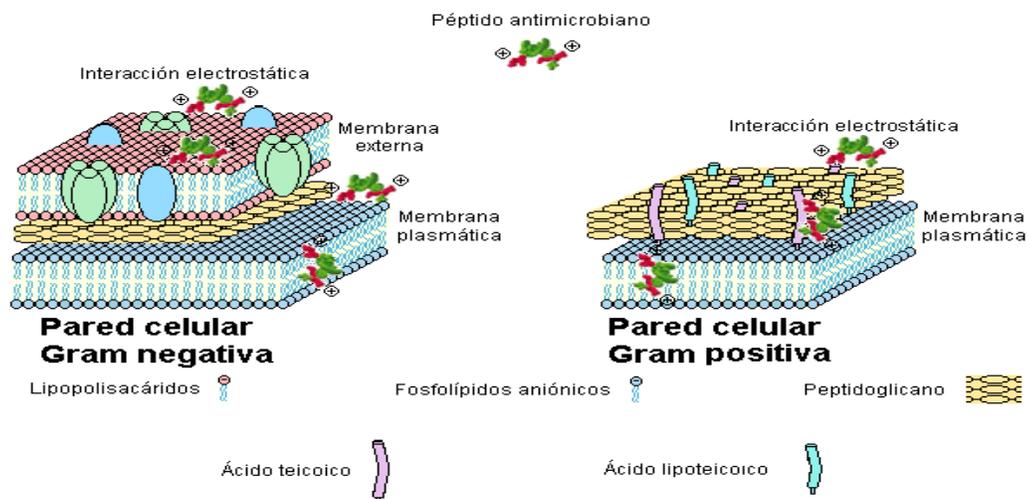


Figura 1. Mecanismo electrostático de los péptidos antimicrobianos sobre la superficie de las bacterias Gram negativas y Gram positivas. Los péptidos antimicrobianos catiónicos son atraídos por las cargas negativas del exterior de las bacterias (fosfolípidos aniónicos y grupos fosfato de los LPS en las bacterias Gram negativas y el ácido teicoico en las bacterias Gram positivas). Una vez que los péptidos están en la superficie microbiana deben atravesar los lipopolisacáridos de la membrana en las bacterias Gram negativas, en tanto, que en las bacterias Gram positivas deben atravesar los ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos, antes que puedan interactuar con la membrana plasmática de las bacterias (Brogden, 2005).

En los hongos, los PA catiónicos interactúan electrostáticamente con las manoproteínas (componentes de la pared celular de las levaduras), perforan la membrana lo cual provoca la fuga de iones esenciales y la subsecuente muerte celular (Lupetti *et al.*, 2002). No está claro si en esta interacción participan receptores específicos como en la actividad antifúngica de las histatinas contra *Candida albicans* (Edgerton *et al.*, 1998) o las glicosilceramidas que funcionan como receptores para la defensina Rs-AFP2 de rábano en la membrana de *Pichia pastoris* (Thevissen *et al.*, 2004, Figura 2).

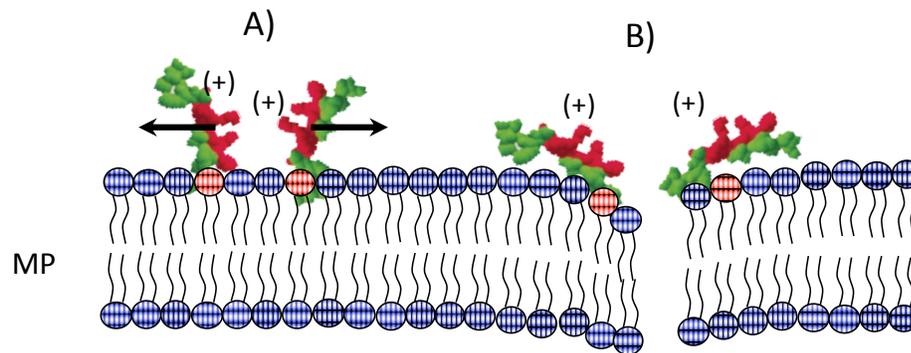


Figura 2. Mecanismo de acción probable del péptido antimicrobiano Rs-AFP2. Las glucosilceramidas de la MP de los hongos (representadas por círculos rojos), actúan como receptores de la Rs-AFP2. A) Las cargas positivas del PA se repelen entre sí, y B) la repulsión entre las cargas provoca la formación del poro (Pellegrini y Franco, 2005).

En el caso de la inactivación de los virus, existen distintos mecanismos de acción efectuados por diversos PA que se producen ante una infección viral. Algunos de ellos se ilustran en la Figura 3. Dichos mecanismos de acción dependen de diversos factores como la presencia de proteínas séricas (Klotman y Chang, 2006).

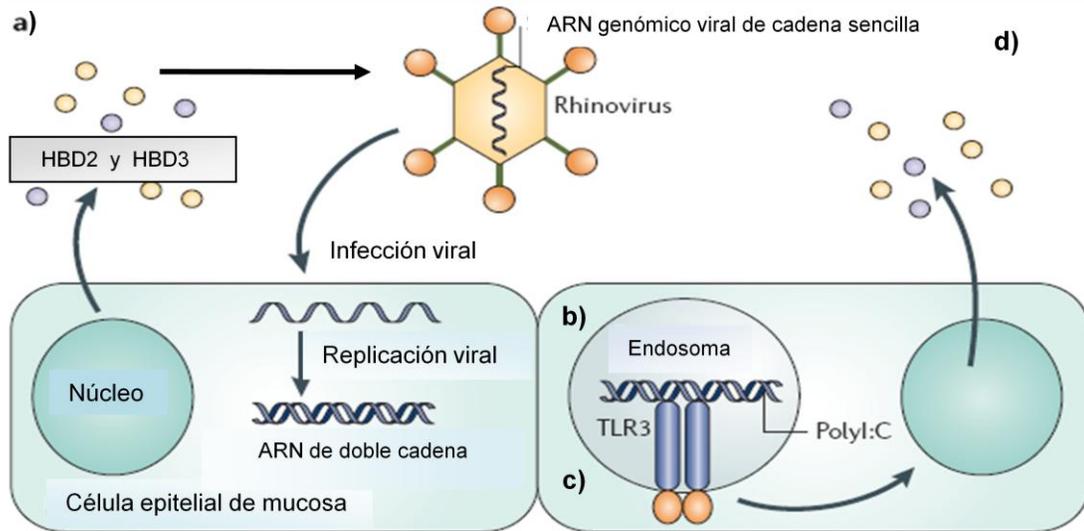


Figura 3. Inducción de las defensas en respuesta a la infección viral en células de mucosa epitelial. a) El ataque directo de las defensas HBD2 y HBD3 al virus mediante la interacción con las glicoproteínas virales provocándole la ruptura de la membrana (cápside) viral, b) inhibiendo la replicación viral encerrando al virus en un endosoma, c) modificando las vías de señalización para evitar la transcripción viral, o d) de manera indirecta puede interactuar con la célula hospedera para inducir una mayor producción de PA (Klotman y Chang, 2006).

Muchos péptidos antimicrobianos son poco efectivos en células eucarióticas normales. Esto parece estar relacionado principalmente por la composición lipídica de la membrana blanco (ej. fluidez, densidad de carga negativa y la presencia o ausencia de colesterol), y de presentar un potencial eléctrico transmembranal altamente negativo (Nicolas, 2009). En células tumorales, los PA interaccionan con la membrana de las células cancerígenas, las cuales contienen una pequeña cantidad de fosfatidilserina lo que les da una carga negativa mayor con respecto a las células normales. Además, las células cancerígenas contienen mucinas O-glicosiladas que atraen a las serinas y treoninas de los PA. Otra posible explicación de la interacción de los PA con las células cancerígenas es el alto número de microvellosidades presentes en las células cancerígenas comparada con las de las células normales, lo que incrementa la superficie de unión de las membranas de las células cancerígenas con los PA (Papo y Shai, 2005, Figura 4)

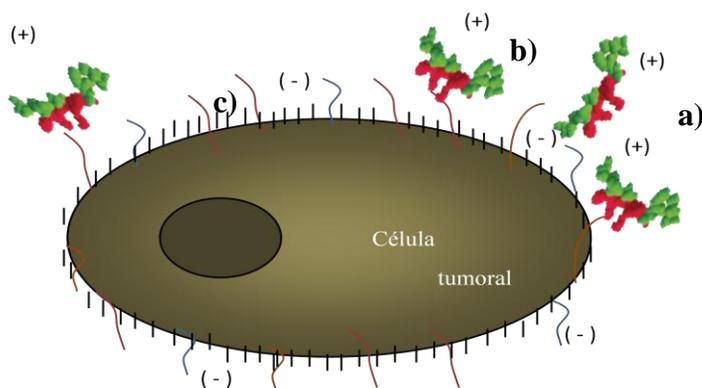


Figura 4. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos sobre las células tumorales. a) La presencia de fosfatidilserinas (azul) aumentan las cargas negativas de las células tumorales aumentando la atracción de los PA catiónicos. b) Las proteínas O-glicosiladas (rojo) atraen ciertos aminoácidos de los PA. c) El alto número de microvellosidades que componen a las células tumorales aumenta su superficie de unión para los PA (Papo y Shai, 2005).

El mecanismo de acción de los PA también puede variar dependiendo de la concentración del mismo, por ejemplo, a altas concentraciones los PA pueden tapizar la membrana plasmática generando rápidamente micelas provocándole la lisis celular, mientras que a bajas concentraciones, los PA pueden formar lentamente los poros en la membrana, también pueden insertar su región polar entre los fosfolípidos de la membrana atravesándola de lado a lado, provocando el adelgazamiento de la misma o pueden atravesar la membrana plasmática sin causarle daño y atacar o bloquear un blanco intracelular (Hancock y Rozek, 2002; Brogden, 2005).

3.4 Mecanismos intracelulares de los PA

Hay evidencia creciente que indica que los péptidos antimicrobianos tienen blancos intracelulares, además de sus interacciones con las membranas plasmáticas, debido a que se han identificado blancos en el interior de células microbianas y el mecanismo por el cual los péptidos antimicrobianos pueden entrar en la célula microbiana sin afectar su estructura exterior mediante transporte pasivo (Nicolas, 2009).

Se han propuesto dos mecanismos generales para describir el proceso mediante el cual los PA entran a las células microbianas; translocación asistida por lípidos de manera espontánea y translocación membranal mediada por un receptor estereoespecífico, estos mecanismos de internalización varían dependiendo del tipo de PA y de la célula sobre la cual

actúe. Además, la composición de aminoácidos de los PA juegan un papel crucial en la internalización, ya que al estar compuestos en su mayoría por aminoácidos básicos (arginina principalmente), los PA pueden interactuar de una mejor manera con los lípidos de la membrana permitiéndoles el paso al interior (Nicolas, 2009).

Una vez que los PA acceden al interior de las células microbianas, éstos interfieren en sus funciones metabólicas como; alterar el citoplasma, aglutinar los contenidos intracelulares, modificar las vías de señalización (apoptosis), regular la transcripción de ciertos genes, unirse a los ácidos nucleicos e inhibir el proceso de transcripción, inhibir la síntesis de la pared celular, la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas o la actividad enzimática (Brogden, 2005). Algunos ejemplos de PA con actividad intracelular se muestran en la Figura 5.

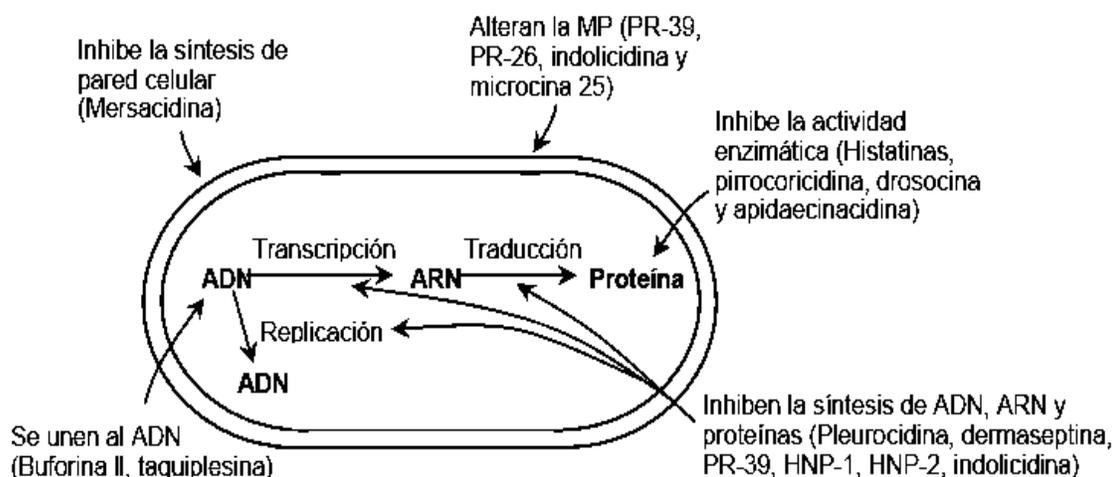


Figura 5. Acción intracelular de algunos péptidos antimicrobianos. En la figura se representa a *Escherichia coli* como célula blanco (Brogden, 2005).

Se ha demostrado claramente que los PA tienen la capacidad de translocarse a través de la membrana de células de mamífero. Lo anterior se ha demostrado con microscopía de laser confocal en células de carcinoma cervical humano (HeLa), células fibroblásticas TM12 y en células de ovario K1 de hámster, la cual muestra que la magainina-2 permeabiliza las células formando poros en la membrana celular permitiendo la entrada de moléculas grandes hacia el

citósol. El péptido se internaliza en un tiempo aproximado de 10 minutos, una vez adentro, se acumula en la mitocondria y en el núcleo (Takeshima *et al.*, 2003; Imura *et al.*, 2008). En el caso de la permeabilización de las células de ovario de hámster chino éstas sufren una deformación extensiva en su membrana. Se desconoce si la magainina-2 mata a las células de mamífero mediante la disipación del potencial de membrana ó daño a la mitocondria. Así mismo, estudios sobre la buforina sugieren una habilidad similar para translocarse dentro e células de mamífero mediante un mecanismo pasivo dependiente de concentración, independiente de la temperatura y sin mostrar algún efecto citotóxico (Imura *et al.*, 2008).

Los mecanismos de entrada de los PA a las células de mamífero pueden ser por medio de dos vías; mediante la penetración directa sin dañar la membrana celular (probablemente porque la misma membrana se encarga de reparar inmediatamente éstos daños mediante la movilización de vesículas, Palm-Apergi *et al.*, 2009), y mediante la endocitosis, la cual pudiera ser la más preferida, principalmente cuando éstos se unen a la superficie de la membrana mediante cargas eléctricas ó receptores específicos. El tipo de mecanismo que el PA emplee para atravesar la membrana celular va a depender de la composición de la misma (Nicolas, 2009).

3.5 PA de plantas

La mayoría de los PA de plantas caracterizados tienen un peso molecular en el rango de los 2 y los 10 kDa, son básicos y contienen 4, 6, 8 ó 12 cisteínas que forman enlaces disulfuro que le confieren estabilidad estructural a las hojas- β y a las hélices- α , además de estabilidad termodinámica (Segura *et al.*, 1998; García *et al.*, 2001; Lay y Anderson, 2005;).

Entre las familias de PA descritos en las plantas (Tabla 2), se encuentran las tioninas, que fueron los primeros péptidos que mostraron actividad contra patógenos de plantas *in vitro*. Subsecuentemente, varias familias de péptidos ricos en cisteínas han sido caracterizadas, incluyendo a las defensinas de plantas que son estructuralmente similares a las defensinas de insectos y de mamíferos (García *et al.*, 2001).

Tabla 2. Péptidos antimicrobianos de plantas

Péptidos antimicrobianos de plantas				
FAMILIA	NÚMERO DE AMINOÁCIDOS	ENLACES DISULFURO	TIPO Y SUBFAMILIA	ACTIVIDAD CONTRA
LTPs	90–95	3–4	I–II	Bacterias y hongos
Esnacinas	61–70	6	I–III	Bacterias y hongos
Defensinas	45–54	4	I–IV	Bacterias y hongos
Tioninas	45–47	3–4	I–IV	Bacterias y hongos
Hevein-like	43	4	I	Bacterias Gram (+) y hongos
Knottin-like	36–37	3	I	Bacterias Gram (+) y hongos
Shepherinas	28–38	0 (lineal)	I–II	Bacterias y hongos
MBP-1	33	2	I	Bacterias y hongos
Péptidos macrocíclicos	29–31	3	I–III	Bacterias Gram (+)
Ib-AMPs	20	2	I	Bacterias Gram (+) y hongos

(Tomada de García *et al.*, 2001)

3.6 Tioninas

Las plantas producen tioninas que están implicadas en la protección de la planta contra microorganismos fitopatógenos. Esta clase de PA, encontrados en varios tejidos de las plantas, como lo es el endospermo de la semilla, el tallo y las raíces, presentan una estructura tridimensional que puede ser representada por la letra gamma (γ), donde la porción vertical consiste en un par de hélices- α antiparalelas y el brazo horizontal corto consiste en una hoja- β antiparalela (Thevissen *et al.*, 1996).

Las tioninas pertenecen a un grupo pequeño de péptidos básicos, ricos en cisteína que son tóxicas para bacterias y hongos fitopatógenos (Vignutelli *et al.*, 1998; Zasloff, 2002). Se ha propuesto que la toxicidad requiere de la interacción electrostática de las tioninas con las cargas negativas de la membrana, provocando así la formación de poros en la misma (Thevissen *et al.*, 1996).

3.6.1 Tionina 2.1

Arabidopsis thaliana es una de las plantas modelo para la investigación y el desarrollo genómico (Nicholas *et al.*, 2002). Esta expresa constitutivamente el péptido antimicrobiano Thi2.1 (Tionina 2.1) en flores, silicuas y hojas. Sin embargo, presenta una regulación inducible cuando se desarrollan infecciones secundarias, propiciando la resistencia en contra de *Fusarium oxysporum*, alterando el crecimiento fúngico (Epple *et al.*, 1995; Vignutelli *et al.*, 1998; Zasloff, 2002).

El ADNc *Ath Thi2.1* cuenta con 402 pares de bases (pb). Éste codifica para un péptido antimicrobiano de 134 aa, presenta 6 residuos de cisteína y un residuo de tirosina en la posición 13 del péptido maduro. La estructura general de la tionina Thi2.1 se muestra en la Figura 6. Cuenta con un dominio correspondiente al péptido señal en el amino-terminal (N-terminal), un dominio del péptido maduro y un dominio ácido carboxilo-terminal (C-terminal). El péptido maduro tiene 6 residuos de cisteína, es básico y contiene 47 aa (Epple *et al.*, 1995).



Figura 6. Dominios de la tionina Thi2.1. El pro-péptido Thi2.1 presenta tres dominios. En el N-terminal, está el péptido señal, indicado en negro; el péptido maduro (Thi2.1), indicado en gris y el dominio ácido, señalado en blanco en el C-terminal (Epple *et al.*, 1995).

3.7 Defensinas de plantas

Las defensinas de plantas (DP) son PA con un peso molecular aproximado de 5 kDa, están conformados por 45 a 54 aa, son básicos y tienen típicamente 8 cisteínas. La γ -purotionina (γ -1P) y la γ -hordotionina (γ -1H) fueron las primeras DP que se aislaron, se obtuvieron de granos de trigo y cebada, respectivamente. Inicialmente se les clasificó como γ -tioninas por las similitudes en el peso que mostraban con las α y β -tioninas (~5 kDa) y los 4 enlaces disulfuro que tienen; sin embargo, las cisteínas que forman los enlaces disulfuro en las γ -tioninas tiene un motivo conservado distinto al de α y β -tioninas (Broekaert *et al.*, 1995).

3.7.1 γ -tionina de *Capsicum chinense*

En *C. chinense* se ha reportado la expresión del ARNm de la defensina γ -tionina en diversos tejidos (Aluru *et al.*, 1999). Sin embargo, hasta el momento, la proteína γ -tionina no ha sido detectada o aislada, solo se ha sintetizado su ADNc, por lo que su actividad no ha sido descrita anteriormente. La proteína putativa traducida a partir de la secuencia del ADNc se muestra en la Figura 7. Consta de 107 aa, con un peso aproximado de 9 kDa, está organizada en tres regiones: un péptido señal en la región N-terminal entre los aa 1 al 25, predicho mediante el programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), una región central con 8 cisteínas espaciadas y conservadas entre los aa 28 y 75, y una región ácida en el C-terminal, que comprende los aa 76 al 107.

Se han detectado transcritos de la defensina de chile habanero en las raíces, el tallo, las hojas, las flores, la placenta y las semillas. Los niveles del transcrito son relativamente bajos en hojas y no han sido detectados en las paredes del fruto (Aluru *et al.*, 1999).

MARSIYFMAFLVLA^VTLFVANGVQG^QNNICK^TTSKHF^KGLCFAD^SSKCRK^VCIQEDKFED
 GHCSKL^QRKCL^CTKNC^VFDNIPNDVGTILVQDAKTLEAQLLEEEILGL

Figura 7. Secuencia putativa de aminoácidos de la γ -tionina de *Capsicum chinense* predicha a partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc. Las letras en cursivas representan la región correspondiente al péptido señal en el extremo N-terminal, la región central marcada en negritas contiene las ocho cisteínas conservadas de las DP indicadas con un asterisco, las letras subrayadas corresponden al dominio ácido C-terminal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

3.8 Inmunidad innata

Los vertebrados en general, cuentan con un sistema complejo y muy desarrollado de defensas antimicrobianas para protegerse durante las distintas etapas del proceso infeccioso. Estas defensas se han agrupado en dos grandes categorías: innatas o naturales y adquiridas o adaptativas.

Las defensas innatas o naturales, también llamadas constitutivas, se les considera como la rama evolutiva más antigua de los mecanismos de defensa, ya que en plantas y animales se han observado mecanismos moleculares similares para responder a patógenos, además de que

son comunes en todos los individuos sanos y protegen contra la infección por bacterias de la microbiota normal, o contra la colonización e infección causadas por patógenos. Estas defensas están siempre disponibles, tienen una especificidad limitada y están dirigidas a contrarrestar las estrategias generales utilizadas por los patógenos para invadir a los organismos. Por ello, son consideradas como la primera barrera de defensa para limitar, detener o eliminar infecciones microbianas (Gajardo y Sánchez, 2006).

Las plantas, a diferencia de los vertebrados, carecen de la sofisticación de la inmunidad adaptativa, aunque ello no les evita ofrecer una protección “rápida” contra los patógenos.

3.9 Mecanismos de acción y evasión del sistema inmune de patógenos intracelulares

Algunos patógenos bacterianos tienen la capacidad de replicarse en el interior del hospedero, protegiéndose de la inmunidad innata. Las bacterias tienen como blanco para su internalización principalmente células epiteliales (células fagocíticas no especializadas) o macrófagos y neutrófilos (células fagocíticas especializadas) (Radtke y O’Riordan, 2006). Al momento de la invasión se activan ligandos bacterianos como los receptores Nod o Toll que ayudan a entrar al patógeno. La activación de estos receptores para los patógenos también conducen a la activación y a la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 β (Inohara *et al.*, 2005; Beutler *et al.*, 2006).

Una vez que el patógeno se ha internalizado (por invasión), el hospedero comienza a comunicarse con otras células, mientras que el patógeno enfrenta una batería de defensas al encontrarse en el endosoma o fagosoma, el cual utiliza para evadir las defensas innatas del hospedero. Dentro del endosoma, es conducido al compartimiento lisosomal para ser destruido o puede desviarse para evadir este compartimiento (Radtke y O’Riordan, 2006). Si es conducido al compartimiento lisosomal, las enzimas líticas (lipasas, lisosimas y proteasas) que hay dentro y el pH ácido matan al patógeno. Por otro lado, los macrófagos activados pueden producir intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) en el fagosoma por oxidasas-NADPH seguido de una producción de óxido nítrico (Radtke y O’Riordan, 2006). También el bombeo múltiple remueve cationes metálicos divalentes del lumen del fagosoma disminuyendo la habilidad del patógeno de usar enzimas dependientes del metal para remediar el estrés oxidativo o para el metabolismo. Por lo tanto, tanto el Fe y Mn, son importantes en la virulencia del patógeno y la célula hospedera lo priva o le quita de éstos y otros nutrientes al

patógeno. Para permitir la replicación, muchas bacterias producen compuestos afines al hierro llamados sideróforos, que son capaces de atrapar hierro de proteínas hospederas (De Voss *et al.*, 2000; Parent *et al.*, 2002; Fischbach *et al.*, 2006). Además, las bacterias intracelulares requieren de otros nutrientes para promover la replicación y la sobrevivencia, para ello regulan genes característicos de estrés nutricional (Chatterjee *et al.*, 2006; Jansen y Yu, 2006).

El uso de algunas enzimas líticas como la Cathepsina G ha demostrado tener efectos antimicrobianos *in vitro*, las cuales poseen dominios alfa helicoidales lo que hace pensar que actúan como pequeños péptidos antimicrobianos catiónicos (AMP) (Shafer *et al.*, 1996).

Se han identificado también componentes citosólicos como la ubiquitina, ubiquidina, histonas y HMGN2 (secretada por leucocitos) con propiedades antibacterianas (Kieffer *et al.*, 2003). Otras proteínas que contribuyen a la resistencia innata para bacterias intracelulares han sido identificadas (IPAF, Naip5, Spa, Ipr1) pero exactamente no se conoce como median sus efectos antimicrobianos (Radtke y O’Riordan, 2006).

Los neutrófilos secretan péptidos antimicrobianos para matar patógenos extracelulares o producen péptidos antimicrobianos para los patógenos intracelulares que se encuentran en los compartimentos de los fagosomas (Faurischou y Borregaard, 2003).

3.10 Producción de óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un mensajero intracelular que ha sido reconocido como uno de los actores más versátiles del sistema inmune a bajas concentraciones. NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina y una molécula de oxígeno mediante un proceso enzimático que utiliza electrones donados por NADPH. La familia de enzimas sintetasas de óxido nítrico (NOS) convierten L-arginina a NO y L-citrulina mediante el intermediario N-hidroxi-L-arginina. Dicha ruta metabólica es conocida como la vía NO L-arginina (Moncada *et al.*, 1989; Moncada y Higgs, 2002). NO tiene una vida corta, entre 3 y 20 s en el agua y en soluciones que contienen oxígeno (Moncada *et al.*, 1991, Figura 8).

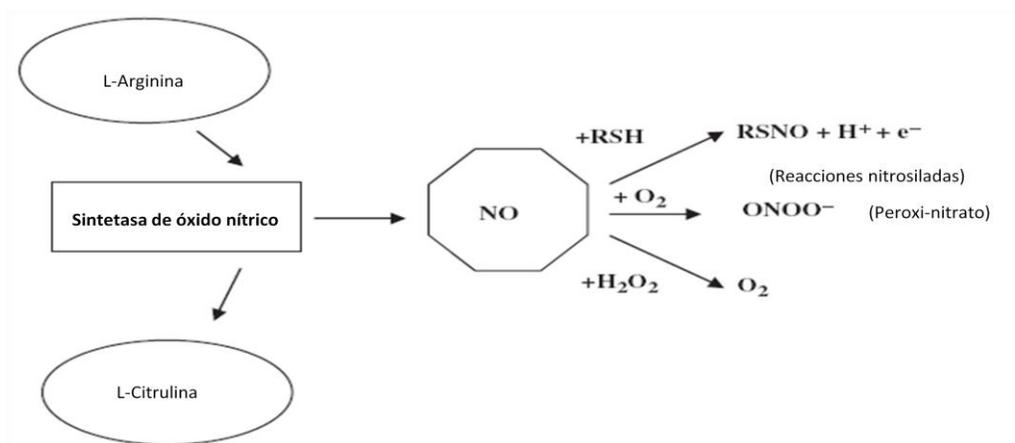


Figura 8. Sintetasa de óxido nítrico. La enzima sintetasa de óxido nítrico (NOS) convierte L-arginina a NO y L-citrulina mediante el intermediario N-hidroxi-L-arginina (Tripathi *et al.*, 2007)

Se ha demostrado que el NO es una molécula crucial en la regulación del tono vascular, neurotransmisión, inflamación crónica y aguda y mecanismos de defensa en hospederos (Michel y Feron, 1997; Maeda y Akaike, 1998; Di Virgilio, 2004). Es considerado como un agente tóxico en la inmunidad innata hacia organismos infecciosos, pero puede inducir o regular la muerte y las funciones de las células inmunes hospederas regulando la inmunidad específica (Bogdan *et al.*, 2000 a, b).

La extensa expresión de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) seguida de la inflamación o infección (Nathan y Xie, 1994a, b) ha sido bien caracterizada y aceptada como un componente vital de la respuesta adaptativa del hospedero hacia diferentes estímulos como patógenos virulentos. El incremento del NO contra diversos patógenos intracelulares se ha descrito, por ejemplo contra virus (Reiss y Komatsu, 1998), contra infecciones fúngicas (Lirk *et al.*, 2002) o contra infecciones bacterianas (Jones *et al.*, 2010).

La producción de NO es una característica de las células del sistema inmune (células dendríticas, células asesinas naturales, y células fagocíticas incluyendo monocitos, macrófagos, microglia, células Kupffer, eosinófilos y neutrófilos), así como otras células involucradas en reacciones inmunes como las células endoteliales, células epiteliales, células de músculo liso vasculares, fibroblastos, queratinocitos, condrocitos, hepatocitos, células mesangiales y células de Schwann (Moncada *et al.*, 1989; Marletta, 1993; Lowenstein *et al.*, 1994; Michel y Feron, 1997; Moncada y Higgs, 2002).

3.10.1 Producción de óxido nítrico en células endoteliales

Las sintetasas de óxido nítrico (NOS) en células endoteliales es conocida como eNOS ó NOS3. eNOS ha sido también localizada en células epiteliales ciliadas de vías aéreas, oviductos, testículos y células endoteliales del cerebro, además del músculo liso de la vasculatura (Zhan *et al.*, 2003).

Entre las principales funciones de eNOS está controlar la actividad antimicrobiana mediante la muerte o reducción de agentes infecciosos (virus, protozoarios, hongos, bacterias y helmintos), el cual puede actuar de manera directa sobre el patógeno o de manera indirecta mediante la vía NOS (ej. reacción de NO con otras moléculas efectoras, agotamiento de arginina, etc.). La producción de NO también modula la producción y función de las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (efectos pro o anti-inflamatorios), regulando la producción de las interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, del interferón γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral α (TNF α) y factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína inflamatoria del macrófago 1 α y 2 (MIP-1 α , MIP-2), proteína quimiotáctica monocítica 1 (MCP-1), modulando las cascadas de señalización (ej. Proteínas G, Jak, MAP cinasas, caspasas, proteínas fosfatasas), los factores de transcripción (ej. NF- κ B, Sp1, AP-1), proteínas que regulan la estabilidad o traducción del ARNm, complejos precursores de citocinas latentes y enzimas que procesan precursores de citocinas (Bogdan, 2001).

La alteración en células endoteliales por patógenos o algún elemento punzocortante es motivo para la activación de la proteína eNOS, la cual produce NO en segundos. Dicho mecanismo es mediado tanto por el incremento de calcio intracelular, como por la fosforilación de eNOS. Durante una alteración prolongada, se produce un incremento en la expresión del ARNm y la proteína, generando la habilidad de las células endoteliales para aumentar la producción de NO. La regulación de la transcripción de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) es mediada por el factor de transcripción NF- κ B bajo condiciones fisiológicas como patológicas (Harrison *et al.*, 2006).

3.10.2 Producción de óxido nítrico en células epiteliales de glándula mamaria

La producción de óxido nítrico (NO) por células de epitelio mamario bovino (CEMB) y las glándulas mamarias en general se ha reportado durante condiciones inflamatorias. La regulación de NO mediante prolactina se ha demostrado en células de epitelio mamario de ratón en donde la prolactina temporalmente aumenta el NO, lo cual incrementa la síntesis de ADN y recluta los receptores de prolactina hacia la superficie celular (Bolander 2001). La sintetasa de óxido nítrico es activada mediante el aumento en los niveles de calcio directamente por la vía de la calmodulina e indirectamente por la vía de la estimulación de la proteína fosfatasa 2B, la cual desfosforila la enzima en los sitios de inhibición. La proteína cinasa B (PKB) puede estimular NOS mediante la desfosforilación en sitios alternos (Dimmeler *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1999). Finalmente, en la mayoría de las células, la arginina, el sustrato para NOS, es limitante y NOS puede ser activada mediante el aumento en la captación de arginina (Dodd *et al.*, 2000). La prolactina tiene el potencial de modificar todas estas vías.

Se ha reportado que bajo condiciones inflamatorias, las CEMB son capaces de producir NO (Onona y Innano, 1998; Boulanger *et al.*, 2001). De acuerdo con lo anterior, en nuestro laboratorio detectamos la inducción del ARNm de iNOS en las CEMB tratadas con prolactina bovina y bajo condiciones de infección por *Staphylococcus aureus* (Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008). Por otro lado, también observamos que la presencia de butirato de sodio aumenta la producción de NO en CEMB para contrarrestar eventos de infección (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009).

3.10.3 Inducción de la producción de óxido nítrico por péptidos antimicrobianos catiónicos

Los péptidos antimicrobianos (PA) compuestos en su mayoría por moléculas cationicas están involucrados en las defensas inmunes innatas. (Evans y Harmon, 1995; Bulet *et al.*, 2004; Ganz, 2004). En los fagocitos (células fagocíticas profesionales) están presentes constitutivamente y almacenados en granulos citoplasmáticos, los cuales son liberados dentro del fagolisosoma en desarrollo. Por otro lado, en las células no fagocíticas también se presenta la producción de PA ante diversos estímulos. Debido a su acción destructiva oxidativa, se cree que los PA desarrollan un papel importante en las defensas hospederas

innatas contra patógenos invasores (Ganz, 1999; Zasloff, 2002). Los péptidos antimicrobianos además de sus propiedades antimicrobianas, también son quimiotácticos y son moléculas de señalización que conectan las respuestas inmunes anatas y adaptativas. Se ha encontrado que los PA regulan la producción de NO de manera dosis dependiente (Zughaier *et al.*, 2005).

Cuando los fagocitos encuentran al patógeno, se puede presentar la fagocitosis y la perturbación membranal. La formación del fagolisosoma y la subsecuente degranulación resultan en la rápida liberación de los PA dentro de la vacuola fagocítica o de la secreción de fluido extracelular (Chaly *et al.*, 2000; Reeves *et al.*, 2002). Cuando se secretan los fluidos extracelulares, los PA pueden neutralizar la inducción de endotoxinas, citocinas celulares y la liberación de NO, ya sea mediante la unión directa a los lipopolisacáridos (LPS) o bloqueando la unión de LPS a la proteína de unión LPS (LBP). (Hancock y Scott, 2000; Nagaoka *et al.*, 2001).

Estudios realizados han demostrado que PA catiónicos y las endotoxinas generan sinérgicamente la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del estallido respiratorio en macrófagos. Los datos sugieren que los efectos sinérgicos de los PA y las endotoxinas en la liberación de ROS es un resultado de un efecto catalítico ejercido por la liberación de enzimas como las oxidasas NADPH. De acuerdo a lo anterior, se han encontrado resultados similares en la liberación de NO con PA catiónicos como la dermaseptina de piel de rana (*Phyllomedusa spp.*) (Ammar *et al.*, 1998).

3.11 Patógenos intracelulares

3.11.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un patógeno importante para la salud humana y la veterinaria. Se puede encontrar como parte de la flora normal. En humanos, más de dos terceras partes de la población son colonizados transitoria o permanentemente por *S. aureus* en distintas proporciones dependiendo de los factores geográficos etnia, clase social y estado de salud (Lowy, 1998). Este patógeno es responsable de diversas infecciones de la piel, del síndrome de choque tóxico, de la endocarditis, la osteomielitis y la artritis séptica, así como es una de las principales causas de infecciones intrahospitalarias. *S. aureus* puede invadir diversos tipos de células fagocíticas no profesionales como células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y osteoblastos (Alexander y Hudson, 2001).

S. aureus puede expresar un gran número de proteínas superficiales o secretadas (como exotoxinas y exoenzimas así como otros componentes de superficie (ej. polisacáridos capsulares) la mayoría de los cuales han sido clasificados como factores de virulencia, contribuyendo al establecimiento o mantenimiento de una infección (Lowy, 1998).

En animales *S. aureus* es el patógeno que con mayor frecuencia se aísla de casos de mastitis bovina (> 70%), y su capacidad de infectar el epitelio mamario se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* en cultivos de células de epitelio mamario bovino (CEMB) (Kerro-Dego, 2002).

3.11.1.1 Internalización de *Staphylococcus aureus* en células fagocíticas no profesionales

Se ha demostrado claramente que *S. aureus* es un microorganismo intracelular facultativo y que la adherencia e invasión son un prerrequisito para las infecciones endovasculares causadas por este microorganismo como la endocarditis infecciosa (Sinha y Herrmann, 2005).

Las infecciones de *S. aureus* endovasculares están entre las más difíciles de tratar, probablemente debido a la patogénesis compleja que envuelve un gran número de factores del hospedero y patógeno. Incluso las personas sanas pueden ser puestas rápidamente en peligro mediante infecciones de *S. aureus* sistémicas. Esto puede deberse a la rápida destrucción de estructuras de válvulas esenciales (endocarditis), formación de trombosis (trombosis séptica) y diseminación con sepsis y formación de abscesos (sistema nervioso central, órganos viscerales). La tasa de mortalidad debida a estas complicaciones de infecciones sistémicas es alta, incluso si los pacientes son tratados tempranamente y de manera apropiada (Waldvogel, 1995).

Datos experimentales han demostrado que las adhesinas (componentes de la superficie bacteriana) plaquetas, proteínas de plasma, células endoteliales y componentes del tejido sub-endotelial están involucrados en la infección de la pared del vaso (Sinha y Herrmann, 2005).

S. aureus ha desarrollado un número de mecanismos para la adherencia a los componentes del hospedero, los cuales son un paso esencial temprano durante la patogénesis microbiana. La adhesión de *S. aureus* a los componentes del hospedero como las proteínas de matriz y plasma (ej. fibronectina, fibrinógeno, vitronectina, trombospondina y colágenos), así como a las células hospederas, es mediada por un número de proteínas de superficie

estafilococales específicas (adhesinas). Hasta ahora, cuatro diferentes clases de adhesinas, incluyendo las no proteínicas (de pared y lipo) como los ácidos teicoicos son conocidas en *S. aureus* (Weidenmaier *et al.*, 2005)

En los modelos de cultivos celulares, la invasión a células hospederas en células fagocíticas no profesionales por *S. aureus* dependen de la presencia de estas proteínas de unión a fibronectina en la superficie bacteriana. La entrada bacteriana es por un mecanismo tipo cierre dependiente de actina F que se parece a la fagocitosis profesional (Sinha *et al.*, 1999). Las proteínas de unión a fibronectina son importantes no solo para la adhesión, sino también para la activación y reacomodo del citoesqueleto de la célula hospedera vía señalización acoplada a integrina. Las señales intracelulares involucradas, entre otras, son la fosforilación de tirosina, activación de la cinasa MAPK (fosforilación de Erk-1 y Erk-2) y la activación de la cinasa *src* (Ellington *et al.*, 2001; Fowler *et al.*, 2003; Agerer *et al.*, 2003).

Estudios recientes indican que los reacomodos citoesqueléticos de las proteínas de unión a fibronectina regulan la invasión lenta e ineficientemente, y posiblemente sea una estrategia del *S. aureus* para posponer la invasión hasta la acumulación de toxinas bacterianas adecuadas para el escape vacuolar.

Recientemente se han identificado otros factores de adhesión utilizados por *S. aureus* para su internalización como; los ácidos teicoccos de pared, factor de agregación A y B y otras proteínas como SasG e IsdA (Garzoni y Kelley, 2009).

Una vez en el interior de la célula hospedera, *S. aureus* puede hacer lo siguiente:

1. Escapar del fagosoma
2. Permanecer en el fagosoma
3. Sobrevivir dentro del compartimento lisosomal adonde lo llevó la vacuola o escapar de ella.
4. Puede ser envuelto dentro de una doble membrana de organelos autofágicos (membrana de aislamiento) para destruir a la vacuola con el patógeno antes o después de su replicación o escapar de ella.
5. Si no muere dentro de la membrana o del compartimento lisosomal puede causar la lisis celular, mandar a apoptosis o necrosar la célula al replicarse o no y posteriormente reinfectar localmente.

Una vez en el interior de las células epiteliales las bacterias pueden sobrevivir por más de 2 semanas (Radtke y O’Riordan, 2006).

3.11.2 *Escherichia coli*

E. coli es uno de los patógenos de mayor importancia en humanos y animales ya que ocasiona una serie de enfermedades de gran relevancia. En animales, y al igual que *S. aureus*, *E. coli* causa la inflamación de la glándula mamaria de bovinos provocando la mastitis denominada ambiental (Bradley y Green, 2001). En años recientes la importancia de *E. coli* como patógeno causante de mastitis en bovinos ha aumentado, ya que es la causa más común de mastitis clínica en hatos lecheros con conteos bajos de células somáticas (Bradley y Green, 2001; Bradley *et al.*, 2007).

En humanos, *E. coli* es la principal bacteria responsable de las diarreas y de la muerte de ~2.1 millones de personas anualmente como consecuencia de este padecimiento, destacando los decesos de niños provocados por este problema en los países en vías de desarrollo (Cardonha *et al.*, 2004). Se estima que esta bacteria causa la muerte diaria de 12,600 niños menores de 5 años en África, Asia y América Latina, convirtiéndose en uno de los principales problemas de Salud Pública en estas regiones (Nguyen *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2005). Los serotipos de *E. coli*, que pueden causar enfermedades gastrointestinales con síntomas como diarrea, son clasificados de acuerdo con sus mecanismos de virulencia en cepas enterotoxigénicas (ETEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroinvasivas (EIEC), enteropatogénicas (EPEC), enteroadherentes (DAEC) y enteroagregativas (EAEC) (Vásquez y Cabral, 2001). Con base en lo anterior, se ha descrito que *E. coli* puede persistir en el interior de células epiteliales de mucosas como la intestinal o la urinaria, o en el caso de los bovinos, en el interior de las células epiteliales mamarias (Shpigel *et al.*, 2008).

3.11.2.1 Internalización de *Escherichia coli* en epitelio mamario bovino (células fagocíticas no profesionales)

E. coli es considerado como un patógeno ambiental causante de la mastitis bovina, el cual desde 1967 hasta 1998 su presencia en casos ambientales había aumentado desde un 4.5 a un 34.6 % (Bradley, 2002).

Datos de análisis de ADN sugieren fuertemente que algunas cepas de *E. coli* se han adaptado y sobrevivido dentro de la ubre (Bradley y Green, 2001). Sin embargo, no parece ser el único factor responsable para la persistencia dentro de la ubre (Kaipainen *et al.*, 2002; Bean *et al.*, 2004). A pesar de que previamente era considerado como un patógeno no invasivo en la mastitis bovina, *E. coli* puede invadir la línea celular epitelial mamaria bovina MAC-T (Döpfer *et al.*, 2000; Dogan *et al.*, 2006) y células mamarias bovinas primarias (Döpfer *et al.*, 2000).

E. coli se ha localizado dentro de vacuolas de unión a membrana en células MAC-T infectadas (Döpfer *et al.*, 2000) por al menos 48h (Dogan *et al.*, 2006). Se conoce relativamente muy poco acerca de cómo *E. coli* invade y persiste dentro de la glándula mamaria, a pesar de que las proteínas cinasas de la célula hospedera son requeridas para la invasión bacteriana (Döpfer *et al.*, 2001; Dogan *et al.*, 2006)

La invasión de *E. coli* dentro de células hospederas está acompañada por rearrreglos del citoesqueleto de actina de la célula hospedera en numerosas especies bacterianas incluyendo *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* (Steele-Mortimer *et al.*, 2000). El agente de despolimerización de actina citocalasina D ha sido reportado como inhibidor de la invasión de *E. coli* en la mastitis dentro de las células de epitelio mamario bovino (Dogan *et al.*, 2006), sugiriendo que el citoesqueleto de actina es importante en la invasión. Aún no está claro cuáles son los factores que determinan exactamente la entrada de *E. coli* en estas células (Passey *et al.*, 2008).

3.11.2.2 Invasión de *Escherichia coli* en células intestinales epiteliales (Caco-2)

E. coli es un anaerobio facultativo predominante en la flora del colon en humanos. Las cepas de *E. coli* diarreicas han adquirido distintos papeles en los genes de virulencia y por lo tanto difieren de otros residentes normalmente en el colon que poseen distintos factores de virulencia. Éstos se distinguen y se definen en base de los mecanismos patogénicos y se han dividido en seis grupos patogénicos bien definidos; enteroinvasiva (EIEC), enterotoxigénica (ETEC), enteropatogénica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAaggEC) y difusamente adherente (DAEC). Los grupos patogénicos de *E. coli* usan una estrategia en común de infección de colonización del epitelio intestinal, evasión de defensas hospederas, multiplicación y daño al hospedero. Sin embargo, sus mecanismos patogénicos son distintos,

tres paradigmas generales de la virulencia han sido descritos: (i) producción enterotoxigénica, (ii) unión íntima con la membrana de señalización, y/o iii) invasión (Nataro y Kaper, 1998).

3.11.3 *Candida albicans*

C. albicans es un hongo oportunista, unicelular que en estado de saprofito se encuentra en forma de levadura, son células redondeadas u ovaladas de 2 a 4 micras, con paredes finas, su reproducción es asexual que realiza mediante blastosporas que se forman por brotes o gemación simple. En estado parasitario forma filamentos con extremos redondeados de 3 a 5 micras de diámetro, de longitud variable, los brotes no se separan de la célula madre y toman así una forma cilíndrica, formando pseudomicelios. *C. albicans* es un hongo dimórfico, que en la superficie de los medios sólidos crece como levaduras gemantes ovales, pero cuando lo hace en la profundidad del medio, puede formar hifas, tanto en los tejidos infectados, como en los cultivos, pueden encontrarse característicamente ambas formas. Crece fácilmente en los medios tradicionales y a temperatura ambiente. En los cultivos de 37° C en medios sólidos las colonias nuevas son lisas, cremosas y brillantes, pero las colonias viejas son grandes, de aspecto rugoso y apariencia hundida (Palace, 2008). También se conoce que con la ayuda de las enzimas extracelulares *C. albicans* degrada el tejido y penetra hasta el torrente sanguíneo, donde evade el sistema inmune del hospedero mediante el cambio fenotípico de levadura a hifa, o recubriéndose con plaquetas que se adhieren a sus ligandos de unión a fibrinógeno (Cotter y Kavanagh, 2000). Una vez que se encuentra en el torrente sanguíneo, *C. albicans* se adhiere a las células endoteliales y es endocitada por éstas. La endocitosis de *C. albicans* puede ser inducida por factores que se expresan en las primeras etapas de la formación del tubo germinal en la transición de levadura a hifa como en las células epiteliales (Phan *et al.*, 2000). Forma parte de la microflora natural de la piel y las mucosas de los humanos. De todas las especies de *Candida*, *Candida albicans* es la que se aísla con mayor frecuencia en boca, con un rango de 90% de patogenicidad en relación a otras especies. A principios de siglo, solo la especie *albicans* del género *Candida* era considerada como patógena, y es alrededor de los años cincuenta cuando comenzaron a aislarse nuevas especies. Actualmente más de treinta especies de *Candida* han sido aisladas, de las cuales solo alrededor de una docena poseen la facultad de adaptarse a la temperatura y constituirse ocasionalmente como patógeno para el ser humano (Palace, 2008).

3.11.3.1 Internalización de *Candida albicans* en células fagocíticas no profesionales

C. albicans tiene la capacidad de adherirse e invadir las células endoteliales y es responsable de la mayoría de las infecciones superficiales o sistémicas en pacientes inmunocomprometidos o inmunosuprimidos, ocupando el cuarto lugar entre los organismos causantes de infecciones intrahospitalarias del torrente sanguíneo (Filler *et al*, 1995; Calderone *et al*, 2000; Phan *et al*, 2000; Hazan *et al*, 2002; Sánchez *et al*, 2004).

Muchos investigadores proponen que existe una relación directa entre la forma micelial y la infección. Se cree que las hifas pueden penetrar al tejido endotelial en forma más rápida que la levadura, la cual es mucho más difícil de ingerir y por lo tanto al ser esta propiedad exclusiva de *Candida albicans*, esto le confiere mayor patogenicidad que las otras formas de *Candida*. La transformación de blastosporas a hifas podría ser el equivalente del cambio de estado comensal a patógeno. Las hifas pueden penetrar el tejido, pero curiosamente, ellas solo abarcan las porciones más superficiales del epitelio, la capa queratinizada y granular, pero nunca penetra toda la extensión del mismo. Algunos autores sugieren que en las primeras etapas del proceso infeccioso, las variantes levaduriformes del hongo pueden penetrar la superficie del epitelio, creando resistencia a la acción fagocitaria de los polimorfonucleares, mediante la posible selección de células levaduriformes resistentes a la muerte intracelular. Posteriormente y de manera casi simultánea, formarían los tubos germinales, los que tendrían la facultad de resistir mecánicamente la acción de las células fagocíticas, escapando de ellas y diseminando así la infección, a otros tejidos. Cuando se forman los tubos germinales, estas estructuras son más susceptibles a la acción fagocitaria de otros polimorfonucleares y es posible que bajo estas circunstancias *C. albicans* comience a formar de nuevo más blastosporas, resistentes, y quizás este es un mecanismo del hongo para combatir la fagocitosis (Palace, 2008).

También se conoce que con la ayuda de las enzimas extracelulares *C. albicans* degrada el tejido y penetra hasta el torrente sanguíneo, donde evade el sistema inmune del hospedero mediante el cambio fenotípico de levadura a hifa, o recubriéndose con plaquetas que se adhieren a sus ligandos de unión a fibrinógeno (Cotter y Kavanagh, 2000). Una vez que se encuentra en el torrente sanguíneo, *C. albicans* se adhiere a las células endoteliales y es endocitada por éstas. La endocitosis de *C. albicans* puede ser inducida por factores que se

expresan en las primeras etapas de la formación del tubo germinal en la transición de levadura a hifa como en las células epiteliales (Phan *et al.*, 2000).

4. ANTECEDENTES

Reportes previos del laboratorio han mostrado que el empleo del endotelio bovino es un modelo adecuado de expresión de PA. Por ejemplo, se ha evaluado la capacidad antimicrobiana de la γ -tionina, expresada por las células endoteliales bovinas, demostrándose su actividad sobre el hongo *Candida albicans* y la línea tumoral HeLa (Anaya-López *et al.*, 2006a). Evidencias recientes han mostrado que la expresión del PA Thi2.1 en células endoteliales bovinas ocasiona que estas presenten actividad contra bacterias patógenas Gram positivas, como lo son diversos aislamientos de *Staphylococcus aureus* de casos de mastitis bovina (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008a). De igual forma, Thi2.1 presenta actividad contra bacterias patógenas Gram negativas como *Escherichia coli* enteropatogénica (responsables de diarreas en humanos), contra hongos como *C. albicans* y hacia células tumorales de pulmón (A549), de mama (MCF7) y de cervix (HeLa) (Loeza-Ángeles *et al.*, 2008).

5. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de la Biotecnología ha permitido explorar el efecto de los PA sobre microorganismos patógenos de animales empleando sistemas alternativos heterólogos para su expresión, por ejemplo, las células de mamífero. En este sentido, el empleo de los PA representa una nueva estrategia de tratamiento de las enfermedades infecciosas, como alternativa al uso indiscriminado de antibióticos y en consecuencia a la selección de cepas resistentes a los mismos (Brogden, 2005).

El uso con fines terapéuticos de los PA es prometedor, ya que a pesar de haberse producido durante miles de años dentro de la inmunidad innata de los seres vivos, no se ha registrado hasta ahora un alto índice de cepas resistentes a la acción antimicrobiana de estos péptidos, lo cual puede dar lugar a la exploración de nuevas alternativas terapéuticas, sobre

todo en aquellos microorganismos que son multifármaco-resistentes y que hoy en día producen infecciones de difícil tratamiento. Es incluso posible que el uso de antibióticos tradicionales acompañados de algún PA pueda ser sinérgico, lo que beneficiará enormemente la eficiencia y la rapidez del tratamiento contra los patógenos que utilizan el interior celular para diseminarse y reproducirse (Rivas-Santiago *et al.*, 2006), ya que son pocos los antibióticos que tienen efectos intracelulares en las primeras horas de tratamiento.

Recientemente se ha reportado que los PA como las puroindolinas del trigo, la magainina-2 de rana y la buforina de sapo, tienen capacidad antibacteriana en contra de patógenos intracelulares (Takeshima *et al.*, 2003; Capparelli *et al.*, 2007; Imura *et al.*, 2008).

En base a lo mencionado anteriormente y debido a los efectos antifúngicos, bacterianos y citotóxicos del péptido Thi2.1 y antifúngico y citotóxico de la γ -tionina que han demostrado en contra de patógenos de plantas, animales y humanos (Anaya-López *et al.*, 2006a; Loeza-Ángeles *et al.*, 2008) se abre la posibilidad de probar su efecto sobre los patógenos intracelulares *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

6. HIPÓTESIS

Los PA γ -tionina de *C. chinense* y Thi2.1 de *A. thaliana* producidos por células endoteliales bovinas presentan actividad antimicrobiana en contra de los patógenos intracelulares *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de la defensina γ -tionina de *C. chinense* y de la tionina Thi2.1 de *A. thaliana* producidos por células endoteliales bovinas en contra de los patógenos intracelulares *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

7.1 OBJETIVOS PARTICULARES

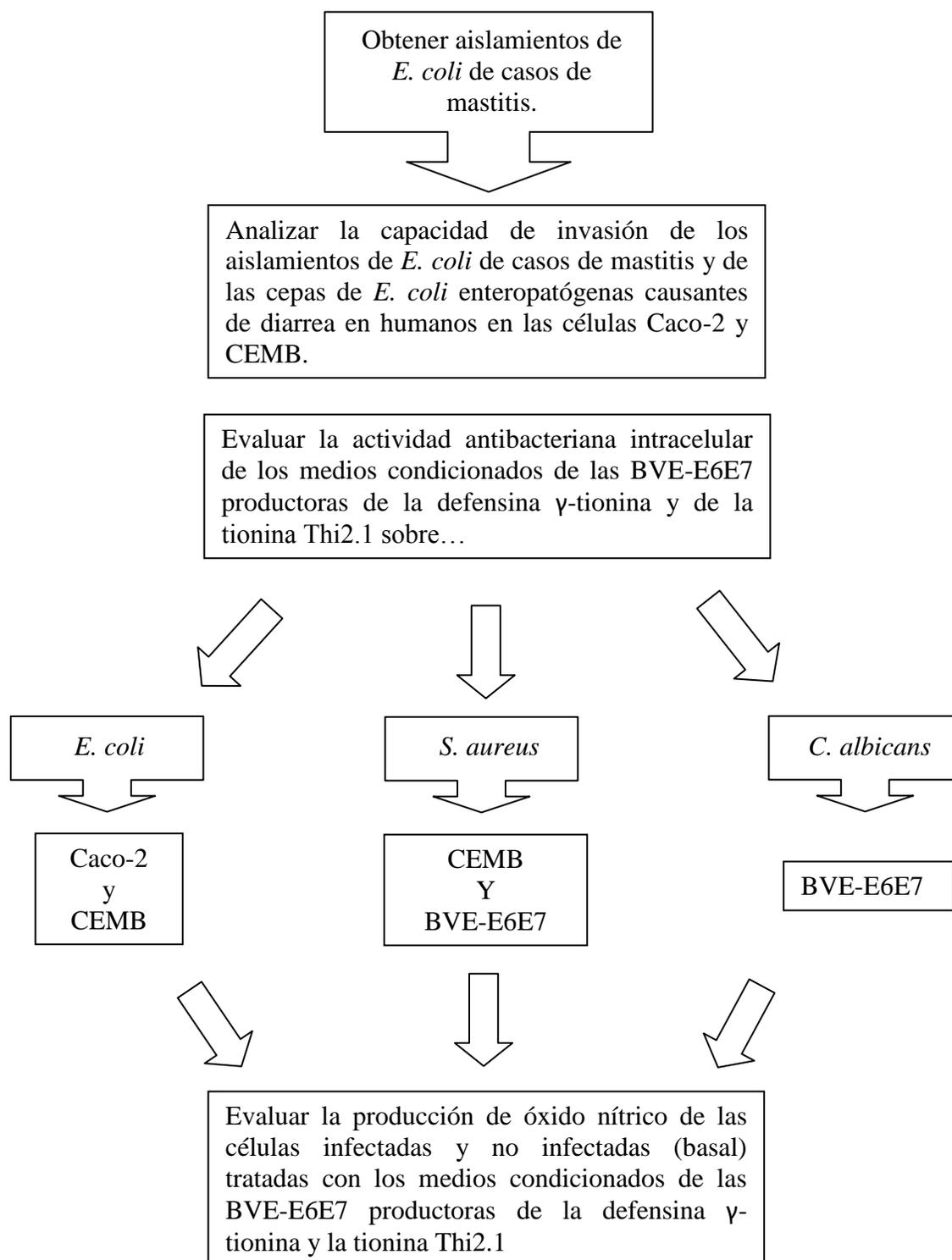
1. Obtener aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de casos de mastitis bovina y analizar su capacidad de invasión en células de epitelio intestinal humano y CEMB.
2. Evaluar la actividad antibacteriana intracelular de los medios condicionados de las células endoteliales productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre las cepas patógenas de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, en modelos de infección hospedero-patógeno.
3. Evaluar la producción de óxido nítrico de las células infectadas y no infectadas (basal) tratadas con los medios condicionados de las células endoteliales productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Se emplearon los siguientes modelos de interacción hospedero-patógeno:
 - a) Línea celular de colon humano Caco-2 y CEMB-*Escherichia coli*.
 - b) CEMB y la línea endotelial bovina BVE-E6E7-*Staphylococcus aureus*.
 - c) Línea endotelial bovina BVE-E6E7-*Candida albicans*.
2. Para realizar los ensayos de infección, se utilizaron las líneas celulares de mamífero confluentes, a las que se les añadió el patógeno correspondiente en medio libre de suero y antibióticos y/o antimicóticos. Se infectaron durante 2 h, con las bacterias, y 4 h con los hongos. Al cabo de este tiempo, se incubaron con antibióticos y/o antimicóticos para eliminar los patógenos intracelulares.
3. Una vez infectadas las células, se incubaron a una concentración de 3.125µg de la proteína total de los medios condicionados (MC) de las células endoteliales productoras de la defensina γ -tionina de *C. chinense* y de la tionina Thi2.1 de *A. thaliana* y se evaluaron diferentes tiempos (2, 6, 12, 24, 36 y 48 h) Como control se empleó medio condicionado de las mismas células pero que no expresan los PA (células endoteliales sin transfectar), al igual que medio no condicionado (medio OPTIMEM).
4. Se colectaron y filtraron los MC a distintos tiempos (2, 6, 8, 12, 24, 36 y 48 h) para evaluar la presencia de óxido nítrico producido por las células estimuladas por los MC.
5. Finalmente, las células infectadas se despegaron del plato de cultivo con Tripsina-EDTA, se lisaron con agua esterilizada, se distribuyó el lisado celular sobre medio sólido para bacterias u hongos, se incubaron, y se determinó el número de unidades formadoras de colonias de bacterias u hongos.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Diagrama general de la estrategia metodológica



9.2 Aislamientos de *Escherichia coli* de casos de mastitis

Se colectaron muestras de leche de vacas lactantes mantenidas en un sistema de producción lechera semi-tecnificado de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia (Posta veterinaria) de la UMSNH en Morelia Michoacán, con signos clínicos de mastitis. El diagnóstico de la mastitis se realizó con la prueba de California. La leche se colectó en tubos estériles y se conservó a 4°C (máximo de 3 días) hasta su procesamiento. Para la obtención de los aislamientos se tomaron alícuotas de 200 µl de la leche colectada y se distribuyó en cajas de Petri con agar Mac Conkey, el cual es un medio de selección para bacterias coliformes. Las cajas se colocaron a 37°C durante 18-24 h. Para su conservación, el aislamiento se cultivó en medio líquido LB por 16 h, se adicionó glicerol al 15% y se almacenó a -80°C.

9.3 Caracterización de los aislamientos de *Escherichia coli*

Las cepas bacterianas de *E. coli* aisladas, se identificaron mediante la amplificación por PCR de una región del rARN 16S y su posterior secuenciación. Se utilizó 10–100 ng de ADN genómico, amortiguador para PCR 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's 200 µM, 0.5 µM de cada oligonucleótido y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystem 2700 con el siguiente programa: 1 ciclo a 95°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1.5 min, 53°C por 1.5 min y 72°C por 70 s; 1 ciclo de 72°C por 7 min; 1 ciclo sostenido de enfriamiento a 4°C. Las amplificaciones (~ 200 pb) se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Los productos de amplificación se sometieron a análisis de la secuencia. Cabe señalar, que esta parte del proyecto se está realizando como parte de otros proyectos del grupo de investigación.

9.4 Microorganismos

Los microorganismos que se utilizaron en este trabajo, se describen en la Tabla 3, y corresponden a aislamientos de *S. aureus* y *E. coli* de casos de mastitis bovina, así como a cepas certificadas de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*.

TABLA 3. Microorganismos que se utilizaron en este trabajo

Aislamiento o cepa	Descripción	Caracterización molecular	Capacidad invasiva	Referencia
E21M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	<i>Shigella dysenteriae</i> y <i>E. coli</i>	ND ^a	Este trabajo
S16M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	ND	ND	Este trabajo
S13M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ND	Este trabajo
S7M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	ND	ND	Este trabajo
04M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	<i>Shigella dysenteriae</i> y <i>E. coli</i>	ND	Este trabajo
S21-2M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	<i>E. coli</i>	ND	Este trabajo
S2M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	<i>Shigella dysenteriae</i> y <i>E. coli</i>	ND	Este trabajo
S4M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	<i>Shigella dysenteriae</i> y <i>E. coli</i>	ND	Este trabajo
S8M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	ND	ND	Este trabajo
N7M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	ND	ND	Este trabajo
S14M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	ND	ND	Este trabajo
S20-2M	Aislamiento de leche de vacas con mastitis bovina	ND	ND	Este trabajo
ATCC 27543	Caso de mastitis clínica	<i>S. aureus</i>	CEMB, BVE-E6E7	Anaya-López <i>et al.</i> , 2006b; Oviedo-Boyso <i>et al.</i> , 2008
H10407 (ETEC)	Cepa del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica	<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Caco-2	Boudeau <i>et al.</i> , 1999
E11 (EIEC)	Cepa del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica	<i>E. coli</i> enteroinvasiva	ND	
0111 (EPEC)	Cepa del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica	<i>E. coli</i> enteropatógena	HeLa	Scaletsky <i>et al.</i> , 1995
ATCC 10230	Cepa certificada obtenida de un caso clínico	<i>Candida albicans</i>	BVE-E6E7	Anaya-López <i>et al.</i> , 2006a

ATCC (American type culture collection), ETEC (enterotoxigénica), EIEC (enteroinvasiva), EPEC (*coli* enteropatógena)

^aNo determinado.

9.5 Líneas celulares

En la Tabla 4 se muestran las líneas celulares de mamíferos que se emplearon para realizar los ensayos de infección, así como a las células endoteliales productoras de los PA. Se describen sus principales características de cultivo.

9.6 Ensayo de endocitosis de las cepas de *Escherichia coli* y de coliformes sobre CEMB y Caco-2

Se utilizaron monocapas confluentes de las CEMB de cultivo primario pasajes 2-8 y Caco-2 por separado en placas de 24 pozos (Corning), y se incubaron con una multiplicidad de

infección (MDI) de 30 unidades formadoras de colonias (UFC) de los distintos aislamientos de *E. coli* por célula. La cepa de *S. aureus* ATCC 27543, proveniente de un caso de mastitis, se empleó como control positivo de infección. Las CEMB y Caco-2 se incubaron con las bacterias por separado durante 2 h a 37°C en medio DMEM:F12K, sin suero ni antibióticos, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Las bacterias adheridas a la superficie de las células se eliminaron incubando las células infectadas con 50 µg/ml de gentamicina durante 2 h y lavándolas con PBS. Se despegaron las células infectadas con Tripsina-EDTA, se lisaron con agua desionizada estéril y se distribuyeron en una dilución 1/100 sobre placas de agar de LB, luego se incubaron a 37°C durante 24 h y se contaron las UFC correspondientes a cada aislamiento. Se realizaron al menos tres experimentos por triplicado.

TABLA 4. Líneas celulares de mamífero que se utilizaron en este trabajo

Línea Celular	Descripción	Referencia
BVE-E6E7	Línea endotelial de vena de cordón umbilical bovino	Cajero-Juárez <i>et al.</i> , 2002
BVE-E6E7- γ tionina	Línea endotelial de vena de cordón umbilical bovino productora de la defensina γ-tionina de <i>Capsicum chinense</i>	Anaya-López <i>et al.</i> , 2006 ^a
BVE-E6E7- Thi2.1	Línea endotelial de vena de cordón umbilical bovino productora de la tionina Thi2.1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Loeza-Ángeles <i>et al.</i> , 2008
Caco-2	Línea comercial de epitelio intestinal humano (ATCC HTB-37)	
CEMB	Cultivo primario de epitelio mamario bovino	Anaya-López <i>et al.</i> , 2006 ^b

9.7 Obtención del MC de las células endoteliales productoras de la defensina γ-tionina de *C. chinense* y de la tionina Thi2.1 de *A. thaliana*

El MC de las células BVE-E6E7 transfectadas con las construcciones que contienen el ADNc de los PA evaluados (pTracer γ-tionina y pTracer Thi2) se obtuvo empleando cultivos confluentes de las células en cajas de Petri p100 (Corning) y medio OPTIMEM (Invitrogen), sin suero y sin antibióticos (Anaya-López *et al.*, 2006a; Loeza-Ángeles *et al.*, 2008). Las

células estuvieron en presencia de 5 ml de OPTIMEM durante 24 h a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Posteriormente, el MC se retiró y se centrifugó a 2000 rpm para eliminar las células presentes. Se cuantificó la concentración de proteínas de los MC por el método de Bradford. En todos los experimentos se emplearon 3.125 µg de proteína total presente en el MC, considerando que se ha reportado previamente que esta concentración de proteína total del MC de células productoras de Thi2.1 inhibe la viabilidad bacteriana y fúngica (Loeza-Ángeles *et al.*, 2008).

9.8 Cuantificación del óxido nítrico (NO) producido por las CEMB y BVE-E6E7

Como parte de la respuesta inmune innata se cuantificó la producción de NO en las CEMB y BVE-E6E7 infectadas con *S. aureus* y *C. albicans* que fueron tratadas con los MC de las células endoteliales productoras de la defensina γ -tionina de *C. chinense* y de la tionina Thi2.1 de *A. thaliana*. El NO producido se colectó y filtró a distintas horas (2, 6, 12, 24, 36 y 48 h). La concentración de NO se determinó cuantificando los nitritos (NO₂⁻) en el medio condicionado libre de células y empleando la reacción de Greiss. El reactivo de Greiss se preparó mezclando volúmenes iguales de la solución stock A (10% de sulfanilamida, 40 % de ácido fosfórico, Sigma) y la solución stock B [1%N-(1-naphthyl) etilenediamina dihidroclorido (Sigma)] antes de medir la concentración de nitritos. Una parte de la mezcla de reactivos se transfirió a 7 partes de medio condicionado y la absorbancia se determinó a 550 nm en un espectrofotómetro (DAS). La concentración de nitrito se calculó a partir de una curva estándar de NaNO₂ (Sigma) en PBS (pH 7.4).

9.9 Actividad antimicrobiana intracelular de los medios condicionados de las células endoteliales productoras de la defensina γ -tionina de *C. chinense* y de la tionina Thi2.1 de *A. thaliana*

La actividad antibacteriana y antifúngica se determinó como se describe en la estrategia experimental.

9.10 Análisis estadístico

Los datos de los ensayos de invasión y la producción de NO fueron obtenidos de tres experimentos independientes por triplicado. Los valores estimados de los ensayos de invasión

y producción de NO fueron en relación al medio condicionado de las células sin transfectar. Los datos fueron analizados mediante la prueba *t* de Student. Los resultados están reportados como errores estándar de las medias \pm . Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados como significantes.

10. RESULTADOS

10.1 Capacidad de endocitosis de los aislamientos de bacterias coliformes de casos de mastitis bovina en CEMB

La cepa de *S. aureus* ATCC 27543, proveniente de un caso de mastitis se empleó como control positivo de infección. Se evaluaron 12 aislamientos de bacterias coliformes (Tabla 3) obtenidos de leche de vacas con mastitis. Los aislamientos que mostraron capacidad de endocitosis en las CEMB fueron S20-2M y S2M en un 8.5% y 7.5% respectivamente, de acuerdo con el número de UFC recuperadas con respecto a la endocitosis mostrada por la cepa de *S. aureus* considerada como el 100% (Figura 9). La capacidad de endocitosis de cada uno de los aislamientos varía dependiendo de sus características de virulencia, que en este caso, las bacterias coliformes aisladas de casos de mastitis tienen una baja capacidad de endocitosis en CEMB en relación con el control positivo empleado (*S. aureus*).

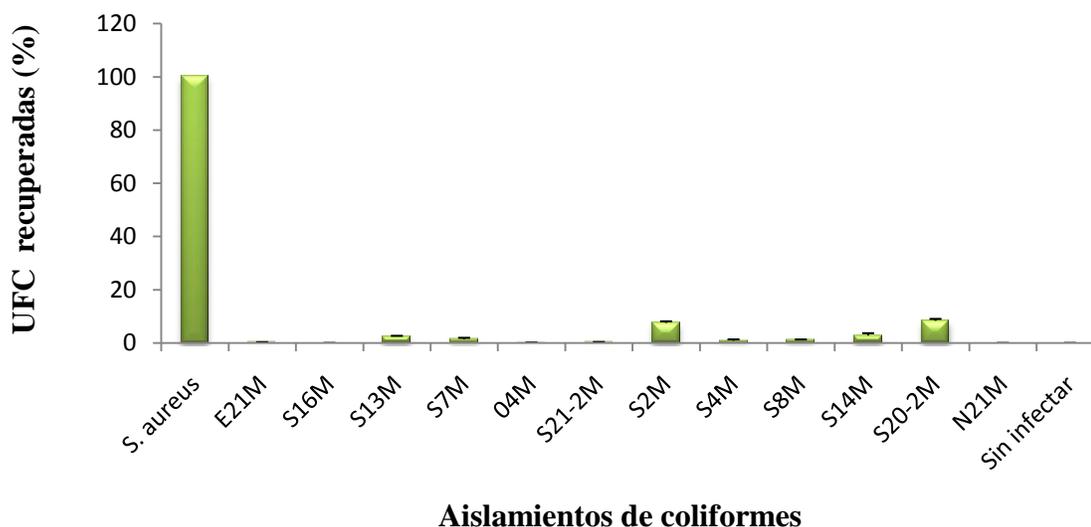


Figura 9. Capacidad de endocitosis de los aislamientos de bacterias coliformes de los casos de mastitis bovina en CEMB. Las CEMB se infectaron durante 2 h con una MDI de 30 bacterias por célula. Se muestra el porcentaje de triplicados con las respectivas desviaciones estándar de 3 experimentos independientes.

10.2 Capacidad de endocitosis de los aislamientos de bacterias coliformes de los casos de mastitis bovina en la línea intestinal humana CaCo-2

Se evaluaron los 12 aislamientos de bacterias coliformes mostrados en la Tabla 3 obtenidos de leche de vacas con mastitis. Los aislamientos que mostraron mayor capacidad de endocitosis en las células CaCo-2 fueron S14M, S2M, S21-2M, N21M y O4M, además de las cepas enterotoxigénica H10407 y enteropatogénica O111 de acuerdo con el número de UFC recuperadas con respecto a la endocitosis mostrada por la cepa enteroinvasiva E11 (control) (Figura 10). Los aislamientos de bacterias coliformes pueden ser endocitados por las células CaCo-2 de manera similar al control empleado (E11). Estos resultados sugieren que las bacterias coliformes provenientes de casos de mastitis bovina, pueden ser consideradas zoonóticas.

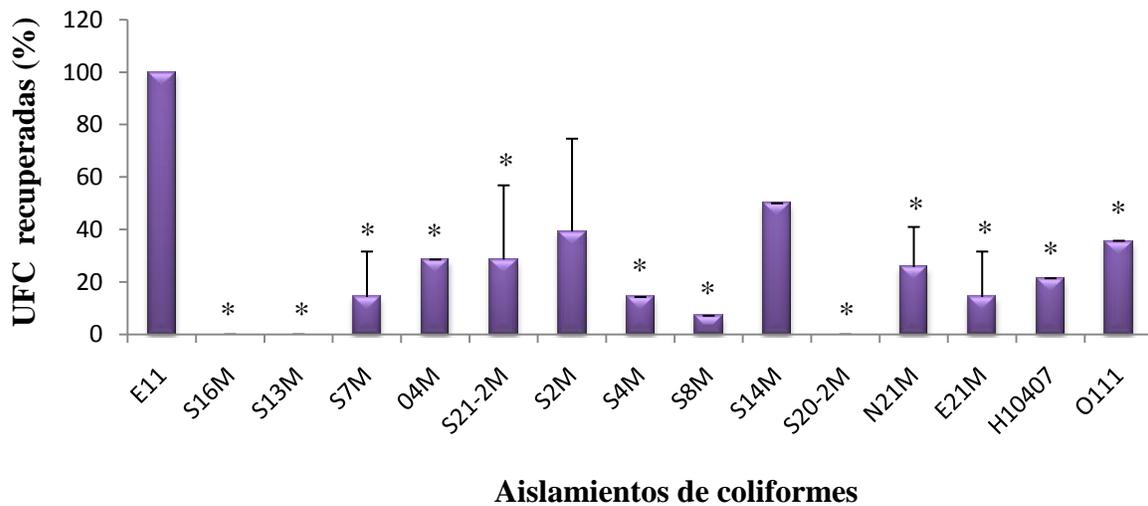


Figura 10. Capacidad de endocitosis de los aislamientos de bacterias coliformes de los casos de mastitis en la línea CaCo-2. Las CaCo-2 se infectaron durante 2 h con una MDI de 30 bacterias por célula. Se muestra el promedio de triplicados con las respectivas desviaciones estándar de 3 experimentos. * $P \leq 0.05$ en relación con la cepa E11.

10.3 Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de *Staphylococcus aureus* en CEMB

Para evaluar el efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 en contra de *S. aureus* endocitado en CEMB, se realizó el ensayo de infección utilizando la cepa *S. aureus* ATCC 27543 capaz de internalizarse en las CEMB (Tabla 3). Como control negativo, se utilizaron el MC de células sin transfectar y el medio Optimem. La infección se realizó durante 2 h. Al cabo de este tiempo, se agregó 3.125 μ g de proteína total de cada uno de los MC, y las CEMB se lisaron a diferentes tiempos de incubación con los MC. De acuerdo con el número de UFC recuperadas de *S. aureus* (Figura 6), en presencia del MC de las células sin transfectar se incrementó el número de UFC intracelular de *S. aureus* desde las primeras horas, mientras que el MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina inhibió el crecimiento del patógeno intracelular en todos los tiempos evaluados en un 75%, mientras que el MC de las células BVE-E6E7 productoras de la tionina Thi2.1 inhibió en un 75, 85 y 95% a las 2, 6 y 12h respectivamente, hasta la inhibición del 100% a partir de las 24 h con respecto al MC de las células sin transfectar (Figura 11).

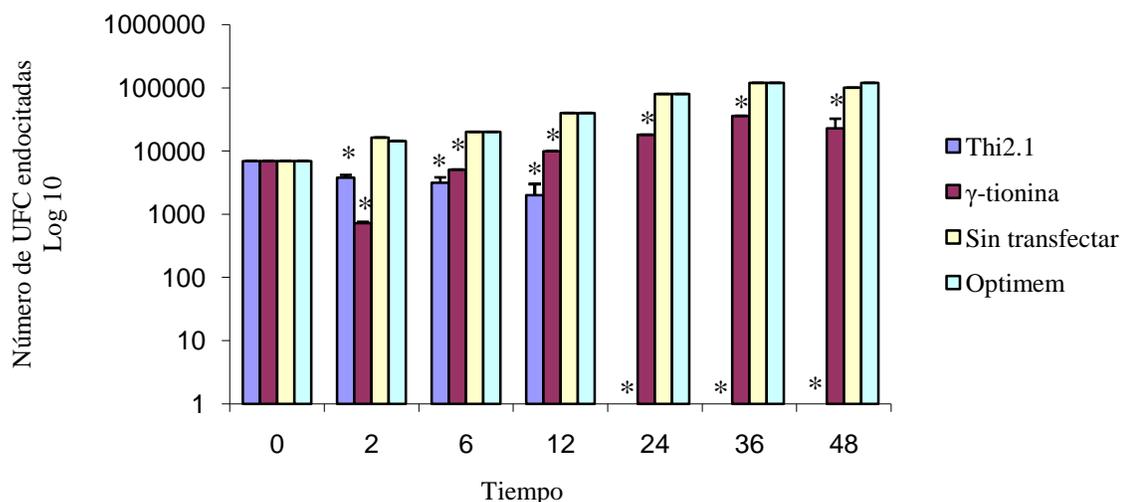
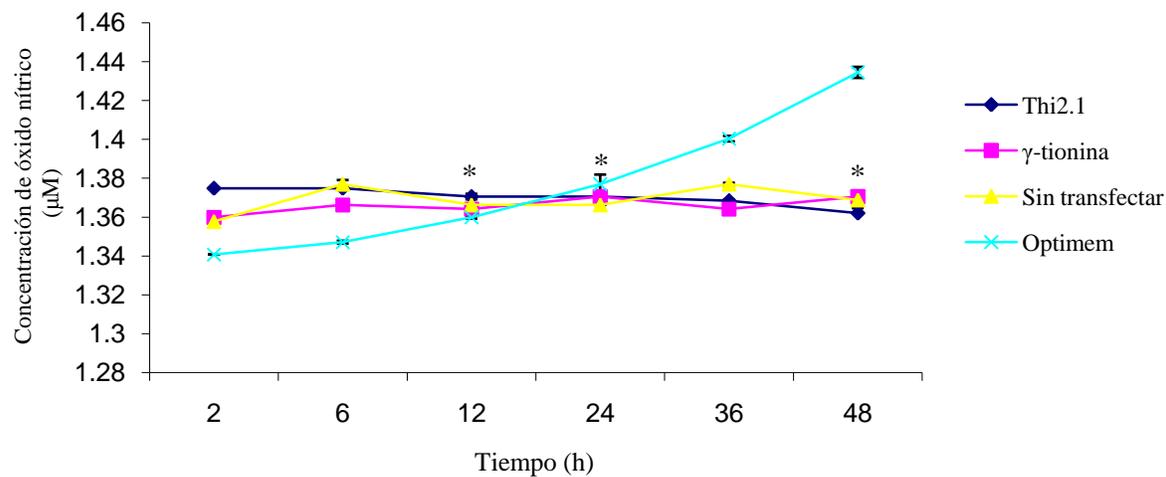


Figura 11. Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 en CEMB. Las CEMB se infectaron durante 2 h con una MDI de 30 bacterias por célula, y se incubaron a diferentes tiempos con 3.125 μ g de proteína total de los tres diferentes MC. Se muestra el promedio de triplicados con sus respectivos errores estándar de 3 experimentos. * $P \leq 0.05$ en relación con el efecto del MC sin transfectar.

10.4 Producción de óxido nítrico en las CEMB sin infectar (basal) e infectadas con *Staphylococcus aureus* en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1

Para evaluar la producción de óxido nítrico en las CEMB en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 en CEMB sin infectar (basal) e infectadas con *S. aureus*, se colectó el MC a distintos tiempos para ser filtrado y evaluar así la presencia de óxido nítrico en el MC mediante el reactivo de Griess. Como control negativo, se utilizó el MC de células sin transfectar y el medio Optimem. La producción de óxido nítrico de las CEMB sin infectar en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 es similar en todos los tiempos evaluados con respecto al control negativo (Figura 12a). Mientras que la producción de óxido nítrico por las CEMB infectadas se observó en todos los tiempos evaluados en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1, destacando que la mayor producción de óxido nítrico por las CEMB infectadas es en presencia del MC de las células BVE-E6E7 productoras de la tionina Thi2.1 a las 12h fue de un 40% más con respecto al MC de las células sin transfectar (control). Ésto coincide con la inhibición del 95% del patógeno intracelular a las 12h y posteriormente el 100% a las 24h en presencia de este MC Thi2.1 (Figura 11). Lo anterior nos indica, que el óxido nítrico producido por las CEMB infectadas en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 puede jugar un papel importante en inhibir la replicación del patógeno intracelular de manera indirecta mediante la modulación de la inmunidad innata, la cual es una característica de los péptidos antimicrobianos. Este evento ocurre de manera particular para el MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina, ya que éste no tiene efectos antibacterianos de manera directa (Figura 12a y 12b).

a)



b)

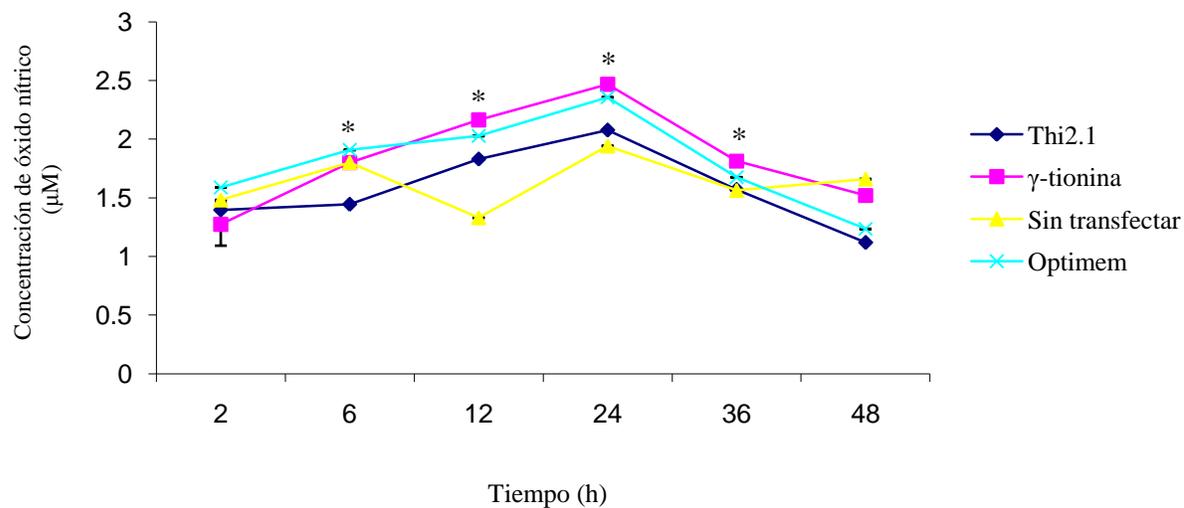


Figura 12. Producción de óxido nítrico en CEMB sin infectar e infectadas con *Staphylococcus aureus* en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1. Se colectaron los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1, así como los MC de las células sin transfectar (control) y el medio Optimem, para determinar la presencia de óxido nítrico en las células **a)** sin infectar y **b)** infectadas con *S. aureus* a distintos tiempos. Se muestra el promedio de triplicados con sus respectivos errores estándar de 3 experimentos. * $P \leq 0.05$ en relación con el efecto del MC sin transfectar.

10.5 Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de *Staphylococcus aureus* en BVE-E6E7

Se realizó el ensayo de infección utilizando la cepa *S. aureus* ATCC 27543 capaz de internalizarse en las BVE-E6E7 (Tabla 3) para posteriormente evaluar el efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 en contra de *S. aureus* endocitado en BVE-E6E7. Como control negativo, se utilizó el MC de células sin transfectar y el medio Optimem. La infección se realizó durante 2 h. Al cabo de este tiempo, se agregó 3.125 μg de proteína total de cada uno de los MC, y las BVE-E6E7 se lisaron a diferentes tiempos de incubación con los MC. De acuerdo con el número de UFC recuperadas de *S. aureus*, en presencia del MC de las células sin transfectar se incrementó rápidamente el número de UFC intracelular de *S. aureus* desde las primeras horas, mientras que el MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y el MC de las células BVE-E6E7 productoras de la tionina Thi2.1 inhibieron el crecimiento de los patógenos intracelulares en un 60 y 40% respectivamente en promedio en los tiempos evaluados con respecto al MC de las células sin transfectar (control) (Figura 13).

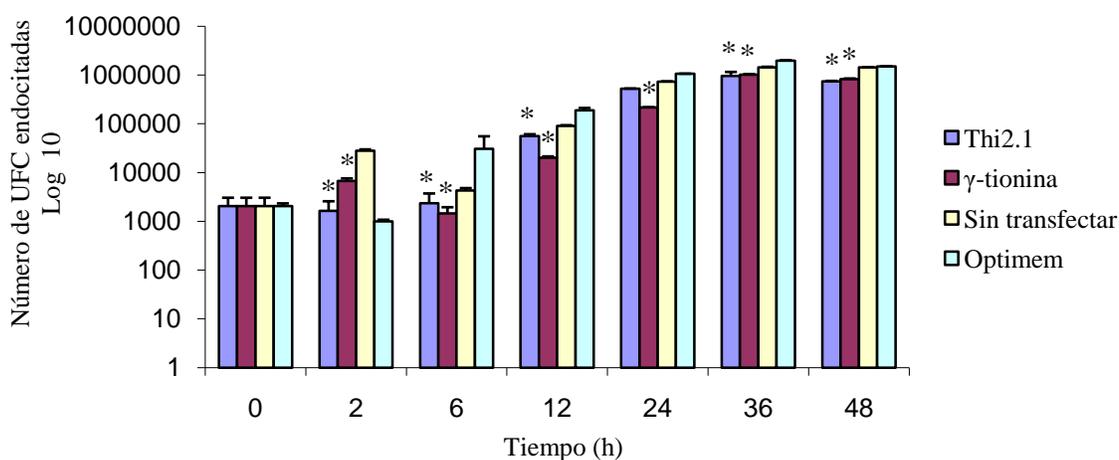


Figura 13. Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 en BVE-E6E7. Las BVE-E6E7 se infectaron durante 2 h con una MDI de 30 bacterias por célula, y se incubaron a diferentes tiempos con 3.125 μg de proteína total de los tres diferentes MC. Se muestra el promedio de triplicados con sus respectivos errores estándar de 3 experimentos. * $P \leq 0.05$ en relación con el efecto del MC sin transfectar.

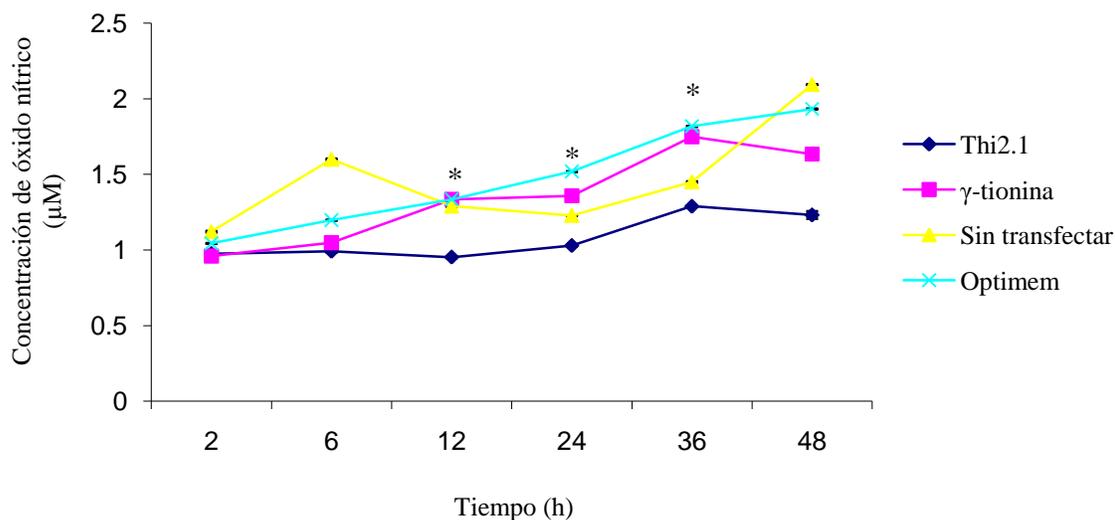
10.6 Producción de óxido nítrico en las BVE-E6E7 sin infectar (basal) e infectadas con *Staphylococcus aureus* en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1

Se colectó y filtró el MC para evaluar la producción de óxido nítrico a distintos tiempos en las BVE-E6E7 en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 en BVE-E6E7 sin infectar (basal) e infectadas con *S. aureus*, mediante el reactivo de Griess. Como control negativo, se utilizó el MC de células sin transfectar y el medio Optimem. En presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 en células BVE-E6E7 sin infectar (basal) se observó presencia de óxido nítrico, principalmente el óxido nítrico producido a las 12 y 24h por el MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina que aumentan drásticamente de un 5 y 10% (Figura 14a) respectivamente, a un 50 y 25% en las células BVE-E6E7 infectadas con respecto al MC de las células sin transfectar (Figura 14b). Éste efecto que genera la defensina γ -tionina en la producción de óxido nítrico en las células BVE-E6E7 para la inhibición del patógeno intracelular se correlacionan con la inhibición en la sobrevivencia intracelular de *S. aureus* en CEMB mostrada en la Figura 13.

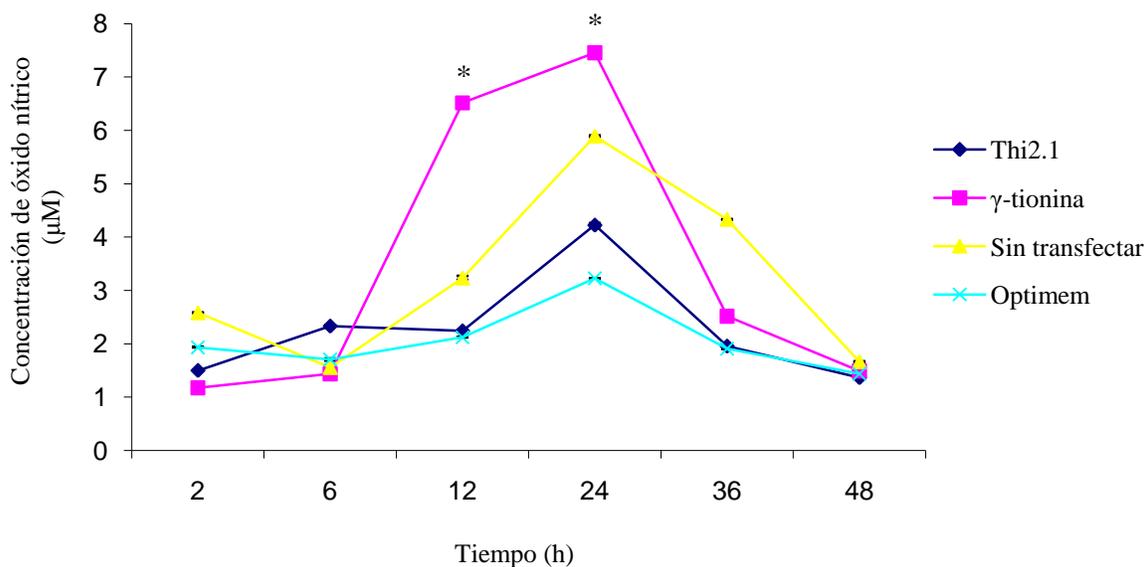
10.7 Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de *Candida albicans* en BVE-E6E7

Se realizó un ensayo de infección durante 4h en células BVE-E6E7 con la cepa *C. albicans* ATCC 10230 (Tabla 3), la cual tiene la capacidad de internalizarse en éstas células. Posteriormente, se evaluó el efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 en contra de *C. albicans* una vez endocitado en las células BVE-E6E7. Como control, se utilizó el MC de células sin transfectar y el medio Optimem. Se agregó 3.125 μ g de proteína total de cada uno de los MC, y las BVE-E6E7 se lisaron a diferentes tiempos de incubación con los MC. Después de las 12h se observó un promedio de inhibición del hongo intracelular en presencia del MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina en un 35%, mientras que el promedio de inhibición en presencia del MC de las células BVE-E6E7 productoras de la tionina Thi2.1 fue del 90% con respecto al MC de las células sin transfectar (control) (Figura 15).

a)



b)



Figuras 14. Producción de óxido nítrico en las BVE-E6E7 sin infectar e infectadas con *Staphylococcus aureus* en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1. Se colectaron los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1, así como los MC de las células sin transfectar (control) y el medio Optimem, para determinar la presencia del óxido nítrico en las células **a)** sin infectar (basal) e **b)** infectadas con *S. aureus* a distintos tiempos. Se muestra el promedio de triplicados con sus respectivos errores estándar de 3 experimentos. * $P \leq 0.05$ en relación con el efecto del MC sin transfectar.

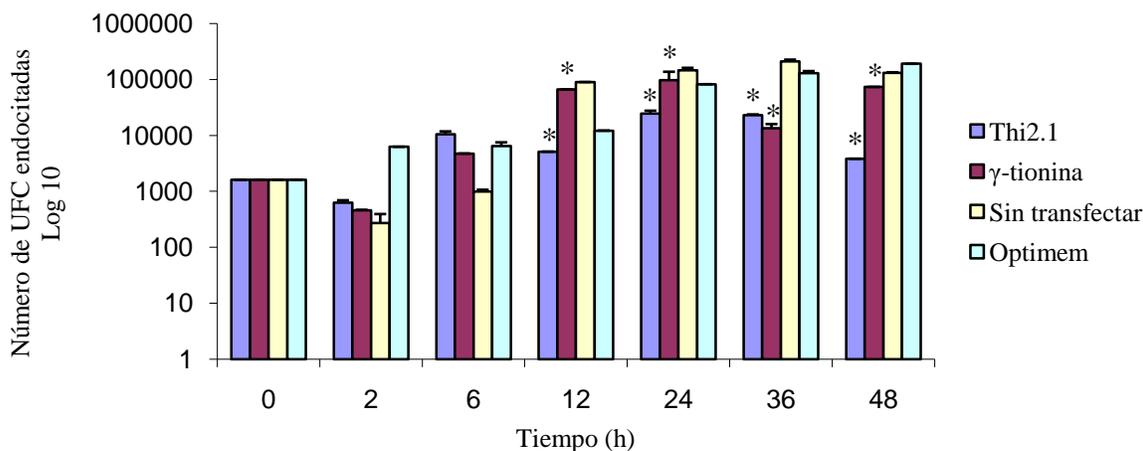
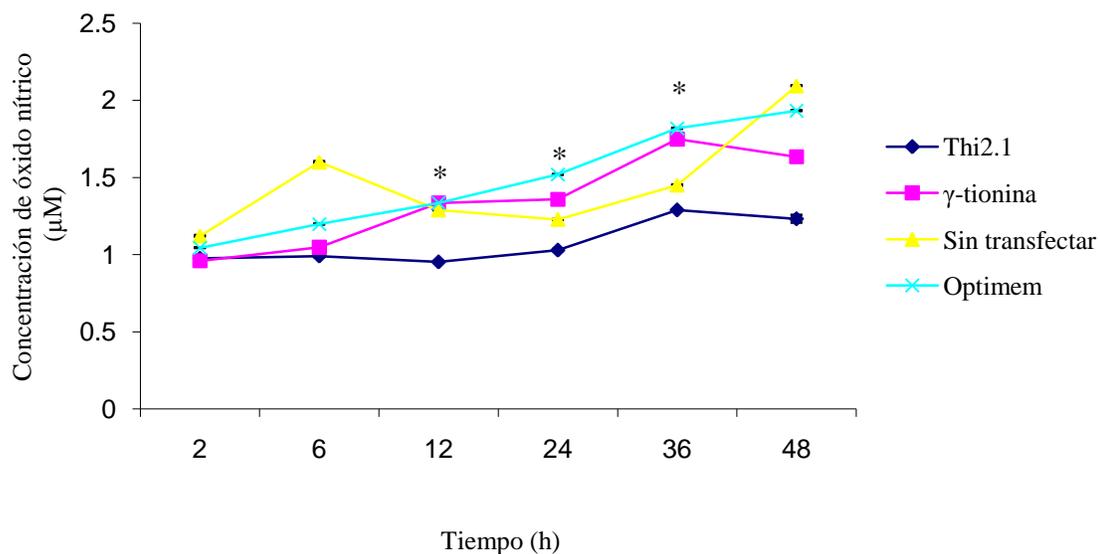


Figura 15. Efecto de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 sobre la sobrevivencia intracelular de *Candida albicans* ATCC 10230 en BVE-E6E7. Las BVE-E6E7 se infectaron durante 4 h con una MDI de 2 levaduras por célula, y se incubaron a diferentes tiempos con 2.5 μ g de proteína total de los tres diferentes MC. Se muestra el promedio de triplicados con sus respectivos errores estándar de 3 experimentos. * $P \leq 0.05$ en relación con el efecto del MC sin transfectar.

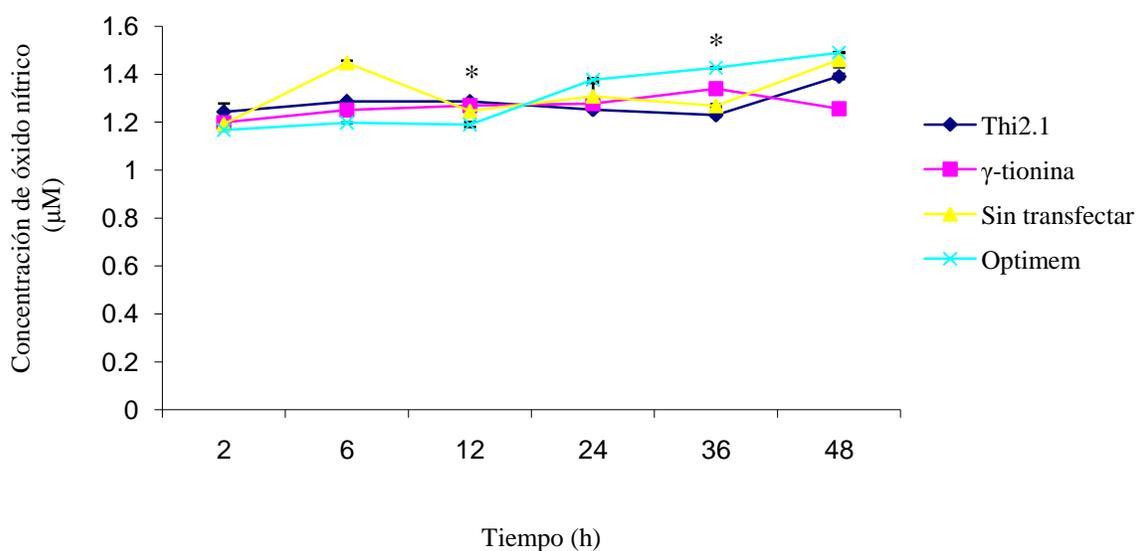
10.8 Producción de óxido nítrico en las BVE-E6E7 sin infectar (basal) e infectadas con *Candida albicans* en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1

Se evaluó la producción de óxido nítrico en las BVE-E6E7 sin infectar (basal) e infectadas con *C. albicans* en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1 en, se colectó el MC a distintos tiempos para ser filtrados y evaluar así la presencia de óxido nítrico en el MC mediante el reactivo de Griess. Como control negativo, se utilizó el MC de células sin transfectar y el medio Optimem. En presencia de todos los MC hay producción de óxido nítrico similar por parte de las células BVE-E6E7 en todos los tiempos evaluados, tanto en las células sin infectar (basal) como en las células infectadas con *C. albicans*, lo que nos indica que la defensina γ -tionina y la tionina Thi2.1 tienen un efecto directo sobre el patógeno interno sin modular la respuesta inmune de la célula huésped, ya que la producción de óxido nítrico en las BVE-E6E7 sin infectar (basal) e infectadas con *C. albicans* en presencia de los MC son similares (Figuras 16).

a)



b)



Figuras 16. Producción de óxido nítrico en las BVE-E6E7 sin infectar e infectadas con *Candida albicans* en presencia de los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1. Se colectaron los MC de las células BVE-E6E7 productoras de la defensina γ -tionina y de la tionina Thi2.1, así como los MC de las células sin transfectar (control) y el medio Optimem, para determinar la presencia del óxido nítrico producido por las células **a)** sin infectar (basal) e **b)** infectadas a distintos tiempos. Se muestra el promedio de triplicados con sus respectivos errores estándar de 3 experimentos. * $P \leq 0.05$ en relación con el efecto del MC sin transfectar.

11. DISCUSIÓN

Debido a la resistencia que han adquirido los patógenos por el uso indiscriminado de los fármacos convencionales, se han buscado alternativas para su control. En este sentido, los péptidos antimicrobianos (PA) pueden ser una alternativa viable, ya que han demostrado tener efectos antibacterianos y antifúngicos, pueden inactivar virus e incluso ser citotóxicos en contra de células tumorales (Sitaram y Nagaraj, 1999; Hancock y Scott, 2000; Risso, 2000; Loeza-Angeles *et al.*, 2008). Incluso algunos de estos PA ya están siendo utilizados de manera terapéutica, clínica y comercial (Papo y Shai, 2005; Lupetti *et al.*, 2002).

El presente trabajo tuvo la finalidad de evaluar la capacidad antimicrobiana de los PA γ -tionina de *C. chinense* y Thi2.1 de *A. thaliana* producidos por endotelio bovino, sobre patógenos bacterianos y fúngicos intracelulares de mamíferos, de manera particular *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Lo anterior se realizó en base a que se ha demostrado que los PA tienen capacidad bactericida contra *Staphylococcus epidermidis* (patógeno intracelular, causante de infecciones en la piel) (Caparelli *et al.*, 2008), capaces de atravesar las membranas celulares de mamíferos y formar poros en células de ovario K1 de hámster, células fibroblásticas TM12 y células de carcinoma cervical humano HeLa (Takeshima *et al.*, 2003; Imura *et al.*, 2008) y además de la capacidad de internalizarse en las células mediante un mecanismo pasivo dependiente de concentración, independiente de la temperatura y sin causar algún efecto citotóxico (Imura *et al.* 2008).

Algunos patógenos tienen la capacidad de internalizarse en células fagocíticas no profesionales con la finalidad de evadir los antibióticos o las defensas del sistema inmune. Las células intestinales epiteliales (Caco-2) comúnmente son infectadas por coliformes principalmente por cepas enterepatógenas de *E. coli*. Con la finalidad de encontrar el aislamiento o cepa con la mayor capacidad de internalización en Caco-2, y así poder evaluar el efecto de los PA de la defensina γ -tionina de *C. chinense* y de la tionina Thi2.1 de *A. thaliana* sobre coliformes intracelulares en las células Caco-2, se realizaron ensayos de invasión en células Caco-2 con los 12 aislamientos de coliformes obtenidas de casos de mastitis identificados en su mayoría como *E. coli* y las 3 cepas enteropatógenas de *E. coli* provenientes de casos clínicos de diarrea [enterotoxigénica (H10407), enteropatogénica (O111) y enteroinvasiva (E11)]. Se ha reportado que la cepa ETEC H10407 es capaz de invadir células

intestinales humanas con una MDI alta (Elsinghorst y Kopecko, 1992). Desafortunadamente en este trabajo no se encontró ningún aislamiento o cepa de *E. coli* capaz de internalizarse considerablemente en las células Caco-2 (Figura 10). Lo anterior puede deberse a algunas características particulares de las células Caco-2 como: la capacidad de producir efectores que maten a los patógenos rápidamente como la producción de iNOS o NO después de la infección del patógeno (Witthöft *et al.*, 1998), además también producen PA como las β -defensinas 1 y 2 (O'Neil *et al.*, 1999; Shelee *et al.*, 2007; Vora *et al.*, 2004), α y β - defensinas 5 y 6 (Wehkamp *et al.*, 2002) los cuales eliminan a patógenos ajenos a la microflora intestinal. Es importante señalar que se realizaron ensayos con MDI mas grandes (hasta 100); sin embargo, los resultados no evidenciaron un incremento en la endocitosis de esta bacteria por las células Caco-2 (datos no mostrados).

En este trabajo se demostró que el PA Thi2.1 de *A. thaliana* producido por células BVE-E6E7, puede presentar actividad antimicrobiana en contra de los patógenos *S. aureus* y *C. albicans* una vez endocitados en las CEMB y BVE-E6E7, ya que se observó una reducción de hasta un 100% apartir de las 24h y de un 40% respectivamente en las células tratadas con estos PA respecto al control (Figuras 11 y 13). Estos resultados coinciden con estudios previos en el laboratorio donde se demostró que la tionina Thi2.1 de *A. thaliana*, muestra actividad antibacteriana y antifúngica de manera directa sobre las cepas de *S. aureus* y *C. albicans* (Loeza-Angeles *et al.*, 2008). Por otro lado, un reporte previo de nuestro grupo de trabajo reportó una baja actividad antibacteriana de la γ -tionina de manera directa sobre *S. aureus* (Anaya-López *et al.*, 2006a). Sin embargo, en este trabajo se observó una reducción importante del 75 y 60% en las UFC de *S. aureus* recuperadas en las células CEMB y BVE-E6E7 tratadas respectivamente con este PA (Figuras 11 y 13). Estos datos podrían ser explicados debido a que el PA γ -tionina de *C. chinense* producido por las células BVE-E6E7 podría estar induciendo la producción de óxido nítrico en las células CEMB y BVE-E6E7. En apoyo a esta hipótesis, la medición de los niveles de NO producido por las CEMB y BVE-E6E7 tratadas en presencia del MC e infectadas con *S. aureus* o *C. albicans* mostraron mayores niveles de NO (Figuras 12 y 14), resultados que coinciden con lo reportado por Ochoa-Zarzosa *et al.*, (2009) para células infectadas con *S. aureus* y por Fratti *et al.*, (1996) con células infectadas con *C. albicans*. Esto nos indica que la producción de NO en las células modulado por la γ -tionina puede ser el responsable de matar al patógeno intracelular. Como se mencionó anteriormente,

la modulación de la respuesta inmune es una característica de los PA (Ganz, 2003) y estos resultados coinciden con los reportados en donde PA como la dermaseptina de piel de rana, inducen las especies reactivas del oxígeno (ERO o ROS *por sus siglas en inglés*) para el control de patógenos intracelulares mediante un efecto catalítico con la generación de enzimas como las oxidasas NADPH (Ammar *et al.*, 1998).

Por otra parte, los efectos antifúngicos que presenta el PA γ -tionina en contra de *C. albicans* endocitado en las BVE-E6E7 (Figura 15), pudieran ser resultado del efecto directo del PA y no estar mediados por la producción de NO, ya que los niveles de NO en células infectadas con el hongo y en ausencia de éste son similares. Dicho efecto directo sobre *C. albicans* coincide con el estudio realizado por Anaya-López *et al.*, (2006a).

Para eliminar la posibilidad de que los PA que penetran las células BVE-E6E7 pudieran dañarlas, se realizó un ensayo de viabilidad donde las células fueron tratadas hasta por 48h con los MC, los resultados obtenidos permitieron establecer que no existe una disminución en la viabilidad en las células endoteliales (datos no mostrados), lo que descarta la posibilidad de que la disminución en las UFC recuperadas sea debida a una reducción en el número de células viables. Estos resultados fueron similares a lo reportado anteriormente (Loeza-Angeles *et al.*, 2008).

Un resumen de los resultados obtenidos en este trabajo se muestran en la Figura 17, en donde Thi2.1 presenta actividad antimicrobiana en contra de los patógenos *S. aureus* y *C. albicans* una vez endocitados en CEMB y BVE-E6E7; mientras que la γ -tionina muestra actividad antibacteriana en contra de *S. aureus*, a través de regular la producción de NO en células CEMB y BVE-E6E7. En cuanto a los efectos antifúngicos que presenta la γ -tionina en contra de *C. albicans* endocitado en las BVE-E6E7, éstos son efectos directos no mediados por la producción de NO.

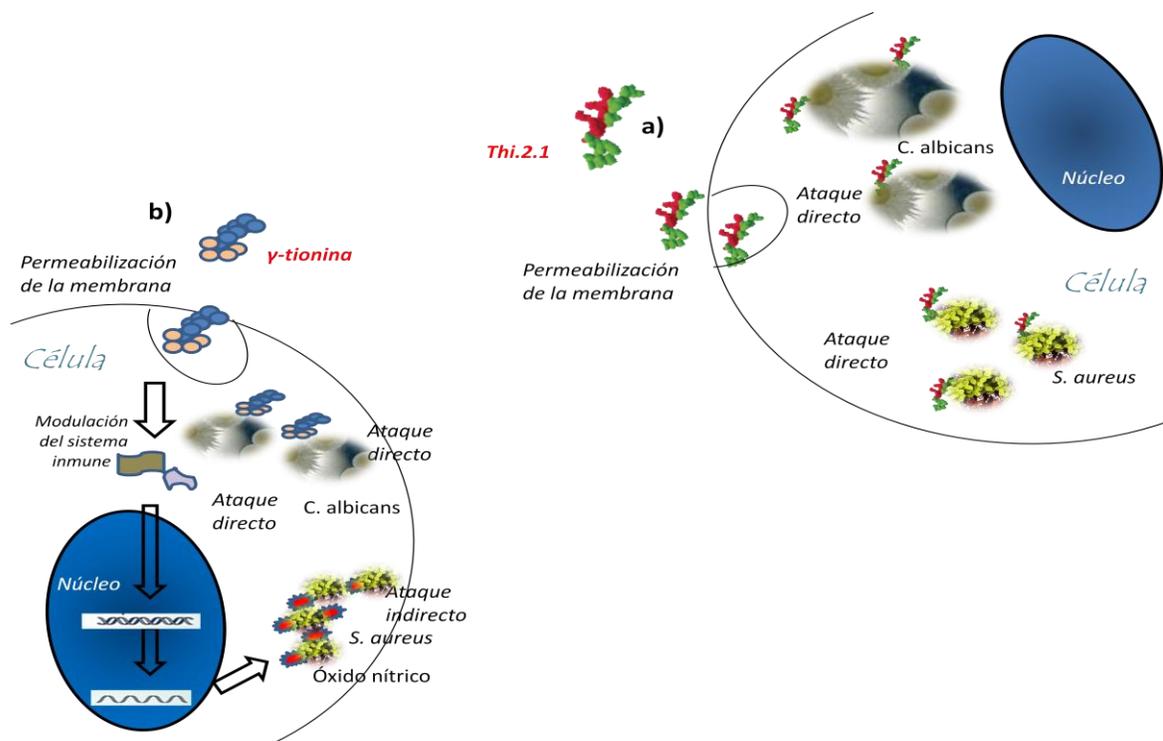


Figura 17. Mecanismos de acción de la tionina Thi2.1 y de la defensina γ -tionina sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* endocitados en CEMB y BVE-E6E7. a) La tionina Thi2.1 tiene actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *C. albicans* de manera directa una vez endocitados. b) La defensina γ -tionina posee actividad antifúngica en contra de *C. albicans* directamente y actividad antibacteriana contra *S. aureus* de manera indirecta mediante la modulación de la respuesta inmune de la célula.

12. CONCLUSIONES

El PA Thi2.1 de *A. thaliana* producido por células BVE-E6E7 puede presentar actividad antimicrobiana directa en contra de los patógenos *S. aureus* y *C. albicans* una vez endocitados en CEMB y BVE-E6E7; mientras que el PA γ -tionina de *C. chinense* producido por células BVE-E6E7, puede mostrar actividad antibacteriana indirecta en contra de *S. aureus*, a través de regular la producción de NO en células CEMB y BVE-E6E7. Por otra parte, los efectos antifúngicos que presenta el PA γ -tionina en contra de *C. albicans* endocitado en las BVE-E6E7 son efectos directos no mediados por la producción de NO.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Agerer F., Michel A., Ohlsen K. y Hauck C.R. 2003. Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 43: 42524-42531.
- Alexander E.H. y Hudson M.C. 2001. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl Microbiol Biotechnol.* 3-4: 361-366.
- Alonso A. y García-del Portillo F. 2004. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol.* 3: 181-191.
- Aluru M., Curry J. y O'Connell M.A. 1999. Nucleotide sequence of a defensin or γ -thionin-like gene (accession no. AF128239) from habanero chilli. *Plant Physiol.* 120: 633.
- Ammar B., Perianin A., Mor A., Sarfati G., Tissot M. y Nicolas P., et al. 1998. Dermaseptin, a peptide antibiotic, stimulates microbicidal activities of polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 3: 870-875.
- Anaya-López J.L., López-Meza J.E., Baizabal-Aguirre V.M., Cano-Camacho H. y Ochoa-Zarzosa A. 2006a. Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. *Biotech Lett.* 14: 1101-1108.
- Anaya-López J.L., Contreras-Guzmán O.E., Cárabez-Trejo A., Baizabal-Aguirre V.M., López-Meza J.E., Valdez-Alarcón J.J. y Ochoa-Zarzosa A. 2006b. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res Vet Sci.* 3: 358-361.
- Bean A., Williamson J. y Cursons R.T. 2004. Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 6: 285-287.
- Beutler B., Jiang Z., Georgel P., Crozat K., Croker B. y Rutschmann 2006. Genetic analysis of host resistance: toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol.* 24: 353-389.
- Bogdan C., Rollinghoff M. y Diefenbach A. 2000a. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 1: 64-76.
- Bogdan C., Rollinghoff M. y Diefenbach A. 2000b. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev.* 173: 17-26.
-

- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 10: 907-916.
- Bolander F.F. 2001. The role of nitric oxide in the biological activity of prolactin in the mouse mammary gland. *Mol Cell Endocrinol.* 1-2: 91-98.
- Boman H.G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol.* 13: 61-92.
- Boman H.G. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med.* 3: 197-215.
- Boudeau J., Glasser A.L., Masseret E., Joly B. y Darfeuille-Michaud A. 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun.* 9: 4499-4509.
- Boulanger V., Bouchard L., Zhao X. y Lacasse P. 2001. Induction of nitric oxide production by bovine mammary epithelial cells and blood leukocytes. *J Dairy Sci.* 6: 1430-1437.
- Bradley A. y Green M. 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J Clin Microbiol.* 5: 1845-1849.
- Bradley, A., 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J.* 2: 116-128.
- Bradley A.J., Leach K.A., Breen J.E., Green L.E. y Green M.J. 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet Res.* 8: 253-257.
- Brogden K.A. 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 3: 238-250.
- Bradshaw J.P. 2003. Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. *Biodrugs* 4: 233-240.
- Broekaert W.F., Terras F.R.G., Cammue B.P.A. y Osborn R.W. 1995. Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 4: 1353-1358.
- Bulet P., Stocklin R. y Menin L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.* 198:169-184.
- Calderone R., Suzuki S., Cannon R., Cho T., Boyd D., Calera J., Chibana H., Herman D., Holmes A., Jeng H.W., Kaminishi H., Matsumoto T., Mikami T., O'Sullivan J.M., Sudoh M., Suzuki M., Nakashima Y., Tanaka T., Tompkins G.R. y Watanabe T.

2000. *Candida albicans*: Adherence, signal and virulence. *Med Mycol.* 1: 125-137.
- Capparelli R., Ventimiglia I., Palumbo D., Nicodemo D., Salvatore P., Amoroso M.G. y Iannaccone M. 2007. Expression of recombinant puroindolines for the treatment of staphylococcal skin infections (acne vulgaris). *J Biotechnol.* 3: 606-614.
- Cardonha A., Vieira R., Rodrigues D., Macrae A., Peirano G. y Teophilo G. 2004. Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. *Int Microbiol.* 3: 213-218.
- Cajero-Juárez M., Avila B., Ochoa A., Garrido-Guerrero E., Varela-Echavarría A., Martínez de la Escalera G. y Clapp C. 2002. Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur J Cell Biol.* 1:1-8.
- Chaly Y.V., Paleolog E.M., Kolesnikova T.S., Tikhonov I.I., Petratchenko E.V. y Voitenok N.N. 2000. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur Cytokine Netw.* 2: 257-266.
- Chatterjee S.S., Hossain H., Otten S., Kuenne C., Kuchmina K. y Machata S. 2006. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 2: 1323-1338.
- Cotter G. y Kavanagh K. 2000. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *Br J Biomed Sci.* 3: 241-249.
- De Voss J.J., Rutter K., Schroeder B.G., Su H., Zhu Y. y Barry C.E. 3rd. 2000. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci.* 3: 1252-1257.
- Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R. y Zeiher A.M. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 6736: 601-605.
- Di Virgilio F. 2004. New pathways for reactive oxygen species generation in inflammation and potential novel pharmacological targets. *Curr Pharm Des.* 14: 1647-1652.

- Dodd F., Limoges M., Boudreau R.T.M., Rowden G., Murphy P.R. y Too C.K.L. 2000. L-arginine inhibits apoptosis via a NO-dependent mechanism in Nb2 lymphoma cells. *J Cell Biochem.* 4: 624-634.
- Dogan B., Klaessig S., Rishniw M., Almeida R.A., Oliver S.P., Simpson K. y Schukken Y.H., 2006. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 4: 270-282.
- Döpfer D., Almeida R.A., Lam T.J., Nederbragt H., Oliver S.P. y Gaastra W. 2000. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Vet Microbiol.* 4: 331-343.
- Döpfer D., Nedebragt H., Almeida R.A. y Gaastra W. 2001. Studies about the mechanism of internalization by mammary epithelial cells of *Escherichia coli* isolated from persistent bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 3: 285-296.
- Edgerton M., Koshlukova S.E., Lote., Chrzan B.G., Straubinger R.M. y Rajpa. 1998. Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 32: 20438-20447.
- Ellington J.K., Elhofy A., Bost K.L. et al. 2001. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in *Staphylococcus aureus* invasion of normal osteoblasts. *Infect Immun.* 9: 5235-5242.
- Elsinghorst E.A. y Kopecko D.J. 1992. Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 6: 2409-2417.
- Epand R.M. y Vogel H.J. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochem Biophys Acta.* 1-2: 11-28.
- Epple P., Apel K. y Bohlmann H. 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 3: 813-20.
- Epple P., Apel K. y Bohlmann H. 1997. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell.* 9: 509-520.
- Evans E.W. y Harmon B.G. 1995. A review of antimicrobial peptides: defensins and related cationic peptides. *Vet Clin Pathol.* 4: 109-116.
- Faurschou M. y Borregaard N. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 14: 1317-1327.

- Filler S., Swerdloff J., Hobbs C. y Luckett P. 1995. Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect Immun.* 3: 976-983.
- Fischbach M.A., Lin H., Liu D.R. y Walsh C.T. 2006. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat Chem Biol.* 3: 132-138.
- Fowler T., Johansson S., Wary K.K. et al. 2003. *Src* kinase has a central role in *in vitro* cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol.* 6: 417-426.
- Fratti R.A., Ghannoum M.A., Edwards J.E. Jr. y Filler S.G. 1996. Gamma interferon protects endothelial cells from damage by *Candida albicans* by inhibiting endothelial cell phagocytosis. *Infect Immun.* 11: 4714-4718.
- Fulton D., Gratton J.P., McCabe T.J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T.F., Papapetropoulos A. y Sessa W.C. 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 6736: 597-601.
- Gajardo M. y Sánchez G. 2006. Péptidos antimicrobianos y su participación en la defensa contra infecciones bacterianas. Departamento de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. *Revista* 17.
- Ganz T. 1999. Defensins and host defense. *Science.* 5439: 420-421.
- Ganz T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 9: 710-720.
- Ganz T. 2004. Antimicrobial polypeptides. *J Leukoc Biol.* 75: 34-38.
- García F., Molina A., Alamillo M.J. y Rodríguez P. 1998. Plant defense peptides. *Biopolymers* 6: 479-491.
- García F., Rodríguez P., Molina A., Alamillo J.M., López E., Berrocal M. y Poza C. 2001. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defence. *FEBS Lett.* 2-3: 219-222.
- Garzoni C. y Kelley W.L. 2009. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* 2: 59-65
- Gutiérrez-Barroso A., Anaya-López J.L., Lara-Zárate L., Loeza-Lara P.D., López-Meza J.E. y Ochoa-Zarzosa A. 2008. Prolactin modulates the expression of inflammatory response genes and stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 1-2: 113-22.

- Hancock R.E.W. y Lehrer R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 2: 82-88.
- Hancock R.E.W. y Chapple D.S. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 6: 1317-1323.
- Hancock R.E.W. y Scott M.G. 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defense. *Proc Natl Acad Sci.* 16: 8856-8861.
- Hancock R.E.W. y Rozek A. 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett.* 2: 143-149.
- Harrison D.G., Widder J., Grumbachi I., Chen W., Weber M. y Searles C. 2006. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med.* 4: 351-363.
- Hazan I., Sepulveda-Becerra M. y Liu H. 2002. Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 1: 134-145.
<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.
- Imura Y., Choda N. y Matsuzaki K. 2008. Magainin 2 in action: distinct modes of membrane permeabilization in living bacterial and mammalian cells. *Biophys J.* 12: 5757-5765.
- Inohara C., McDonald C. y Nunez G. 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem.* 74: 355-383.
- Jansen A. y Yu J. 2006. Differential gene expression of pathogens inside infected hosts. *Curr Opin Microbiol.* 2: 138-142.
- Jones M.L., Ganopolsky J.G., Labbé A. y Prakash S. 2010. A novel nitric oxide producing probiotic patch and its antimicrobial efficacy: preparation and in vitro analysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* En prensa DOI10.1007/s00253-010-2490-x.
- Kaipainen T., Pohjanvirta T., Shpigel N.Y., Shwimmer A., Pyorala S. y Pelkonen S. 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol.* 1: 37-46.
- Kaiser V. y Diamond G. 2000. Expression of mammalian defensin genes. *J Leukoc Biol.* 6: 779-784.
- Kamysz W., Okrój M. y Lukasiak J. 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol.* 2: 461-469.

- Kerro-Dego O., Van Dijk J.E. y Nederbragt H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet Q.* 4: 181-198
- Kieffer A.E., Goumon Y., Ruh O., Chasserot-Golaz S., Nullans G. y Gasnier C. 2003. The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *FASEB J.* 6: 776-778.
- Klotman M.E. y Chang T.L. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol.* 6: 447-456.
- Lay F.T. y Anderson M.A. 2005. Defensins: Components of the innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci.* 1: 85-101.
- Lirk P., Hoffmann G. y Rieder J. 2002. Inducible nitric oxide synthase – time for reappraisal. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 1: 89-108.
- Loeza-Ángeles H., Sagrero-Cisneros E., Lara-Zárate L., Villagómez-Gómez E., López-Meza J.E. y Ochoa-Zarzosa A. 2008. Expression of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* in endothelial cells with antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotech Lett.* 30: 1713-1719.
- Lowenstein C.J., Dinerman J.L. y Snyder S.H. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Int Med.* 3: 227-237.
- Lowy F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 8: 520-532.
- Lupetti A., Danesi R., W van't Woot J., van Dissel J.T., Senesi S. y Nibbering P.H. 2002. Antimicrobial Peptides: therapeutics potential for the treatment of *Candida* infections. *Expert Opin Investig Drugs* 2: 309-318.
- Maeda H. y Akaike T. 1998. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochem.* 7: 854-865.
- Marletta M.A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 17: 12231-12234.
- Michel T. y Feron O. 1997. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest.* 9: 2146-2152.
- Mitchell A.P. 1998. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 6: 687-692.

- Moncada S., Palmer R.M.J. y Higgs E.A. 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 11: 1709-1715.
- Moncada S., Palmer R.M. y Higgs E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2: 109-142.
- Moncada S. y Higgs A. 2002. The L-arginine–nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 27: 2002-2012.
- Nagaoka I., Hirota S., Niyonsaba F., Hirata M., Adachi Y., Tamura H. y Heumann D. 2001. Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14 (+) cells. *J Immunol.* 6: 3329-3338.
- Nataro J.P. y Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1: 142-201.
- Nathan C. y Xie Q.W. 1994a. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell.* 6: 915-918.
- Nathan C. y Xie Q.W. 1994b. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 19: 13725-13728.
- Nguyen T., Van Le P., Le C.H. y Weintraub A. 2005. Antibiotic resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2: 816-819.
- Nicholas G.D., Auld M.J., Molan P.C., Stelwagen K. y Prosser C.G. 2002. Effects of stage of lactation and time of year on plasmin-derived proteolytic activity in bovine milk in New Zealand. *J Dairy Res.* 4: 533-540.
- Nicolas P. 2009. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *The FEBS J.* 22: 6483-6496.
- Ochoa-Zarzosa A., Loeza-Angeles H., Lara-Zárate L., Sagrero-Cisneros E., Villagómez-Gómez E. y López-Meza J.E. 2008a. Antibacterial activity of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 3-4: 425-430.
- Ochoa-Zarzosa A., Villarreal-Fernández E., Cano-Camacho H. y López-Meza J.E., 2009. Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine

- mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microb Pathog.* 1: 1-7.
- Ogata K., Linzer B.A., Zuberi RI., Ganz T. y Catanzaro S. 1992. Activity of defensins of human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immun.* 11: 4720-4725.
- Onona M. y Inano H. 1998. Localization of nitric oxide synthases and nitric oxide production in the rat mammary gland. *J Histochem Cytochem.* 11: 1269-1278.
- Oviedo-Boyso J., Barriga-Rivera J.G., Valdez-Alarcón J.J., Bravo-Patiño A., Cárabez-Trejo A., Cajero-Juárez M. y Baizabal-Aguirre V.M. 2008. Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF-kappaB and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta. *Scand J Immunol.* 2: 169-176.
- Palace A. 2008. "Fagocitosis" <http://autorneto.com/referencia/salud-y-bienestar/fagocitosis/> (Accesada en Diciembre del 2009).
- Palm-Apergi C., Lorents A., Padari K., Pooga M. y Hällbrink M. 2009. The membrane repair response masks membrane disturbances caused by cell-penetrating peptide uptake. *FASEB J.* 1: 214-223.
- Papo N. y Shai Y. 2005. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol Life Sci.* 7-8: 784-790.
- Parent M.A., Bellaire B.H., Murphy E.A., Roop R.M. 2nd, Elzer P.H. y Baldwin C.L. 2002. *Brucella abortus* siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) facilitates intracellular survival of the bacteria. *Microb Pathog.* 5: 239-248.
- Passey S., Bradley A. y Mellor H. 2008. *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis invade mammary cells by a modified endocytic pathway. *Vet Microbiol.* 1-2: 151-164.
- Pellegrini P.B. y Franco O.L. 2005. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell B.* 11: 2239-2253.
- Phan Q.T., Belanger P.H. y Filler S.G. 2000. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect Immun.* 6: 3485-3490.

- Radtke A.L. y O'Riordan M.X. 2006. Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cell Microbiol.* 8: 1720-1729.
- Reeves E.P., Lu H., Jacobs H.L., Messina C.G., Bolsover S. y Gabella G., et al. 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nat.* 416: 291-297.
- Reiss C.S. y Komatsu T. 1998. Does nitric oxide play a critical role in viral infections? *J Virol.* 6: 4547-4551.
- Risso A. 2000. Leukocyte antimicrobial peptides: Multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol.* 6: 785-792.
- Rivas-Santiago B., Sada E., Hernández-Pando R. y Tsutsumi V. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Publica Mexicana* 1: 62-71.
- Ryan O., Prado M. y Pickering L. K. 2005. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing in work. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2: 125-136.
- Sánchez A.A., Johnston D.A., Myers C., Edwards J.E., Mitchell A.P. y Filler S.G. 2004. Relationship between *Candida albicans* virulence during experimental hematogenously disseminated infection and endothelial cell damage *in vitro*. *Infect Immun.* 1: 598-601.
- Segura A., Moreno M., Molina A. y García-Olmedo F. 1998. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett.* 2-3:159-162.
- Scaletsky I.C., Gatti M.S., da Silveira J.F., DeLuca I.M., Freymuller E. y Travassos L.R. 1995. Plasmid coding for drug resistance and invasion of epithelial cells in enteropathogenic *Escherichia coli* 0111:H. *Microb Pathog.* 6: 387-399.
- Shafer W.M., Hubalek F., Huang M. y Pohl J. 1996. Bactericidal activity of a synthetic peptide (CG 117-136) of human lysosomal cathepsin G is dependent on arginine content. *Infect Immun.* 11: 4842-4845.
- Shpigel N.Y., Elazar S. y Rosenshine I. 2008. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol.* 1: 60-65.
- Sinha B., Francois P.P., Nüße O., Foti M., Hartford O.M., Vaudaux P., Foster T.J., Lew D.P., Herrmann M. y Krause K.H. 1999. Fibronectin binding protein acts as

- Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. Cell Microbiol. 1: 101-117.
- Sinha B. y Herrmann M. 2005. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. Thromb Haemost. 2: 266-277.
- Sitaram N. y Nagaraj R. 1999. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity. Biochim Biophys Acta. 1-2: 29-54.
- Steele-Mortimer O., Knodler L.A. y Finlay B.B. 2000. Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. Traffic. 2: 107-118.
- Takekuma K., Chikushi A., Lee K.K., Yonehara S. y Matsuzaki K. 2003. Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes. J Biol Chem. 2: 1310-1315.
- Thevissen K., Ghazi A., De Samblax G.W., Brownlee C., Osborn R. y Broekaert W.W.F. 1996. Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. J Biol Chem. 25: 15018-15025.
- Thevissen K., Warnecke D., Francois I., Leipelt M., Heinz E., Ott C., Zahringer U., Thomma B.P., Fereket K., Cammue B.P. 2004. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. J Biol Chem. 6: 3900-3905.
- Tripathi P., Tripathi P., Kashyap L. y Singh V. 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. FEMS Immunol Med Microbiol. 3: 443-452.
- Vignutelli A., Wasternack C., Apel K. y Bohlmann H. 1998. Systemic and local induction of an *Arabidopsis thionin* gene by wounding and pathogens. Plant J. 3: 285-295.
- Vora P., Youdim A., Thomas L.S., Fukata M., Tesfay S.Y., Lukasek K., Michelsen K.S., Wada A., Hirayama T., Arditi M. y Abreu M.T. 2004. β -Defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. J Immunol. 9: 5398-5405.
- Waldvogel F.A. 1995. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In Principles and Practice Infec Dis. 1754-1776.
- Wehkamp J., Schwind B., Herrlinger K.R., Baxmann S., Schmidt K., Duchrow M., Wohlschlager C., Feller A.C., Stange E.F. y Fellermann K. 2002. Innate immunity and colonic inflammation enhanced expression of epithelial α -Defensins. Dig Dis Sci. 6: 1349-1355.

- Weidenmaier C., Peschel A. y Xiong Y.Q. et al. 2005. Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J Infect Dis.* 10: 1771-1777.
- Witthöft T., Eckmann L., Kim J.M. y Kagnoff M.F. 1998. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am J Physiol.* 3 Pt 1: G564-G571.
- Zughaier S.M., Shafer W.M. y Stephens D.S. 2005. Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. *Cell Microbiol.* 9: 1251-1262.
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature.* 6878: 389-395.
- Zhan X., Li D. y Johns R.A. 2003. Expression of endothelial nitric oxide synthase in ciliated epithelia of rats. *J Histochem Cytochem.* 1: 81-87.