



# Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Programa Institucional de Maestría en Ciencias  
Biológicas

---

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Área temática  
Biotecnología Pecuaria



## **“Evaluación de la actividad inhibitoria de proteasas de la defensina (PaDef) de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*)”**

Tesis

Para obtener el grado de:  
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta

QFB. Cinthya Estefani López Aguilar

Director de tesis

D.C. Rodolfo López Gómez

Codirector

D.C. Joel Edmundo López Meza

Comité

D.C. Patricia Nayeli Alva Murillo

D.C. Alejandra Ochoa Zarzosa

D.C. Rafael Salgado Garciglia

Morelia, Michoacán a febrero del 2022

*“La fe y la razón son como dos alas en las que el  
espíritu humano se eleva hacia la contemplación  
de la verdad”*

*Papa San Juan Pablo II, Fides et Ration*

*Dedicada a las mujeres más importantes, mi  
abuelita Petrita que sin importar el plano  
espiritual continúa amándome, apoyándome y  
guiándome desde el cielo. Y a mi mamá, que  
además de su invaluable presencia, me enseña a  
perseverar y ser valiente ante cualquier  
circunstancia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente a Dios por brindarme los elementos necesarios para crecer en paciencia, sabiduría e inteligencia, las cuales, han sido cruciales en el desarrollo de mi formación integral.

A mi mamá Enriqueta Aguilar García por su confianza, amor, apoyo incondicional y motivación para descubrir una versión mejorada de mí, cada día.

A mis hermanos David Alejandro y Luis Alberto López Aguilar por su consejo, cuidado, confianza y amor en cada uno de mis días.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico, el cual fue vital para poder llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, de manera especial a todo el personal académico y administrativo que integra el Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, por su invaluable trabajo que beneficia a decenas de estudiantes año tras año.

A los laboratorios de Fisiología Molecular de Plantas, Biotecnología Molecular y Respuesta inmune innata de la interacción hospedero patógeno, por permitirme realizar este proyecto, bajo su presupuesto e instalaciones.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato, de manera especial al departamento de Biotecnología y Bioquímica a cargo de la D.C. Silvia Edith Valdés Rodríguez, así como a sus integrantes por la amistad y apoyo recibido durante la estancia realizada en dicho lugar.

A mi director y co-director, el D.C. Rodolfo López Gómez y el D.C. Joel Edmundo López Meza, respectivamente, por la confianza, paciencia, motivación, consejo y apoyo incondicional durante el desarrollo del proyecto.

Al M.C. Luis María Suárez Rodríguez, por su amistad sincera, asesoría, consejo, paciencia y apoyo brindado a lo largo de todos estos años, desde mi llegada al laboratorio “Fisiología Molecular de Plantas”.

A mi comité evaluador, la D.C. Alejandra Ochoa Zarzosa, la D.C. Patricia Nayeli Alva Murillo y al D.C. Rafael Salgado Garciglia, por sus invaluable consejos y aportaciones durante la realización de este proyecto.

A todos mis compañeros que a lo largo de los años hemos coincidido en este hermoso camino del saber, y que no solo han sido de gran apoyo en el aprendizaje, sino que también se han convertido en buenos amigos, Jesús, Rosi, Huber, Mitcy, Fernando, Aimé, Edson, Kirán, Liz, Saraí, Karina, Cristóbal y Adrián.

A mis grandes amigos Luis, Salvador, Estefaní y Cristian, gracias por apoyarme, alentarme y/o corregirme en cada una de mis locuras y nunca dejar de creer en mí.

A mi guía espiritual el Pbro. David Sandoval, que a pesar de la distancia nunca dejó de aconsejarme y animarme en los días buenos, pero sobre todo en los malos. Además, por alentarme a cuestionar todo cuanto existe, comprendiendo así que no hay fe sin razón.

A familiares, amigos, hermanos en la fe y a cada uno de los que no han dejado de creer en mí, que con sus oraciones y palabras de aliento me han motivado a perseverar y culminar este proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                                            |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                                    | vi   |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                                                                     | viii |
| ÍNDICE DE CUADROS .....                                                                    | viii |
| Resumen.....                                                                               | vii  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....                                                                       | 1    |
| 2. MARCO TEÓRICO .....                                                                     | 3    |
| 2.1 Generalidades de las proteasas .....                                                   | 3    |
| 2.1.2 Clasificación de las proteasas.....                                                  | 4    |
| 2.1.3 Inhibidores de proteasas.....                                                        | 11   |
| 2.2 Péptidos antimicrobianos (PAMs) .....                                                  | 14   |
| 2.2.3 Péptidos antimicrobianos de plantas .....                                            | 16   |
| 3. ANTECEDENTES .....                                                                      | 20   |
| 4. JUSTIFICACIÓN .....                                                                     | 21   |
| 5. HIPÓTESIS .....                                                                         | 22   |
| 6. OBJETIVOS.....                                                                          | 23   |
| 6.1 Objetivo general.....                                                                  | 23   |
| 6.2 Objetivos específicos .....                                                            | 23   |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                               | 27   |
| 7.1 Péptido PaDef .....                                                                    | 27   |
| 7.2 Línea celular MCF-7 .....                                                              | 27   |
| 7.3 Construcción de la relación filogenética de PaDef con otras defensinas de plantas..... | 27   |
| 7.4 Actividad inhibitoria de tipo serina proteasas (tripsina y quimotripsina).....         | 28   |
| 7.5 Actividad inhibitoria de tipo cisteína proteasas (papaína).....                        | 30   |
| 7.7. Actividad inhibitoria de metaloproteasas .....                                        | 31   |
| 7.6.1 Cultivo celular de la línea MFC-7 de cáncer de mama.....                             | 31   |
| 7.6.2 Extracción de proteína total del cultivo celular .....                               | 32   |
| 7.6.3 Cuantificación y visualización de las proteínas de interés.....                      | 32   |
| 7.6.4 Determinación de la actividad enzimática de metaloproteasas .....                    | 34   |
| 7.6.5 Determinación de la actividad inhibitoria en colagenasa II. ....                     | 36   |
| 7.7. Ensayos de tipo <i>in silico</i> de acoplamiento molecular o Docking.....             | 37   |

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.7.1. Preparación de receptores y ligando.....                                                                               | 37 |
| 7.7.2 Estudios de acoplamiento molecular .....                                                                                | 38 |
| 7.7.3. Análisis de los resultados .....                                                                                       | 38 |
| 7.8 Determinación cualitativa <i>in vitro</i> del acoplamiento del péptido PaDef con la tripsina proteasa. ....               | 38 |
| 7.8.1 Geles de poliacrilamida en condiciones nativas .....                                                                    | 38 |
| 7.8.2 Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata .....                                                           | 39 |
| 7.8.1 Análisis densitométrico .....                                                                                           | 40 |
| 8. RESULTADOS .....                                                                                                           | 41 |
| 8.1 Relación filogenética de la defensina PaDef y otras defensinas reportadas con actividad de tipo inhibidor enzimática..... | 41 |
| 8.2 Actividad <i>in vitro</i> del péptido PaDef sobre proteasas de tipo serina proteasas (tripsina y quimotripsina) .....     | 42 |
| 8.3 Actividad <i>in vitro</i> del péptido PaDef sobre proteasas de tipo cisteína proteasas (papaína) .....                    | 44 |
| 8.4 Actividad <i>in vitro</i> del péptido PaDef sobre metaloproteasas .....                                                   | 45 |
| 8.4.1. Actividad <i>in vitro</i> del péptido PaDef sobre colagenasa II .....                                                  | 47 |
| 8.5. Ensayos <i>in silico</i> de acoplamiento molecular o Docking.....                                                        | 48 |
| 8.6 Análisis cualitativo de la interacción del péptido PaDef con una serina proteasa (tripsina) .....                         | 51 |
| 9.DISCUSIÓN .....                                                                                                             | 53 |
| 10.CONCLUSIONES .....                                                                                                         | 57 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA .....                                                                                                        | 58 |
| 12. ANEXOS .....                                                                                                              | 67 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Proceso de hidrólisis de las proteasas.....                                                                 | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Mecanismos de reacción catalizado por serina proteasas.....                                                 | 6  |
| <b>Figura 3.</b> Mecanismo de reacción catalizado por cisteína proteasas.....                                                | 8  |
| <b>Figura 4.</b> Clasificación de metaloproteasas.....                                                                       | 9  |
| <b>Figura 5.</b> Estructura típica de una metaloproteasa.....                                                                | 10 |
| <b>Figura 6.</b> Angiogénesis tumoral.....                                                                                   | 11 |
| <b>Figura 7.</b> Mecanismos de acción general de los inhibidores de proteasas.....                                           | 13 |
| <b>Figura 8.</b> Modelos del mecanismo de acción de los PAMs.....                                                            | 15 |
| <b>Figura 9.</b> Mecanismos de acción intracelulares de los péptidos antimicrobianos..                                       | 16 |
| <b>Figura 10.</b> Clasificación del de las defensinas.....                                                                   | 18 |
| <b>Figura 11.</b> Estructura típica tridimensional de las defensinas.....                                                    | 19 |
| <b>Figura 12.</b> Alineamiento de defensinas de plantas.....                                                                 | 41 |
| <b>Figura 13.</b> Análisis evolutivo del péptido PaDef por método de máxima verosimilitud.....                               | 42 |
| <b>Figura 14.</b> Evaluación de la actividad enzimática de tipo tripsina en tratamiento con el péptido PaDef.....            | 43 |
| <b>Figura 15.</b> Evaluación de la actividad enzimática de tipo quimotripsina en tratamiento con el péptido PaDef.....       | 44 |
| <b>Figura 16.</b> Evaluación de la actividad enzimática de tipo papaína en tratamiento con el péptido PaDef.....             | 45 |
| <b>Figura 17.</b> Electroforesis en gel de acrilamida al 13% en condiciones desnaturizante, teñido con azul de Comassie..... | 46 |
| <b>Figura 18.</b> Evaluación de la actividad inhibitoria del péptido PaDef sobre metaloproteasas.....                        | 47 |
| <b>Figura 19.</b> Evaluación de la actividad inhibitoria del péptido PaDef sobre colagenasa II.....                          | 48 |
| <b>Figura 20.</b> Alineamiento de secuencias reportadas para la enzima tripsina.....                                         | 49 |
| <b>Figura 21.</b> Acoplamiento molecular de la tripsina con el péptido PaDef.....                                            | 50 |

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 22.</b> Acoplamiento molecular de la quimotripsina con el péptido PaDef.....                                 | 51 |
| <b>Figura 23.</b> Electroforesis en gel de acrilamida al 13 % en condiciones nativas, teñido con nitrato de plata..... | 52 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Criterios de clasificación de las proteasas.....                                | 5  |
| <b>Tabla 2.</b> Clasificación de los péptidos antimicrobianos de plantas.....                   | 17 |
| <b>Tabla 3.</b> Reactivos para establecer el control de enzima de tripsina y quimotripsina..... | 28 |
| <b>Tabla 4.</b> Reactivos para evaluar la actividad inhibitoria enzimática.....                 | 29 |
| <b>Tabla 5.</b> Reactivos para establecer el control de enzima de la papaína.....               | 31 |
| <b>Tabla 6.</b> Reactivos para evaluar la actividad inhibitoria enzimática.....                 | 31 |
| <b>Tabla 7.</b> Preparación de los geles de poliacrilamida.....                                 | 33 |
| <b>Tabla8.</b> Reactivos para evaluar la actividad enzimática de las metaloproteasas.....       | 35 |
| <b>Tabla 9.</b> Reactivos para evaluar la actividad enzimática de collagenasa II.....           | 36 |
| <b>Tabla 10.</b> Elemento para la preparación de los geles de poliacrilamida.....               | 39 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Formulas empleadas para determinar el control enzimático .....         | 29 |
| <b>Cuadro 2.</b> Fórmula para calcular las unidades de actividad enzimática.....        | 30 |
| <b>Cuadro 3.</b> Fórmulas para calcular el porcentaje de inhibición.....                | 35 |
| <b>Cuadro 4.</b> Sitios de corte del péptido PaDef generados por las serina proteasas.. | 56 |

## Resumen

Las proteasas o peptidasas son un grupo de enzimas que se encargan de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Se encuentran en todas las formas de vida y se reporta que se involucran en la mayoría de los procesos fisiológicos, así como en diversas patologías. Dada su importancia es vital su regulación, una de las estrategias para este proceso, es el uso de inhibidores de proteasa los cuales actúan principalmente sobre el sitio activo y/o un sitio alostérico de la enzima, estos pueden tener un origen químico o biológico. Dentro de los inhibidores de proteasa con origen biológico se encuentran los péptidos antimicrobianos, los cuales son secuencias cortas de aminoácidos, presentes en todos los organismos vivos. Diversos péptidos antimicrobianos de plantas de la familia defensina se han reportado con actividad de tipo inhibidor de proteasas, ejemplo de ello es la defensina *CfD2* de *Cassia fistula*, *ATTp* de *Arabidopsis thaliana* y una defensina de *Vigna unguiculata*.

En este trabajo se evaluó a la defensina PaDef de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*), como posible inhibidor enzimático. Para lo cual se evaluó la actividad enzimática de serina proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas en tratamiento con el péptido antes mencionado. Los resultados reportan un efecto inhibidor sobre metaloproteasas de matriz extracelular de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. En el caso de la cisteína proteasa, el péptido PaDef no generó efecto alguno sobre la papaína, lo que sugiere un efecto promotor de la actividad enzimática sobre las enzimas pertenecientes al grupo de la serina proteasa, como lo son la tripsina y quimotripsina bovina. Este resultado es novedoso, dado que no existen reportes de péptidos antimicrobianos con actividad de tipo promotora enzimática.

**Palabras claves:** Planta, Actividad enzimática, Inhibidor enzimático, Péptido antimicrobiano, Defensina PaDef.

## Abstract

Proteases or peptidases are a group of enzymes that are responsible for catalyzing the hydrolysis of peptide bonds in proteins. They are found in all life forms and are reported to be involved in most physiological processes, as well as in various pathologies. Given its importance, its regulation is vital, one of the strategies for this process is the use of protease inhibitors which act mainly on the active site and/or an allosteric site of the enzyme, these can have a chemical or biological origin. Among the protease inhibitors with biological origin are antimicrobial peptides, which are short sequences of amino acids, present in all living organisms. Various antimicrobial peptides from plants of the defensin family have been reported with protease inhibitor-type activity, an example of this is the CfD2 defensin from *Cassia fistula*, ATTp from *Arabidopsis thaliana*, and a defensin from *Vigna unguiculata*.

In this work, the PaDef defensin from Mexican native avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) was evaluated as a possible enzyme inhibitor. For which the enzymatic activity of serine proteases, cysteine proteases, and metalloproteases in treatment with the peptide was evaluated. The results showed that PaDef has an inhibitory effect on extracellular matrix metalloproteases of the MCF-7 breast cancer cell line. In the case of cysteine protease, PaDef does not have any effect on papain and interestingly a promoting effect of enzymatic activity of serine protease group, such as bovine trypsin and chymotrypsin, was observed. This result was novel since there are no reports of antimicrobial peptides with enzyme promoter-type activity.

**Key words:** Plant, Enzymatic activity, Enzymatic inhibitor, Antimicrobial peptide, Defensin PaDef.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las proteasas conforman una gran familia de enzimas encargadas de hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas. Se clasifican en función al aminoácido o metal presente en su centro activo (proteasas aspárticas, glutámicas, cisteína proteasas, serina proteasas, treonina proteasas, metaloproteasas y proteasas con mecanismos catalíticos desconocidos). Su buen funcionamiento es fundamental en todos los seres vivos ya que se involucran en un sinnúmero de procesos fisiológicos, desde el crecimiento, la nutrición, mecanismos de defensa e incluso en la regulación de la apoptosis. Además, se sabe que también se asocian a procesos patológicos como es el caso del cáncer y el VIH (Polgán, 2005; Sapkale *et al.*, 2012; Salvesen *et al.*, 2016).

Dado el papel fisiológico de las proteasas, es de suma importancia regular su actividad, para ello los organismos han desarrollado diversos mecanismos, los cuales actúan desde la activación de las proteasas por la escisión del dominio zimógeno, hasta el uso de inhibidores enzimáticos, los cuales actúan sobre el sitio activo o alostérico.

Dentro de los inhibidores investigados recientemente se encuentran los péptidos antimicrobianos de plantas. Estos son secuencias cortas de aminoácidos (<100 residuos de aminoácidos), su estructura terciaria se encuentra estabilizada por puentes disulfuros, los cuales se establecen entre cisteínas altamente conservadas, favoreciendo así su actividad biológica. Se les asocia principalmente en la defensa contra diversos patógenos. Sin embargo, se sabe están involucrados en múltiples procesos fisiológicos (Herrera-Díaz *et al.*, 2016; Haney *et al.*, 2019; Koehbach y Craik, 2019).

La familia de las defensinas es un grupo de péptidos antimicrobianos de los cuales se tienen reportes que actúan como inhibidores de proteasas, tal es el caso de la defensina CfD2 de *Cassia fistula*, ATTp de *Arabidopsis thaliana* y una defensina de *Vigna unguiculata*. Dichas defensinas presentan actividad frente a enzimas de la

familia serina proteasa, específicamente sobre tripsina y quimotripsina proteasas, asociadas principalmente a procesos digestivos y nutricionales (Melo *et al*, 2002; Wijaya *et al*, 2000; Zhao *et al*, 2002).

En el 2016 durante la realización de un transcriptoma del mesocarpo del Aguacate Nativo Mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*), López Gómez y colaboradores identificaron la expresión de un mensajero abundante, que al ser analizado por herramientas bioinformáticas se verificó que se trataba de una secuencia codificable para un péptido antimicrobiano de tipo defensina, el cual fue denominado PaDef (*Persea americana* Defensina). Posterior a su identificación se realizaron diversos estudios corroborando su actividad antibacteriana contra bacterias Gram– y Gram+, además de ser citotóxica frente a líneas de cáncer de mama (MCF-7) y leucemia mieloide crónica (K562) (Guzmán- Rodríguez *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2016; Flores-Alvares *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconoce si al igual que otras defensinas de plantas, PaDef presenta actividad inhibitoria sobre proteasas.

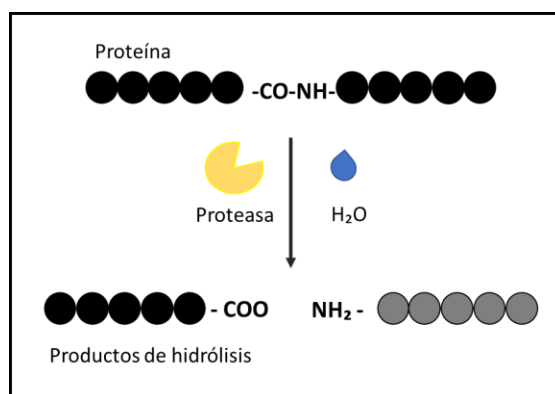
Por ello, es de interés de este trabajo determinar por métodos *in vitro* e *in silico* el efecto del péptido PaDef sobre la actividad de serina proteasas (tripsina y quimotripsina), cisteína proteasas (papaína) y metaloproteasas (metaloproteasas de matriz extracelular y collagenasa II). Esto con la finalidad de obtener un amplio rango de evaluación para futuras aplicaciones.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades de las proteasas

Las proteasas o peptidasas es una de las familias de enzimas más antiguas, por tanto, se pueden encontrar presentes en todos los seres vivos (Salvesen *et al.*, 2016), su actividad es catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos de proteínas y péptidos, generando cadenas de residuos de aminoácidos más pequeñas (Fig. 1). Se sintetizan como precursores inactivos o zimógenos, los cuales contienen un prodominio que bloquea el acceso del sustrato al sitio activo y pueden tener funciones adicionales en el plegamiento de proteínas. La activación tiene lugar dentro de un compartimento subcelular o el entorno extracelular, en el que la enzima realiza su función biológica (Verma *et al.*, 2016).

Se involucran en la regulación de múltiples procesos fisiológicos como el crecimiento celular, la nutrición, el recambio celular e incluso la apoptosis. De igual manera se han relacionado en múltiples procesos patológicos, por ejemplo, en el caso de humanos se involucran en afecciones como cáncer, artritis, progeria y enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares. Por tanto, es de vital importancia regular la actividad de dichas enzimas (Tsiatsiani y Heck, 2015; Clemente *et al.*, 2019).



**Figura 1. Proceso de hidrólisis de las proteasas.** Las proteasas en presencia de agua realizan la proteólisis de las cadenas polipeptídicas que conforman a las proteínas, generando al menos dos productos de dicha escisión.

Por lo señalado anteriormente, y aunado a su relevante papel biológico, fisiológico y sus potenciales usos biotecnológicos, en los últimos años se ha despertado un interés especial sobre el estudio de estas enzimas.

### **2.1.2 Clasificación de las proteasas**

A lo largo del tiempo las proteasas se han clasificado considerando varios criterios (Tabla 1). De manera general y en función a su origen, se agrupan en proteasas microbianas (bacterianas, fúngicas y virales), vegetales, animales y humanas.

En función al sitio de acción de la enzima se clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas son aquellas que catalizan cortes proteolíticos cerca de los extremos terminales del sustrato, por tanto, se dividen en dos tipos, las aminopeptidasas que realizan proteólisis en el extremo amino y las carboxipeptidasas en el extremo carboxilo. Las endopeptidasas escinden enlaces peptídicos dentro de una cadena polipeptídica (Rao *et al.*, 1998).

Basado en el mecanismo catalítico y la presencia de residuos de aminoácidos en su sitio activo, se agrupan en proteasas aspárticas, glutámicas, cisteína proteasas, serina proteasas, treonina proteasas, metaloproteasas y proteasas con mecanismos catalíticos desconocidos (Rao *et al.*, 1998; Mótyán *et al.*, 2013).

Actualmente las herramientas bioinformáticas han permitido agruparlas en función a la similitud de su secuencia y estructura secundaria, dicha clasificación está disponible en la base de datos MEROPS (Rawling *et al.*, 2012).

De las diversas agrupaciones mencionadas, la que se utiliza con mayor frecuencia es aquella que está determinada en función a su mecanismo catalítico y el residuo de aminoácido presente en su sitio activo. Dentro de esta clasificación entre las que se han estudiado con mayor frecuencia son las de tipo serina proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas.

**Tabla 1. Criterios de clasificación de las proteasas** (Rao *et al.*, 1998, Rawling *et al.*, 2012 y Mótyán *et al.*, 2013)

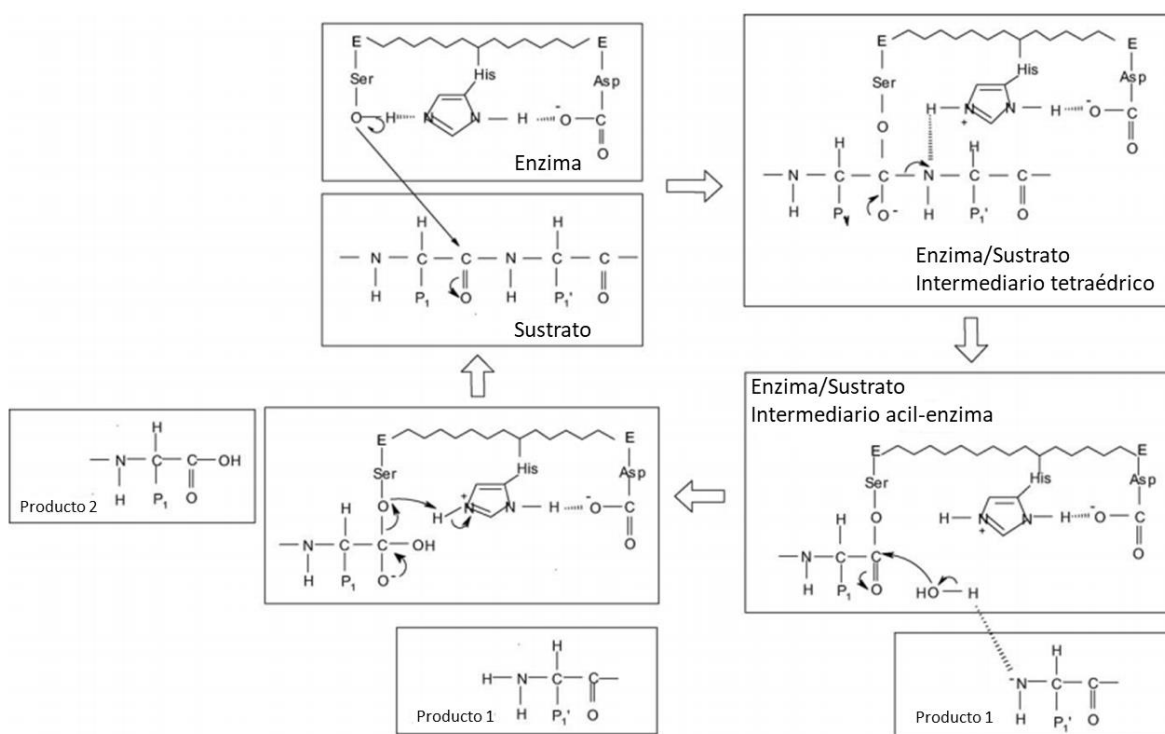
| En función a                                                        | Grupos                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Su origen                                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Microbianas</li> <li>-Vegetales</li> <li>-Animales</li> <li>-Humanas</li> </ul>                                                                                                                                         |
| Sitio de acción                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Exopeptidasas (aminopeptidasas y carboxipeptidasas)</li> <li>-Endopeptidasas</li> </ul>                                                                                                                                 |
| Mecanismo catalítico y el residuo de aa presente en su sitio activo | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Proteasas aspárticas y glutámicas</li> <li>-Cisteína proteasas</li> <li>-Serina proteasas</li> <li>-Treonina proteasas</li> <li>-Metaloproteasas</li> <li>-Proteasas con mecanismos catalíticos desconocidos</li> </ul> |
| Similitud de secuencia y estructura secundaria                      | Base de datos MEROPS<br><a href="https://www.ebi.ac.uk/merops/">https://www.ebi.ac.uk/merops/</a>                                                                                                                                                               |

### 2.1.2.1 Serina proteasas

Se denominan serina proteasas porque su centro activo posee un residuo de serina, el cual es indispensable para realizar el corte proteolítico. Cabe mencionar que este grupo es el más abundante de las proteasas, diversos estudios lo han identificado en múltiples procesos vitales de eucariotas, procariotas, arqueas y virus (Hedstrom, 2002).

El dominio catalítico de este grupo de enzimas es altamente variable, únicamente se conservan 3 residuos de aminoácidos que conforman la triada catalítica, integrada por Histidina (Hi), Ácido aspártico (Asp) y Serina (Ser). De manera general, en el mecanismo básico de acción (Fig. 2) se muestra que el ataque nucleofílico por el grupo hidroxilo de serina sobre el átomo de carbono del carbonilo del sustrato es catalizado por un grupo imidazol de histidina como base general. Esto conduce a la formación de un intermedio tetrahédrico y un ión imidazolio (reacción de adición). El intermedio tetrahédrico se descompone por catálisis ácida

general en una acil-enzima, una base de imidazol y un producto de amina (reacción de eliminación). Durante la etapa de acilación, el grupo imidazol transfiere el protón del hidroxilo de serina al grupo saliente de amina. La acil-enzima luego se desacila a través de la ruta de reacción inversa de acilación, pero en la segunda reacción de adición-eliminación una molécula de agua en lugar del residuo de serina es el nucleófilo atacante (Antaño y Melcata, 2005; Polgán, 2005).



**Figura 2. Mecanismos de reacción catalizado por serina proteasas.** La triada catalítica está compuesta por Ser (un nucleófilo), Asp (un electrófilo) e His (una base). El mecanismo básico se da mediante la formación de un éster entre el átomo de oxígeno de la serina y la porción acilo del sustrato, que produce un intermedio tetraédrico y libera la parte amino del sustrato, posteriormente el ataque del agua sobre el intermediario acil-enzima, lo descompone y libera el producto ácido, mientras que regenera la forma enzimática original (Modificado de Antaño y Melcata, 2005).

Las enzimas representativas de este grupo son la tripsina, quimotripsina y la elastasa, principalmente asociadas a procesos de digestión, no obstante, se sabe que en las plantas desarrollan diversas funciones como la regulación celular durante

el desarrollo y la senescencia, además regulan la formación de granos de polen y participan en la defensa de las plantas contra las plagas y microorganismos fitopatógenos. Por otro lado, en los animales, adicional a su valiosa participación en los procesos de nutrición, se involucran también en la coagulación sanguínea, la fibrinólisis (descomposición de coágulos de sangre) y en el desarrollo celular y la apoptosis (Antaño, 2005 y Craik *et al.*, 2011).

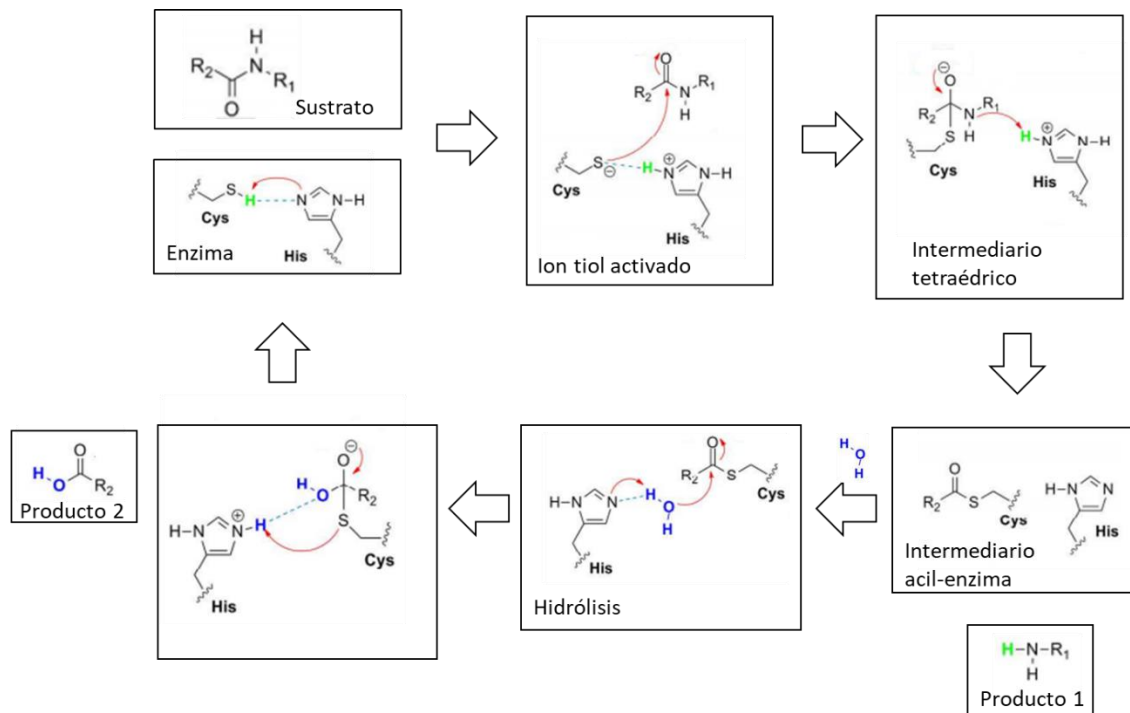
### **2.1.2.2 Cisteína proteasas**

Este grupo se encuentra ampliamente distribuido en todos los grupos de organismos vivos, incluidas bacterias, hongos, protistas, plantas, invertebrados y vertebrados. Se denominan cisteína proteasas porque en su centro activo presenta una triada catalítica conformada por Cisteína (Cys), Histidina (Hi) y Asparagina (Asn) (Kedzior *et al.*, 2016)

Su mecanismo de acción es similar al empleado por las serina proteasas. Para ello, un residuo de His, presente en el sitio activo, actúa como donante de protones y mejora la nucleofilia del residuo de Cys. El residuo de Cys nucleófilo ataca al carbono del enlace peptídico reactivo, produciendo el primer intermedio tioéster tetrahédrico en la reacción con liberación de un fragmento amina o amino terminal del sustrato. Este intermedio se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre el sustrato oxianión y un residuo de glutamina altamente conservado. Posteriormente, el enlace tioéster se hidroliza para producir un resto de ácido carboxílico a partir del fragmento de sustrato restante. El mecanismo se resume en la Fig. 3 (Verma *et al.*, 2016; Elsasser *et al.*, 2017).

Una de las enzimas representantes de este grupo es la papaína, esta fue la primera en ser cristalizada y descrita en la mayoría de sus características, otras de relevancia son las caspasas y las calpaínas (Verma *et al.*, 2016). Anteriormente, al igual que las proteasas de tipo serina, las cisteína proteasas se relacionaban directamente con actividad de tipo digestiva, sin embargo, actualmente se sabe que se involucran en diversos procesos importantes para la sobrevivencia, por ejemplo,

en plantas participan en el procesamiento de proteínas de almacenamiento antes de su deposición en semillas en desarrollo, movilización de proteínas de almacenamiento durante la germinación de semillas y crecimiento de plántulas, senescencia de órganos, apoptosis y en el sistema de defensa proteolítica de la planta contra patógenos externos, entre otras. En el caso de los animales, desempeñan un papel fundamental en la renovación de proteínas intracelulares, remodelación ósea, progresión del ciclo celular y apoptosis. Finalmente, las producidas por microorganismos, contribuyen a la renovación general de proteína, al procesamiento de nutrientes y constituyen importantes factores de virulencia durante la invasión del huésped (Mateusz *et al.*, 2016).



**Figura 3. Mecanismo de reacción catalizado por cisteína proteasas.** La unión del sustrato da como resultado la activación del tiol. El tiol activado actúa como nucleófilo, atacando el enlace peptídico y provocando su ruptura. Se libera un péptido (producto 1) y el otro péptido se une covalentemente al azufre. La hidrólisis por agua libera el segundo péptido (producto 2) y completa el ciclo (Modificado de Elsasser *et al.*, 2017).

### 2.1.2.3 Metaloproteasas

Este grupo de proteasas se encuentran principalmente fuera de las células, ya sea como enzimas secretadas o asociadas a la membrana. Para llevar a cabo su actividad proteolítica requieren de la presencia en su sitio activo de zinc o cobalto (Alipour *et al.*, 2016).

Dependiendo al sitio donde realizan el corte proteolítico, estas se agrupan en dos tipos (Fig. 4); las metaloexopeptidasas, que catalizan cortes proteolíticos cerca de los extremos amino y/o carboxilo terminal del sustrato, y las metaloendopeptidasas si escinden enlaces peptídicos dentro de una cadena polipeptídica. Este último grupo se divide en una desintegrina y metaloproteasas de matriz extracelular (MMP). Además, las MMP se dividieron a su vez en collagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelisin (MMP-3, MMP-10, MMP-11 y MMP-17), matrilisin (MMP-7 y MMP-26), de tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24 y MMP-25) y otros tipos (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-28 y MMP-29) (Cascales-Angosto y Álvarez-Gómez, 2010; Alipour *et al.*, 2016).

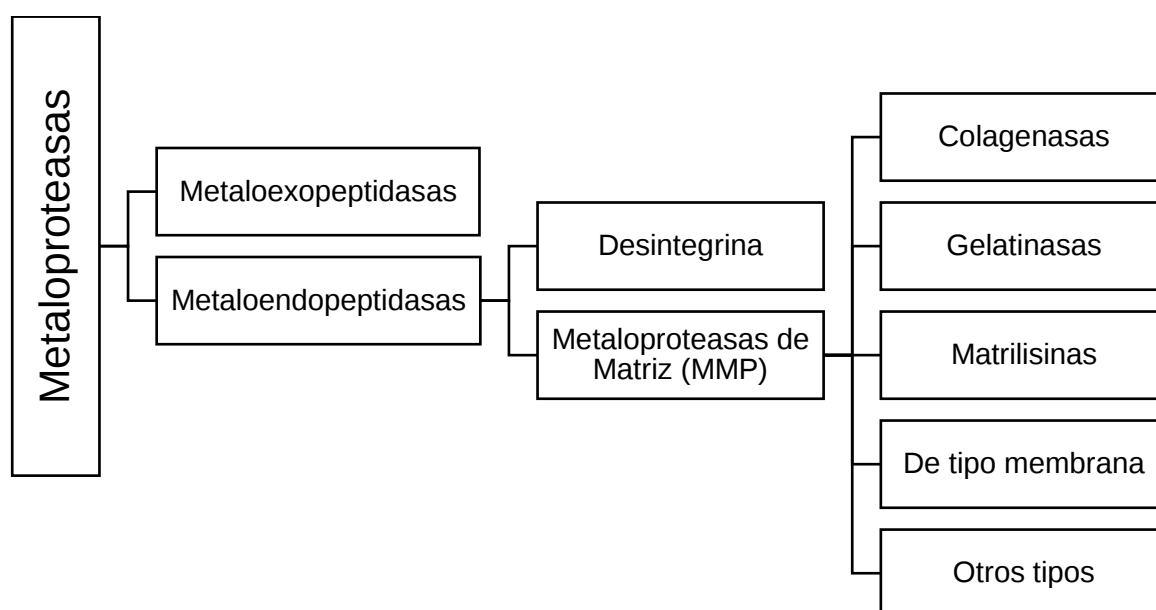
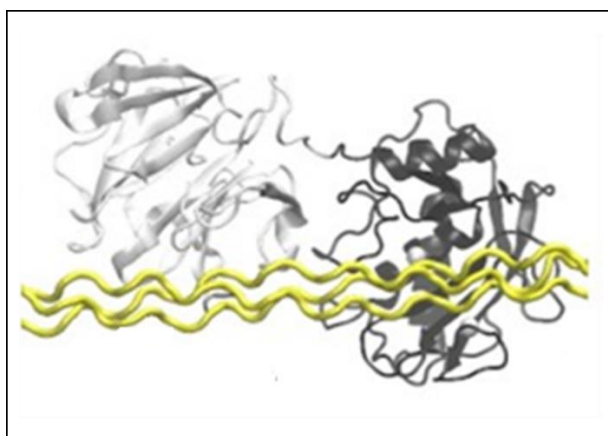


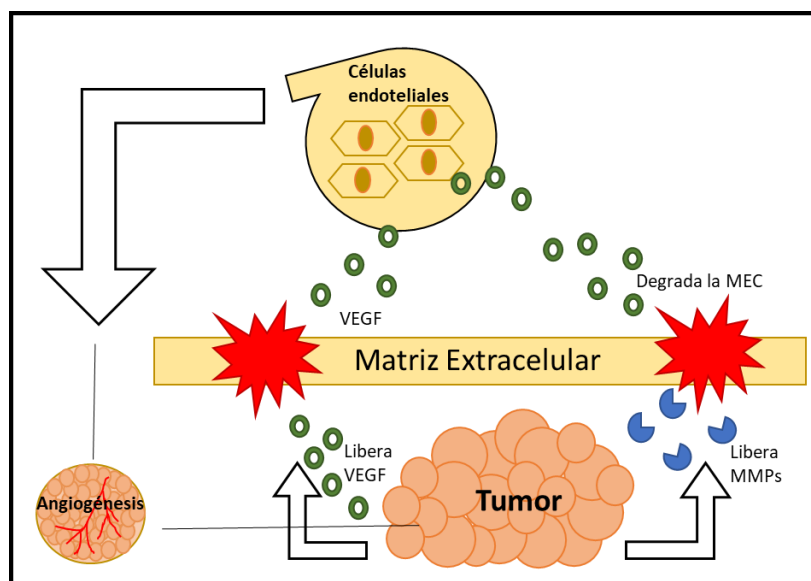
Figura 4. Clasificación de metaloproteasas

Dado que las estructuras de las metaloproteasas son diferentes entre los diversos grupos, se ha descrito una estructura típica (Fig. 5), la cual se compone de un dominio propéptido zimogénico amino terminal el cual es una región de alrededor de 80 aminoácidos, un dominio catalítico de aproximadamente 170 aminoácidos, este es dependiente de metales, una región enlazadora de entre 15 - 65 aminoácidos, y un dominio carboxilo terminal que corresponde alrededor de 200 aminoácidos (Quintero-Fabian *et al.*, 2019).



**Fig. 5 Estructura típica de una metaloproteasa.** El dominio amino terminal aparece en amarillo, mientras que el dominio catalítico se señala en color negro y el dominio carboxilo terminal en blanco (Quintero-Fabian *et al.*, 2019).

Cabe señalar que las metaloproteasas, difieren en expresión, localización, especificidad del perfil de sustrato, así como en la función que desempeñan. Sin embargo, de manera general, se sabe que las MMP de los vertebrados se encargan principalmente de la degradación de la matriz extracelular, lo que favorece el recambio celular y participa en la diferenciación y proliferación celular, así como en la apoptosis, hecho por el cual también se les asocia directamente con patologías como el crecimiento tumoral maligno, angiogénesis, invasión y metástasis (Fig. 6). Además, en microorganismos como bacterias, estas proteasas actúan como parte de los factores de virulencia (Cascales-Angosto y Álvarez-Gómez, 2010; Alipour *et al.*, 2016; Quintero-Fabian *et al.*, 2019).



**Figura 6. Angiogénesis tumoral.** La matriz extracelular es degradada por metaloproteasas, provocando que las células liberen VEGF y otros factores de crecimiento angiogénico, los cuales migran a las células endoteliales de los vasos más cercanos, promoviendo la expresión de proteínas necesarias para la formación de nuevos vasos. Eso facilita la regeneración de la matriz extracelular para nutrir y sostener a los vasos nuevos que permitirán hacer metástasis y aumentar el tamaño del tumor (Cascales-Angosto y Álvarez-Gómez, 2010).

### 2.1.3 Inhibidores de proteasas

Ya que las proteasas participan en diversos procesos biológicos y en múltiples estados patológicos, es de vital importancia regular su actividad con precisión, para ello cada organismo posee mecanismos regulatorios, los cuales actúan desde la activación de las proteasas por la escisión del dominio zimógeno, hasta el uso de inhibidores enzimáticos, los cuales muchas veces actúan sobre el sitio activo o un sitio alostérico (Clemente *et al.*, 2019).

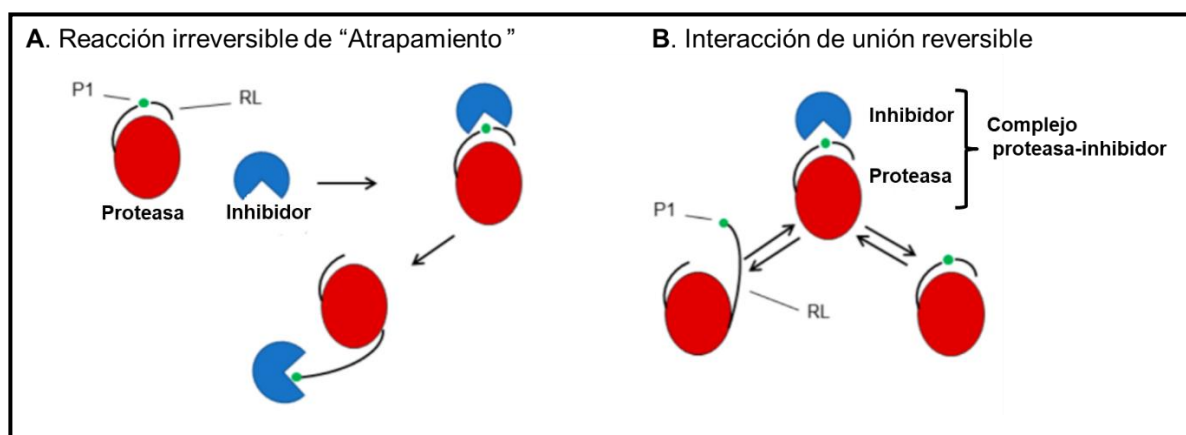
Los inhibidores de proteasas es una familia diversa de moléculas que permiten mantener la homeostasis y supervivencia celular. En animales se han descrito como factores de crecimiento, receptores en la vía de señalización celular o durante los procesos de carcinogénesis. Sin embargo, en enfermedades como el enfisema y ciertos tipos de epilepsia se deben al mal funcionamiento de estos inhibidores (Bitoun *et al.*, 2002; Lomas *et al.*, 2002; Ritchie 2003; Qi *et al.*, 2005).

En las plantas los inhibidores de proteasas se involucran en la movilización de proteína de almacenamiento, regulación de actividades enzimáticas endógenas, modulación de apoptosis, mecanismos de defensa frente a animales, insectos y microorganismo, entre otras (Haq *et al.*, 2004; Valueva y Mosolar, 2004; Van der Hoorn y Jones, 2004; Hoger y Van der Hoorn, 2013; Clemente *et al.*, 2019).

Bajo un criterio general estos inhibidores se han clasificado en función a su origen en dos grandes grupos, aquellos de origen natural (principalmente proteínas) y los obtenidos por síntesis química. No obstante, Laskowski y Kato (1980) propusieron clasificarlos en familias, considerando el sitio reactivo específico presente en las secuencias, generando 4 familias principales: 1) inhibidores de cisteína proteasa, 2) inhibidores de metaloproteasa, 3) inhibidores de proteasa aspártica, y 4) inhibidores de serina proteasa. En el 2004, Rawlings y colaboradores propusieron una nueva clasificación agrupándolos en familias y en clanes, reflejando así las relaciones evolutivas que existían entre los mismos. En este sistema, las secuencias que integran un clan tienen estructuras terciarias similares. Los clanes se dividen en familias las cuales se agrupan en función a un ancestro común, ya que todos los miembros presentan secuencias de aminoácidos similares. Actualmente los inhibidores de proteasa se encuentran agrupados en 38 clanes y 85 familias diferentes (Clemente *et al.*, 2019).

Los inhibidores pueden establecer diversas interacciones con sus respectivas proteasas. Sin embargo, en su mayoría estos interaccionan bajos dos mecanismos. Uno de ellos es la reacción irreversible de “atrapamiento” (Fig. 7A), en este mecanismo, durante la interacción proteasa-inhibidor, se provoca un cambio conformacional del inhibidor por la escisión de un enlace peptídico interno de su estructura, ocasionando que nunca recupere su estado inicial, por esta razón la reacción es irreversible, a este tipo de inhibidores también se les conoce como suicidas. Las familias mejor caracterizadas de inhibidores de proteasa que mostraron este mecanismo corresponden a las familias de serpinas, macroglobulinas  $\alpha_2$  e inhibidores de la proteína p35 del baculovirus (Rawlings *et al.*, 2004; Rawlings, 2010). El otro mecanismo se conoce como interacción reversible

de unión fuerte (Fig. 7B), en esta reacción los inhibidores interactúan como lo hace la enzima- sustrato, es decir, con el sitio activo de la proteasa. El complejo proteasa-inhibidor coexiste en un equilibrio estable entre la forma estable y modificada del inhibidor donde se escinde el enlace peptídico del sitio activo. Todos los inhibidores que operan este mecanismo son canónicos, ejemplo de ellos son los inhibidores de la serina proteasa (Laskowski y Qasim, 2000; Rawlings *et al.*, 2004; Farady y Craik, 2010).



**Figura 7. Mecanismos de acción general de los inhibidores de proteasas. A. Reacción irreversible de "atrapamiento".** La interacción proteasa-inhibidor desencadena un cambio conformacional. Esta reacción no es reversible y el inhibidor nunca recupera su estructura inicial. **B. Interacción de unión reversible.** El complejo proteasa-inhibidor coexiste en un equilibrio estable entre la forma intacta del inhibidor y las formas modificadas del inhibidor donde se escinde el enlace peptídico del sitio reactivo. P1: sitio reactivo con el inhibidor de proteasas; RL: bucle reactivo (Clemente *et al.*, 2019).

Dada su importancia fisiológica y versatilidad el estudio de los inhibidores de proteasas ha generado un especial interés por sus múltiples aplicaciones biotecnológicas (Volpicella *et al.*, 2011). Por citar algunos ejemplos, en el campo de la medicina los inhibidores de metaloproteasas se investigan y aplican en terapias alternativas contra el cáncer y VIH (Sapkale *et al.*, 2012).

En las últimas décadas se ha hecho hincapié en el estudio de los inhibidores de proteasas de origen proteico, de manera especial sobre los péptidos antimicrobianos con un realce sobre aquellos proveniente de plantas como las

defensinas, ciclótidos y las  $\alpha$ -harpininas (Melo *et al.*, 2002; Hellinger y Gruber, 2019; Slavokhotova y Rogozhin, 2020).

## 2.2 Péptidos antimicrobianos (PAMs)

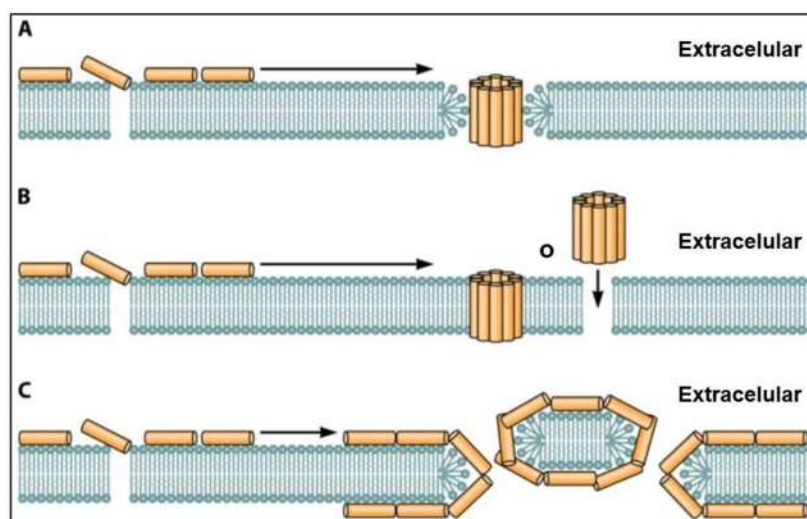
Los péptidos antimicrobianos forman parte de los mecanismos de defensa de los organismos vivos. Se ha reportado su expresión inducible y/o constitutiva en bacterias, arqueas, protozoarios, hongos, plantas y animales (Herrera-Díaz *et al.*, 2016).

Se caracterizan por ser moléculas anfipáticas, mayoritariamente catiónicas las cuales presentan entre 12 y 100 aminoácidos (Koehbach y Craik, 2019), por lo que su peso molecular oscila entre 2 y 10 kDa. Además, presentan 4, 6, 8 ó 12 residuos de cisteína altamente conservadas, las cuales le proporcionan estabilidad estructural al péptido, favoreciendo así las funciones biológicas del mismo.

La primera función descrita y reportada para estos péptidos fue la de protección del hospedero contra una amplia gama de microorganismos patógenos (Herrera-Díaz *et al.*, 2016). Sin embargo, actualmente se sabe que adicional a su actividad antimicrobiana, estos presentan diversas actividades biológicas entre las que se encuentran: antiviral, antibiofilm, inhibidor enzimático, inmunomodulador y citotóxico de células cancerosas, entre otras (Wijaya *et al.*, 2000; Yaw-Jen, 2006; Haney *et al.*, 2019).

Ya que su actividad biológica es diversa, estos péptidos pueden presentar varios mecanismos de acción. Debido a su carga neta, que en la mayoría de los casos es positiva y a su capacidad de plegarse en estructuras hidrófobas e hidrofílicas (anfipático), los PAMs tiene la facilidad de interactuar con los componentes cargados de la membrana celular, como lo son los fosfolípidos, lipopolisacáridos y ácidos teicoicos (Morgera *et al.*, 2008, Wang, 2008). Dicha interacción puede provocar la ruptura o la permeabilización de la membrana, esto mediante la formación de poros generados entre los componentes de la membrana y los

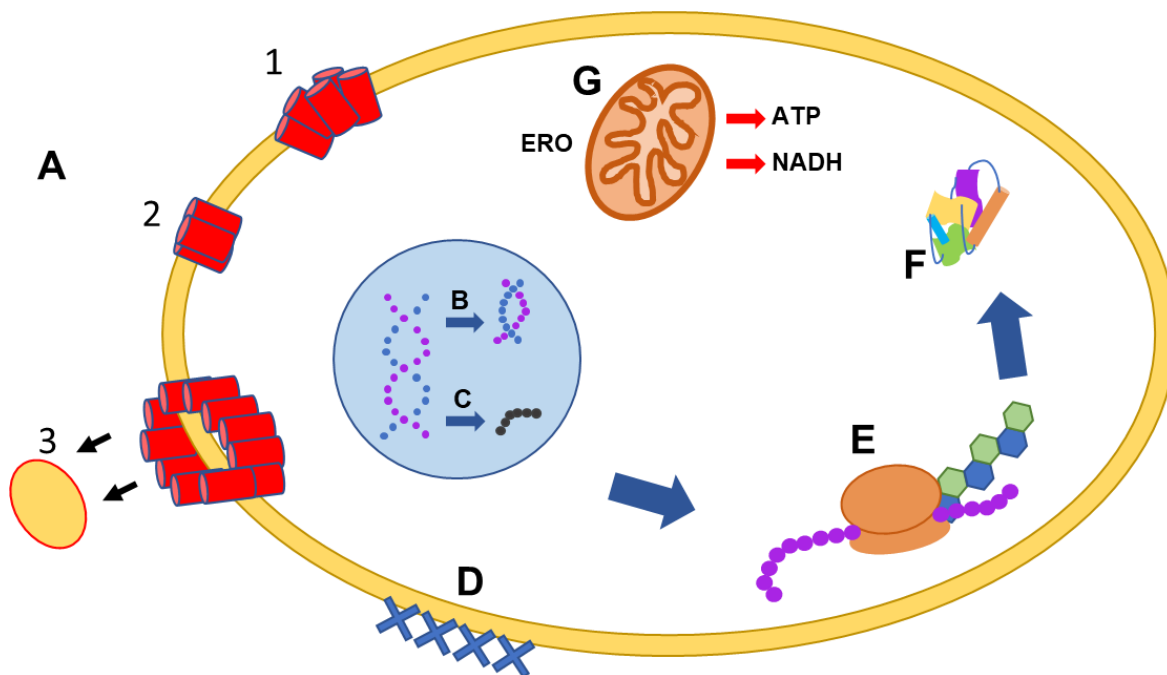
arreglos estructurales de los PAMs. Los modelos mejor descritos hasta el momento son el de barril, de alfombra y de poro toroidal (Fig. 8). En el caso del modelo del poro toroidal (Fig. 8A), se genera un canal continuo, esto por la agregación de unidades monoméricas entrantes del péptido, haciendo que las membranas interna y externa se plieguen, favoreciendo la asociación de los fosfolípidos de la membrana con el péptido. En el modelo de barril (Fig. 8B), los monómeros peptídicos están dispuestos de forma paralela a los fosfolípidos de membrana, el lumen del canal transmembrana se reviste por la zona hidrófila de los péptidos, mientras que el lado hidrófobo se orienta hacia afuera en asociación con el núcleo lipídico de las bicapas. En el modelo de alfombra (Fig. 8C) se da una acumulación de los péptidos que interactúan con la membrana externa, lo que desintegra la membrana, dando una apariencia de alfombra (Le *et al.*, 2017).



**Figura 8. Modelos del mecanismo de acción de los PAMs. A. Modelo poro toroidal; B. Modelo de barril; C. Modelo de alfombra (Le *et al.*, 2017).**

Una vez que los PAMs permean la membrana pueden provocar efectos sobre blancos intracelulares (Fig. 9), como la inhibición de la biosíntesis y metabolismo del ADN, RNA y proteínas, bloqueo de chaperonas por el plegamiento de proteínas, inhibición de enzimas, biosíntesis de pared celular e incluso se ha reportado que favorecen la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la interrupción de

la mitocondria afectando así el flujo de ATP Y NADH (Peters *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2017; Haney *et al.*, 2019 ).



**Figura 9. Mecanismos de acción intracelulares de los péptidos antimicrobianos.** A. Interacción con la membrana plasmática (1, 2 y 3); B. Inhibición de la síntesis de ADN; C. Bloqueo de la síntesis de ARN; D. Inhibición de enzimas necesarias para la unión de proteínas a la pared celular; E. Inhibición de la función de los ribosomas y la síntesis de proteínas; F. Bloqueo de proteínas chaperonas necesarias para el plegamiento de proteínas; G. Blancos en mitocondria: **1)** Inhibición de la respiración celular y la inducción de la formación de ROS y **2)** disrupción de la integridad de la membrana mitocondrial y el flujo de ATP y NADH (Peters *et al.*, 2010; Haney *et al.*, 2019).

### 2.2.3 Péptidos antimicrobianos de plantas

Los péptidos antimicrobianos (PAM) de plantas son pequeñas secuencias de aminoácidos (12-100 aa), catiónicos, anfipáticos, presentar un mayor número de cisteínas respecto a los de otros organismos, lo cual les proporciona mayor estabilidad. Además de formar parte de los mecanismos de defensa de las plantas, se involucran en la regulación y coordinación celular del crecimiento, el desarrollo y

la tolerancia al estrés, por lo tanto, son de vital importancia (Tam *et al.*, 2015; Lattarulo *et al.*, 2018).

En función al número de residuos de aminoácidos, el peso molecular y el número de enlaces disulfuro que establecen entre sus cisteínas, se clasifican en 12 familias, las cuales se muestran en la Tabla 2 (De Souza *et al.*, 2011; García-Olmedo *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 1997).

**Tabla 2. Clasificación de los péptidos antimicrobianos de plantas** (de Souza *et al.*, 2011; García *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 1997).

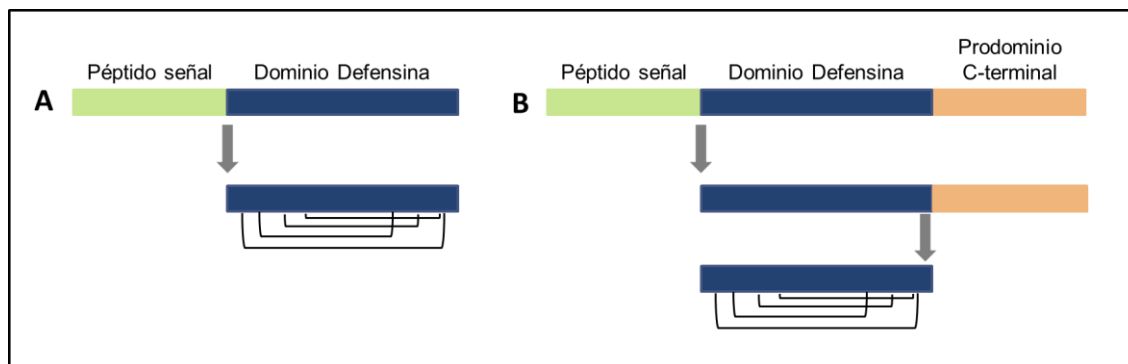
| Familia             | PM<br>kDa | No.<br>de aa | Enlaces<br>disulfuro | Actividad                             |
|---------------------|-----------|--------------|----------------------|---------------------------------------|
| LTP                 | 10        | 90-95        | 3-4                  | Bacterias y Hongos                    |
| Snakina             | 7         | 60-70        | 6                    | Bacterias y Hongos                    |
| Defensina           | 5         | 45-54        | 4                    | Bacterias, Hongos y Citotóxico        |
| Tioninas            | 5         | 45-47        | 3-4                  | Bacterias, Hongos y Citotóxico        |
| Tipo Heveína        | 5         | 43           | 4                    | Bacterias Gram positivas y Hongos     |
| Tipo Knottinas      | 4         | 36-37        | 3                    | Bacterias Gram positivas y Hongos     |
| Cepperinas          | 4         | 28-38        | 0 (lineal)           | Bacterias y Hongos                    |
| MBP-1               | 4         | 33           | 2                    | Bacterias y Hongos                    |
| Ciclótidos          | 3         | 29-31        | 3                    | Bacterias, Virus, Hongos y Citotóxico |
| Ib-AMP              | 2         | 20           | 2                    | Bacterias Gram positivas y Hongos     |
| $\beta$ -barrelinas |           |              | 6                    | Hongos                                |
| 25S albúminas       | 4-9       |              | 2                    | Bacterias y Hongos                    |

### 2.2.3.1 Familia de las defensinas

Por mucho tiempo, las defensinas de plantas fueron consideradas como parte de la familia de las tioninas, esto debido a que su estructura es muy similar. Sin embargo, al realizarse análisis estructurales se determinó que estos péptidos presentaban una mayor similitud a las defensinas de insectos y herbívoros, dando origen así a la familia de las defensinas de plantas (Cornet *et al.*, 1995).

De acuerdo con los elementos que las conforman, las defensinas de plantas se clasifican en dos grupos, las de tipo I presentan un péptido señal ubicado en el

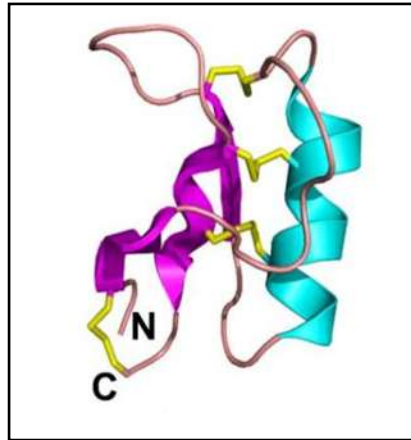
extremo N-terminal, se encarga de dirigir al péptido a su sitio de acción, en el cual es escindido por proteasas y el dominio defensina. Mientras que las de tipo II se conforman por un péptido señal, el dominio defensina y un prodominio C-terminal el cual, se sabe que asocia el péptido a la vacuola (Fig. 10) (Lay y Anderson, 2005; Lay *et al.*, 2014).



**Figura 10. Clasificación de las Defensinas.** **A.** Tipo I: conformadas por un péptido señal y un dominio defensina. **B.** Tipo II: conformadas por un péptido señal, el dominio defensina y un prodominio C-terminal (Lay y Anderson, 2005).

La estructura tridimensional de esta familia se conforma por 3 láminas  $\beta$  y una hélice  $\alpha$  (Fig. 11). Cabe señalar que las secuencias de aminoácidos de estos péptidos difieren en gran medida entre sí. Sin embargo, se sabe que presentan residuos de aminoácidos altamente conservados como lo son 2 glicinas, 1 aminoácido aromático, 1 ácido glutámico, 1 serina y 8 cisteínas. Estas últimas forman entre sí 4 puentes disulfuro, los cuales le proporcionan estabilidad estructural y favorece su actividad biológica (Cornet *et al.*, 1995, Bloch *et al.*, 1991; Thevissen *et al.*, 2004; Lay y Anderson, 2005).

Además, los péptidos de la familia defensina poseen un motivo altamente conservado, denominado  $\gamma$ -core (GXCX<sub>3-9</sub>C) al cual se le ha atribuido su actividad biológica. No obstante, reportes recientes han demostrado que el motivo  $\gamma$ -core si bien es necesario, pero no suficiente para que las defensinas cumplan su función (Sathoff *et al.*, 2019).



**Figura 11. Estructura típica tridimensional de las defensinas.** Conformada por 3 láminas  $\beta$  (señalado en púrpura), una hélice  $\alpha$  (señalado en azul) y 4 puentes disulfuro (señalado en color amarillo).

Dado que sus secuencias son muy diferentes entre sí, es de esperarse que presenten actividad biológica variada. Se sabe que actúan como antibacterianos, antifúngicos, citotóxico frente a líneas celulares de cáncer, reguladores de crecimientos, inhibidores de la síntesis de proteínas, se involucran en la tolerancia a metales pesados y como inhibidores enzimáticos (tripsina y  $\alpha$ -amilasa), entre otros (Melo *et al.*, 2002; Wijaya *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2002; Van der Weerden y Anderson, 2013).

### 3. ANTECEDENTES

En el 2016, al realizarse estudios de ESTs del mesocarpo del aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) se identificaron mensajeros abundantes. Uno de ellos tuvo similitud para un péptido antimicrobiano del tipo defensina el cual fue denominado PaDef (GenBank Accession: KC007441) (López-Gómez *et al.*, 2016). Posteriormente al ser caracterizado por herramientas bioinformáticas, se confirmó que se trataba de una secuencia de 78 residuos de aminoácidos de los cuales 31 conforman el péptido señal y 44 la región madura del péptido, clasificándola así dentro de las defensinas tipo II. Su estructura secundaria se conforma de 3 láminas  $\beta$  y 1 hélice  $\alpha$ , motivo característico de las defensinas de planta (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013).

Este péptido se utilizó para evaluar su actividad antibacteriana mediante un sistema heterólogo (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013, Meng *et al.*, 2016) y citotóxica para las líneas cancerosas de leucemia mieloide crónica K562 (Flores-Alvarez *et al.*, 2018) y de mama MCF-7 (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016). Interesantemente, resultados preliminares sugieren que PaDef posee una actividad del tipo de inhibición de metaloproteasas (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016).

Diversas investigaciones reportan que algunos péptidos antimicrobianos de la familia de las defensinas presentan actividad inhibitoria sobre serina proteasas, ejemplo de ellos es la defensina *CfD2* de *Cassia fistula*, *ATTp* de *Arabidopsis thaliana* y una defensina de *Vigna unguiculata*. Estas presentan actividad sobre tripsina a concentraciones milimolares (Melo *et al.*, 2002; Wijaya *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2002).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Las proteasas participan en la regulación de procesos esenciales para el organismo, entre los que se encuentran los mecanismos de defensa. Los péptidos antimicrobianos de manera tradicional tienen actividad del tipo antimicrobiana y/o citotóxica, sin embargo, se ha reportado que se involucran en diversos procesos entre los que se encuentra la actividad de tipo inhibidor de proteasas en las plantas. La familia de las defensinas es una a las que se le ha atribuido este tipo actividad, por tanto, es interés de este trabajo evaluar si la defensina PaDef de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) posee actividades inhibitoras sobre proteasas del tipo serina, cisteína y metaloproteasas.

## 5. HIPÓTESIS

La defensina PaDef de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) presenta actividad inhibitoria sobre proteasas de tipo serina, cisteína y metaloproteasas.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

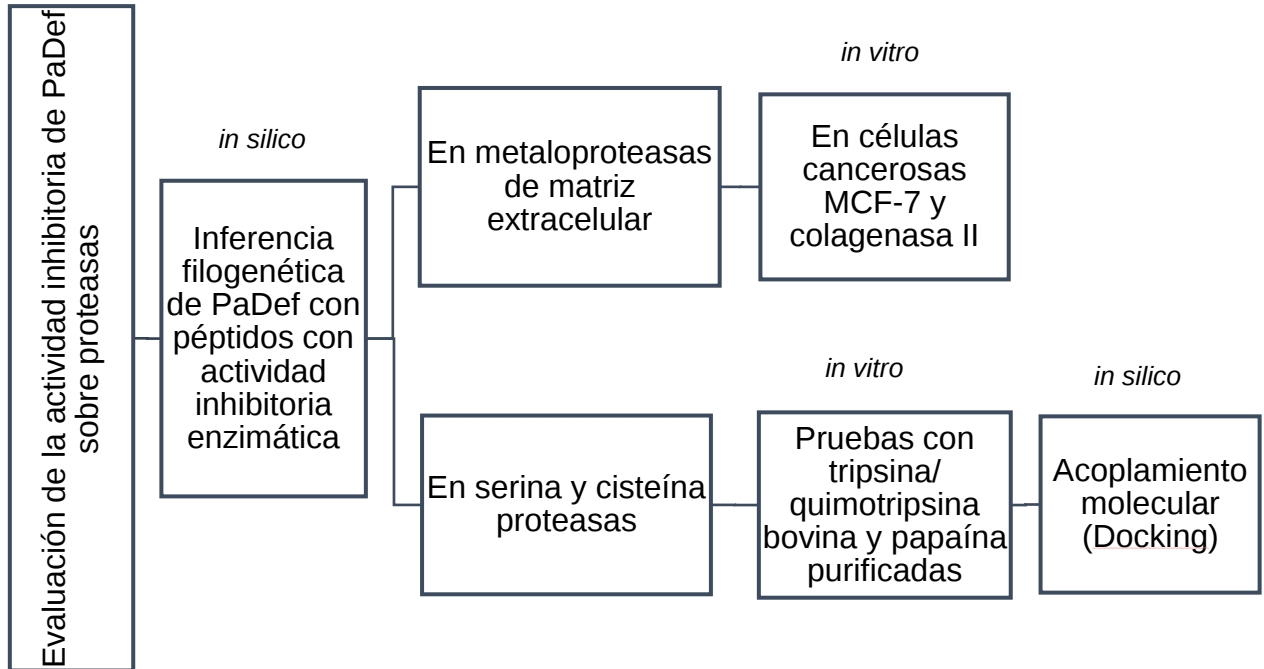
Evaluar la actividad inhibitoria de la defensina PaDef de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre proteasas.

### **6.2 Objetivos específicos**

- 1.-Establecer la relación filogenética del péptido PaDef y las defensinas vegetales con actividad de tipo inhibidor enzimático.
2. Determinar el efecto del péptido PaDef sobre la actividad de proteasas digestivas de tipo serina y cisteína proteasas en un sistema *in vitro*.
- 3.- Determinar en un sistema *in vitro*, el efecto del péptido PaDef sobre la actividad de metaloproteasas de la línea celular MFC-7 de cáncer de mama.
- 4.- Establecer por ensayos *in silico* las interacciones del péptido PaDef con diversas proteasas.

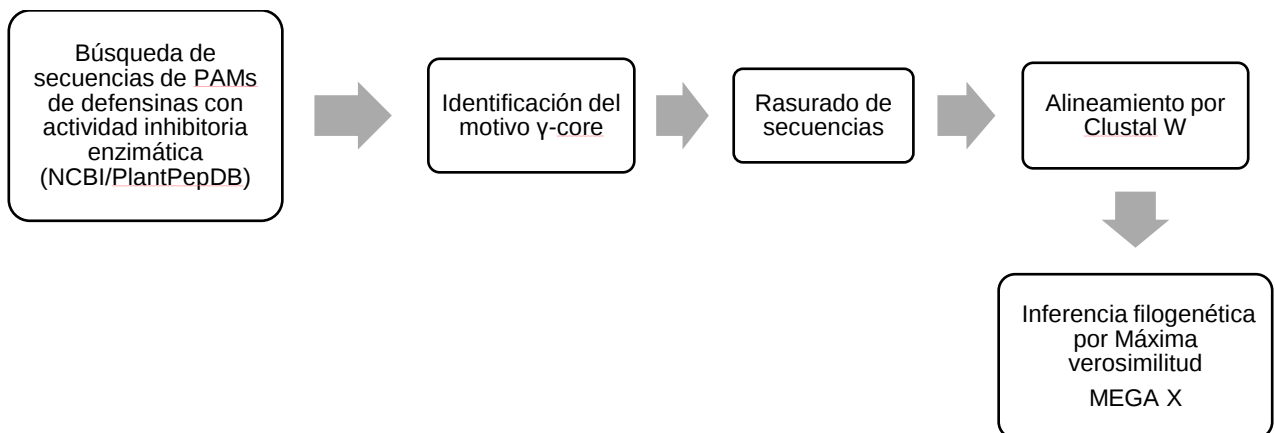
## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### General

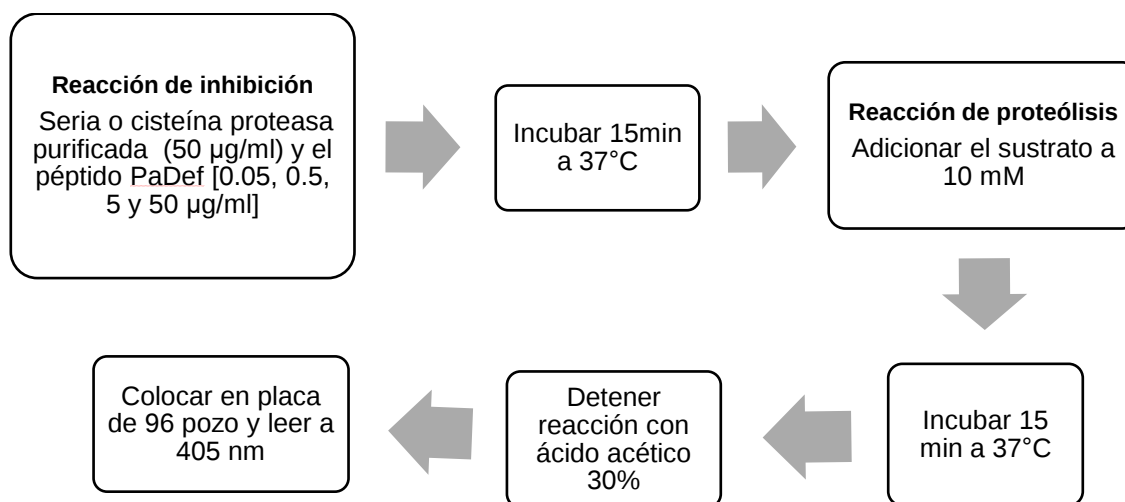


### Por objetivos

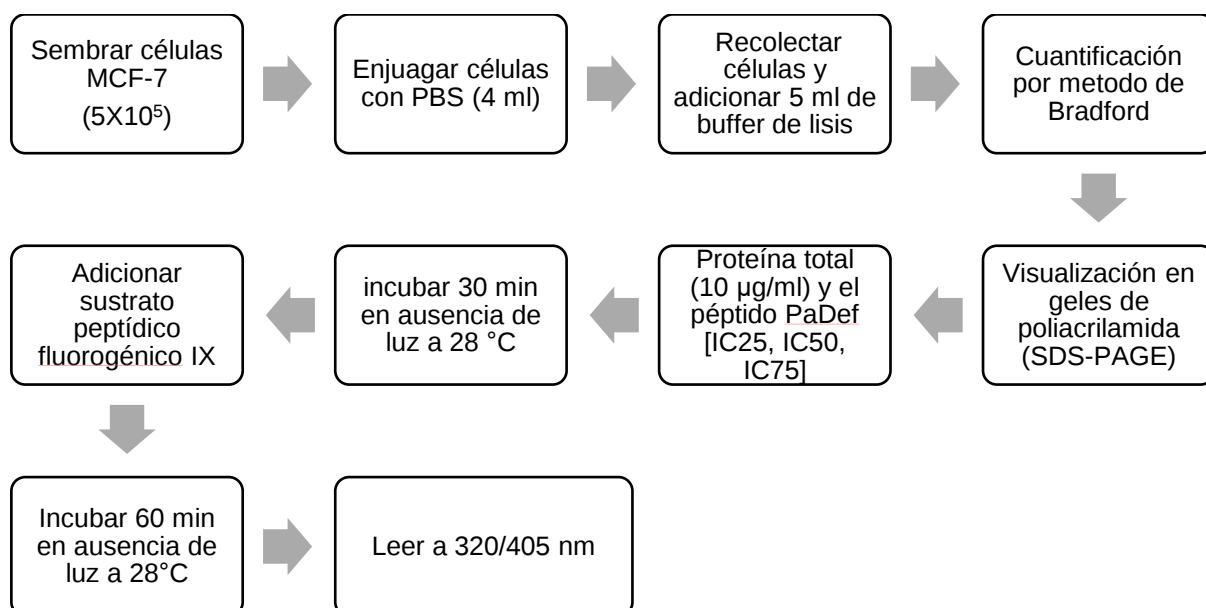
Construcción de la inferencia filogenética de PaDef con péptidos con actividad inhibitoria enzimática previamente reportada



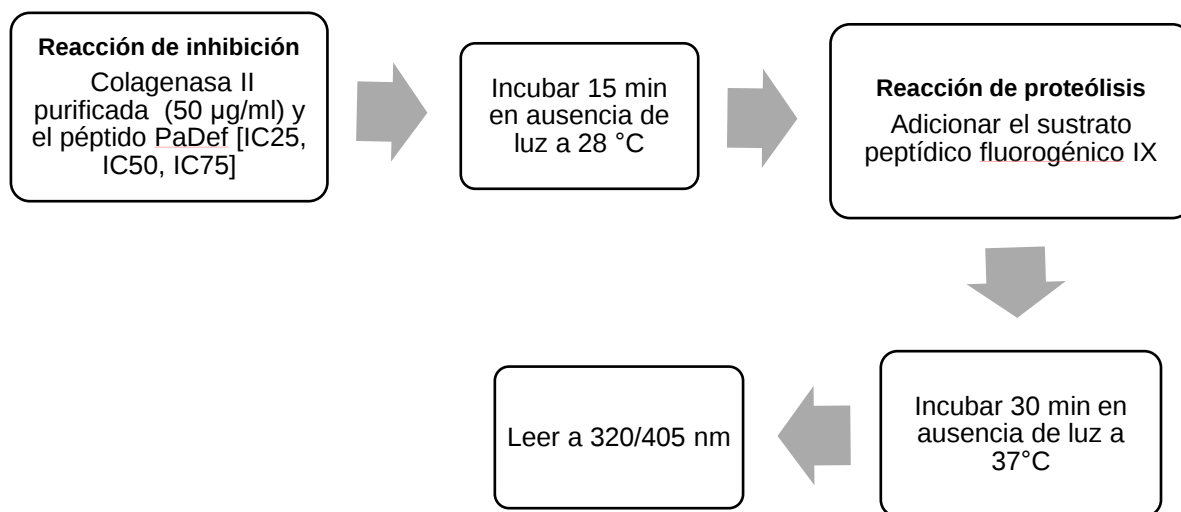
## Ensayos *in vitro* del efecto del péptido PaDef sobre la actividad enzimática de serina y cisteína proteasas



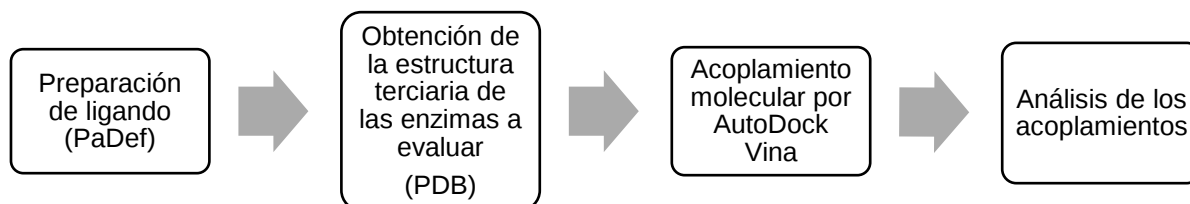
## Ensayos *in vitro* del efecto del péptido PaDef sobre la actividad enzimática de las metaloproteasas



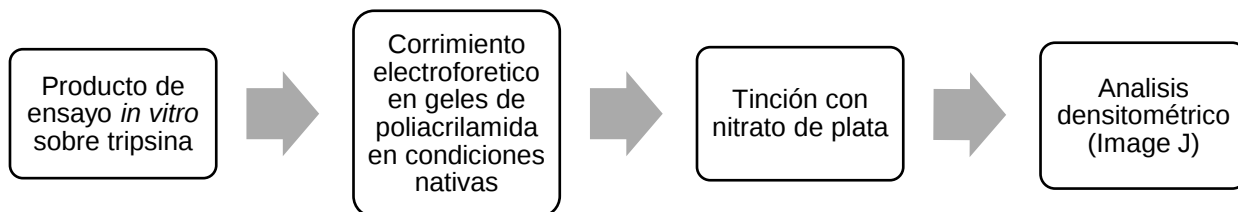
## Ensayos *in vitro* del efecto del péptido PaDef sobre la actividad enzimática de la collagenasa II



## Ensayos *in silico* de acoplamiento molecular del péptido PaDef con las enzimas de tipo serina proteasa



## Determinación cualitativa *in vitro* del acoplamiento del péptido PaDef con la tripsina proteasa



## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Péptido PaDef**

Para las evaluaciones realizadas en esta investigación, se utilizó la región madura del péptido PaDef, que corresponde a 47aa (ATCETPSKHFNGLCIRSSNCASVCHGEHFTDGRCQGVRRRCMCLKPC), (Genbank AGC82207.1), la cual fue sintetizada químicamente por BIOMATIK. Antes de los ensayos se favoreció la formación de enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína, por oxidación con la adición de DMSO al 20% y agitación constante durante 5 días a temperatura ambiente. La formación de enlaces fue confirmada por espectrometría de masas.

### **7.2 Línea celular MCF-7**

La línea celular MCF-7 de tumor de mama humano se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivó en medio DMEM, mezcla de nutrientes F-12 Ham (SIGMA) completo (ANEXO I), en condiciones de una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **7.3 Construcción de la relación filogenética de PaDef con otras defensinas de plantas**

Con la finalidad de establecer una relación filogenética del péptido PaDef con las defensinas reportadas con actividad de tipo inhibidor enzimática, se procedió a la realización de esta, para ello se buscaron y descargaron las secuencias de interés, utilizando la base de datos PlantPepDB (<http://14.139.61.8/PlantPepDB/index.php>) y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias se guardaron en formato FASTA y posteriormente con el programa MEGAX v.10.0.4 se realizó un alineamiento con la región correspondiente al motivo  $\gamma$ -core, conservando únicamente dicha región en todas las secuencias a analizar. Con el criterio de máxima verosimilitud se seleccionó el modelo idóneo con el cual, se realizó

finalmente la construcción de la relación filogenética en el programa antes mencionado.

#### 7.4 Actividad inhibitoria de tipo serina proteasas (Tripsina y quimotripsina)

Una vez comprobada la relación filogenética de la defensina PaDef con defensinas de tipo inhibidor enzimática, se procedió a realizar estudios *in vitro*, para ellos se evaluó la actividad inhibitoria de tipo serina proteasas, la cual se realizó por el método modificado de Erlanger y colaboradores, 1961. Se utilizó tripsina y quimotripsina bovina purificada, por lo tanto, se prepararon soluciones de dichas enzimas a una concentración de 0.05 mg/ml, además del sustrato BApNa 10 mM y buffer de reacción Tris-HCl 100 mM pH 8.0 (ANEXO II).

Se estableció un control de enzima con la finalidad de determinar la concentración de enzima requerida para que en una longitud de onda de 405 nm se obtenga una absorbancia de 0.5, para lo cual, se realizó un barrido por triplicado a 10, 20 y 30  $\mu$ l de la enzima a una concentración de 0.05  $\mu$ g/ ml. Para ello, se colocaron los reactivos en el orden que lo indica la tabla 3 en una placa de 96 pozos. Se midió la absorbancia en un Varioskan Bio-Rad, Inc. xMark a una longitud de onda de 410 nm.

De los datos obtenidos se realizaron los cálculos para establecer el control enzima

**Tabla 3.** Reactivos para establecer el control de enzima de tripsina y quimotripsina

| Reactivo                      | Blanco      | Blanco sustrato | Control enzima | Control de enzima | Control de enzima |
|-------------------------------|-------------|-----------------|----------------|-------------------|-------------------|
| Buffer de reacción            | 200 $\mu$ l | 180 $\mu$ l     | 170 $\mu$ l    | 160 $\mu$ l       | 150 $\mu$ l       |
| Tripsina o Quimotripsina      | -----       | -----           | 10 $\mu$ l     | 20 $\mu$ l        | 30 $\mu$ l        |
| Incubar durante 15 min a 37°C |             |                 |                |                   |                   |
| BapNa 10 mM                   | ----        | 20 $\mu$ l      | 20 $\mu$ l     | 20 $\mu$ l        | 20 $\mu$ l        |
| Incubar durante 15 min a 37°C |             |                 |                |                   |                   |
| Ácido acético 30%             | 40 $\mu$ l  | 40 $\mu$ l      | 40 $\mu$ l     | 40 $\mu$ l        | 40 $\mu$ l        |

**Cuadro 1.** Formulas empeladas para determinar el control enzima

|                                                          |
|----------------------------------------------------------|
| <b>Sustrato</b> = Abs de Blanco sustrato – Abs de Blanco |
| <b>Enzima</b> = Abs de Control enzima – Abs de Blanco    |
| Control Enzima= <b>Enzima - Sustrato</b>                 |

Una vez estandarizada la cantidad de enzima, se procedió a realizar los ensayos de tipo inhibición enzimática, empleado como posible inhibidor al péptido PaDef a concentraciones de 0.05, 0.5, 5 y 50 µg/ml. Como control positivo de inhibición en el caso de tripsina se utilizó el inhibidor de frijol *tepari* (TBPI) (Pliego-Arteaga, et al., 2019) a una concentración de 6 µg/ml. Además, el vehículo del péptido es dimetilsulfóxido (DMSO) al 2%, por tanto, fue evaluado para descartar que pudiese generar un efecto en la actividad enzimática. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Para ello se colocaron los reactivos en el orden de la tabla 4. De los datos obtenidos se calcularon las unidades de actividad enzimática y posteriormente fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA y Tukey con el software PAST v2.17c.

**Tabla 4.** Reactivos para evaluar la actividad inhibitoria enzimática

| Reactivo                      | Blanco | Blanco sustrato | Control enzima | Blanco inhibidor | Ensayo inhibición |
|-------------------------------|--------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|
| Buffer de reacción            | 200 µl | 180 µl          | 145 µl         | 125 µl           | 125 µl            |
| Inhibidor                     | -----  | -----           | -----          | 20 µl            | 20 µl             |
| Tripsina o Quimotripsina      | -----  | -----           | 35 µl          | -----            | 35 µl             |
| Incubar durante 15 min a 37°C |        |                 |                |                  |                   |
| BapNa 10 mM                   | ----   | 20 µl           | 20 µl          | 20 µl            | 20 µl             |
| Incubar durante 15 min a 37°C |        |                 |                |                  |                   |
| Ácido acético 30%             | 40 µl  | 40 µl           | 40 µl          | 40 µl            | 40 µl             |
| Leer absorbancia 405nm        |        |                 |                |                  |                   |

**Cuadro 2.** Fórmula para calcular las unidades de actividad enzimática

$$UA = \frac{\text{Ensayo de inhibición} - \text{Blanco sustrato}}{0.01}$$

Una unidad de actividad enzimática (UA) se define como el incremento de 0.01 DO (Densidad Óptica) a 405 nm para el caso de las de tipo tripsina.

**7.5 Actividad inhibitoria de tipo cisteína proteasas (papaína)**

El siguiente ensayo *in vitro* a evaluar fue el efecto del péptido PaDef sobre una enzima de tipo cisteína proteasas, para ello, se siguió el protocolo descrito por Yoza y colaboradores (2002), para lo cual, se preparó: buffer de reacción (100 mM Buffer de fostatos de sodio, pH 6.8, 2.5 mM DTT, 10 mM EDTA), papaína purificada a 0.1 mg/ml y sustrato BAPA a 10 mM (ANEXO III).

Se estableció un control enzima con la finalidad de determinar la concentración de enzima a la cual a una longitud de onda de 410 nm se obtenga una absorbancia de 0.05, para lo cual se realizó un barrido por triplicado a 50, 60 y 70 µl de enzima a una concentración de 0.1 µg/µl. Para ello en tubos eppendorf se coloca los reactivos como lo indica la tabla 5. Del producto de cada reacción se colocó 250 µl en una placa de 96 pozos y en un Varioskan Bio-Rad, Inc. xMark se midió la absorbancia a 410 nm. Con los datos obtenidos y utilizando las fórmulas de cuadro 1, se realizaron los cálculos para establecer el control enzima.

Una vez estandarizada la cantidad de enzima, se procedió a realizar los ensayos de tipo inhibición enzimática, empleado como posible inhibidor al péptido PaDef a concentraciones de 0.05, 0.5, 5 y 50 µg/ml y el respectivo vehículo (DMSO 1%) como control positivo de inhibición se utilizó la cistatina de amaranto (Valdés-Rodríguez, *et al.*, 2015) a una concentración de 6 µg/ml. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Para ello se colocaron en tubos eppendorf los reactivos en el orden de la tabla 6.

**Tabla 5.** Reactivos para establecer el control de enzima de la papaína

| Reactivo                      | Blanco | Blanco sustrato | Control enzima | Control de enzima | Control de enzima |
|-------------------------------|--------|-----------------|----------------|-------------------|-------------------|
| Buffer de reacción            | 500 µl | 450 µl          | 400 µl         | 390 µl            | 380 µl            |
| Papaína                       | -----  | -----           | 50 µl          | 60 µl             | 70 µl             |
| Incubar durante 15 min a 37°C |        |                 |                |                   |                   |
| BAPA 10mM                     | ----   | 50 µl           | 50 µl          | 50 µl             | 50 µl             |
| Incubar durante 15 min a 37°C |        |                 |                |                   |                   |
| Ácido acético 30%             | 125 µl | 125 µl          | 125 µl         | 125 µl            | 125 µl            |

**Tabla 6.** Reactivos para evaluar la actividad inhibitoria enzimática

| Reactivo                      | Blanco | Blanco sustrato | Control enzima | Blanco inhibidor | Ensayo inhibición |
|-------------------------------|--------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|
| Buffer de reacción            | 500 µl | 450 µl          | 390 µl         | 370 µl           | 370 µl            |
| Inhibidor                     | -----  | -----           | -----          | 20 µl            | 20 µl             |
| Papaína                       | -----  | -----           | 60 µl          | -----            | 60 µl             |
| Incubar durante 15 min a 37°C |        |                 |                |                  |                   |
| BAPA10mM                      | ----   | 50 µl           | 50 µl          | 50 µl            | 20 µl             |
| Incubar durante 15 min a 37°C |        |                 |                |                  |                   |
| Ácido acético 30%             | 40 µl  | 40 µl           | 40 µl          | 40 µl            | 40 µl             |
| Leer absorbancia 405 nm       |        |                 |                |                  |                   |

Con los datos obtenidos se calcularon las unidades de actividad enzimática utilizando la fórmula del cuadro 2. Los datos obtenidos se sometieron a los análisis estadísticos ANOVA y Tukey con el software PAST v2.17c.

## 7.6 Actividad inhibitoria de metaloproteasas

### 7.6.1 Cultivo celular de la línea MFC-7 de cáncer de mama

Para la proliferación celular, en una placa de cultivo Petri de 25 ml, se adicionó 8 ml de medio F-12 Ham completo (ANEXO I) y se inoculó con  $5 \times 10^5$  células de la línea

MCF-7 de cáncer de mama, se incubaron en condiciones de una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Realizando cambio de medio cada tercer día, una vez confluentes se cambió a medio de cultivo incompleto y se incubó a las mismas condiciones por 24 h.

### **7.6.2 Extracción de proteína total del cultivo celular**

Una vez que se observó un crecimiento confluyente, se realizó un enjuague de las células adicionando 4 ml de Buffer PBS (138 mM NaCl, 3 mM KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Posteriormente las células se despegaron cuidadosamente con el buffer antes mencionado y con la ayuda mecánica de una espátula estéril, se recolectaron y centrifugaron a 1500 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante y se añadió 5 ml de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 3% Tritón X-100), seguido de agitación vigorosa en vórtex por 10 s e incubando en hielo por 10min, se repitió este último paso, finalmente se conservó a -20 °C hasta su uso.

### **7.6.3 Cuantificación y visualización de las proteínas de interés**

#### **7.6.3.1 Cuantificación de proteína total por el método Bradford**

Para estandarizar los ensayos *in vitro* de las metaloproteasas, fue necesario determinar la concentración de la proteína obtenida, por lo tanto, se realizó la curva de calibración de Bradford, para ello se utilizó como proteína estándar la albumina sérica bovina (BSA). Las concentraciones del estándar proteico fueron 100, 250, 500, 700 y 1000 µg/ml. A partir de estas concentraciones se mezclaron 5 µl con 500 µl de reactivo de Bradford y se dejaron reaccionar por 15 min en ausencia de luz a temperatura ambiente, para su posterior cuantificación (Bradford 1976) en un Eppendorf Biophotometer 6131 UV/Vis Spectrophotometer a una longitud de onda de 595 nm.

Para la cuantificación de las muestras se mezcló 1 µl de la muestra de proteína total o 1 µl de buffer de lisis en el caso del blanco, con 500 µl de Reactivo de Bradford, dejándose incubar por 15 min en ausencia de luz a temperatura ambiente, posteriormente se cuantificaron a una longitud de onda de 595 nm. Las muestras presentaron una concentración igual o mayor a 520 µg/ml. Adicionalmente, las

muestras fueron cuantificadas en un Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometers usando la función de Protein A280, para lo cual se utilizó 2 µl de buffer de lisis como blanco. De igual manera para las muestras se empleó 2 µl de cada una. Las muestras cuantificadas presentaron una concentración similar a la obtenida por el método Bradford (igual o mayor a 520 µg/ml).

### 7.6.3.2 Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para verificar la integridad de la proteína obtenida se requirió su visualización, por lo tanto, se procedió a realizar geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Para ello se utilizó el protocolo descrito por Laemmli y Favre (1973). Cabe mencionar que el gel de poliacrilamida está formado por 2 partes: el gel concentrador y el de separación, por lo tanto, fueron preparados al 4% y 13%, respectivamente con los elementos que se señalan en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Preparación de geles de poliacrilamida.

| Reactivo                   | Gel concentrador (4%) | Gel de separación (13%) |
|----------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Agua destilada estéril     | 0.8 ml                | 2.4 ml                  |
| Tris HCl 1.5M pH 8.8       | -----                 | 1.25 ml                 |
| Tris HCl 0.5M pH 6.8       | 0.5 ml                | -----                   |
| Acrilamida (49.5% T, 1% C) | 200 µl                | 1.3 ml                  |
| SDS 10%                    | 20 µl                 | 50 µl                   |
| Persulfato de amonio       | 10 µl                 | 30 µl                   |
| TEMED                      | 5 µl                  | 10 µl                   |

Para cargar los geles se utilizó 5 y 10 µl de proteína total previamente extraída. Las muestras se prepararon adicionando Buffer de carga (0.06M Tris HCl pH 6.8, 12.5% glicerol, 2% SDS, 0.0144 M β-Mercaptoetanol y 0.1% de azul de bromofenol) a una relación de 3:1 y desnaturalizando a 65°C durante 15 minutos.

Se cargaron las muestras en los geles de poliacrilamida, los cuales fueron corridos a 60 volts por 15-25 minutos (gel concentrador) y a 120 volts por 45-55 minutos (gel

de separación) usando buffer de glicina (0.025M Tris, 0.192M Glicina, 0.1% SDS a pH 8.3).

#### **7.6.3.3 Tinción de proteínas con azul de Coomassie**

El gel se colocó en una solución fijadora durante 15 minutos (50% metanol, 10% ácido acético glacial y 40% agua destilada). Posteriormente, se desechó la solución y se añadió la solución de tinción durante 20 minutos (10% ácido acético glacial, 0.05% azul de Coomassie y 89.95% agua destilada). Pasado este tiempo se desechó la solución y se enjuagó el gel con agua destilada para después adicionar la solución de destinción (7% ácido acético glacial, 5% metanol y 88% agua destilada) hasta la eliminación completa de los residuos del colorante en el gel (Laemmli y Favre 1973). Las proteínas se observaron en un fotodocumentador Hoefer MacroVue UVIS-20.

#### **7.6.4 Determinación de la actividad enzimática de metaloproteasas**

Una vez que se corroboró la integridad y se determinó la concentración de las proteínas totales, se procedió a realizar el ensayo *in vitro* para evaluar el efecto del péptido PaDef sobre las metaloproteasas de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Para dicha evaluación se siguió el método modificado de Walsh y Damjanovski, 2011, para lo cual, en una placa de 96 pozos de fondo negro, se colocó 10 µg de proteína total, buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 3% Tritón X-100), el péptido PaDef a una IC 25, IC 50 y IC 75 (Guzmán - Rodríguez *et al.*, 2013) que corresponden a 70.80 µg/ml, 141 µg/ml y 212.43 µg/ml respectivamente y el vehículo (DMSO 1%). Como control positivo de inhibición se empleó 10 µg de un cocktail inhibidor de proteasas (SIGMA Cat. P2714-1BTL). La mezcla anterior se incubó en ausencia de luz a temperatura ambiente durante 30 min, posteriormente se adicionó 0.16 µg/ml de sustrato fluorogénico IX (R&D Systems Cat. ES010) y se incubó durante 1 h en ausencia de luz a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se midió su absorbancia a 320/405 nm.

Cada ensayo se realizó por triplicado en tres eventos independientes. El proceso descrito anteriormente se resume en la tabla 8.

Con las absorbancias obtenidas se obtuvo el porcentaje de inhibición utilizando las fórmulas del cuadro 3. Los datos obtenidos se sometieron a los análisis estadísticos ANOVA y Tukey con el software PAST v2.17c.

**Tabla 8.** Reactivos para evaluar la actividad enzimática de las metaloproteasas

| Reactivo                                                         | Blanco | Blanco sustrato | Control enzima | Blanco inhibidor | Ensayo inhibición |
|------------------------------------------------------------------|--------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|
| Buffer de lisis                                                  | 100 µl | 98.4 µl         | 88.4 µl        | 88.4 µl          | 78.4 µl           |
| Inhibidor (PaDef, DMSO 20% o cocktail)                           | -----  | -----           | -----          | 10 µl            | 10 µl             |
| Proteína total de MCF-7                                          | -----  | -----           | 10 µl          | ---              | 10 µl             |
| Incubar durante 30 min en ausencia de luz a temperatura ambiente |        |                 |                |                  |                   |
| Sustrato fluorogénico IX                                         | ----   | 1.6 µl          | 1.6 µl         | 1.6 µl           | 1.6 µl            |
| Incubar durante 1h en ausencia de luz a temperatura ambiente     |        |                 |                |                  |                   |
| Leer a 320/405 nm                                                |        |                 |                |                  |                   |

**Cuadro 3.** Fórmulas para calcular el porcentaje de inhibición

|                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. <b>Sustrato</b> = Abs de Blanco sustrato – Abs de Blanco                                                  |
| 2. <b>Enzima</b> = Abs de Control enzima – Abs de Blanco                                                     |
| 3. <b>Control Enzima</b> = <b>Enzima – Sustrato</b>                                                          |
| 4. <b>Blanco inhibidor</b> = Abs de blanco inhibidor – Abs Blanco                                            |
| 5. <b>Inhibidor</b> = Abs inhibidor – blanco inhibidor                                                       |
| 6. <b>% de inhibición</b> = $100 - \left[ \frac{\text{Inhibidor} \times 100}{\text{Control enzima}} \right]$ |

### 7.6.5 Determinación de la actividad inhibitoria en collagenasa II

Dado que la collagenasa II es una de las metaloproteasas más abundantes se procedió a realizar pruebas *in vitro* con dicha enzima, para lo cual se utilizó el protocolo modificado de Thring *et al.*, 2009. Por lo tanto, se preparó una solución de collagenasa de II purificada de *Clostridium histolyticum* (Gibco Cat. 17101015) a una concentración de 50 µg/ml. Posteriormente, en una placa de 96 pozos de fondo negro, se colocó el buffer de reacción (50 mM Tricina, 10 mM CaCl<sub>2</sub> y 400 mM NaCl pH 7.5), 2 µg de collagenasa II y el péptido PaDef a una IC 25, IC 50 y IC 75 (Guzmán - Rodríguez *et al.*, 2013) que corresponden a 70.80 µg/ml, 141 µg/ml y 212.43 µg/ml respectivamente y el vehículo (DMSO 1%). Como control positivo de inhibición se empleó 10 µg de un cocktail inhibidor de proteasas (SIGMA Cat. P2714-1BTL). Se agitó vigorosamente y se incubó durante 15 min en ausencia de luz a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionó 0.16 µg/ml de sustrato fluorogénico IX (R&D Systems Cat. ES010) y se incubó durante 30 min en ausencia de luz a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se midió su absorbancia a 320/405 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado en tres eventos independientes. El procedimiento se resume en la tabla 9.

**Tabla 9.** Reactivos para evaluar la actividad enzimática de collagenasa II

| Reactivo                                                         | Blanco | Blanco sustrato | Control enzima | Blanco inhibidor | Ensayo inhibición |
|------------------------------------------------------------------|--------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|
| Buffer de reacción                                               | 200 µl | 198.4 µl        | 158.4 µl       | 188.4 µl         | 148.4 µl          |
| Inhibidor (PaDef, DMSO 20% o cocktail)                           | -----  | -----           | -----          | 10 µl            | 10 µl             |
| Collagenasa II                                                   | -----  | -----           | 40 µl          | ---              | 40 µl             |
| Incubar durante 15 min en ausencia de luz a temperatura ambiente |        |                 |                |                  |                   |
| Sustrato fluorogénico IX                                         | ----   | 1.6 µl          | 1.6 µl         | 1.6 µl           | 1.6 µl            |
| Incubar durante 30 min en ausencia de luz a temperatura ambiente |        |                 |                |                  |                   |

Con las absorbancias obtenidas y con base a las fórmulas descritas en el cuadro 3, se realizaron los cálculos para la obtención del porcentaje de inhibición de cada una de las muestras. Los datos obtenidos se sometieron a los análisis estadísticos ANOVA y Tukey con el software PAST v2.17c.

## 7.7. Ensayos de tipo *in silico* de acoplamiento molecular o Docking

### 7.7.1. Preparación de receptores y ligando.

Para llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular, se emplearon las estructuras cristalográficas encontradas en el Protein Data Bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102472/>) (PDB) 1T8L (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283604012598?via%3DiHub>) y 3BTH (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283699926542?via%3DiHub>) para quimiotripsina y tripsina, respectivamente.

El ligando empleado en este estudio fue el péptido PaDef (Genbank AGC82207.1) cuyo modelado molecular se obtuvo a través de la herramienta en línea “Swiss model” (<https://swissmodel.expasy.org>) por homología estructural con péptidos de tipo defensina de plantas (SMTL ID : 7c2p.1), al final, se generó la secuencia FASTA que se empleó como archivo de entrada para la generación de los archivos necesarios para los estudios de acoplamiento molecular.

Previo a la realización de los estudios de acoplamiento molecular, es importante contar con estructuras cristalográficas adecuadas de los receptores empleados, por lo que se llevó a cabo una minimización de su energía empleando el programa Chimera (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15264254/>), además de la corrección de los posibles residuos de aminoácidos faltantes.

Los archivos PDB individuales fueron preparados para acoplarse usando el script `prepare_ligand4.py` de MGLTools (<https://link.springer.com/article/10.1007/s10822-010-9352-6>).

### **7.7.2 Estudios de acoplamiento molecular**

Se utilizó Vina 1.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3041641/>) para todos los acoplamientos en este estudio. En general, los parámetros de acoplamiento para Vina se mantuvieron en sus valores predeterminados. El espacio de cálculo fue de 127 x 127 x 127 puntos, con las siguientes coordenadas:  $x=37.908$ ,  $y=36.888$ ,  $z=1.959$ , la cuadrícula el espaciado de 0,375 Å.

### **7.7.3. Análisis de los resultados**

Los resultados obtenidos fueron analizados empleando el software Autodock Tools (<https://link.springer.com/article/10.1007/s10822-010-9352-6>), y el análisis de las interacciones de los ligandos con los receptores se obtuvieron empleando el visualizador Discovery Studio (<https://ajrconline.org/AbstractView.aspx?PID=2021-14-1-14>) . enfocándose de manera especial en el sitio catalítico de ambos blancos (Ser 195, His 57, Asp 102).

## **7.8 Determinación cualitativa *in vitro* del acoplamiento del péptido PaDef con la tripsina proteasa**

### **7.8.1 Geles de poliacrilamida en condiciones nativas**

Para visualizar el posible complejo obtenido de la reacción entre el péptido PaDef (50 µg/ml) y la tripsina proteasa (50 µg/ml) (véase sección 7.4) se requirió realizar geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Dicho gel de poliacrilamida está formado por 2 partes: el gel concentrador y el de separación, por lo tanto, fueron preparados al 4% y 13%, respectivamente con los elementos que se señalan en la Tabla 10.

Para cargar los geles se utilizó 10 µl de la reacción enzimática de tripsina con el péptido PaDef. Las muestras se prepararon adicionando buffer de carga (312.5 mM Tris HCl pH 6.8, 50% glicerol y 0.5% de azul de bromofenol) a una relación de 3:1. Una vez cargadas las muestras, los geles de poliacrilamida fueron corridos a 60 volts por 15-25 minutos (gel concentrador) y a 120 volts por 45-55 minutos (gel de separación) usando buffer de glicina (25 mM Tris y 192 mM Glicina).

**Tabla 10.** Preparación de geles de poliacrilamida.

| Reactivo                   | Gel concentrador (4%) | Gel de separación (13%) |
|----------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Agua destilada estéril     | 0.8 ml                | 2.4 ml                  |
| Tris HCl 1.5M pH 8.8       | -----                 | 1.25 ml                 |
| Tris HCl 0.5M pH 6.8       | 0.5 ml                | -----                   |
| Acrilamida (49.5% T, 1% C) | 200 µl                | 1.3 ml                  |
| Persulfato de amonio       | 10 µl                 | 30 µl                   |
| TEMED                      | 5 µl                  | 10 µl                   |

### 7.8.2 Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

Dado que la concentración de proteína presente en la muestra era muy baja. Una vez que el gel concluyó la corrida, se procedió a realizar la tinción de este con nitrato de plata. Para ello, el gel se fijó durante 1 h en solución de fijación (50% metanol, 10% ácido acético glacial y 40% agua desionizada). Posteriormente, se desechó la solución y se le adicionó agua desionizada para rehidratar el gel durante 30 minutos. Una vez hidratado, se adicionó la solución sensibilizadora (0.02% tiosulfato de sodio) incubando durante 1 minuto. Posteriormente se enjuagó tres veces durante 20 segundos con agua desionizada, se adicionó la solución de nitrato de plata fría (0.15% nitrato de plata y 0.02% formaldehído) y se incubó por 20 min. Transcurrido el tiempo se realizaron tres enjuagues de 20 segundos con agua desionizada y se cambió de charola de tinción. Después, se añadió la solución de revelado (3% carbonato de sodio y 0.05% formaldehído) incubando durante 3-5 minutos, se enjuagó con agua desionizada 3 veces durante 20 segundos y finalmente se adicionó una solución terminadora (5% ácido acético) durante 5 minutos, pasado

este tiempo se enjuaga 3 veces con agua desionizada, conservando el gel en agua desionizada estéril hasta su posterior análisis (Schägger, 2006).

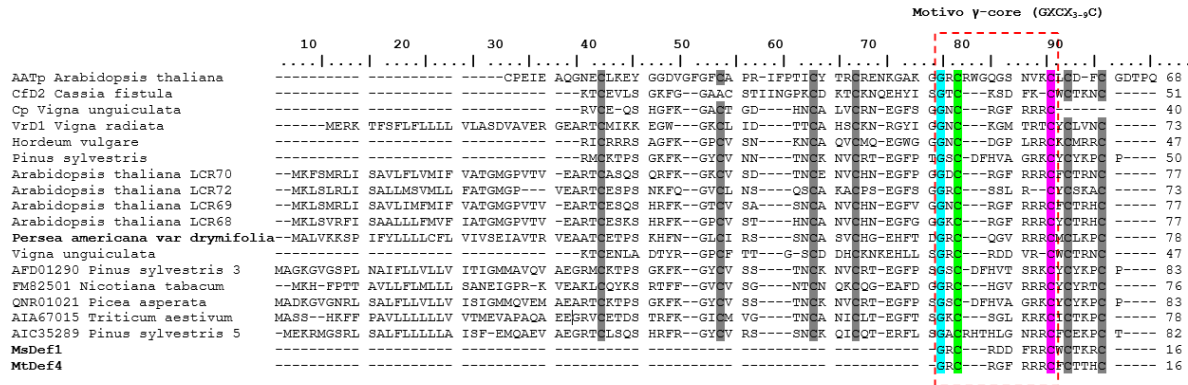
#### **7.8.1 Análisis densitométrico**

La imagen del gel teñido con nitrato de plata fue obtenida por un fotodocumentador Hoefer MacroVue UVIS-20. Para el análisis de imágenes se usó el software ImageJ a partir del cual se obtuvieron las áreas por carril en el gel de poliacrilamida teñido, a partir de estos datos se realizó el cálculo comparativo entre las bandas de interés.

## 8. RESULTADOS

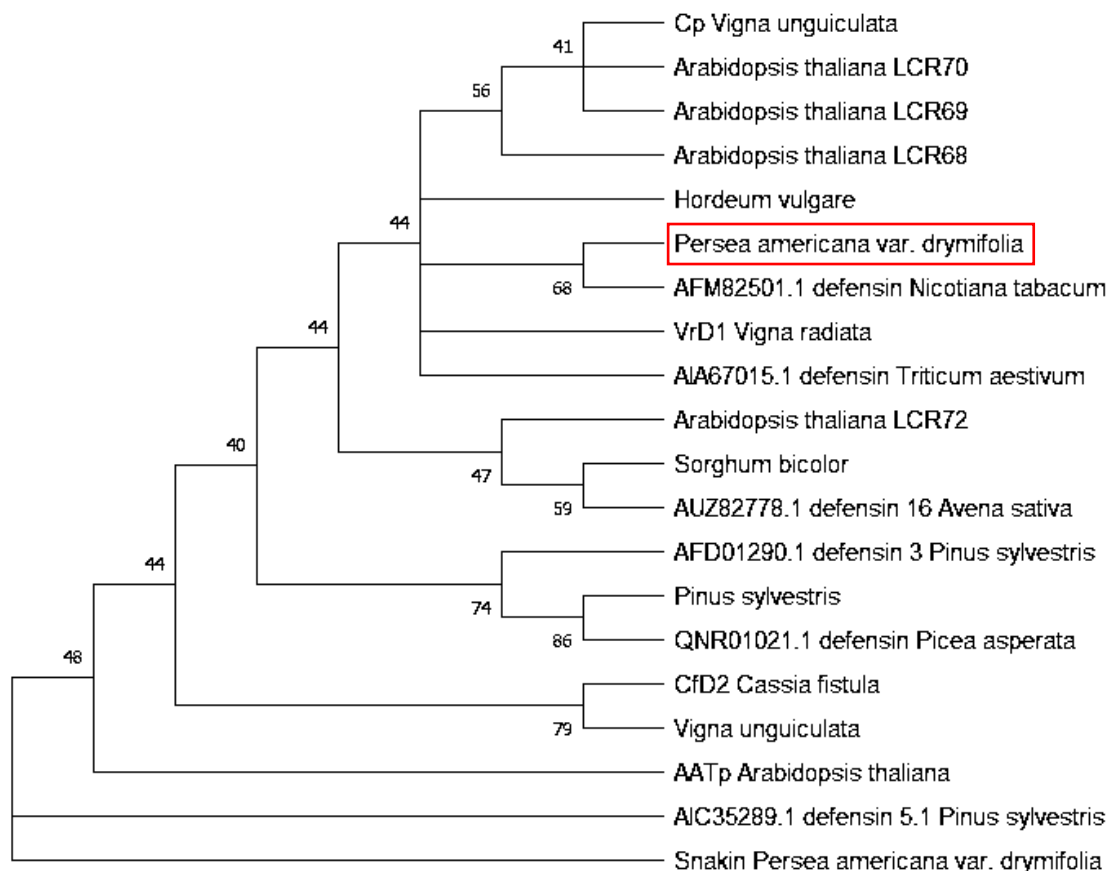
### 8.1 Relación filogenética de la defensina PaDef y otras defensinas reportadas con actividad de tipo inhibidor enzimática

En bases de datos (PlantPepDB y NCBI) se realizó una búsqueda de secuencias de defensinas de plantas que estuviesen reportadas como inhibidoras de enzimas, obteniendo un total de 11 secuencias, además se seleccionaron 5 defensinas al azar que no se reportan con dicha actividad. Una vez recolectada la información, se utilizaron las secuencias reportadas por Sathoff *et al.*, (2019) del motivo  $\gamma$ -core conservado, para elaborar un alineamiento con la herramienta MEGAX v.10.0.4 (Fig.12).



**Figura 12. Alineamiento de defensinas de plantas.** Con un cuadro punteado se resaltan los aminoácidos que conforman el motivo  $\gamma$ -core (GXCCX<sub>3-9</sub>C). Se utilizó el software informático MEGAX v. 10.0.4.

Una vez rasuradas las secuencias, utilizando el método de máxima verosimilitud, el modelo basado en la matriz de Dayhoff y la secuencia de Snakina de *Persea americana* var. *drymifolia* para enraizar, se procedió a construir el árbol filogenético en la herramienta Mega X (Fig. 13). Los resultados agrupan de manera cercana a la defensina PaDef con defensinas reportadas como inhibidores enzimáticos, por lo tanto, se puede estimar que el péptido de interés tiene probabilidad de presentar dicha actividad.

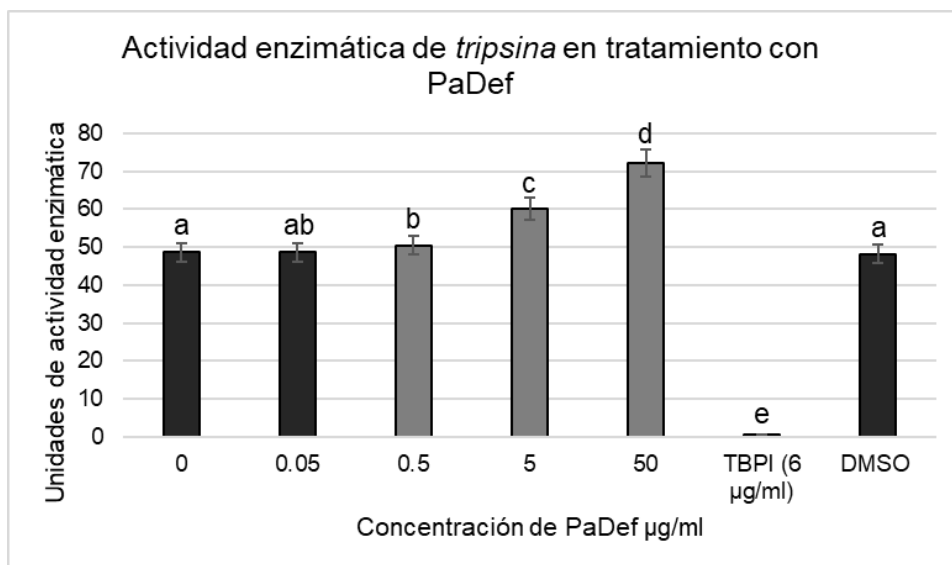


**Figura 13. Análisis filogenético del péptido PaDef por método de máxima verosimilitud.** La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo basado en la matriz de Dayhoff. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron aplicando el método BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el modelo de Dayhoff. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de tasa de evolución entre los sitios (2 categoría). Este análisis involucró 19 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 105 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X .

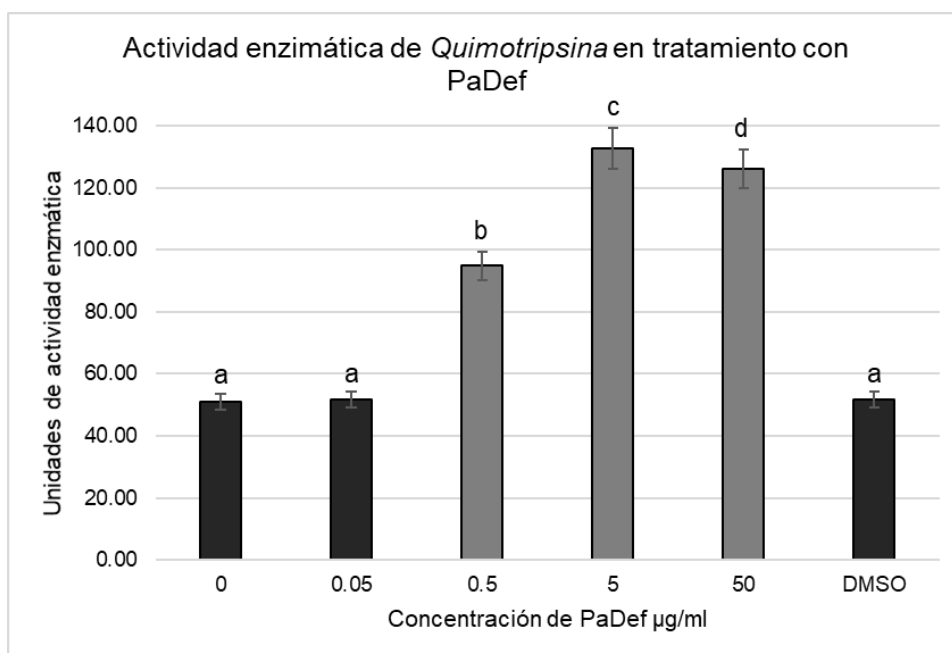
## 8.2 Actividad *in vitro* del péptido PaDef sobre proteasas de tipo serina proteasas (tripsina y quimotripsina)

Con la finalidad de tener un amplio rango para el análisis, los ensayos se realizaron con el péptido PaDef sintetizado químicamente a 4 concentraciones diferentes (0.05, 0.5, 5 y 50 µg/ml). Observando en ambas enzimas un incremento de la actividad enzimática en función al incremento de la concentración del péptido.

Además, el análisis estadístico Tukey con un valor de  $\alpha=0.05$ , muestra que existe una diferencia significativa en la mayoría de los tratamientos, excepto entre el grupo control y el tratamiento a 0.05  $\mu\text{g/ml}$  del péptido PaDef. Es importante señalar que en ambos casos el vehículo (DMSO 2%), no generó cambio alguno en la actividad de las enzimas evaluadas.



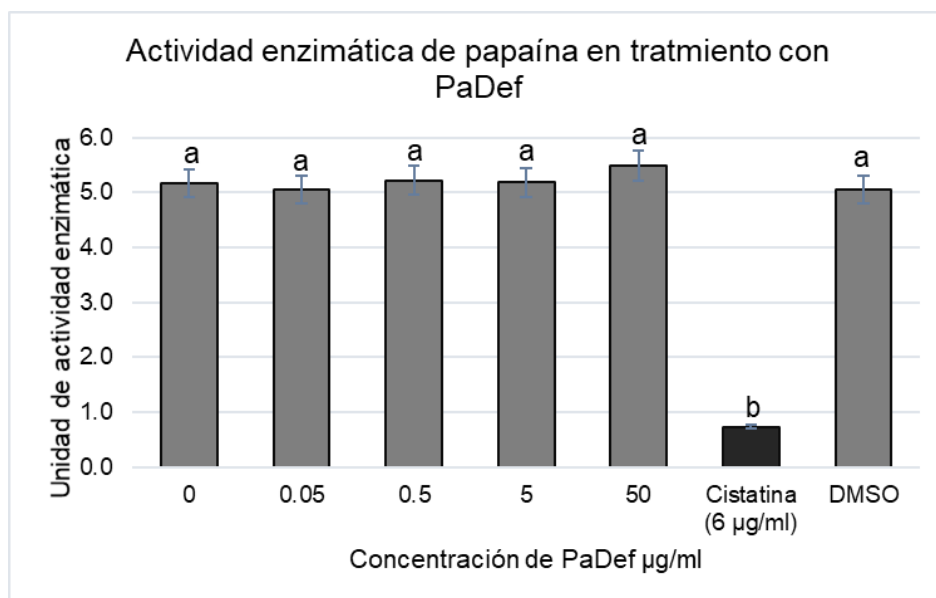
**Figura 14. Evaluación de la actividad enzimática de tipo tripsina en tratamiento con el péptido PaDef. Barras oscuras:** Tratamientos en los que la actividad enzimática se comporta como los controles. **Barras tenues:** Tratamientos significativamente diferentes.



**Figura 15. Evaluación de la actividad enzimática de tipo quimotripsina en tratamiento con el péptido PaDef. Barras oscuras:** Tratamientos en los que la actividad enzimática se comporta como los controles. **Barras tenues:** Tratamientos significativamente diferentes.

### 8.3 Actividad *in vitro* del péptido PaDef sobre proteasas de tipo cisteína proteasas (papaína)

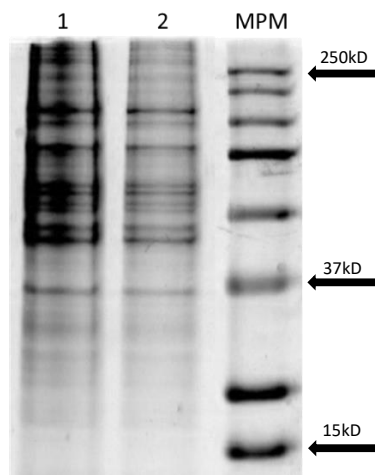
Para el análisis de la actividad enzimática de tipo papaína en tratamiento con el péptido PaDef, se construyó un gráfico de barras con las medias y desviaciones estándar obtenidas de las unidades de actividad enzimática (Fig. 16), en el cual se puede observar que el péptido PaDef no ejerce ningún efecto sobre la actividad de tipo papaína. El análisis estadístico Tukey señala que existe una diferencia estadísticamente significativa entre todos los tratamientos y el grupo control positivo de inhibición (cistatina 6 µg/ml), así como entre los tratamientos de 0.05 µg/ml y 50 µg/ml del péptido PaDef, no obstante, como la diferencia es menor a la mitad de una unidad de actividad enzimática no se considera tal diferencia. Es importante señalar que el vehículo (DMSO 1%) en el cual se encuentra el péptido PaDef, no generó cambio alguno en la actividad de la papaína.



**Figura 16. Evaluación de la actividad enzimática de tipo papaína en tratamiento con el péptido PaDef. Barras tenues:** Tratamientos en los que la actividad enzimática se comporta como los controles. **Barras oscuras:** Tratamientos significativamente diferentes.

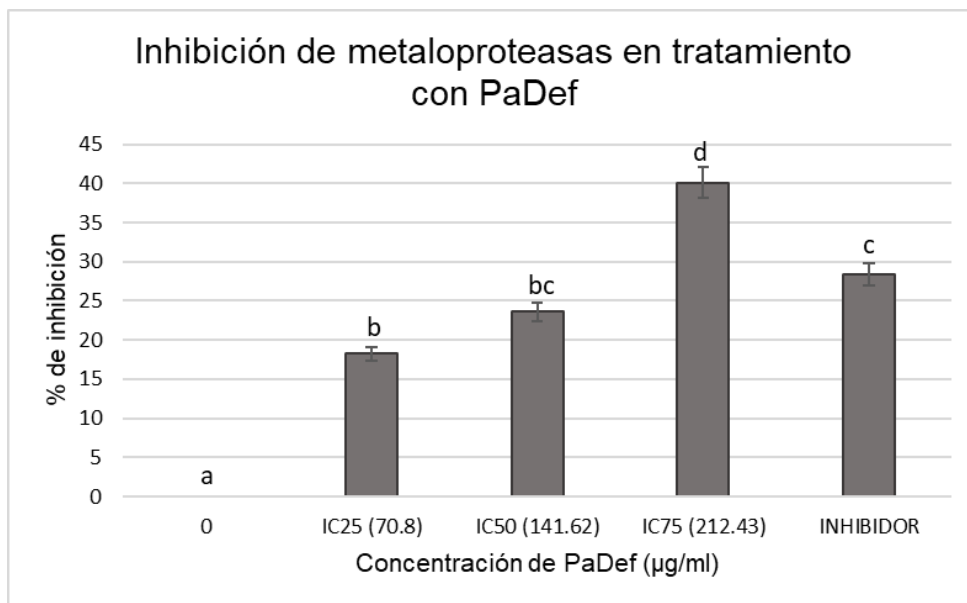
#### 8.4 Actividad *in vitro* del péptido PaDef sobre metaloproteasas

Para realizar la evaluación *in vitro* de la actividad del péptido PaDef sobre metaloproteasas se requirió realizar un cultivo celular de la línea MCF-7 de cáncer de mama y se realizó una extracción de proteína total por lisis celular y su posterior cuantificación por el método de Bradford. Del producto de extracción con la finalidad de verificar la integridad de las proteínas se realizó un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), observando el buen estado de estas (Fig. 17).



**Figura 17. Electroforesis en gel de acrilamida al 13% en condiciones desnaturalizante, teñido con azul de Coomassie. Carril 1:** Proteína total de la línea MCF-7 (10 µl); **2:** Proteína total de la línea MCF-7 (5 µl); **MPM:** Marcador de peso molecular de alto peso.

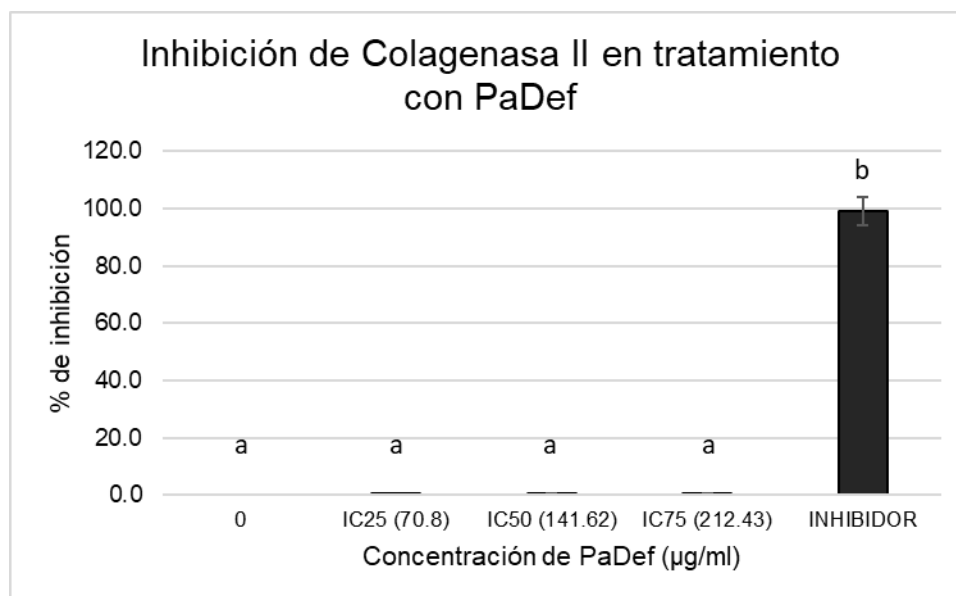
Una vez cuantificada y verificada la integridad de la proteína total obtenida, se procedió a realizar los ensayos *in vitro* para determinar el porcentaje de inhibición de actividad enzimática, para ello se utilizó la IC<sub>25</sub> (70.8 µg/ml), IC<sub>50</sub> (141.62 µg/ml) e IC<sub>75</sub> (212.43 µg/ml) del péptido PaDef. Con el porcentaje de inhibición enzimática, las respectivas medias y desviaciones estándar obtenidas se construyó un gráfico (Fig. 18), en el cual, se observó que el péptido PaDef inhibió la actividad enzimática de las metaloproteasas a medida que se incrementó la concentración del péptido. El análisis estadístico Tukey, señaló que existe una diferencia significativa entre la IC<sub>25</sub> y IC<sub>75</sub>, y que el efecto del control positivo (inhibidor) es igual al obtenido a la IC<sub>50</sub> del péptido.



**Figura 18. Evaluación de la actividad inhibitoria del péptido PaDef sobre metaloproteasas. Barras tenues:** Tratamientos en los que la actividad enzimática se comporta como los controles. **Barras oscuras:** Tratamientos significativamente diferentes.

#### 8.4.1. Actividad *in vitro* del péptido PaDef sobre collagenasa II

Dado que el péptido PaDef presentó actividad de tipo inhibidor enzimática sobre metaloproteasas de matriz extracelular, se procedió a realizar una prueba con una enzima purificada. Para ello, se empleó la collagenasa II, ya que es una de las metaloproteasas más abundantes y representativas. En el ensayo se utilizó la IC25 (70.8 µg/ml), IC50 (141.62 µg/ml) e IC75 (212.43 µg/ml) del péptido PaDef con 2 µg de collagenasa II en cada tratamiento. Con el producto de los cálculos de inhibición de actividad enzimática, así como el análisis estadístico obtenido, se construyó un gráfico de barras (Fig. 19), en el cual se puede apreciar que la defensina PaDef en ninguna de las concentraciones empleadas inhibió la actividad enzimática de la collagenasa II. Por otro lado, el cocktail de inhibidor empleado inhibe totalmente la actividad de la enzima de interés.



**Figura 19. Evaluación de la actividad inhibitoria del péptido PaDef sobre colagenasa II. Barras tenues:** Tratamientos en los que la actividad enzimática se comporta como el control negativo. **Barras oscuras:** Tratamiento significativamente diferente.

## 8.5. Ensayos *in silico* de acoplamiento molecular o Docking

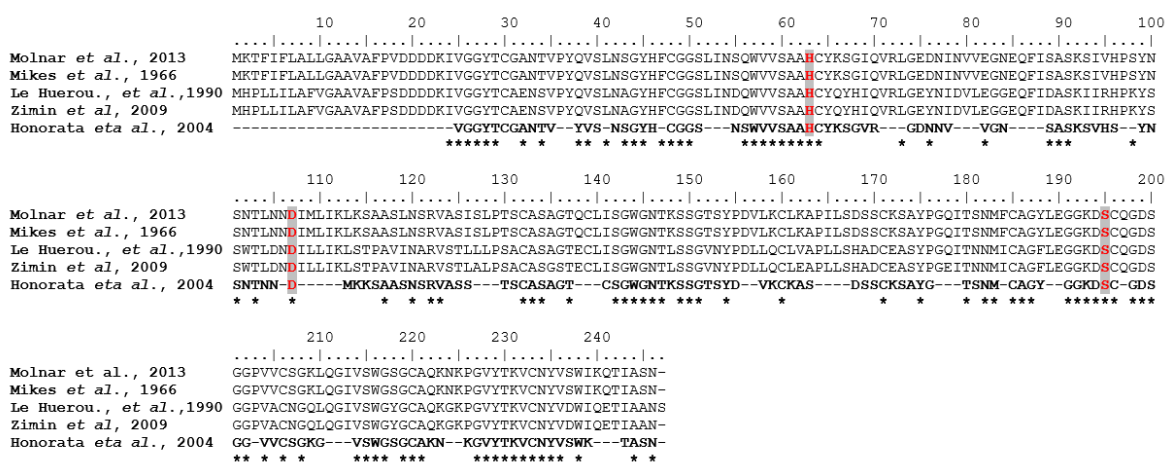
Con la finalidad de dilucidar los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* sobre las serina proteasas (tripsina y quimotripsina), se realizaron acoplamientos moleculares que nos permitieran explicar el efecto promotor que ejerce el péptido PaDef sobre dichas enzimas. Cabe destacar que en el caso de las metaloproteasas no fue posibles realizar este tipo de ensayos dado que aún se desconoce cuál de todas las metaloproteasas de matriz extracelular está inhibiendo este péptido.

### Tripsina

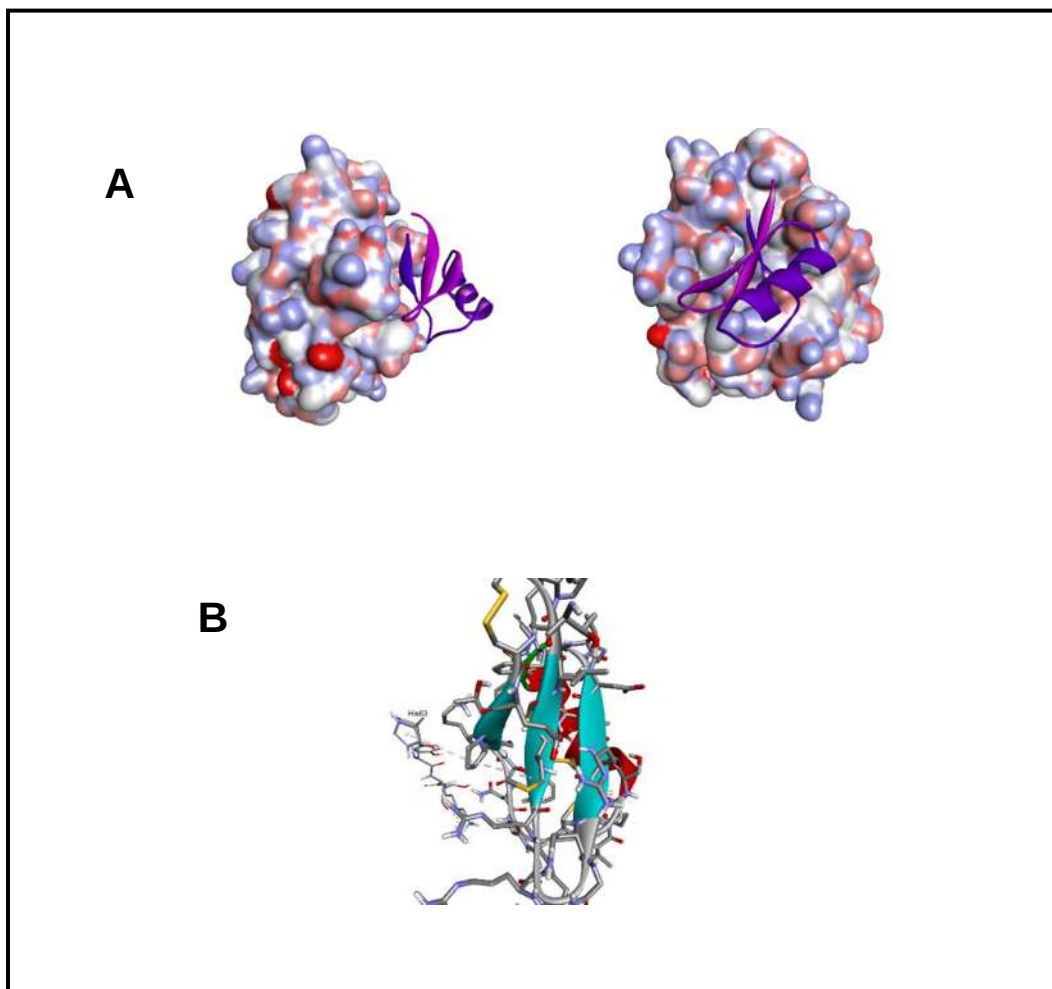
Como producto del análisis *in silico* del péptido PaDef con la enzima tripsina, se obtuvieron las diez conformaciones las cuales presentaban valores energéticos bajos de entre  $-3.40 \Delta G$  y  $-3.1 \Delta G$ , lo cual favorece la interacción con la enzima. Cabe mencionar que el acoplamiento realizado fue de tipo “ciego”, es decir el análisis se realizó sobre toda la superficie de la enzima. Interesantemente nueve de las diez conformaciones, persisten sobre un mismo sitio (Fig. 21A), que de acuerdo con la bibliografía corresponde al sitio catalítico de la enzima, sin embargo, la triada catalítica no se encuentra en la posición reportada (Polgán, 2005). Por lo tanto, se

realizó un alineamiento de varias secuencias publicadas en los últimos años para la tripsina bovina (Fig. 20), ubicando los residuos de aminoácidos conservados cercanos a los reportados por la bibliografía (señalados en rojo), determinado así, que el sitio catalítico lo conforma la triada His, 63, Asp 107 y la Ser 195.

Con los datos obtenidos, se identificó que todas las conformaciones interactuaban con el residuo de aminoácido Histidina 63 (Fig. 20B), el cual, con base al análisis realizado conforma la triada catalítica de la tripsina.



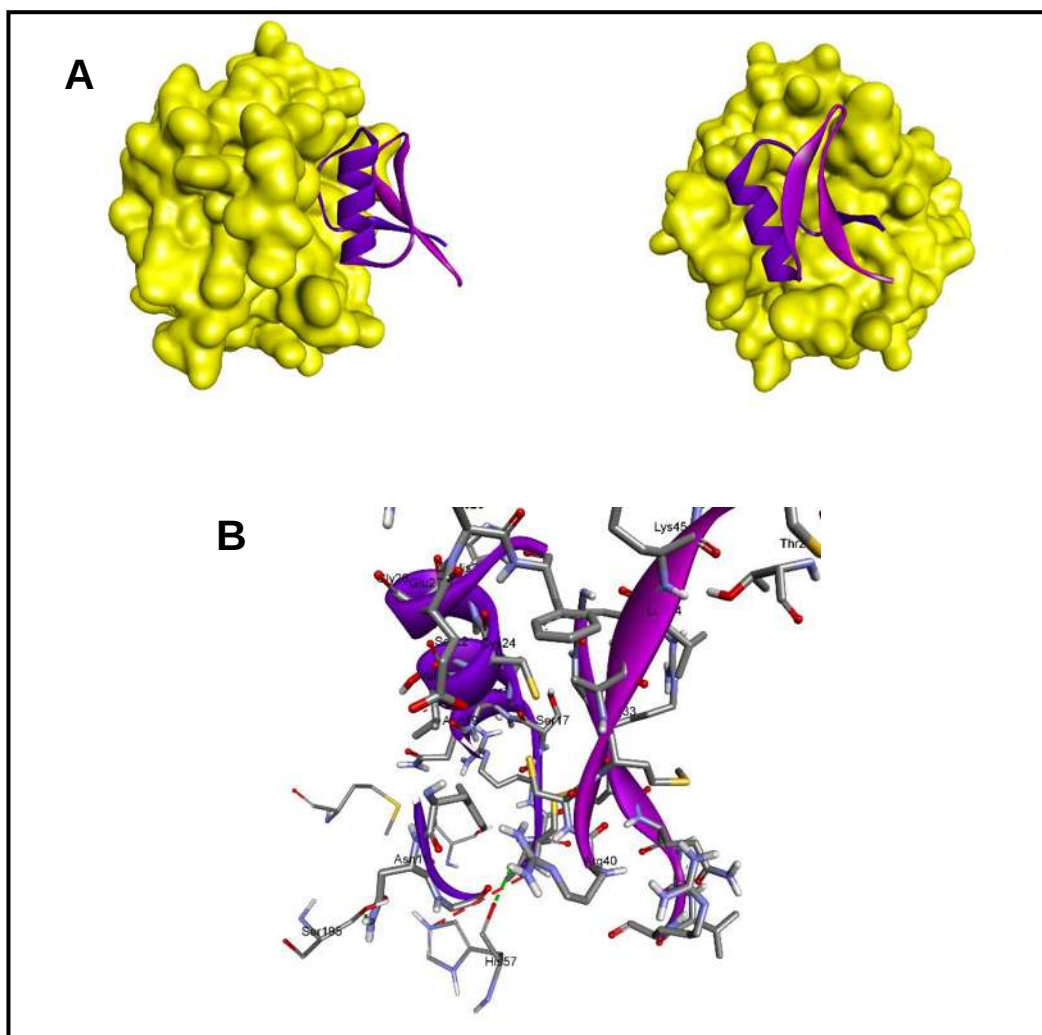
**Figura 20. Alineamiento de secuencias reportadas para la enzima tripsina.** Se señala en rojo los aminoácidos conservados, correspondientes al sitio catalítico de la enzima tripsina. Se utilizó el software informático MEGAX v. 10.0.4.



**Figura 21. Acoplamiento molecular de la tripsina con el péptido PaDef.** **A.** Acoplamiento sobre el sitio catalítico de la proteína, persistente en 9 de las 10 conformaciones obtenidas. **B.** Interacción del péptido PaDef con los residuos de aminoácidos cercanos al sitio catalítico de la enzima.

### Quimotripsina

En el caso de la quimotripsina de igual manera se realizó un acoplamiento “ciego” y se obtuvieron las diez conformaciones las cuales presentaban valores energéticos bajos de entre  $-3,6 \Delta G$  y  $-2,9 \Delta G$ , lo cual favorece la interacción con la enzima. Interesantemente todas las conformaciones se acoplan al sitio catalítico (Fig. 22 A), con al menos uno de los 3 residuos de aminoácidos que conforman la triada catalítica (His 57, Asp 102 y Ser 195). En su mayoría se establece una interacción con la Histidina 57 y la Serina 195 (Fig. 22B).

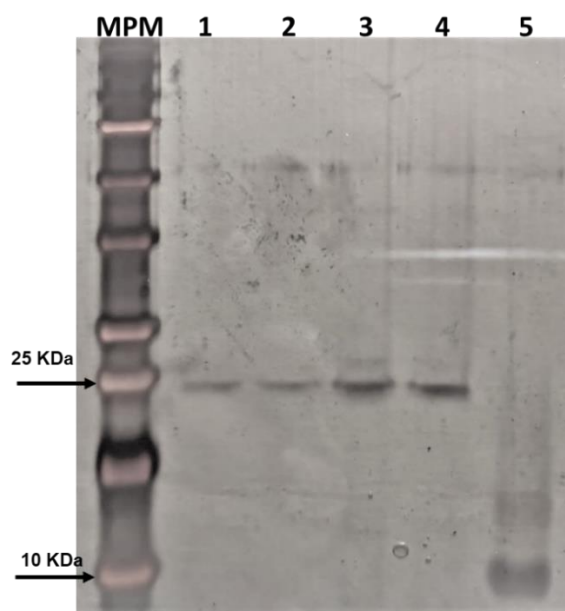


**Figura 22. Acoplamiento molecular de la quimotripsina con el péptido PaDef. A.** Acoplamiento sobre el sitio catalítico de la proteína, persistente en las 10 conformaciones obtenidas. **B.** Interacción del péptido PaDef con los residuos de aminoácidos del sitio catalítico de la enzima (His 57, Asp 102 y Ser 195).

### 8.6 Análisis cualitativo de la interacción del péptido PaDef con una serina proteasa (tripsina)

Una vez que se identificó por un método *in silico* que el péptido PaDef establece una interacción con el centro activo de la tripsina y la quimotripsina, se realizó un análisis *in vitro*, para determinar cualitativamente dicha interacción, para ello se utilizó los productos de la reacción enzimática de la tripsina en tratamiento con el péptido PaDef (Apartado 8.2). Dichas muestras se sometieron a corrimiento electroforético en condiciones nativas y se tiñeron con plata, esto con la finalidad de

no afectar dicha interacción y poder apreciar mejor las bandas obtenidas por la sensibilidad del revelado. Interesantemente, no se logró apreciar como se esperaba por el tamaño de banda, la diferencia de peso molecular asociada a la interacción, sin embargo, lo que se observó fue una diferencia en la intensidad de las bandas, lo que al analizarse por densitometría en el programa ImageJ, señaló que la banda de interés (tripsina en tratamiento con PaDef) es 3 veces más intensa que la banda control (solo la enzima) (Fig. 22), por lo cual se infiere que el efecto que el péptido PaDef causa en la tripsina se debe a la interacción con un pequeño fragmento del péptido y no con el péptido completo, como se pensaba.



**Figura 23. Electroforesis en gel de acrilamida al 13 % en condiciones nativas, teñido con nitrato de plata. Carril 1:** Tripsina; **2:** Blanco de la reacción (tripsina-buffer de reacción-DMSO); **3:** Producto de reacción de tripsina en tratamientos con PaDef (tripsina-PaDef-sustrato); **4:** Producto de reacción de tripsina en tratamientos con PaDef (sin sustrato); **5:** Péptido PaDef; **MPM:** Marcador de peso molecular de alto peso. Todos los pozos se cargaron con 10  $\mu$ l del producto de las reacciones.

## 9.DISCUSIÓN

En los últimos años, la búsqueda de péptidos con capacidad de inhibir actividades enzimáticas se ha convertido en un tema de gran relevancia, esto debido a sus múltiples aplicaciones, ejemplo de estas es en la agronomía; empleados en el control de plagas, en la industria alimenticia; en la formulación de alimentos funcionales, en el área clínica; como tratamientos alternativos en enfermedades digestivas, cáncer e incluso en el VIH (Ritchie, 2003; Sapkale *et al.*, 2012; Hag *et al.*, 2014; Quintero-Fabián *et al.*, 2019).

Un grupo de péptidos sobre los que se ha investigado al respecto son los péptidos antimicrobianos, los cuales se han reportado como inhibidores enzimáticos. Una de las familias pertenecientes a este grupo de péptidos es la de las defensinas de plantas que se han reportado como inhibidoras de enzimas como  $\alpha$ -amilasa y la proteasa tripsina (Melo *et al.*, 2002; Yaw-Jen *et al.*, 2006). En este trabajo se evaluó el efecto que presenta una defensina de aguacate sobre la actividad de diversas proteasas, identificada en el 2013 y reportada en 2016 por López Gómez y colaboradores en el mesocarpo del fruto del aguacate nativo mexicano (PaDef). Hasta ahora se sabe que PaDef presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas (Guzmán- Rodríguez *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2016), citotoxicidad en células de cáncer de mama y de leucemia (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Flores-Alvarez *et al.*, 2018.), sin embargo, se desconoce si al igual que otros miembros de su familia presenta actividad de tipo inhibidor enzimático. A través de métodos *in silico* e *in vitro* se evaluó este efecto en el péptido de interés.

En las últimas décadas en el campo de la genética se han desarrollado herramientas bioinformáticas que permiten relacionar o asociar evolutivamente a los organismos, lo cual en un análisis de secuencias permite realizar aproximaciones sobre la posible función de un gen. Precisamente, en este estudio una relación filogenética realizada con defensinas con y sin actividad tipo inhibidor enzimática permitió asociar al péptido PaDef con las secuencias que presentan actividad de tipo

inhibidor enzimática (Fig. 13), como lo son las defensinas de *Arabidopsis thaliana* (ATTp) y *Vigna unguiculata*, reportadas como inhibidoras de la tripsina (Zhao *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2002), sugiriendo así que el péptido de interés por cercanía evolutiva puede presentar actividad sobre las proteasas.

De los ensayos *in vitro* realizados para determinar la actividad enzimática de las serina proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas, en tratamiento con el péptido PaDef, los resultados fueron novedosos. En el grupo de la cisteína proteasas no se encontró efecto alguno, incluso es importante resaltar que no existe reporte bibliográfico que señale que las defensinas de plantas presenten actividad sobre este grupo. No obstante, en los otros dos grupos si se presentó un efecto importante. En el caso de las metaloproteasas se encontró la actividad buscada, sin embargo, cabe mencionar que en la literatura no existe reporte sobre péptidos antimicrobianos que inhiban este tipo de enzimas, incluso se seleccionó a la colagenasa II para evaluar sobre esta enzima purificada, esto por ser una de las metaloproteasas representativas de este grupo, observando que el péptido no ejerce ningún efecto sobre esta.

Por otro lado, en el otro grupo donde se encontró un efecto del péptido fue en la serina proteasas. Sin embargo, este no fue el esperado como lo reportan otros autores para este tipo de enzimas como Wijaya y Melo con las defensinas CfD2 y ATTp (Wijaya *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2002), respectivamente, donde se apreció una inhibición enzimática desde dosis de 1  $\mu$ M y 5  $\mu$ M, la cuales están en el rango en la que fue evaluada en este trabajo. Interesantemente en la evaluación con la tripsina y la quimotripsina se encontró un efecto de tipo promotor enzimático, a medida que se incrementa la concentración del péptido PaDef se aumentó la actividad enzimática (Fig. 14 y 15). Cabe señalar que la actividad de tipo promotora o activadora no se ha reportado para péptidos antimicrobianos, sin embargo, autores como Shen (2010) refiere que pequeñas moléculas de origen natural como el ácido fítico (InsP<sub>6</sub>), el cual, es específico de células eucariotas, regula directamente la actividad de enzimas involucradas en procesos como la reparación del ADN y la edición del ARN. Adicionalmente, también se sabe que éste tiene la

capacidad de unirse de forma alostérica a cisteína proteasas de *Vibrio sp*, activando dichas proteasas y consigo sus factores de virulencia. Si bien es poco el conocimiento sobre estas pequeñas moléculas activadoras de origen natural, pero debido a sus múltiples aplicaciones, existe un gran interés por diseñarlas y sintetizarlas químicamente.

Dado que los ensayos *in vitro* indican que el péptido ejerce un efecto promotor sobre dichas enzimas se buscó por ensayos *in silico* la interacción que el péptido PaDef tiene con las enzimas en las que se generó un efecto promotor. Se esperaba que al ser un docking ciego (análisis en toda la superficie de la enzima) el péptido se acoplara en diversas regiones de la enzima, sin embargo, en ambos casos las conformaciones obtenidas se acoplaron persistentemente sobre el sitio catalítico (His 57, Asp 102 y Ser 195), el cual fue identificado con base a lo reportado en el 2005 por Polgán.

Para evaluar cualitativamente la interacción que el péptido PaDef presenta con las enzimas en las que generó un efecto activador, se llevó a cabo un corrimiento electroforético en condiciones nativas de las muestras obtenidas de la actividad enzimática. Se esperaba que por diferencia de peso molecular se apreciara la interacción. Sin embargo, interesantemente solo se observó un incremento (aprox. 3 veces) en la intensidad de la banda en las muestras que presentaban tratamiento con el péptido PaDef, a diferencia de las que no. Esto lleva a inferir que lo que esta interactuando con las enzimas y provocando su activación no es el péptido completo, sino solo un pequeño fragmento de este, tal como lo señala Shen para las pequeñas moléculas que se acoplan a sitios alostéricos, por ello no se puede apreciar por diferencia de peso, pero si en la intensidad de la banda. Además, que debido a su alta afinidad del péptido sobre el sitio catalítico, se esperaría que este inhibiera la actividad de las serina proteasas o en su defecto que actuara como sustrato y al apreciar que no inhibía la actividad enzimática se infirió que PaDef puede ser susceptible a cortes proteolíticos por parte de estas. Por ello se realizó un análisis de dichos cortes en la herramienta en línea peptide cutter ([https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/)), confirmando que, en el caso de la

quimotripsina corta al péptido, generando 3 fragmentos (Cuadro 4 a) y la tripsina 6 fragmentos (Cuadro 4 b).

|                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Quimotripsina                                                                                  |
| AT <b>C</b> ETPSKHF / NGL <b>C</b> IRSSN <b>C</b> ASV <b>C</b> HGEHF / TD <b>GRCQGVRRRCMCLKPC</b> |
| b) Tripsina                                                                                       |
| AT <b>C</b> ETPSK / HFNGL <b>C</b> IR / SSN <b>C</b> ASV <b>C</b> HGEHFTD <b>GRCQGVRRRCMCLKPC</b> |

**Cuadro 4. Sitios de corte del péptido PaDef generados por las serina proteasas. A.** Fragmento generados por el corte proteolítico de la Quimotripsina. **B.** Fragmentos generados del péptido PaDef por la enzima Tripsina. Se señala con negritas el sitio correspondiente al motivo  $\gamma$ -core y con rojo las cisteínas que le proporcionan estabilidad al péptido.

Los resultados de los ensayos *in silico* han sido de gran ayuda ya que permitieron estimar que la actividad promotora observada en los ensayos *in vitro* se debe a la interacción de una región pequeña del péptido PaDef con las serina proteasas. Sin embargo, aun esta por dilucidar cual de todos estos fragmentos generados es el responsable de la actividad observada, para ello será necesario realizar ensayos *in silico* y una vez obteniendo el fragmento candidato proceder a evaluaciones *in vitro* e *in vivo*.

## **10.CONCLUSIÓN**

El péptido PaDef presenta actividad de tipo inhibidor enzimático solo sobre las metaloproteasas de matriz extracelular de la línea celular de cáncer de mama MCF-7. De manera relevante, promueve la actividad enzimática de las serina proteasas (tripsina y quimotripsina) la cual, se sugiere que está asociada a un fragmento de dicho péptido.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

**Alipour, H., Raz, A., Zakeri, S. y Djadid, N.D.** (2016). Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 11, 975-981.

**Antaño, C.M. y Melcata, F.X.** (2005). Plant serine proteases: biochemical, physiological, and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 637-650.

**Bitoun, E., Chavanas, S., Irvine, A.D., Lonie, L., Bodemer, C., Paradisi, M., Hamel-Teillac, D., Ansai, S., Mitsuhashi, Y. y Taïeb, A.** (2002). Netherton syndrome: Disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. *Journal of Investigative Dermatology*, 118, 352–361

**Bloch, C. y Richardson, M.** (1991). A new family of small (5 kDa) protein inhibitor of insect  $\alpha$ -amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat  $\gamma$ -purothionins. *FEBS letters*. 279, 101-104.

**Bradford, M.**, (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

**Cascales-Angosto, M. y Álvarez-Gómez, J.** (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 76, 59-84.

**Clemente, M.**, Corigliano, M., Pariani, S., Sánchez-López, E., Sander, V. y Ramos-Duarte, V. (2019). Plant Serine Protease Inhibitors: Biotechnology Application in Agriculture and Molecular Farming. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1345.

**Colilla, F. J., Rocher, A., y Méndez, E.** (1990). gamma-Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Letters*, 270, 191–194.

- Cornet, B., Bonmatin, J. M., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Ptak, M., y Vovelle, F.** (1995). Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure*. *Current Biology* 3, 435–448.
- Craik, C.S., Page, M.J. y Madison, E.L.** (2011). Proteases as therapeutics. *Biochemical Journal*, 435, 1-16.
- De Souza, E., Cândido, M. F. S., Pinto, P. B., y Pelegrini** (2011). Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The FASEB Journal*. 25 (10), 3290–3305.
- Dracatos, P. M., Payne, J., Di Pietro, A., Anderson, M. A., y Plummer, K. M.** (2016). Plant defensins NaD1 and NaD2 induce different stress response pathways in fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 17.
- Elsasser, B., Zauner F.B., Messiner, J., Suck-Soh, W., Dall, E. y Brandstetter, H.** (2017). Distinct Roles of Catalytic Cysteine and Histidine in the Protease and Ligase Mechanisms of Human Legumain as Revealed by DFT-Based QM / MM Simulations. *ACS Catalysis*, 9, 5585-5593.
- Erlanger, B., Kokowsky, N. y Cohen, W.** (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 96, 271-278.
- Farady, C.J. y Craik, C.S.** (2010). Mechanisms of macromolecular protease inhibitors. *ChemBioChem*, 11, 2341–2346.
- Flores-Alvarez, L.J., Guzmán-Rodríguez, J.J., López-Gómez, R., Salgado-Garcilia, Ochoa-Zaragoza, A. y López Meza, J.E.** (2018). PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 99, 10-18.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, a, Alamillo, J. M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M. y Poza-Carrión, C.** (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. *FEBS Letters*, 498 (3), 219–222.
- Guzmán-Rodríguez, J.J, López-Gómez, R., Salgado-Garcilia, R., Ochoa-Zaragoza, A. y López Meza, J.E.** (2016). The defensin from avocado (*Persea americana*

var.drymifolia) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 82, 620-627.

**Guzmán-Rodríguez, J.J, López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L.M., Salgado-García, R., Rodríguez-Zapata, L., Ochoa-Zaragoza, A. y López Meza, J.E.** (2013). Antibacterial Activity of Defensin PaDef from Avocado Fruit (*Persea americana* var. drymifolia) Expressed in Endothelial Cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*. 1-9.

**Haney, E., Mansour, S. y Hancock, R.** (2017) Antimicrobial Peptides: An Introduction. *Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1548, 3-21.

**Haney, E., Straus, S. y Hancock, R.** (2019) Reassessing the Host Peptide Landscape. *Front. Chem*, 7, 1-22.

**Haq, S.K., Atif, S.M. y Khan, R.H.** (2014). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: Natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431, 145–159.

**Hedstrom, L.** (2002). Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews*, 12, 4501-4524.

**Helliger, R. y Gruber, C.W.** (2019). Peptide-based protease inhibitors from plants. *Drug Discovery Today*, 24, 1877-1889.

**Herrera-Díaz, A., Kovacs, I., y Lindermayr, C.** (2016). Inducible Expression of the De-Novo Designed Antimicrobial Peptide SP1-1 in Tomato Confers Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *PLoS ONE* 11(10)

**Honorata, C., Ronny, H., Arne, O.S. y Jacek, O.** (2004). Crystal Structures of Five Bovine Chymotrypsin Complexes with P1 BPTI Variants. *Journal of Molecular Biology*, 344 (4), 1005-1020.

**Horger, A.C. y Van der Hoorn, R.A.** (2013). The structural basis of specific protease-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Current Opinion in Structural Biology*, 23, 842–850.

**Kedzior, M., Seredynski, R. y Gutowicz, J.** (2016). Microbial Inhibitors of cysteine proteases. *Medical Microbiology and Immunology*, 295, 275-296.

**Koehbach, J y Craik, D.** (2019) The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. *Trends in Pharmacological Sciences*. 40 (7), 517-528.

**Lacerda, A. F., Del Sarto, R. P., Silva, M. S., de Vasconcelos, E. A. R., Coelho, R. R., dos Santos, V. O., y Grossi-de-Sa, M. F.** (2016). The recombinant pea defensin Drr230a is active against impacting soybean and cotton pathogenic fungi from the genera *Fusarium*, *Colletotrichum* and *Phakopsora*. *3 Biotech*, 6, 1–10.

**Laemmli, U. K. y Favre, M.** (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol*. 80, 575–98.

**Laskowski, M y Kato, I.** (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49, 593-626.

**Laskowski, M. y Qasim, M.A.** (2000) What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477, 324–337.

**Lattarulo-Campos, M., Maurmann de Souza, C., Botelho-Sampaio de Oliveira K., Campos-Dias, S. y Luiz Franco, O.** (2018). The role of antimicrobial peptides in plant immunity. *Journal of Experimental Botany*, 69, 4997-5011.

**Lay, F. T., Mills, G. D., Poon, I. K. H., Cowieson, N. P., Kirby, N., Baxter, A. A., y Hulett, M. D.** (2012). Dimerization of plant defensin NaD1 enhances its antifungal activity. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 19961–19972.

**Lay, F. T., Poon, S., McKenna, J. A., Connelly, A. A., Barbeta, B. L., McGinness, B. S., y Anderson, M. A.** (2014). The C-terminal propeptide of a plant defensin confers cytoprotective and subcellular targeting functions. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–13.

**Lay, F.T, y Anderson, M.** (2005). Defensins Components of the Innate Immune System in Plants. *Current Protein & Peptide Science*, 6, 85–101.

**Le Huerou, I., Wicker, C., Guilloteau, P., Toullec, R. y Puigserver, A.** (1990). Isolation and nucleotide sequence of cDNA clone for bovine pancreatic anionic trypsinogen. Structural identity within the trypsin family. *European Journal of Biochemistry*, 193 (3), 767-773.

**Le, C. F., Fang, C. M., y Sekaran, S. D.** (2017). Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), 1–16.

**Lomas, D.A., Loubakos, A., Cumming, S.A. y Belorgey, D.** (2002). Hypersensitive mousetraps, alpha1-antitrypsin deficiency, and dementia. *Biochemical Society Transactions*, 30, 89–92.

**López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L.M., Ibarra-Laclette, E., Guzmán-Rodríguez, J.J., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., Salgado-Garcilia, R., Rodríguez-Zapata, L.C., Jiménez-Moraila, B. y Herrera-Estrella, L.** (2016). Transcriptome (ESTs) of native Mexican avocado fruit is dominated by stress and innate immunity genes. *Acta Horticulturae*, 1144, 43-48.

**Marcus, J. P., Goulter, K. C., Green, J. L., Harrison, S. J. y Manners, J. M.** (1997). Purification, characterisation and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. *European Journal of Biochemistry*. 244 (3), 743–749.

**Mateusz, K., Serednski, R. y Gutowicz, J.** (2016). Microbial Inhibitors of cysteine proteases. *Medical Microbiology and Immunology*, 205, 275-296.

**Melo, F., Rigden, D., Franco, O., Mello, L., Ary, M., Grosii, M. y Bloch, C.** (2002). Inhibition of Trypsin by Cowpea Thionin: Characterization, Molecular Modeling, and Docking. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 48, 311–319.

**Méndez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G. G., Méndez, R., y de Haro, C.** (1990). Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell- free system of a novel thionin,  $\gamma$ -hordothionin, from barley endosperm. *European Journal of Biochemistry*, 194, 533–539.

**Meng, D.M., Zhao, J.F., Ling, X., Dai, H.X., Guo, Y.J., Gao, X.F., Dong, B., Zhang, Z.Q., Meng, X. y Fan, Z.C.** (2017). Recombinant expression, purification and antimicrobial activity of a novel antimicrobial peptide PaDef in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 203, 90-99.

**Mikes, O., Holeysovsky, V., Tomasek, V. y Sorm, F.** (1966). Covalent structure of bovine trypsinogen. The position of the remaining amides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 24, 346-352.

**Molnar, T., Voros, J., Szeder, B., Takats, K., Kardos, J., Katona, G y Graf, L.** (2013). Comparison of complexes formed by a crustacean and a vertebrate trypsin with bovine pancreatic trypsin inhibitor - the key to achieving extreme stability? *FEBS Journal*, 280, 5750- 5763.

- Morgera F., N. Antcheva, S. Pacor, L.Quaroni, F. Berti, L. y Vaccari, A.** (2008). TossiStructuring and interactions of human beta-defensins 2 and 3 with model membranes *J. Pept. Sci.*, 14, pp. 518-523.
- Mótyán, J.A., Tóth, F. y Tozsér, J.** (2013). Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology Biomolecules. 3 (4), 923-942.
- Peters, B. M., Shirliff, M. E., y Jabra-Rizk, M. A.** (2010). Antimicrobial peptides : Primeval molecules or future drugs?. *PLoS Pathogens*, 6(10), 4–7.
- Picart, P., Pirttilä, A. M., Raventos, D., Kristensen, H. H., y Sahl, H. G.** (2012). Identification of defensin-encoding genes of *Picea glauca*: characterization of 75 PgD5, a conserved spruce defensin with strong antifungal activity. *BMC Plant Biology*, 12.
- Pliego-Arteaga, R., Roldán-Padrón, O., Castro-Guillén, J., Mendiola-Oyala, E., Jiménez-Sandoval, P., Briebe, L., Dagio-Hernández, M. y Blanco-Labra, A.** (2019). Properties of a Non-canonical Complex Formed Between a Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Protease Inhibitor and  $\alpha$ -Chymotrypsin. *The Protein Journal*. 38 (4), 435-446.
- Polgán, L.** (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2161-2172.
- Qi, R.F., Song, Z.W. y Chi, C.W. S.** (2005) Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Biochemical et Biophysical Acta* 37, 283–292.
- Quintero-Fabián, S., Arreola, R., Becerril-Villanueva, E., Torres-Romero, J.C., Arana-Argáez, V., Lara-Riego, J., Ramírez-Camacho, M.A. y Álvarez- Sánchez, M.E.** (2019). Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Frontier in Oncology* 9, 1-21.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. y Deshpande, V.V.** (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology Molecular Biology*. 62, 597-635.
- Rawling, N.D. y Barret, A.J.** Evolutionary families of peptidases. (1993). *Biochemistry Journal*, 290, 205-218
- Rawling, N.D., Barret, A.J. y Bateman, A.** (2012). The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 40, D343-D350.

- Rawlings, N.D.** Peptidase inhibitors in the MEROPS database. (2010). *Biochimie*, 92, 1463–1483.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P. y Barrett, A.J.** (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378, 705–716.
- Ritchie, B.C.** Protease inhibitors in the treatment of hereditary angioedema. (2003). *Transfusion and Apheresis Science*, 29, 259–267.
- Salvesen, G.S., Hempel, A. y Coli N.S.** (2016). Protease signaling in animal and plant-regulated cell death. *The FEBS Journal*, 283, 2577-2598.
- Sapkale, P.V., Jadhav, S.B. y Sable, P.N.** (2012). Protease Inhibitors: A Review. *Indian Drugs*, 50, 5-19.
- Sathoff, A., Velivelli, S., Shah, D. y Samac, D.** (2019). Plant Defensin Peptides have Antifungal and Antibacterial Activity Against Human and Plant Pathogens. *Phytopathology*. 109 (3), 402-408.
- Schägger, H.** (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1, 16-22.
- Seo, H. H., Park, S., Park, S., Oh, B. J., Back, K., Han, O., y Kim, Y. S.** (2014). Overexpression of a defensin enhances resistance to a fruit-specific anthracnose fungus in pepper. *Public Library of Science ONE*, 9(5).
- Shen, A.** (2010). Allosteric regulation of protease activity by small molecules. *Molecular Biosystem*, 6, 1431-1443.
- Slavokhotova, A.A y Rogozhin, E.A.** (2020). Defense Peptides From the  $\alpha$ -Harpinin Family are Components of Plant Innate Immunity. *Frontiers in Plant Science*, 11, 465.
- Tam, J., Wang, S., Wong K. y Tan, Wei, L.** (2015). Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals*, 8, 711-757.
- Thevissen, K., Warnecke, D. C., Francois, I. E. J. A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., y Cammue, B. P. A.** (2004). Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 3900–3905.
- Thring, T., Hili, P. y Naughton, D.** (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC complementary medicine and therapies*, 27.

**Tsiatsiani, L. y Heck, A.J.** (2015). Proteomics beyond trypsin. *The FEBS Journal*, 282, 2612-2626.

**Valdés-Rodríguez, S., Galván-Ramírez, J.P., Guerrero-Rangel, A. y Cedro-Tanda, A.** (2015). Multifunctional amaranth cystatin inhibits endogenous and digestive insect cysteine endopeptidases: A potential tool to prevent proteolysis and for the control of insect pests. *Biotechnol Appl Biochem.* 62, 634–641.

**Valueva, T.A. y Mosolov, V.V.** Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. (2004). *Biochemistry*, 69, 1305–1309.

**Van der Hoorn, R.A. y Jones, J.D.** (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Plant Biology*, 7, 400–407.

**Van der Weerden, N., Bleackley, M. y Anderson, M.** (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3545- 3570.

**Verma, S., Dixit, R. y Pandey, K.** (2016). Cysteine proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 1-12.

**Volpicella, M., Leoni, C., Costanza, A., De Leo, F., Gallerani, R. y Ceci, L.R.** (2011). Cystatins, serpins, and other families of protease inhibitors in plants. *Current Protein and Peptide Science*, 12, 386–398.

**Walsh, L y Damjanovski, S.** (2011). IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF- $\beta$ 1 resulting in epithelial to mesenchymal transition. *Cell communication and signaling*, 10.

**Wang G.** (2008). Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles *J. Biol. Chem.*, 283, pp. 32637- 32643.

**Wijaya, R., Neumann, G., Condon, R., Hughes, A. y Polya, G.** (2000). Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Science*, 159, 243–255.

**Yaw-Jen, L., Chao-Sheng, C., Szu-Ming, L., Ming-Pin, H., Ching-San, C. y Ping-Chiang L.** (2006). Solution Structure of the Plant Defensin VrD1 From Mung Bean and Its Possible Role in Insecticidal Activity Against Bruchids. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 63, 777–786.

**Yoza, J., Nakamura, S., Yaguchi, M., Haraguchi, K. y Ohtsubo, K.** (2002). Molecular Cloning and Functional Expression of cDNA Encoding a Cysteine Proteinase Inhibitor, Cystatin, from Job's Tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. *Ma-yuen* Stapf). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 66, 2287-2291.

**Zhao, Q., Chae, Y. y Markley, J.** (2002). NMR solution structure of ATTp, an *Arabidopsis thaliana* trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 41, 12284–12296.

**Zimin, A.V., Delcher, A.L., Florea, L., Kelley, D.R., Schatz, M.C., Puiu, D., Hanrahan, F., Pertea, G., Van-Tassell, C.P., Sonstegard, T.S., Marcais, G., Roberts, M., Subramanian, P., Yorke, J.A. y Salzberg, S.L.** (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos Taurus*. *Genome Biology*, 10 (4), R42.

## 12. ANEXOS

**Anexo I.** Medio de cultivo celular DMEM/ mezcla de nutrientes F-12 Ham completo.

Se considera medio completo al ser suplementado con los siguientes elementos:

| Elemento                    | Cantidad    |
|-----------------------------|-------------|
| Suero fetal                 | 5 ml        |
| Suero de ternera            | 5 ml        |
| Penicilina - Estreptomicina | 1 ml        |
| Anfotericina                | 100 $\mu$ l |
| Medio DMEM                  | cbp. 100 ml |

**Anexo II.** Preparación de reactivos para la actividad inhibitoria de tipo serina proteasa (tripsina y quimotripsina)

Tripsina / Quimotripsina solución stock (1mg/ml)

Para preparar la solución stock se pesa 1 mg de enzima y se diluye con 1 ml de agua a un pH 3.0.

Para la solución de trabajo, se realiza una dilución 1:20 en agua ácida (pH 3.0) y se almacena a -20°C para una mayor estabilidad.

Sustrato BapNa (N- $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginina-4-nitroanilide) solución de trabajo 10 mM

Pesar 6.52 mg de sustrato BapNa y diluir en 1.5 ml de DMSO (Dimetilsulfóxido), posteriormente calentar a 40°C y agitar en vórtex hasta que se disuelva por completo. Almacenar a -20°C protegiéndolo de la luz, por lo cual se aconseja cubrirlo de papel aluminio.

Buffer de reacción Tris-HCl 100 mM, pH 8.0

Pesar 0.6057 g de Trizma base (SIGMA) y diluir cbp 50 ml de agua, ajustar pH 8.0 con HCl, esterilizar y conservar a temperatura ambiente.

**Anexo III.** Preparación de reactivos para la actividad inhibitoria de tipo cisteína proteasa (papaína)

Papaína solución stock (1mg/ml)

Para preparar la solución stock se pesa 1 mg de enzima y se diluye con 1ml de agua desionizada.

Para la solución de trabajo, se realiza una dilución 1:10 en agua desionizada estéril, obteniendo una concentración de 0.1 mg/ml. Para mayor estabilidad cubrirlo de la luz y almacenar a -20°C, hasta su uso.

Sustrato BAPA (Benzoil-Arginina-4-nitroanilida) solución de trabajo 10 mM

Pesar 6.52 mg de sustrato BAPA y diluir en 1.5 ml de DMSO (Dimetilsulfóxido), posteriormente calentar a 40°C y agitar en vórtex hasta que se disuelva por completo. Almacenar a -20°C protegiéndolo de la luz.

Buffer de reacción

Preparar soluciones stock a 1 M de Buffer de Fosfato de Sodio pH 6.8, 2M DTT, 2 M EDTA. Tomar 1 ml, 12.5 µl y 200 µl respectivamente, aforar a 10ml con agua desionizada. Se recomienda que esta solución se prepare el mismo día de su uso.