



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

**EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO E3 DE AGUACATE (*Persea americana* var.
Drymifolia) EN CÉLULAS ENDOTELIALES BOVINAS
Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

TESIS QUE PRESENTA:

Q.F.B. JAQUELINA JULIA GUZMÁN RODRÍGUEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

ASESOR:

DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

COASESOR:

DR. RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ

MORELIA, MICHOACÁN. MARZO 2012



El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza y la coasesoría del Dr. Rodolfo López Gómez. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (14.5) y CONACyT (CB-2008-101451 y beca 239238).

ÍNDICE

	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1. Péptidos antimicrobianos	4
3.2. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos	5
3.3. Péptidos antimicrobianos de plantas	7
3.4. Expresión de péptidos antimicrobianos de plantas	9
3.5. Defensinas de plantas	12
3.5.1. Estructura de las defensinas de plantas	13
3.5.2. Clasificación de las defensinas de plantas	14
3.5.3. Actividad antibacteriana y antifúngica de las defensinas de plantas	15
3.5.4. Relación entre la estructura y la actividad de las defensinas de plantas	16
3.5.5. Aplicaciones biotecnológicas de las defensinas de plantas	19
3.6. Expresión de péptidos antimicrobianos en sistemas heterólogos	20
3.7. Potencial terapéutico de los PA como agentes antiinfecciosos.	23
3.7.1. Aspectos a considerar en la implementación de PA como fármacos	25

4. ANTECEDENTES	29
5. HIPÓTESIS	33
6. OBJETIVO GENERAL	33
6.1. Objetivos específicos	33
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	34
8. METODOLOGÍA	35
8.1. Análisis bioinformático	35
8.2. Clonación del PA E3 en pTracer-EF/V5-His A (Invitrogen)	35
8.3. Cultivo y mantenimiento de la línea celular BVE-E6E7	37
8.4. Transfección de células BVE-E6E7 por lipofección	38
8.5. Selección de clonas de las células BVE-E6E7 transfectadas	38
8.6. Determinación de la expresión del ARNm del PA E3	39
8.7. Preparación de los medios condicionados (MC)	39
8.8. Cuantificación de la proteína total	39
8.9. Ensayo de viabilidad por exclusión de azul tripano	40
8.9.1. Ensayo de viabilidad de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i>	40
8.9.2. Análisis estadístico	41
9. RESULTADOS	42
9.1. Análisis bioinformático	42

9.2. Clonación del PA E3 en pTracer-EF/V5-His A (Invitrogen)	46
9.3. Transfección de células BVE-E6E7 con el vector pTracerE3	49
9.4. Selección de poblaciones monoclonales	50
9.5. Determinación de la expresión del ARNm del PA E3	51
9.6. Preparación de los medios condicionados	54
9.7. Determinación de la proteína total	54
9.8. Ensayo de viabilidad de las células BVE-E6E7	54
9.9. Medición de la actividad antimicrobiana del péptido E3	56
10. DISCUSIÓN	61
11. CONCLUSIÓN	69
12. REFERENCIAS	70

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Modelos de interacción de PA con la membrana plasmática.	6
Figura 2. Blancos intracelulares de los PA.	7
Figura 3. Reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos.	10
Figura 4. Estructura general de las defensinas de plantas.	13
Figura 5. Tipos de defensinas de plantas.	14
Figura 6. Condiciones de la PCR utilizadas para amplificar el inserto que codifica para el péptido E3.	36
Figura 7. Alineamiento completo de la secuencia del péptido E3 de <i>P. americana</i> y formación de enlaces disulfuro.	43
Figura 8. Árbol filogenético del péptido E3 de <i>P. americana</i> .	44
Figura 9. Alineamiento completo (Clustal W) de 26 secuencias de defensinas incluido el péptido E3.	45
Figura 9. Alineamiento de defensinas de plantas tipo 1 y 2.	46
Figura 10. Proteína de fusión.	47
Figura 11. Generación de la construcción pTracerE3.	48
Figura 12. Comprobación de la inserción del ADNc del péptido E3 en la construcción pTracerE3.	48
Figura 13. Expresión de la proteína GFP en poblaciones policlonales.	50

Figura 14. Expresión de la proteína GFP en poblaciones monoclonales.	51
Figura 15. Demostración de la expresión del ARNm del PA E3 en las células BVE-E6E7.	52
Figura 16. Expresión relativa del péptido E3 en las diferentes clonas.	53
Figura 17. Ensayo de viabilidad de las células BVE-E6E7.	55
Figura 18. Ensayo de viabilidad de <i>E. coli</i> por MTT.	57
Figura 19. Ensayo de viabilidad de <i>S. aureus</i> por MTT.	58
Figura 20. Ensayo de viabilidad de <i>C. albicans</i> por MTT.	60

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Clasificación de los PA de plantas.	9
Tabla 2. Factores bióticos y abióticos de estrés que inducen la expresión de PA de plantas.	11
Tabla 3. Origen y actividad de algunas defensinas de plantas.	16
Tabla 4. Comparación de diferentes sistemas de expresión heteróloga.	22
Tabla 5. PA en fases clínicas de desarrollo.	24
Tabla 6. Estrategias de desarrollo y diseño de PA para su aplicación terapéutica.	27
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	35
Tabla 8. Características del vector pTracer-EF/V5-HIS A (Invitrogen).	36
Tabla 9. Inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> con MC (100 µg/ml) de las células BVE-E6E7 que producen el péptido E3.	57
Tabla 10. Inhibición del crecimiento de <i>S. aureus</i> con MC de las células BVE-E6E7 que producen el péptido E3.	59

1. RESUMEN

La selección de microorganismos multirresistentes a los antibióticos convencionales es un problema de salud importante a nivel mundial, esto ha conducido a la búsqueda de nuevas estrategias de control. Una de ellas son los péptidos antimicrobianos (PA) que son moléculas de defensa de plantas y animales. Los PA de plantas más estudiados han sido las defensinas, las cuales poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas. Sin embargo, en el aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*), el cual es utilizado en la medicina tradicional para eliminar microorganismos y parásitos, no se han descrito PA. A partir de un banco de ADNc del mesocarpo del fruto y semilla de esta variedad de aguacate se identificaron secuencias cuyas proteínas predichas tienen alta homología con PA, entre ellas el péptido E3. En este trabajo, el ADNc del péptido E3 se expresó en células endoteliales bovinas y se evaluó su actividad antimicrobiana. Para ello, el ADNc del péptido E3 se clonó en el vector pTracer-EF/V5-His A generando la construcción pTracerE3, la cual se utilizó para transfectar una línea inmortal de células endoteliales bovinas (BVE-E6E7). Se obtuvo una población policlonal y de ella se seleccionaron 9 poblaciones monoclonales. Se verificó la expresión del ARNm del péptido E3 en las células transfectadas mediante RT-PCR y secuenciación. Se obtuvo el medio condicionado (MC) de las clonas, se cuantificó la proteína total y se evaluó su actividad contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* a través del ensayo de MTT. Las clonas tuvieron efectos antimicrobianos similares y este fue dependiente de la concentración (0-100 µg/ml), se obtuvieron inhibiciones de crecimiento de 85.6% y 91.1% contra *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Sin embargo, bajo las condiciones evaluadas en este trabajo no se detectó actividad de los MC contra *Candida albicans*. Estos resultados son el primer reporte de la actividad antimicrobiana de un PA de *P. americana* var. *drymifolia*.

2. INTRODUCCIÓN

Un área de la farmacología que se ha estudiado con gran énfasis es la terapia antimicrobiana. Desde principios del siglo XX con el descubrimiento de la penicilina se desencadenó una serie de eventos que mostraron como un solo antibiótico podía curar la mayoría de las enfermedades infecciosas (Risso, 2000). Sin embargo, pronto se presentaron fenómenos de resistencia antimicrobiana favorecidos por: 1) la presión selectiva ejercida al prescribir formal o libremente medicamentos para uso terapéutico en humanos o animales, 2) la utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos, 3) el uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana, y 4) el desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes microorganismos teniendo en cuenta la flora local de cada institución o comunidad (Sussmann *et al.*, 2008).

A pesar de la gran variedad de antimicrobianos con los que se cuenta actualmente, las infecciones provocadas por bacterias multiresistentes causan una amplia morbilidad y mortalidad. Asimismo, se incrementan los costos por una mayor estancia hospitalaria y complicaciones derivadas de la misma. Se calcula que el costo anual en los Estados Unidos por la resistencia antibiótica es entre 100 millones y 30 billones de dólares (Sussmann *et al.*, 2008).

En los últimos años se han estudiado nuevas estrategias para combatir las enfermedades infecciosas utilizando mecanismos diferentes a los ya establecidos, ejemplo de ello son los péptidos antimicrobianos (PA) que son moléculas efectoras clave en la inmunidad innata de los animales y plantas. Debido a su actividad y selectividad, algunos PA se están considerando como nuevos agentes terapéuticos muy prometedores.

Los PA son moléculas que han sido aisladas de bacterias, hongos, animales y plantas, éstos forman parte importante en la defensa del hospedero; la mayoría de ellos tienen actividad de amplio espectro ya que pueden presentar actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, citotóxica o actuar como moléculas moduladoras del sistema inmune. Dentro de los diferentes tipos de PA presentes

en las plantas destacan las defensinas que primordialmente presentan actividad contra hongos fitopatógenos; este efecto puede estar dado por la afectación directa de la membrana plasmática o por la inhibición de la formación de hifas.

En este proyecto se planteó el uso de un sistema de expresión heteróloga de células de endotelio bovino (BVE-E6E7) para expresar un péptido antimicrobiano de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*), con la finalidad de analizar su actividad antimicrobiana frente a cepas certificadas representativas de bacterias y hongos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Péptidos antimicrobianos

De manera general, los antibióticos de origen peptídico se pueden clasificar en dos grandes grupos: los que no son sintetizados en el ribosoma, como la gramicidina, polimixina, bacitracina, glicopéptidos etc., y los sintetizados en ellos (péptidos antimicrobianos), que son reconocidos como parte importante del sistema inmune innato (Hancock *et al.*, 1999; Tossi *et al.*, 2002).

El sistema inmune de los organismos multicelulares cuenta con un vasto arsenal de mecanismos para protegerlos de las constantes interacciones con los microorganismos infecciosos. Los péptidos antimicrobianos (PA) son pequeños péptidos anfipáticos y catiónicos en su mayoría, que protegen al hospedero contra una amplia gama de microorganismos. Estos péptidos son producidos por varias especies incluyendo bacterias, insectos, plantas y animales; éstos se expresan en las principales barreras del organismo como la piel y el epitelio previniendo así la colonización de los tejidos del hospedero por los patógenos. Los PA son reconocidos principalmente por sus propiedades antimicrobianas; sin embargo, poseen también una gran diversidad de funciones, entre ellas la capacidad de modular la respuesta inmune (Guaní-Guerra *et al.*, 2010).

Actualmente se han descrito más de 1500 PA diferentes, los cuales están clasificados en 4 grupos de acuerdo a sus características estructurales: Los que poseen en su estructura láminas- β , que son péptidos estabilizados por 2 a 4 enlaces disulfuro (por ejemplo; las α y β -defensinas humanas); los que poseen hélices- α (por ejemplo LL-37, cecropinas o magaininas); los de estructura extendida (ricos en glicina, prolina, triptófano, arginina y/o histidina) como la indolicidina; y los péptidos “loop”, que cuentan con un solo enlace disulfuro (por ejemplo bacterenecina). Estos PA derivan de un péptido precursor, el cual después

de uno o varios procesamientos proteolíticos libera el péptido activo (Hancock *et al.*, 2006).

3.2. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos

El mecanismo de acción antimicrobiana de los péptidos se basa en las características físico químicas de su estructura, como su carácter anfipático, la carga iónica y el tamaño; las cuales le permiten interactuar con facilidad e insertarse en la bicapa lipídica de la membrana formando poros que producen la pérdida de iones y líquido intracelular, provocando así la muerte de la célula (Zhang *et al.*, 2006).

El paso inicial es la atracción entre el péptido y la célula blanco, el cual ocurre a través de interacciones electrostáticas entre el péptido catiónico y los componentes cargados negativamente de la envoltura bacteriana (Jenssen *et al.*, 2006). Se han descrito varios modelos que describen la interacción de los PA con la membrana; entre ellos el modelo de “*palo barril*”, que plantea la interacción de algunas moléculas del péptido con la capa externa de la membrana para después insertarse en la bicapa lipídica y formar un poro hidrofílico que abarca la membrana citoplasmática. El modelo de “*carpeta*” describe un mecanismo mediante el cual los péptidos después de la interacción electrostática con la membrana celular, se alinean paralelamente a la superficie de la membrana. Con una concentración umbral determinada, se da la formación de micelas y poros en la membrana. El modelo de “*poro toroidal*” propone que los PA se insertan de manera perpendicular al plano de la bicapa con las regiones hidrofílicas interactuando con los fosfolípidos de la membrana celular, mientras que las regiones hidrofóbicas se asocian con el núcleo lipídico. En el modelo de “*electroporación*”, los PA catiónicos se asocian con la membrana bacteriana y generan una diferencia en el potencial eléctrico a través de la membrana; la formación del poro se da cuando esta diferencia de potencial alcanza 0.2V. El modelo “*hundimiento de balsas lipídicas*” propone que la unión de los PA causa un

desequilibrio en la masa de la membrana y por lo tanto un aumento de la curvatura de la misma, lo que proporciona la fuerza impulsora para la translocación de los péptidos a través de la bicapa; como los PA se insertan en la membrana, dan lugar a la formación transitoria de poros, causando que las moléculas peptídicas se queden ancladas en los dos lados de la membrana después de que se recupera la formación de la bicapa de fosfolípidos (Figura 1) (Murray *et al.*, 2008).

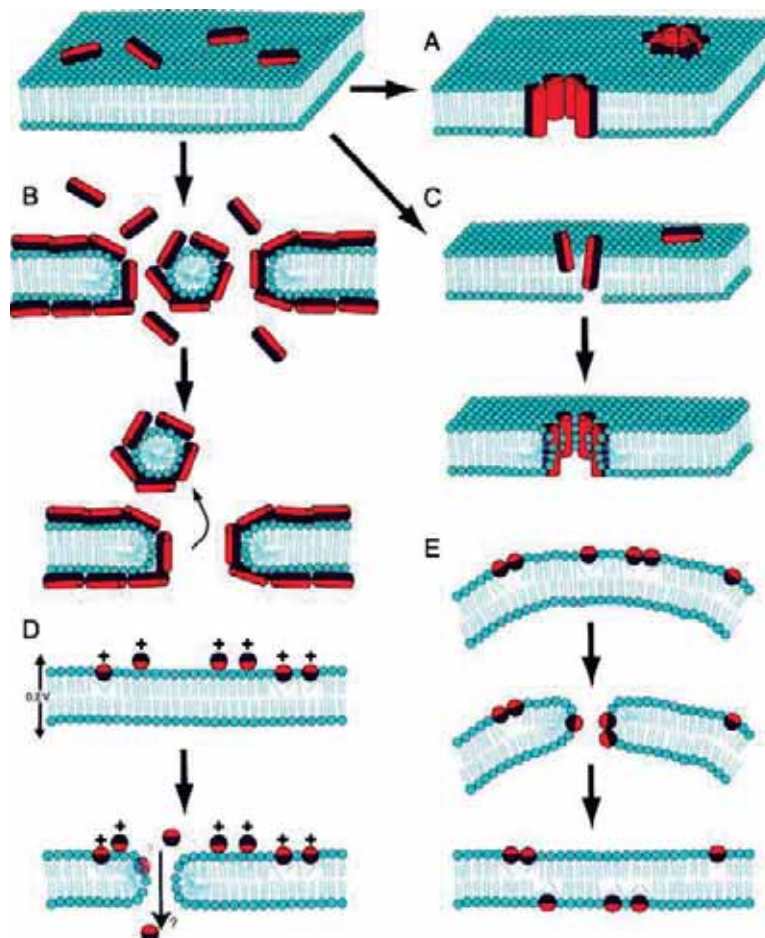


Figura 1. Modelos de interacción de PA con la membrana plasmática. **A.** *Palo-barril.* **B.** *Carpeta.* **C.** *Poro toroidal.* **D.** *Electroporación.* **E.** *Hundimiento de balsas lipídicas.* Tomado de Murray *et al.*, 2008.

Todos los PA interactúan con la membrana citoplasmática aunque sólo sea para llegar a su lugar de acción. Varios de los PA no causan permeabilización de la membrana a la concentración mínima efectiva y aún así pueden matar a la bacteria. Se ha demostrado que algunos PA logran transportarse a través de la

membrana acumulándose intracelularmente, de esta forma interfieren con una variedad de procesos celulares esenciales para mediar en la muerte celular (Figura 2). Estos nuevos mecanismos de acción incluyen la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas, la actividad enzimática y la síntesis de la pared celular (Brogden, 2005).

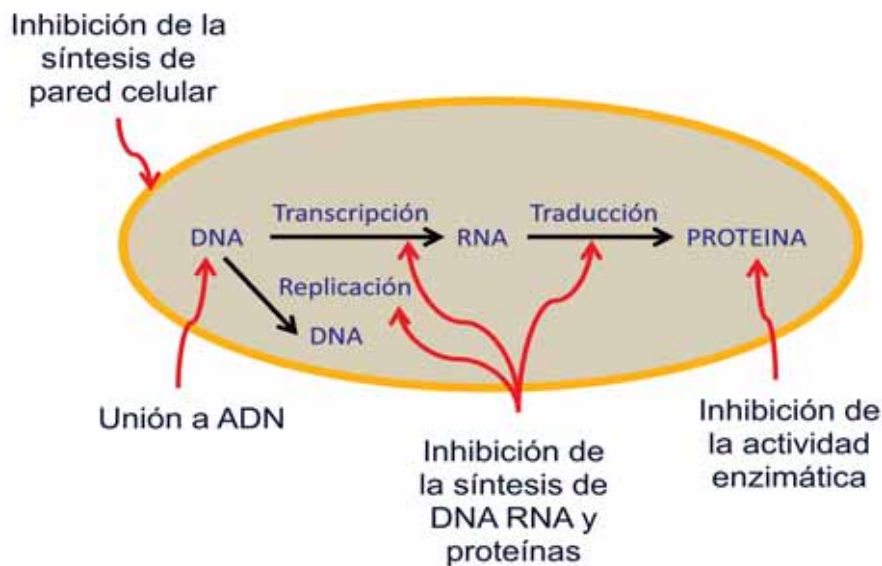


Figura 2. Blancos intracelulares de los PA. Modificado de Brogden (2005).

El amplio espectro y la baja incidencia de resistencia bacteriana hacia los PA, los sitúan como candidatos importantes para la investigación y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Su baja toxicidad, así como la posibilidad de una administración tópica o en forma sistémica, les proporcionan una ventaja sobre otros antibióticos.

3.3. Péptidos antimicrobianos de plantas

Las plantas han generado con la evolución una serie de sistemas de defensa contra el ataque de insectos y patógenos, basados en la generación de una respuesta metabólica activa o a través de barreras químicas y estructurales. Por lo tanto la resistencia de las plantas frecuentemente se divide en defensa constitutiva, expresada como una característica normal del desarrollo de la planta;

o de defensa inducible, la cual se activa al contacto con un organismo invasor. Este último requiere de un sistema de vigilancia, el cual permite el reconocimiento de la amenaza generando un sistema de transducción de señales y una ruta de respuesta, usualmente regulada a nivel transcripcional por medio de la expresión de genes relacionados con la defensa (Blanco y Aguirre 2002).

Las plantas producen pequeños PA ricos en cisteínas como una defensa natural contra los patógenos. Estos pueden ser producidos en todos los órganos, siendo generalmente más abundantes en las capas externas, lo que es coherente con el papel de los PA en la defensa constitutiva del hospedero contra los invasores microbianos que atacan desde el exterior. Los PA de plantas se expresan de manera constitutiva o son inducidos en respuesta al ataque de patógenos, e incluso pueden ser liberados inmediatamente después de iniciada la infección debido a que son producidos por un solo gen, lo que hace que se reduzca el gasto de energía en su expresión (Thomma *et al.*, 2002; Lay y Anderson, 2005).

La mayoría de los PA de plantas reportados hasta ahora tienen un peso molecular entre 2 y 10 kDa, son básicos y contienen 4, 6, 8 ó 12 cisteínas que forman enlaces disulfuro que les confieren estabilidad estructural y termodinámica (García *et al.*, 2001; Lay y Anderson, 2005). En base a la homología en la estructura primaria de los PA es que se han clasificado en diferentes grupos, se reconocen hasta el momento 10 familias (Tabla 1) (García *et al.*, 2001; Lay y Anderson, 2005). Por su importancia destacan los PA tioninas y defensinas ya que son las más diversas y estudiadas. Las tioninas fueron los primeros PA en aislarse de las plantas (Fernández, 1972), son péptidos tóxicos hacia bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, levaduras y varios tipos de células de mamíferos.

Tabla 1. Clasificación de los PA de plantas.

Familia	Número de aminoácidos	Enlaces disulfuro	Actividad contra
LTP	90–95	3–4	Bacterias y hongos
Esnacinas	61–70	6	Bacterias y hongos
Defensinas	45–54	4	Bacterias y hongos
Tioninas	45–47	3–4	Bacterias y hongos
Tipo heveínas	43	4	Bacterias Gram (+) y hongos
Tipo knottinas	36–37	3	Bacterias Gram (+) y hongos
Shepherinas	28–38	0 (lineal)	Bacterias y hongos
MBP-1	33	2	Bacterias y hongos
Ciclótidos	29–31	3	Bacterias, virus e insectos
Ib-AMP	20	2	Bacterias Gram (+) y hongos

(García-Olmedo *et. al.*, 2001)

3.4. Expresión de péptidos antimicrobianos de plantas

Como se mencionó anteriormente, la expresión de los PA de plantas puede ser constitutiva e inducible, en varios casos esta inducción está dada por la interacción directa de la célula hospedero con el patógeno entre otros factores de estrés (Tabla 2) (Lay y Anderson, 2005). Esta percepción de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), constituye la primera línea de defensa de la inmunidad innata de la planta y se conoce como PAMP desencadenados por la inmunidad (PTI) (Zipfel, 2008). Aunque el conocimiento de los PAMPs es aún limitado, se ha descrito que las respuestas intracelulares asociados con PTI son flujos rápidos de iones a través de la membrana plasmática, la activación de MAP cinasas, la producción de especies reactivas de oxígeno, los cambios rápidos en la expresión génica y el reforzamiento de la pared celular.

El PAMP mejor caracterizado en plantas es la flagelina, que es la proteína que constituye el bloque de ensamblaje del flagelo de las eubacterias. Muchas especies de plantas reconocen un epítipo de 22 aminoácidos (fgl22) que está altamente conservado y está presente en el extremo N-terminal de la flagelina. El receptor reconocedor de patrones (PRR) responsable de la interacción con la flagelina es el receptor tipo cinasa con repetidos ricos en leucina (LRR-RLK) (Figura 3); aunque no se conoce el sitio de unión específico de LRR-RLK y el epítipo fgl22, se ha descubierto que plantas de *Arabidopsis thaliana* mutadas en este receptor presentan una muy elevada susceptibilidad a diferentes patógenos, como *Pseudomonas syringae*, lo que puede estar relacionado con la disminución de la expresión de PA entre otros elementos de defensa de la planta (Chinchilla *et al.*, 2006).

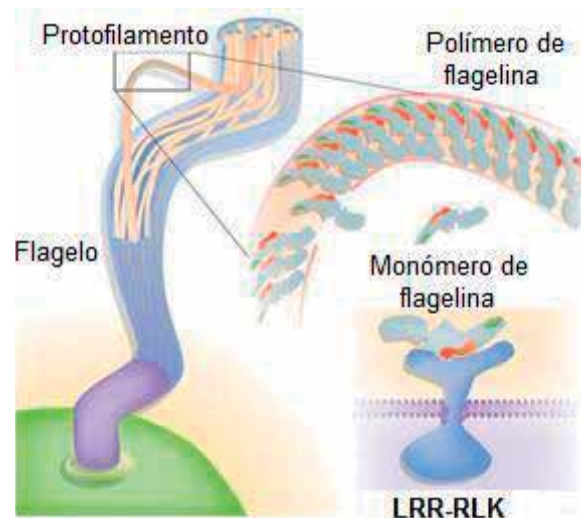


Figura 3. Reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos. Representación esquemática del reconocimiento de la flagelina por receptor LRR-RLK que desencadena la inducción de la expresión de PA de plantas (Modificado de Reichhart, 2003).

Tabla 2. Factores bióticos y abióticos de estrés que inducen la expresión de PA de plantas.

Estrés	Defensina de planta	Planta de origen	Tejido
Interacción con patógenos	DRR230-a, DRR230-b	<i>Pisum sativum</i>	Vainas inmaduras
	Rs-AFP3, Rs-AFP4	<i>Raphanus sativus</i>	Hojas
	DRR230-c	<i>Pisum sativum</i>	Hojas
	PDF1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hojas
	PDF2.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hojas
	FST	<i>Nicotiana tabacum</i>	Sépalos
Heridas	DRR230-c	<i>Pisum sativum</i>	Hojas
Sequía	Dnh8	<i>Glycine max</i>	Hojas y raíces
Salinidad	NeThio1. NeThio2	<i>Nicotiana excelsior</i>	Hojas
Frío	NpThio1	<i>Nicotiana paniculata</i>	Hojas
	Tad1	<i>Triticum aestivum</i>	Tejido de la corona y plántulas

(Lay y Anderson, 2005).

3.5. Defensinas de plantas

Un grupo importante de PA identificados en plantas están estructuralmente relacionados con las defensinas de insectos y las de mamíferos, por lo que se les ha nombrado "defensinas vegetales" (Broekaert *et al.*, 1997). Considerando que la mayoría de los PA de los animales tienen actividad antibacteriana, las defensinas de plantas tienen una alta actividad antifúngica, que refleja la importancia relativa de los hongos frente a los patógenos bacterianos en el mundo vegetal (Hanckoc, 1999).

Las defensinas de plantas (DP) tienen una importante similitud entre sus estructuras, las cuales están generalmente compuestas por hélices- α y láminas- β . A diferencia de las tioninas, las DP tienen similitudes tanto a nivel de estructura secundaria como terciaria, además de que muestran similitud con otras defensinas de insectos. Esta homología entre las defensinas sugiere una alta conservación durante la evolución, lo que podría confirmar su importante papel en la defensa de las plantas contra patógenos (Franco y Pelegrini, 2005). Estos PA pueden ser divididos en dos grupos: 1) las que inhiben el crecimiento de los hongos a través de distorsiones morfológicas; y 2) los que actúan mediante interacciones electrostáticas con las cargas negativas de la membrana provocando la formación de poros (Hanckoc, 1999).

Se han aislado DP en diversos tejidos, principalmente en los que se encuentran expuestos al contacto con los patógenos como las semillas, hojas, vainas, tubérculos, frutos, raíces y cortezas (Gracia *et al.*, 1998). Debido a esto, se ha estudiado la función específica de los PA en los diferentes órganos; por ejemplo, la defensina Rs-AFPs se encuentra expresándose en semillas de rábano cuando ésta se encuentra perforada, ya sea por la germinación o artificialmente, la cantidad de DP que se expresa en esa área es suficiente para inhibir el crecimiento de hongos protegiendo la semilla y asegurando así la supervivencia de las plántulas (Broekaert *et al.*, 1995).

3.5.1. Estructura de las defensinas de plantas

Todas las DP identificadas hasta el momento tienen ocho cisteínas que forman cuatro puentes disulfuro que estabilizan su estructura (Figura 4). Estudios de la estructura tridimensional de una serie de defensinas vegetales han demostrado que estas proteínas se componen de una hélice- α y tres láminas- β antiparalelas, ordenadas en una configuración $\beta\alpha\beta\beta$ (Thomma *et al.*, 2002).

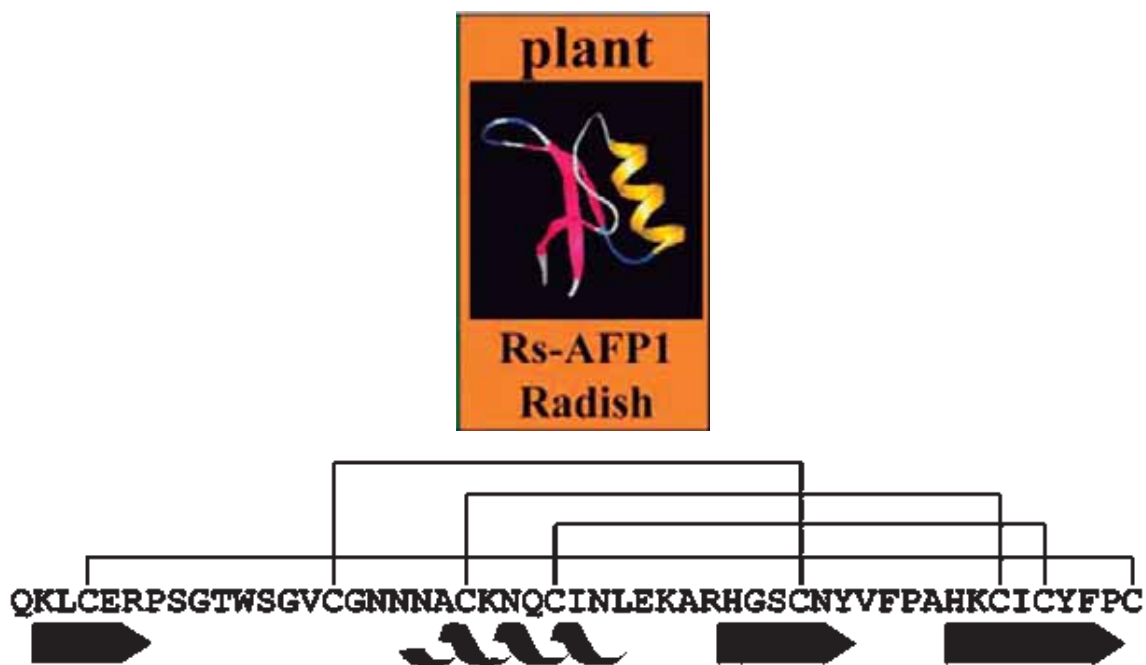


Figura 4. Estructura general de las defensinas de plantas. Un ejemplo representativo de las DP es la Rs-AFP1 de *Raphanus sativus*, la cual está constituida por una configuración estructural conocida como $\beta\alpha\beta\beta$, además de los 4 enlaces disulfuro característicos de estos PA. (Thomma *et al.*, 2002). La flecha indica la región de láminas- β y la hélice representa a la hélice- α .

3.5.2. Clasificación de las defensinas de plantas

Las defensinas de plantas se pueden clasificar en dos tipos, dependiendo de la estructura de la proteína precursora de la que provienen:

Tipo 1: En este grupo se encuentran la mayoría de las defensinas de plantas; en ellas el prepéptido está constituido por un péptido señal unido a la secuencia de la defensina madura en el extremo amino terminal (Figura 5A).

Tipo 2: Se agrupa a las defensinas de plantas cuyo precursor está constituido por un péptido señal, el dominio activo de la defensina y un prodominio C-terminal. Un ejemplo de defensinas de este grupo es la NaD1 de *Nicotiana alata* (Figura 5B) (Padovan *et al.*, 2010).

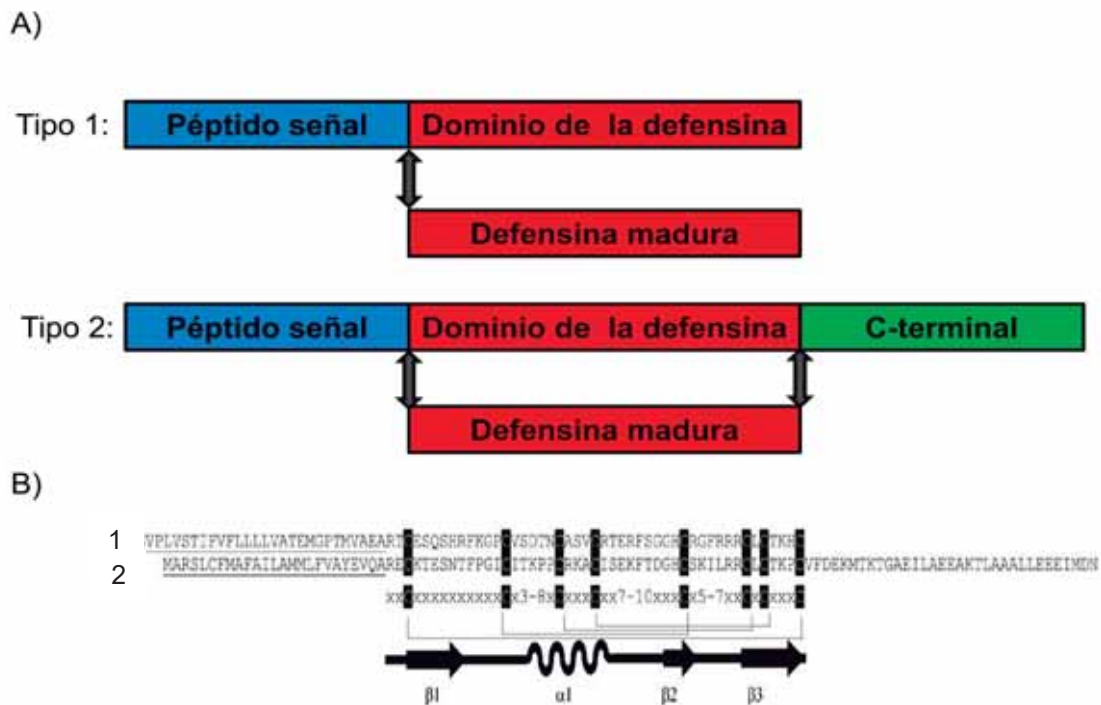


Figura 5. A) Tipos de defensinas de plantas. Tipo 1: La defensina madura está unida, en su extremo N-terminal, a un péptido señal. Tipo 2: Además de la unión al péptido señal, la defensina madura está unida en su extremo C-terminal a un dominio ácido (Lay y Anderson, 2005). B) Ejemplos de defensinas tipo 1 (*Vigna unguiculata*) y tipo 2 (*Nicotiana alata*) (Padovan *et al.*, 2010).

La presencia de la secuencia conservada del péptido señal indica que estos PA son secretados al exterior de la célula en su forma madura, como se demostró con la defensina de alfalfa alfAFP que regula la secreción del péptido hacia los espacios intercelulares del tallo en papas transgénicas (Gao *et al.*, 2000).

A la fecha solo se han hecho especulaciones acerca de la función específica del prodominio C-terminal; por un lado se plantea que esta secuencia actúa como una señal de localización subcelular, por lo que es importante en el tráfico subcelular y para el procesamiento postraduccional. Por otro lado, partiendo del hecho de que este prodominio está constituido en su mayoría por aminoácidos ácidos, se produce un equilibrio electrostático con las cargas positivas que presenta el dominio activo de la defensina, por lo cual se propone que el C-terminal tiene un efecto citoprotector evitando que la defensina interactúe con otras proteínas celulares o con lípidos de membrana durante la traslocación en la ruta de secreción (Lay y Anderson, 2005).

3.5.3. Actividad antibacteriana y antifúngica de las defensinas de plantas

Las defensinas de plantas poseen actividad antibacteriana contra patógenos de diversos organismos; por ejemplo la defensina de espinaca So-D₂, que a concentraciones menores de 20µM presenta actividad contra la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* y la Gram negativa *Ralstonia solanacearum* (Segura *et al.*, 1998). En la tabla 3 se muestran algunas defensinas de plantas y la actividad biológica que éstas presentan, se observa claramente que la gran mayoría tienen actividad antifúngica, como la defensina de rábano RsAFP1 con actividad contra *Colletotrichum lindemuthianum*, y otros hongos fitopatógenos, así como contra el oomiceto *Phytophthora infestans* (Terra *et al.*, 1992). El mecanismo por el cual se presenta este efecto no ha sido elucidado por completo; sin embargo, existe evidencia que las defensinas MsDef1 y MsDef4, provenientes de *Medicago spp*, interactúan directamente con la glucosilceramida

del hongo *Fusarium graminearum*, para inhibir el crecimiento del mismo (Ramamoorthy *et al.*, 2007).

3.5.4. Relación entre la estructura y la actividad de las defensinas de plantas

Una característica importante de los PA de origen animal es su diversidad molecular; sin embargo, como se mencionó anteriormente los PA de plantas se pueden clasificar en diferentes familias como las defensinas, de acuerdo a determinadas características estructurales comunes e importantes: son relativamente cortos y de carácter básico, que se caracterizan por pesos moleculares de hasta 10 kDa, y tienden a presentar un número variable de residuos de cisteína que contribuyen a estabilizar su estructura a través de la formación de puentes disulfuro. De hecho, se ha sugerido que los pequeños péptidos antimicrobianos ricos en cisteínas pueden representar hasta el 3% del repertorio de genes de una planta, por lo que pueden existir miles de estas moléculas en el reino vegetal (Silverstein *et al.*, 2007).

Tabla 3. Origen y actividad de algunas defensinas de plantas.

Especie	Defensina	Actividad Biológica
<i>Spinacia oleracea</i>	So-D ₂	AF, AB ⁺ , AB ⁻
<i>Dahlia merckii</i>	Dm-AMP ₁	AF
<i>Helianthus annuus</i>	SD2	AF
	Ha-DEF ₁	AP
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-AFP ₁	AF
<i>Brassica napus</i>	Bn-AMP ₁	AF
<i>Brassica rapa</i>	Br-AMP ₁	AF
	Br-AMP ₂	AF, AB ⁺
<i>Lepidium meyenii</i>	Lm-def	AF
<i>Raphanus sativus</i>	Rs-AFP ₁	AF
	Rs-AFP ₂	AF

	Rs-AFP ₃	AF
	Rs-AFP ₄	AF
<i>Sinapis alba</i>	Sa-AMP ₁	AF
<i>Beta vulgaris</i>	AX ₁	AF
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	TDEF1	AF
<i>Clitoria ternatea</i>	Ct-AMP ₁	AF
<i>Vigna unguiculata</i>	VUDEF	AF, IA
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PvD ₁	AF
<i>Medicago sativa</i>	AlfAFP	AF, BCI
<i>Medicago truncatula</i>	MtDEF ₂	AF
<i>Lens culinaris</i>	Lc-def	AF
<i>Tephrosia villosa</i>	TvD ₁	AF
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Ha-AMP ₁	AF
<i>Sorghum bicolor</i>	Sl α ₁	IA
<i>Echinochloa crus-galli</i>	Ec-AMP-D ₁	AF
<i>Capsicum annuum</i>	J1-1	AF
<i>Nicotiana glauca</i>	NaD ₁	AF
<i>Petunia hybrida</i>	Ph ₁	AF
<i>Solanum tuberosum</i>	StSN2	AF
<i>Vitis vinifera</i>	Vv-AMP ₁	AF

AF: Actividad antifúngica, B⁺: Actividad contra Gram positivas, B⁻: Actividad contra Gram negativas, IA: Inhibición de α -amilasa, BCI: Bloqueadora de canales iónicos, AP: actividad antiparasitaria (Oliveira y Moreira, 2009).

El término defensinas de plantas se utiliza para describir una clase de PA de plantas con propiedades estructurales y funcionales que se asemejan a los péptidos de la defensa de hongos, invertebrados o vertebrados, llamados “defensinas”. Esta clase de PA es capaz de soportar una muy variada secuencia de aminoácidos, aunque presentan una clara conservación de algunas posiciones de aminoácidos. Esta variación en la secuencia primaria puede ser la causa de la diversa actividad biológica que presentan las defensinas de plantas, incluyendo

principalmente la actividad antimicótica, así como la actividad antibacteriana y la de proteinasa o actividad inhibidora de la amilasa, entre otros (Lay y Anderson, 2005).

Las DP son capaces de inhibir el crecimiento de una amplia gama de hongos, pero son poco tóxicas para las células de mamíferos o plantas. La actividad antifúngica parece requerir la unión a objetivos específicos de la membrana, tales como los esfingolípidos (Thevissen *et al.*, 2004); aunque los determinantes estructurales de su actividad antifúngica y los mecanismos por los que inhiben el crecimiento de hongos aún no están completamente definidos.

En este sentido, las DP han sido funcionalmente clasificadas de acuerdo a sus efectos sobre la morfología de hongos (efecto sobre el alargamiento de las hifas) ya sea morfogenéticas o no morfogenéticas. Algunas DP tienen la capacidad de inhibir la α -amilasa de insectos y vertebrados. Estas defensinas inhibidoras de proteasas muestran algunas diferencias estructurales con las defensinas de plantas y hongos principalmente, permitiéndoles jugar un papel en la protección contra los depredadores, ya que parecen ser débilmente activos contra los hongos (Lara *et al.*, 2010). La presencia de aminoácidos hidrofóbicos y los cargados positivamente en las asas del inicio y terminación de la hélice- α , pueden ser importantes tanto para la actividad antifúngica y la inhibición de la enzima (Lara *et al.*, 2010).

En 1997 se realizó un análisis detallado de mutagénesis dirigida para investigar la relación entre la estructura y la actividad de las DP. En este estudio se observó que al hacer modificaciones puntuales en los aminoácidos básicos, por ejemplo al sustituir la Lys44 por el aminoácido neutro Gln, disminuyó la actividad hasta en un 30%. Esta evidencia muestra que la carga positiva es importante para la actividad antifúngica (De Samblanx *et al.*, 1997).

Aunque el mecanismo de acción antifúngica de las DP no es totalmente conocido, en general se acepta que actúan sobre la membrana microbiana por

interacciones específicas. Por ejemplo la defensina de dalia Dm-AMP1 se une a manosíl-inositol-fosfoceramida, mientras que la defensina de rábano (Rs-AFP2) a glucosílceramida (Thevissen *et al.*, 2004). También se ha reportado que la presencia de ergosterol puede modular la actividad de los péptidos, esta interacción sirve para dirigir los péptidos en la membrana, lo que conduce a la formación de lesiones que dan lugar a la disipación del gradiente de calcio que es esencial para el crecimiento de hongos (Thevissen *et al.*, 2004; Lay y Anderson, 2005).

3.5.5. Aplicaciones biotecnológicas de las defensinas de plantas

Las defensinas de plantas presentan gran diversidad en su actividad biológica, lo que las hace atractivas para desarrollar productos biotecnológicos; entre estas propiedades destacan la actividad antimicrobiana, insecticida e incluso antiparasitaria. Estas cualidades hacen que los PA de plantas, particularmente las defensinas, sean buenos candidatos para su uso en la ingeniería de proteínas y la producción de plantas transgénicas agrónomicamente importantes que pueden combatir los agentes patógenos y las plagas.

Con respecto a la utilización de defensinas como fármacos terapéuticos, hay algunas cuestiones que requieren una revisión para mejorar las tecnologías disponibles; sin embargo, con el descubrimiento de que la defensina PSD1 de *A. thaliana* es capaz de unirse a la ciclina, se abrieron nuevas posibilidades para los enfoques terapéuticos en el tratamiento de algunos tipos de cánceres humanos que sobreexpresan algunos tipos de ciclinas (Lobo *et al.*, 2007). De hecho, el efecto inhibitorio de las defensinas de plantas hacia ciertos tipos de células humanas de cáncer ya ha sido descrito. La vulgarinina fue capaz de inhibir la proliferación de la línea de leucemia L1210 y las líneas celulares M1 en un 35% y 80% respectivamente, y la línea celular de cáncer de mama MCF-7 en un 80% (Wong *et al.*, 2005). Además de que una defensina de *Capsicum chinense* inhibe

la viabilidad de las células tumorales humanas HeLa en un 80% (Anaya *et al.*, 2006).

Por todo lo anterior, las defensinas vegetales son productos naturales creados y fortalecidos por la evolución para hacer frente a las amenazas y permitir la supervivencia de las plantas. Debido a la utilidad de las propiedades que se les han atribuido, se presentan como una nueva oportunidad para el mejoramiento de cultivos y de nuevas estrategias biomédicas que puedan tener un gran impacto en la humanidad.

3.6. Expresión de péptidos antimicrobianos en sistemas heterólogos

Los elementos necesarios para la implementación de un PA como agentes terapéuticos van encaminados a la determinación de la actividad, efectos sinérgicos, patrones de resistencia, mecanismos de acción, así como la toxicidad, la vida media, la susceptibilidad a proteólisis, factores farmacocinéticos entre otros. Sin embargo, debido a la gran diversidad de los PA, la comunidad científica ha visto limitada su capacidad para completar estos estudios por la poca disponibilidad de los péptidos (Ingham y Moore, 2007). Tradicionalmente el péptido ha sido obtenido del organismo que lo produce usando una variedad de métodos bioquímicos. Sin embargo, para llevar a cabo un estudio comparativo confiable, el investigador tiene la perspectiva de aislar péptidos a partir de una bacteria, una planta, un animal o un hongo. Esto crea una situación indeseable de la implementación de procedimientos de producción y extracción específicos para cada PA. En vista de esto, no es raro que la producción del péptido mediante sistemas de expresión heteróloga se esté convirtiendo en una área de actualidad y de rápida expansión en la investigación (Ingham y Moore, 2007).

Recientemente se han implementado técnicas moleculares para expresar los PA en bacterias, hongos, baculovirus y mamíferos; utilizados ampliamente para la sobreexpresión de enzimas y proteínas terapéuticas. En este sentido, las células de mamífero son preferidas en el caso de la producción de proteínas

eucarióticas de importancia farmacéutica que requieren de modificaciones postraduccionales (Arya *et al.*, 2008).

La mayoría de los productos biológicos para uso terapéutico se expresan en células de mamífero particularmente en células de ovario de hámster chino (CHO) y células de riñón de hámster bebé (BHK), ya que son capaces de llevar a cabo todas las modificaciones postraduccionales necesarias para producir un metabolito funcional o una enzima (Chu y Robinson, 2001). Las células CHO tienen la capacidad de imitar la glicosilación humana y producir complejos de glicoproteínas; una ventaja adicional es que secretan la proteína recombinante en los medios de cultivo de forma natural. Se prefieren estas células para la producción de proteínas recombinantes para los casos en que es importante garantizar la seguridad y autenticidad de los productos, especialmente durante su uso terapéutico en seres humanos (Arya *et al.*, 2008). Obviamente, hay algunos inconvenientes con los sistemas de cultivo de células de mamíferos (Tabla 4), el proceso de generar líneas estables de células de mamíferos a menudo es lento y laborioso (Wurm, 2004). Su crecimiento es lento y los recursos para mantener el cultivo son caros, debido a su necesidad de un medio complejo. Los rendimientos de proteína recombinante son también mucho menores que los reportados para los diferentes sistemas microbianos (Rai y Padh, 2001).

Tabla 4. Comparación de diferentes sistemas de expresión heteróloga.

Factor	Bacterias	Levaduras	Células de mamífero
Tiempo invertido	3 meses/gen	4 meses/gen	6 meses/gen
Rendimiento	Alto	Alto	Bajo
Almacenamiento	Stocks en glicerol	Esporas y stocks en glicerol	Líneas celulares congeladas
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Utilización de medio de cultivo simple y barato. - Alta densidad celular. - Organismos bien caracterizados genéticamente. - Facilidad de llevar la producción a gran escala. - Aprobado por la FDA. 	<ul style="list-style-type: none"> - Utilización de medio de cultivo simple y barato. - Alta densidad celular. - Organismos bien caracterizados genéticamente. - Facilidad de llevar la producción a gran escala. - No producen endotoxinas. - Altos niveles de secreción de proteína. - Aprobado por la FDA. 	<ul style="list-style-type: none"> - Modificaciones postraduccionales similares a la proteína nativa. - No presenta problemas de inmunogenicidad. - Aprobado por la FDA.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> - No realiza modificaciones postraduccionales. - Bajos niveles de secreción de proteína. - Agregación de la proteína recombinante en cuerpos de inclusión. 	<ul style="list-style-type: none"> - Presenta diferencias en los patrones de glicosilación comparados con eucariotes mayores. - Produce hipermanosilación. - Degradación proteolítica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Crecimiento celular lento. - limitaciones en el cultivo a gran escala. - Bajos rendimientos de la proteína.

Modificado de Arya *et al.*, 2008

3.7. Potencial terapéutico de los PA como agentes antiinfecciosos.

A pesar del éxito que ha tenido el desarrollo de fármacos antimicrobianos, la aparición permanente e inexorable de mecanismos de resistencia a antibióticos en todo el mundo, sigue impulsando la búsqueda de nuevos agentes antiinfecciosos para reemplazar y/o complementar a los antibióticos convencionales (Gordon y Romanowski, 2005). Las defensinas humanas, como la catelicidina, y un número significativo de PA de diversas bacterias, virus, plantas, vertebrados e invertebrados parecen tener una característica multidimensional universal (es decir, una estructura tridimensional común) que define la actividad de los PA (Yound y Yeaman, 2004); la manipulación de esta estructura química para crear péptidos sintéticos, representa una estrategia prometedora para el desarrollo de los PA como una nueva clase de fármacos para prevenir y tratar las infecciones sistémicas y tópicas (Rotem y Mor, 2009).

Existen diferentes tipos de estrategias potenciales para la aplicación de péptidos antimicrobianos en terapéutica: (1) como únicos agentes antiinfecciosos, (2) en combinación con antibióticos o antivirales convencionales para promover efectos aditivos o sinérgicos (3), como agentes inmunoestimulantes que mejoran la inmunidad innata natural, y (4) como agentes neutralizantes de endotoxinas para prevenir las complicaciones potencialmente mortales asociadas con factores de virulencia de bacterias que causan shock séptico (Gordon y Romanowski, 2005).

De la reserva potencial de miles de péptidos naturales y millones de posibilidades de péptidos sintéticos, relativamente pocos péptidos que se encuentran como prometedores en las bases de datos de estudios *in vitro* y en animales, han avanzado a los ensayos clínicos (Tabla 5). A pesar de un continuo optimismo, una revisión crítica de la literatura hasta la fecha sugiere que el éxito comercial aún es lejano ya que los retos para llevar un PA al mercado siguen siendo enormes.

Tabla 5. PA en fases clínicas de desarrollo.

PA	Vía de administración	Fase de desarrollo	Uso terapéutico
hLF-1-11		Fase 2	Infecciones asociadas al trasplante alogénico de médula ósea.
BL2060		Optimización	Antiinfeccioso
CSA-13		Preclínica	Antiinfeccioso
HB-50		Preclínica	Antiinfeccioso
HB-107	Tópica	Preclínica	Reparación de heridas
IMX942		Fase 3b	Inmunomodulador
Omiganan		Preclínica	Infecciones relacionadas con catéteres
Mersacidina		Preclínica	Infecciones por Gram positivas
Plectasina		Preclínica	Infecciones por Gram positivas
PAC113	Tópica	Aprobado por Investigational New Drug	Candidiasis oral
CZEN-002	Tópica	Fase 2b	Candidiasis vulvovaginal
Pexiganan	Tópica	Fase 3	Infecciones de pie diabético
Iseganan	Oral	Fase 3	Terapias contra el cáncer
MBI-226	Tópica	Fase 3	Infecciones relacionadas con catéteres
Histatina	Oral	Fase 3	Infecciones bucales
Heliomocina	Intravenosa	Preclínica	Infecciones sistémicas por hongos
Neuprex	Intravenosa	Fase 3	Meningitis pediátrica
Mycoprex	Intravenosa		Infecciones sistémicas por hongos

Modificado de Andres y Dinamarcaq, 2004; Gordon y Romanowski, 2005.

A pesar de muchas cualidades atractivas de los PA, hasta la fecha no se han publicado informes de éxito comercial en el desarrollo de estos péptidos como agentes terapéuticos y ninguno de los péptidos descritos ha obtenido la aprobación de la FDA para sus diferentes indicaciones clínicas. Es necesaria una revisión más detallada de algunos de estos péptidos para superar los retos y las

dificultades en el desarrollo de una nueva clase de drogas terapéuticas.

3.7.1. Aspectos a considerar en la implementación de PA como fármacos

Una posible desventaja de los fármacos con mecanismos de acción tan complejos, es su potencial toxicidad. La mayoría de los ensayos clínicos realizados hasta ahora han utilizado aplicaciones tópicas para tratar las infecciones superficiales; sin embargo, el mercado más lucrativo de los antibióticos es la vía sistémica (parenteral y oral). Por lo tanto, es evidente que hay un problema con la posible toxicidad que limita la aplicación sistémica.

Muchos PA son activos en las membranas de procariontas, y tienen una menor capacidad de romper las membranas compuestas de elementos eucariotas debido a la ausencia de lípidos cargados negativamente en la superficie, la falta de un gradiente de potencial de membrana fuerte y la presencia de colesterol en eucariotas (Yeman y Yound, 2003). Sin embargo, no se debe descartar que los PA comparten características con péptidos eucariotas como la presencia de una señal de localización nuclear, como la catelicidina humana LL-37 (Lau *et al.*, 2005). Por lo tanto, se necesitan más estudios que evalúen la aparentemente sutil toxicidad en la aplicación de PA por vía sistémica.

Una segunda desventaja de los péptidos naturales es su inestabilidad potencial ante proteasas, lo que conduce a una farmacocinética potencialmente desfavorable. En particular, enzimas como la quimotripsina atacan a las proteínas en los residuos básicos, que son una característica obligada de los péptidos antimicrobianos. Se han propuesto varias soluciones a este problema, incluyendo el uso de aminoácidos de configuración D (en lugar de naturales L-) lo que produce péptidos resistentes a las proteasas, el uso de peptidomiméticos, la formulación para mejorar la estabilidad (por ejemplo, en liposomas) o la modificación química de péptidos para crear resistencia a las proteasas y/o disminuir su toxicidad entre otras (McPhee *et al.*, 2005). Por otro lado se han

implementado combinaciones de PA con ácidos grasos de cadena media, como una estrategia alternativa para el diseño de nuevos antibióticos con actividad potenciada, en comparación con los péptidos nativos, así como mayor biodisponibilidad y resistencia a proteasas (Malina y Shai, 2005).

El tema de mayor importancia en el campo es sin duda el alto costo de la fabricación de péptidos. Esto ha limitado la prueba y desarrollo de un gran número de variantes y los posibles objetivos clínicos a los que estas moléculas se pueden aplicar. Los péptidos tienden a ser medicamentos muy caros, cuestan entre 100 y 600 dólares por gramo o más, en el caso de la fabricación por síntesis química en fase sólida (Hancock y Sahl, 2006). Por lo tanto, todas las estrategias de avance deben tener esto en cuenta, debido a la una creciente necesidad de una producción menos costosa de los PA.

También se han realizado un gran número de intentos para producir péptidos diseñados por una variedad de métodos de ADN recombinante, utilizando para ello las bacterias y hongos, así como los sistemas de producción de plantas y animales; sin embargo, ninguno de estos sistemas de expresión han demostrado ser comercialmente viable hasta la fecha. Uno de los avances recientes en este sentido, es el uso de un péptido natural de hongos, la plectasina, combinado con un sistema de expresión de hongos para producir un péptido antimicrobiano en la escala y la pureza necesaria para fines terapéuticos (Mygind *et al.*, 2005). En la tabla 6 se presentan algunos de los inconvenientes que se deben tomar en cuenta para la aplicación de los PA a nivel terapéutica, así como las estrategias que se están empleando para resolverlos.

Tabla 6. Estrategias de desarrollo y diseño de PA para su aplicación terapéutica.

Actividad	Reto	Estrategias
Investigación	Gran variedad de PA	<ul style="list-style-type: none"> - Clasificación y arreglos de PA para una mayor diversidad - Implementación de peptidomiméticos. - Utilización de aminoácidos de configuración D. - Investigación tanto de la actividad antimicrobiana como inmunoreguladora.
Toxicidad	Desconocimiento de los mecanismos de toxicidad	<ul style="list-style-type: none"> - Análisis de toxicidad en animales. - Evaluar la toxicidad sutil.
Farmacología	Mejorar la vida media <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Peptidomiméticos. - Implementación de aminoácidos D. - Nuevas formulaciones. - Empleo de PA inmunoreguladores que no requieren regulación en la dosis.
Costo	Disminuir los costos	<ul style="list-style-type: none"> - Producir análogos de PA más cortos. - Utilización de procesos de manufactura recombinantes.

Eficacia	Mejorar la actividad en el contexto del modelo de infección	<ul style="list-style-type: none">- Utilización de PA que requieren dosis más pequeñas.- Modelos más realistas de la enfermedad en animales.- Los ensayos <i>in vitro</i> deben coincidir con los ensayos <i>in vivo</i>.
----------	---	---

Modificado de Hancock y Sahl, 2006.

4. ANTECEDENTES

Los PA juegan un papel importante en la inmunidad innata de los eucariotas contra patógenos, y en procariotas desempeñan funciones de defensa contra otros patógenos (Brogden, 2005). Estas características han propiciado que en los últimos años se consideren una alternativa atractiva para el control de enfermedades. Con el objetivo de evaluar la actividad de los PA se han empleado diferentes sistemas de expresión heteróloga, lo cual incluye bacterias, levaduras, plantas y animales. Por ejemplo, en bacterias se han expresado varios PA como la histonina que presenta actividad antimicrobiana de amplio espectro; se utilizó como modelo la bacteria *E. coli* y se obtuvieron 167mg del péptido por cada litro del cultivo (Jung *et al.*, 2008). En el caso de la expresión en levaduras existen PA como la plecastina, una defensina de hongos que fue expresada en *Pichia pastoris* y presenta actividad contra varias especies del género *Staphylococcus* y *Streptococcus*; con este modelo de expresión se obtuvo un porcentaje de plecastina recombinante del 71.79% del total de proteína excretada (Zhang *et al.*, 2011).

Un ejemplo de la expresión de PA en plantas fue la producción de dos PA, DmAMP1 y RsAFP2 procedentes de semillas de *Dahlia merckii* y *Raphanus sativus* respectivamente en *Arabidopsis thaliana*; estas defensinas presentan actividad antifúngica contra *Fusarium culmorum* y con este modelo las proteínas recombinantes obtenidas equivalen al 0.62% de la proteína total soluble (Francois *et al.*, 2002).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo analizó la actividad fungicida y citotóxica de una defensina de chile habanero (*Capsicum chinense*) expresada en células endoteliales bovinas, demostrando que inhibía ~99% la internalización de *Candida albicans* en las células que expresan la defensina; además de inhibir la formación del tubo germinativo de la hifa hasta en un 84% (Anaya *et al.*, 2006). En el mismo sentido, también se realizó la evaluación de la tionina Thi2.1 de *A.*

thaliana utilizando el mismo modelo de expresión de células endoteliales. En este caso se probó la actividad del PA contra diferentes cepas de *E. coli* así como *S. aureus*, detectándose inhibiciones del crecimiento cercanos al 100% (Loeza *et al.*, 2008). Estos resultados muestran la eficiencia de PA de plantas en contra de patógenos que no son exclusivos de ellas, sino que pueden ser una alternativa de terapia antimicrobiana para humanos o animales.

Por otro lado, las Lauráceas son una familia de Angiospermas del orden Laurales, consta de 55 géneros con unas 3500 especies en las cuales se ha detectado la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana (Montes, 2009). La especie *Persea americana* pertenece a esta familia, es un árbol cuyo fruto es el aguacate y se clasifica dentro del género *Persea* y subgénero *Persea*. En el subgénero *Persea* se reconocen tres especies: *P. americana* Mill., *P. schiedeana* Nees y *P. parvifolia* Williams. La mayoría de los miembros reconocidos del subgénero *Persea* se encuentran principalmente en una misma área que inicia del centro de México hasta Panamá en Centroamérica y se dividen en 3 subespecies, conocidas ahora como razas Mexicana (var. *drymifolia*), Guatemalteca (var. *Gualtemalensis*) y Antillana (var. *Americana*) (Sánchez, 2007).

El fruto, hojas y la semilla del aguacate son utilizados en la medicina tradicional para eliminar microorganismos y parásitos como los causantes de la disentería y de algunos desarreglos digestivos; también sus hojas se emplean como expectorantes (García, 2008).

Con la finalidad de analizar las propiedades fitoquímicas y farmacológicas de las diversas partes de la planta *P. americana*, se han dividido sus constituyentes químicos en varios grupos: alcanoles, glucósidos terpenoides, derivados de anillos de furano, flavonoides y cumarinas. (Yasir *et al.*, 2010).

A lo largo de las últimas décadas se han realizado estudios para analizar la actividad farmacológica, tanto del fruto como las hojas de aguacate. En 1970 Néeman y colaboradores, publicaron uno de los primeros trabajos donde se

analiza la actividad antimicrobiana de diferentes compuestos alifáticos de cadena larga extraídos de fruto y semilla de aguacate, los cuales presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. También se ha estudiado la actividad biológica de los extractos alcohólicos y hexánicos completos frente a diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, con porcentajes de inhibición de hasta el 100% (Gomez *et al.*, 2008); así como la actividad antifúngica contra *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* y *Malassezia pachydermatis* (Giffoni *et al.*, 2009); asimismo, los extractos óleos han presentado actividad insecticida contra *Spodoptera exigua* (Rodríguez *et al.*, 1997).

Además de los efectos antimicrobianos e insecticidas mencionados anteriormente, también se le han atribuido al fruto de aguacate propiedades citotóxicas en contra de diferentes líneas celulares cancerígenas (Oberlies *et al.*, 1998 y Steven *et al.*, 2011); así como propiedades antioxidantes (Nagaraj *et al.*, 2010), además de compuestos supresores de la respuesta inflamatoria (Rosenblat *et al.*, 2011). Sin embargo, actualmente no se han reportado estudios donde se analice la actividad biológica de moléculas del aguacate de tipo proteico.

Otro aspecto importante que se suma a las múltiples propiedades farmacológicas encontradas en la especie *P. americana*, es que el fruto de aguacate posee un gran valor nutricional y por lo tanto un interés comercial importante. México, es el principal consumidor y productor de aguacate en el mundo y Michoacán es el productor más importante del país. A pesar de la importancia económica del aguacate, se sabe poco sobre su genética y es bien sabido que la mayoría de problemas importantes en la producción tienen una base genética.

En este sentido, recientemente López-Gómez y colaboradores elaboraron un banco de ADNc del mesocarpo fruto y semilla de aguacate de la variedad *drymifolia* (comunicación personal). A través de técnicas de secuenciación identificaron dos clonas cuyas proteínas predichas tienen similitud con proteínas

de defensa, una mostró identidad con la familia de PA tioninas y la otra con la familia de PA Snakin-GASA. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado su expresión y actividad. En este trabajo se plantea evaluar la expresión y actividad del péptido E3 con similitud a PA en una línea de células endoteliales bovinas; por lo cual, a continuación se muestran la hipótesis y los objetivos establecidos para este trabajo.

5. HIPÓTESIS

El péptido E3 de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) producido por células endoteliales de bovino presenta actividad antimicrobiana.

6. OBJETIVO GENERAL

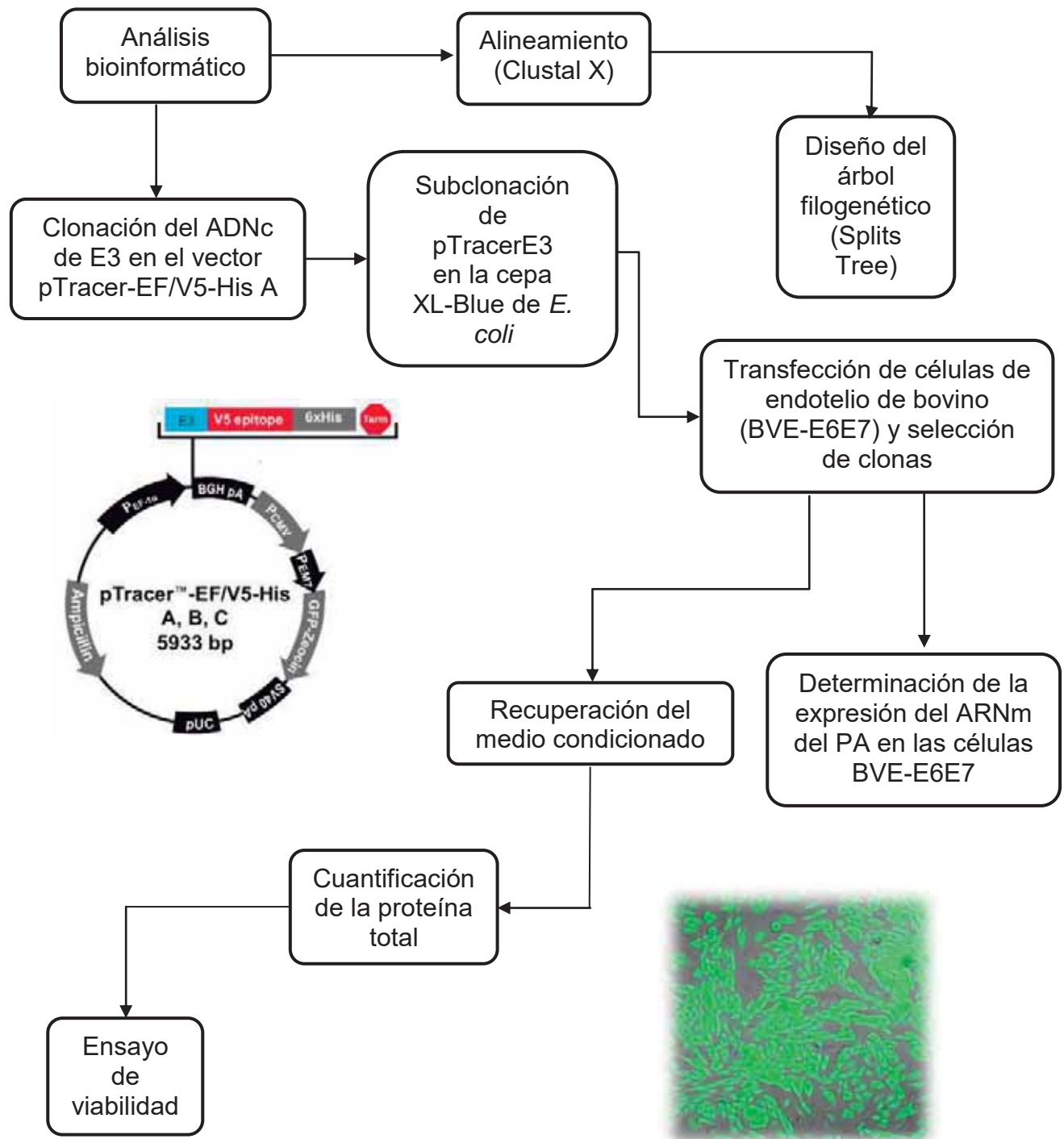
Expresar el péptido E3 de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) en células endoteliales de bovino (BVE-E6E7) y probar su actividad antimicrobiana ante diferentes patógenos.

6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las relaciones filogenéticas del péptido E3 de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) con las familias de PA de plantas.
- Generar un vector de expresión para células de mamífero que contenga el ADNc del péptido E3 (pTracerE3) de *P. americana* var. *drymifolia* que permita su expresión.
- Obtener células BVE-E6E7 que expresen el péptido E3 de *P. americana* var. *drymifolia*.
- Evaluar el efecto de los medios condicionados de las BVE-E6E7 que expresen el péptido E3 contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental utilizada para la realización de este proyecto se plantea en el siguiente esquema:



8. METODOLOGÍA

8.1. Análisis bioinformático

Utilizando el programa Clustal X2 versión 2.0.11, se realizó un alineamiento completo de la secuencia peptídica E3 con las defensinas de plantas ya caracterizadas. Además, con el programa Splits Tree versión 4.11.3, se construyó el árbol filogenético resultado del análisis de las secuencias de las defensinas de plantas y el péptido E3.

8.2. Clonación del péptido E3 en pTracer-EF/V5-HIS A (Invitrogen)

Se diseñaron los oligonucleótidos necesarios para amplificar por PCR la secuencia de nucleótidos del péptido E3 el cual se encuentra clonado en el vector pTriplEx2; éstos se diseñaron con los sitios de restricción *SpeI* y *EcoRI* para facilitar el proceso de clonación en el vector pTracer-EF/V5-HIS A (Tabla 7).

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótidos	Secuencia	Tm	%GC
Directo	5'-TATTACTAGTATGGCGCTGGTCAAGAAG-3'	64°C	43
Reverso	5'-ATAAGAATTCGCAAGGCTTGAGACACA-3'	67°C	41

La región correspondiente a la secuencia E3 se amplificó por PCR bajo las condiciones descritas en la figura 6, utilizando la enzima *Pfu DNA Polimerasa* de alta fidelidad (Promega). El producto de amplificación de 249 pb se insertó en el vector de expresión para células de mamíferos pTracer-EF/V5-His (Invitrogen). Este vector cuenta con tres versiones, A, B, y C; las cuales permiten que el ADNc que se va a clonar quede en fase y sea expresado como una proteína de fusión en la línea celular que contenga dicha construcción. Para la expresión del péptido E3 se utilizó la versión del vector A, ya que cumple con las especificaciones antes

mencionadas. Otras características importantes del vector se describen en la tabla 8.

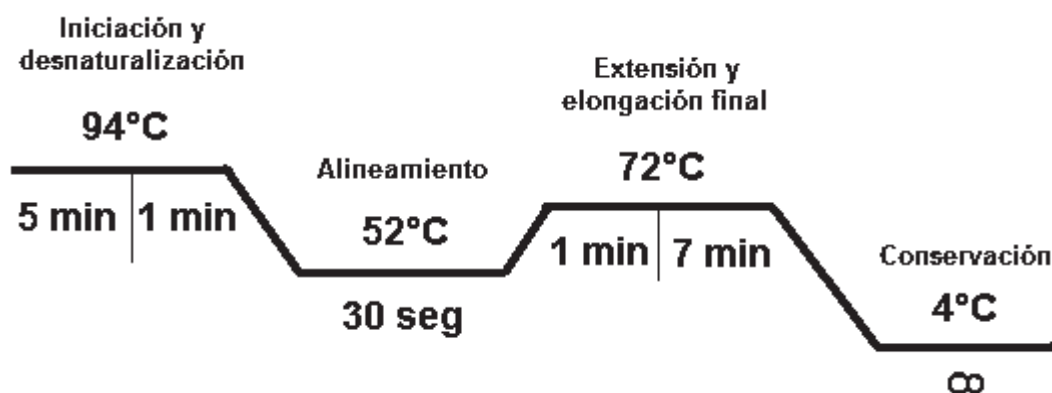


Figura 6. Condiciones de la PCR utilizadas para amplificar el inserto que codifica para el péptido E3. Se realizaron 30 ciclos de reacción.

Tabla 8. Características del vector pTracer-EF/V5-HIS A (Invitrogen).

Característica	Función
Promotor hEF-1 α	Provee altos niveles de expresión del gen de interés en una amplia gama de líneas de células de mamífero.
Oligonucleótido T7	Permite la secuenciación del inserto.
Epítotope V5	Permite la identificación de la proteína recombinante por medio del anticuerpo Anti-V5 y V5-HRP.
Polihistidina C-terminal	Permite la purificación de la proteína recombinante.
Señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH)	Eficiente terminación de la transcripción y poliadenilación del ARNm.
Gen de resistencia a zeocina	Permite la selección de células transformadas.
Gen de la proteína verde fluorescente (GFP)	Detección visual de las células transfectadas mediante microscopía de fluorescencia.
Origen pUC	Permite la replicación, mantenimiento y alto número de copias en <i>E. coli</i> .
Gen de resistencia a ampicilina	Selección del vector en <i>E. coli</i> .

El producto de amplificación y el vector fueron digeridos con las enzimas señaladas. La digestión del ADN se realizó en un tubo Eppendorf en hielo, con 1 µg de ADN, 2 µl del amortiguador adecuado para cada enzima (10X), agua desionizada estéril c. b. p. 20 µl y 1 U de la enzima. La mezcla se incubó por 12 h a 37°C.

Las reacciones de ligación de los fragmentos de ADN se realizaron bajo el siguiente protocolo:

Las relaciones entre el inserto y el vector se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{(ng \text{ del vector})(kb \text{ del inserto})}{kb \text{ del vector}} \right) \left(\frac{\text{inserto}}{\text{vector}} \right)$$

Una vez calculadas las proporciones, se colocó la mezcla en un tubo Eppendorf y se adicionó 1 µl de amortiguador de ligación (10X), 1 U de T4 ADN ligasa (Invitrogen) y agua desionizada estéril c. b. p. 10 µl. La mezcla de reacción se incubó a 16°C por 12 h. Se prepararon competentes de *E. coli* XL Blue (Tang *et al.*, 1994) y se les adicionó la mezcla de ligación, se incubaron por 30 min en hielo y posteriormente se sometieron a un choque térmico por 90 s a 42 °C, por último se incubaron las células a 37 °C por una hora. Las clonas se seleccionaron en cajas con medio Luria-Bertani sólido, zeocina (25 µg/ml) y ampicilina (100 µg/ml). Las colonias transformantes se analizaron por minipreparaciones y PCR. La construcción obtenida se denominó pTracerE3.

8.3. Cultivo y mantenimiento de la línea celular BVE-E6E7

Las células BVE-E6E7 utilizadas provienen de una línea de células endoteliales de cordón umbilical de bovino inmortalizadas a través de mutaciones realizadas con las subunidades E6 y E7 de la proteína P53, la cual es clave en la regulación del ciclo celular (Cajero *et al.*, 2002).

Las células se cultivaron en cajas de Petri (Costar-Corning) con medio F12K de Ham (DMEM/F12K, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Equitech-Bio), 100 U/ml de penicilina-estreptomicina, 40 µg/ml de gentamicina (Pharma Life) y 1 µg/ml de anfotericina B (Invitrogen). Las células se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

8.4. Transfección de las células BVE-E6E7 por lipofección

La transfección de las células BVE-E6E7 se realizó por el método de lipofección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Se utilizaron células 100% confluentes sembradas en cajas de 6 pozos (Costar). Las células se incubaron con Lipofectamina (10 µl) y el vector pTracerE3 (4 µg) durante 24 h en medio Optimem (Gibco) a 37°C. Después de ese tiempo se agregó medio Optimem nuevo y posteriormente se seleccionaron con el antibiótico zeocina a una concentración de 0.5 mg/ml por un periodo de dos semanas (Sagrero-Cisneros, 2007). Transcurridas las 2 semanas se seleccionaron las células por choque térmico, agregando al cultivo buffer HEPES a una concentración de 25 nM, se incubaron a 37°C por 2 h, posteriormente se colocaron a 4°C por 2 h para finalmente incubarlas en condiciones normales de cultivo (37°C con 5 % de atmosfera de CO₂).

8.5. Selección de clones de las células BVE-E6E7 transfectadas

Se aislaron clones de las células trasfectadas por dilución limitante, diluyéndose en medio de cultivo F-12K hasta alcanzar la concentración de 1 célula/100 µl y se sembraron en una microplaca de 96 pozos (Costar) (Sagrero-Cisneros, 2007).

8.6. Determinación de la expresión del ARNm del PA E3

Para determinar la expresión del ARNm se realizó una extracción de ARN total con el reactivo Trizol (Invitrogen) a partir de las células transfectadas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN fueron tratadas con ADNasa I (Invitrogen) para eliminar la contaminación por ADN genómico. La síntesis de ANDc se realizó por medio de la reacción de transcripción reversa (RT) a partir del ARN total. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, conteniendo 25 μ g/ml de Oligo d(T) (Invitrogen) y 500 nM de dNTP's (Invitrogen). La reacción se incubó a 65°C por 5 min. Después se añadió First strand buffer 1X (Invitrogen), ditiotreitól 10 nM e inhibidor de RNasa 2 U/ μ L (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se adicionó la enzima transcriptasa reversa M-MLV (10 U/ μ L, Invitrogen) y posteriormente se incubó a 37°C por 50 min, la reacción se inactivó mediante el calentamiento a 70°C por 15 min. Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados (Tabla 7) y las condiciones descritas en la figura 6 para amplificar el ANDc del péptido E3.

8.7. Preparación de los medios condicionados (MC)

Se sembraron las células transfectadas en cajas p100 en medio F-12K hasta alcanzar 100% de confluencia. Posteriormente se retiró el medio y se lavaron las células con PBS. Se colocó medio Optimem (Gibco), y se incubó por 24 h. Finalmente se colectó el medio y se congeló (a -20 °C) hasta su utilización.

8.8. Cuantificación de la proteína total

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford. Se colocaron 25 μ l de NaOH 1N y 100 μ l de MC por 10 min. La mezcla se aforó a 300 μ l con medio Optimem y 300 μ l del reactivo de Bradford (5 ml de H₃PO₄ al 85%, 2.5 ml de etanol absoluto, 5 mg de azul de Coomassie G250 y H₂O desionizada para un volumen final de 50 ml). Se colocaron 100 μ l de la mezcla en una microplaca de 96 pozos, y se leyó la absorbencia a 595 nm en un

espectrofotómetro de microplacas (DAS). Se determinó la cantidad de proteína total a través de una correlación con la ecuación obtenida de una curva estándar que fue realizada con la proteína albúmina sérico bovina.

8.9. Ensayo de viabilidad por exclusión de azul tripano

Se sembraron 200,000 células BVE-E6E7 en cajas de 24 pozos y se incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO₂, transcurrido el tiempo se eliminó el medio completo a los pozos y se adicionó medio Optimem conteniendo 50 y 100 µg/ml de proteína total del MC de las células transfectadas con pTracerE3 y del MC de las células control (pTracer/BVE-E6E7); se realizaron 2 experimentos, a las 24 y 48 h de tratamiento. Una vez transcurrido el tiempo del tratamiento las células se despegaron de las cajas de cultivo mediante un tratamiento con tripsina y se tomaron 20 µl de la suspensión celular y se adicionaron 20 µl de colorante azul tripano; esta mezcla se llevó a la cámara de Neubauer y se contaron todas las células, marcando como células muertas las teñidas de azul y como células vivas las refringentes.

8.9.1. Ensayo de viabilidad de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*

La actividad del MC sobre los microorganismos se determinó midiendo el efecto sobre la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se incubaron una cantidad conocida de células o unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* en microplacas de 96 pozos, con MC a una concentración de 10, 25, 50 y 100 µg/ml de proteína total durante 4 h a 37°C para *E. coli* y *S. aureus*; y 24 h a 37°C para el caso de *C. albicans*. Después se agregaron 10 µl de reactivo MTT (Sigma) y se incubó por 4 h más. Posteriormente se adicionaron 100 µl de SDS 10% para *E. coli* y *S. aureus*, y 100 µl de 2-propanol/1 M HCl (95:5 v/v) en los ensayos con *C. albicans*. Todos los experimentos se leyeron a una longitud

de onda de 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas (DAS) (Jahn *et al.*, 1995).

8.9.2. Análisis estadístico

Los datos de los ensayos de viabilidad se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los resultados se compararon por la prueba *t* de Student y se reportaron con \pm el error estándar promedio. Los valores de $P < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

9. RESULTADOS

9.1. Análisis bioinformático

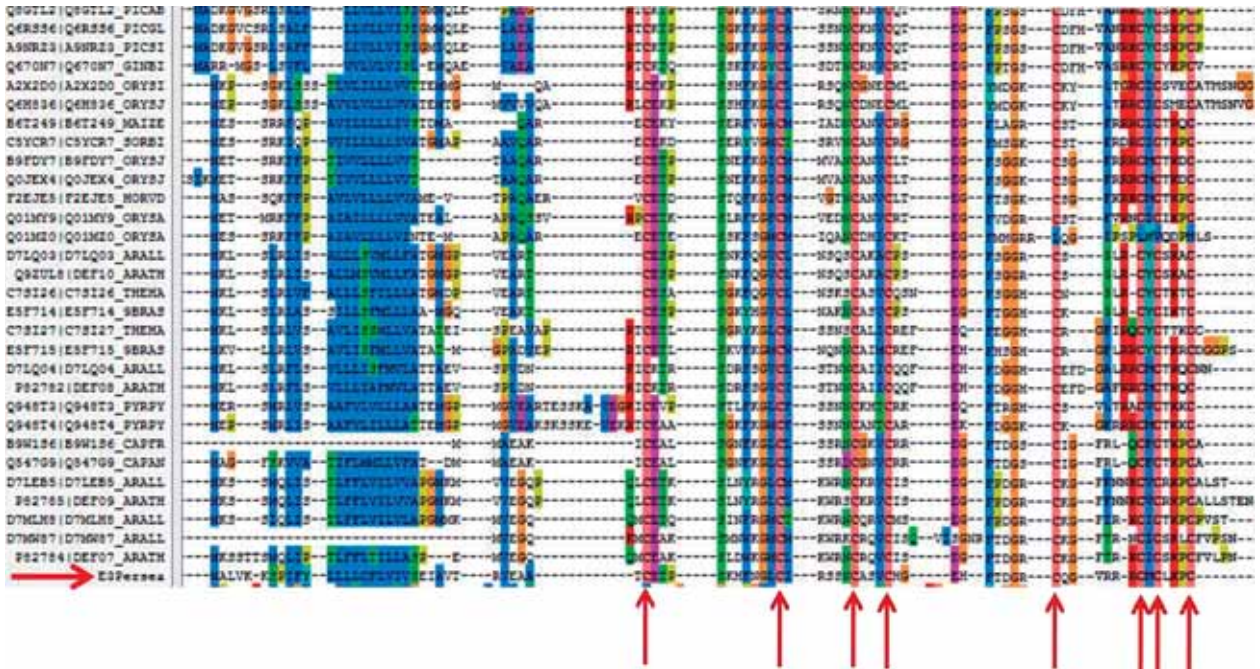
Previo a este estudio; López-Gómez y colaboradores haciendo uso de la herramienta BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>), encontraron que la secuencia del péptido E3 presenta el dominio característico de las γ -thioninas (defensinas), con porcentajes de similitud superiores al 80%. Por lo tanto, para establecer las similitudes o diferencias entre la secuencia proteica E3 y las defensinas de plantas ya caracterizadas, se realizó un alineamiento completo en el programa computacional Clustal X2 versión 2.0.11 en el cual se analizaron 370 secuencias tomadas de la base de datos del EMBL-EBI correspondientes a las defensinas de plantas. Se observó que E3 contiene las 8 cisteínas que pueden conformar los 4 enlaces disulfuro característicos de estos péptidos antimicrobianos. Para establecer mediante un modelo predictivo la conformación de estos enlaces, se llevó a cabo el análisis con el programa DISULFIND (<http://disulfind.dsi.unifi.it/>), además se realizó una predicción de la posible estructura terciaria del péptido E3 (Peng y Xu, 2011) (Figura 7). El programa permitió establecer que el péptido E3 conforma los cuatro enlaces disulfuro, además de que la estructura presenta el motivo CS α β característico de estas defensinas.

Por otro lado, se elaboró un árbol filogenético con las defensinas analizadas para determinar la ubicación del péptido E3 dentro de este grupo, así como las especies con que se encuentra relacionada evolutivamente (Figura 8). Se observó que el péptido E3 se encuentra relacionado de manera cercana con defensinas producidas por especies como: *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, entre otras.

Para determinar los porcentajes de identidad que presenta el péptido E3 con las defensinas con las que se encuentra mayormente relacionado, se realizó

un alineamiento de la secuencia completa (Clustal W). Se encontraron porcentajes de identidad de 28% con una defensina de *Oriza sativa* y de 43.1% con defensinas de *Eutrema parvulum* y *Oryza. sativa* subp. *japonica* (Figura 9).

A)



B)



Figura 7. Alineamiento completo de la secuencia del péptido E3 de *P. americana* var. *drymifolia* y formación de enlaces disulfuro. A) Se muestra la presencia de 8 cisteínas (marcadas por flechas), las cuales pueden participar en la formación de los 4 enlaces disulfuro característicos de las defensinas. B) Predicción de la formación de los enlaces disulfuro (Ceroni *et al.*, 2006) y estructura terciaria del péptido E3 (Peng y Xu, 2011).

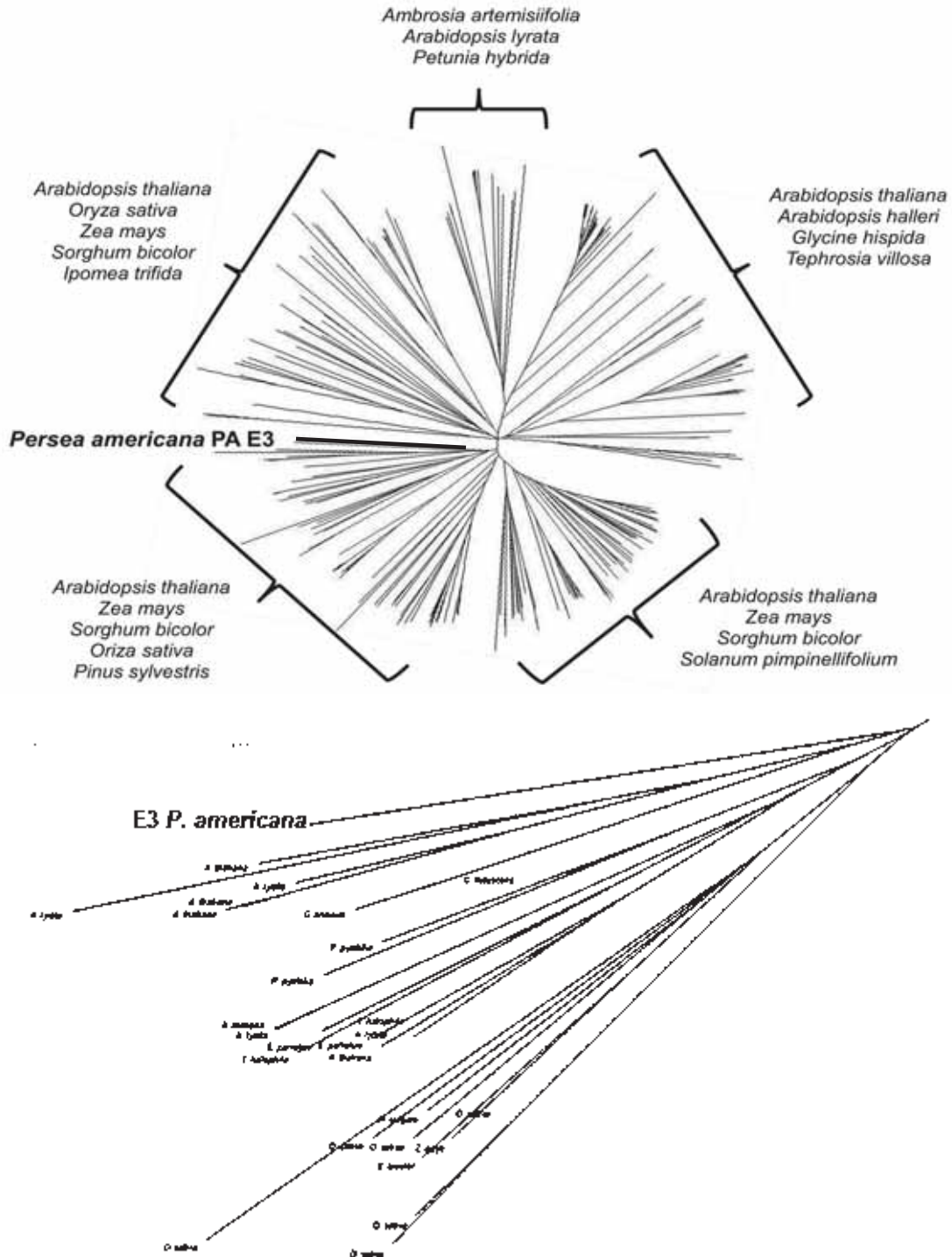


Figura 8. Árbol filogenético del péptido E3 de *P. americana* var. *drymifolia*. Se realizó un alineamiento completo con 370 secuencias de defensinas de plantas y se construyó el árbol filogenético con el programa Splits Tree versión 4.11.3.

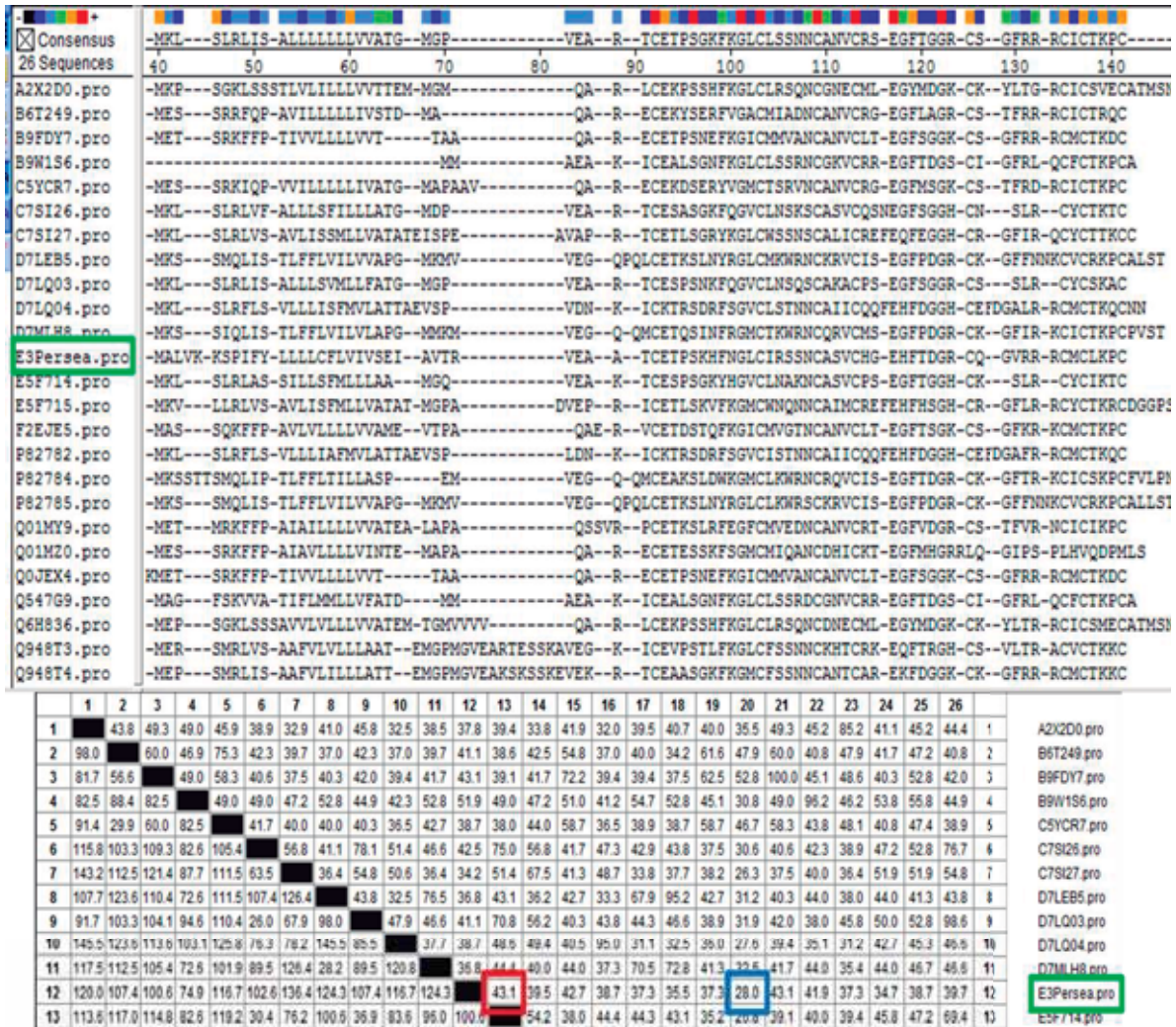


Figura 9. Alineamiento completo (Clustal W) de 26 secuencias de defensas incluido el péptido E3 de *P. americana* var. *drymifolia*.

Un aspecto importante para dar la definición de defensina al péptido E3 fue ubicarla en uno de los grupos en los cuales se clasifican las mismas, esto es en función del prepéptido del que provienen. Para ello, se realizó un alineamiento con un holotipo de las defensinas de tipo 1 (MsDef1 de *Medicago sativa*) y de tipo 2 (NaD1 de *Nicotiana alata*) con el péptido E3 (Figura 9). Con este alineamiento se observó que el péptido E3 analizado está constituido solamente por un péptido señal y el dominio activo, por lo que se clasificó como una defensina del tipo 1.

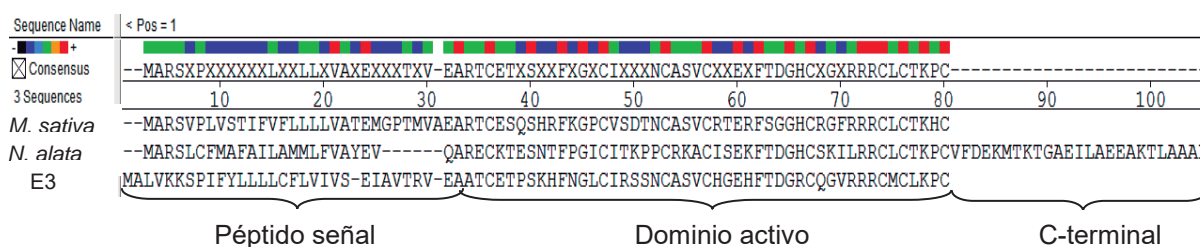


Figura 9. Alineamiento de defensinas de plantas tipo 1 y 2. Alineamiento de defensinas caracterizadas como tipo 1 (*M. sativa*) y tipo 2 (*N. alata*) con la secuencia del péptido E3.

9.2. Clonación de la secuencia del péptido E3 en el vector pTracer-EF/V5-His A (Invitrogen)

Con la finalidad de obtener una construcción adecuada para la expresión del péptido E3 en las células BVE-E6E7, se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar la secuencia E3, adicionando los sitios de corte de las enzimas de restricción *SpeI* y *EcoRI* (Tabla 7); se utilizó la versión A del vector, de esta manera, el marco de lectura quedó en la fase adecuada para producir a proteína de fusión que se espera (Figura 10).

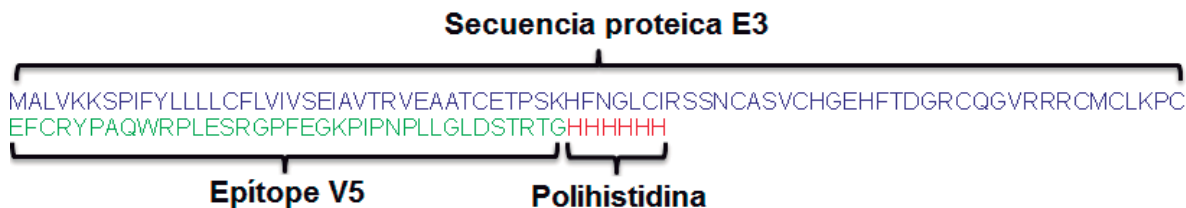


Figura 10. Proteína de fusión predicha como resultado de la fusión del péptido E3 de *P. americana* var. *drymifolia*, el epítotope V5 y la cola de histidinas presentes en el vector pTracer EF/V5-His A.

El ADNc del péptido E3 proveniente del fruto de *P. americana* var. *drymifolia*, está clonado en el sitio *Sfi*I del vector pTriplEx2 y fue donado por el Dr. Rodolfo López-Gómez (IIQB-UMSNH). Se realizó la extracción del ADN plasmídico de este vector y del vector pTracer EF/V5-His A por medio de minipreparaciones (Figura 11A).

Posteriormente se realizó la amplificación de la secuencia E3 por medio de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), utilizando los oligonucleótidos descritos anteriormente; obteniendo una única banda de 237pb, correspondiente al tamaño esperado (Figura 11B).

El producto amplificado de la secuencia E3 y el vector pTracer EF/V5-HIS A, fueron digeridos con las enzimas de restricción *Spe*I y *Eco*RI (Figura 11C), y posteriormente se realizó la reacción de ligación, utilizando proporciones molares de 3:1 (inserto: vector) y se siguió la técnica descrita en la metodología.

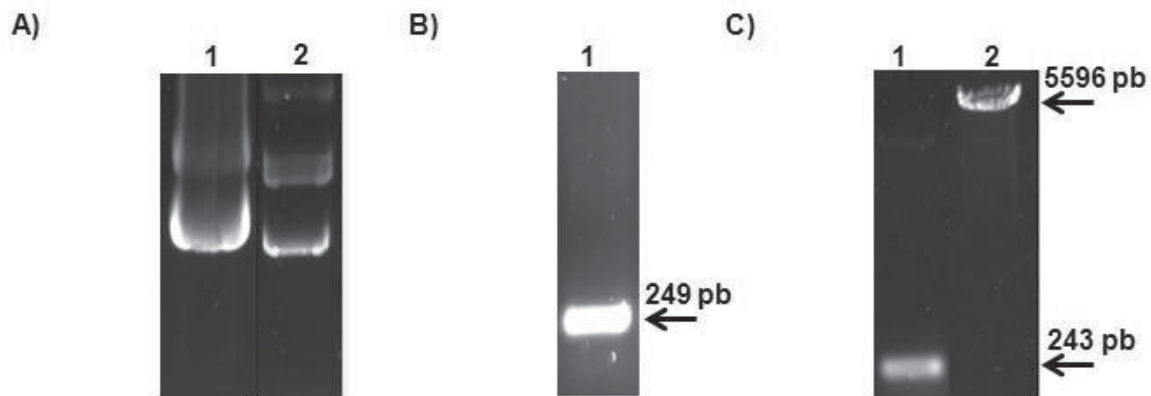


Figura 11. Generación de la construcción pTracerE3. A) Vector pTracer EF/V5-HIS A (carril 1) y vector pTriplEx2 con el inserto de E3 (carril 2). B) Producto de amplificación de la secuencia del péptido E3 (carril 1). C) Secuencia E3 (carril 1) y vector pTracer A (carril 2) digeridos con las enzimas *SpeI* y *EcoRI*.

El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar células de la cepa XL-Blue de *E. coli*; la transformación se llevó a cabo por medio de choque térmico y se seleccionaron las células transformantes en cajas de LB sólido con ampicilina y zeocina. Se seleccionaron 10 clonas y se analizaron por minipreparaciones y PCR, de esta manera se aseguró que el plásmido contiene el inserto de la secuencia E3 (Figura 12).

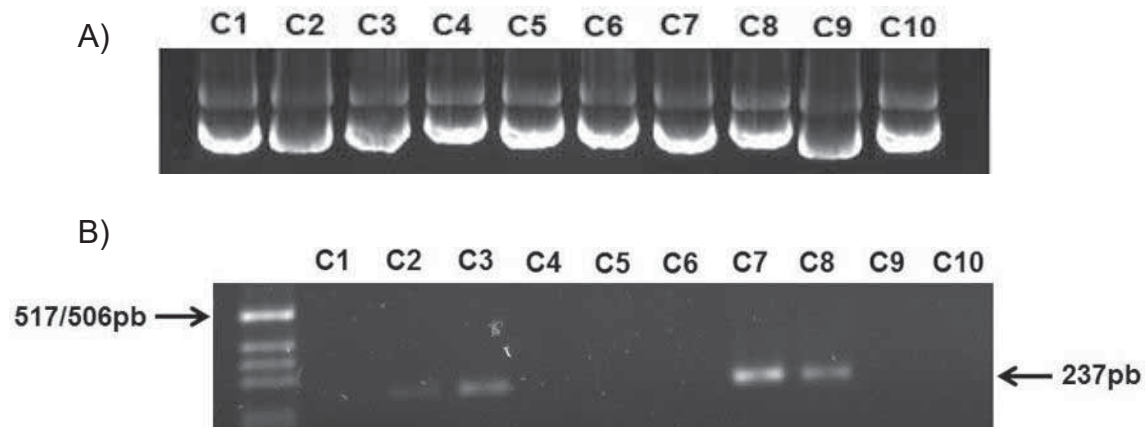


Figura 12. Comprobación de la inserción del ADNc del péptido E3 en la construcción pTracerE3. (A) Minipreparaciones y (B) PCR de las 10 clonas seleccionadas.

Solo se observó el producto de amplificación esperado en las clonas C2, C3, C7 y C8; de estas, la clona C7 presentó una intensidad de banda mayor por lo cual se utilizó esa clona para la transfección de las células BVE-E6E7.

Por medio de secuenciación del fragmento amplificado por PCR y el ADN plasmídico de la clona C7, se comprobó que la proteína de fusión esperada se integró al vector pTracer EF-V5 His A en la fase correcta (datos no mostrados).

9.3. Transfección de las células BVE-E6E7 con el vector pTracerE3

Utilizando el ADN plasmídico de la clona C7, se transfectaron las células endoteliales BVE-E6E7 siguiendo la metodología descrita anteriormente. Además se transfectaron células BVE-E6E7 con el vector pTracer EF/V5-HIS A, con la finalidad de emplearlas como control negativo en los ensayos posteriores. Las células transfectadas fueron seleccionadas por 15 días con zeocina en un medio de cultivo mínimo (Optimem).

Después de transcurrida la selección con el antibiótico las células se observaron en un microscopio confocal (Olympus fluoview F100). Se observó que algunas células de la población policlonal presentaron la fluorescencia característica de la proteína GFP, la cual está contenida en la construcción pTracer E3 como gen reportero (Figura 13). De esta manera se demostró que las células estaban transfectadas y expresando los elementos contenidos en el vector pTracer E3.

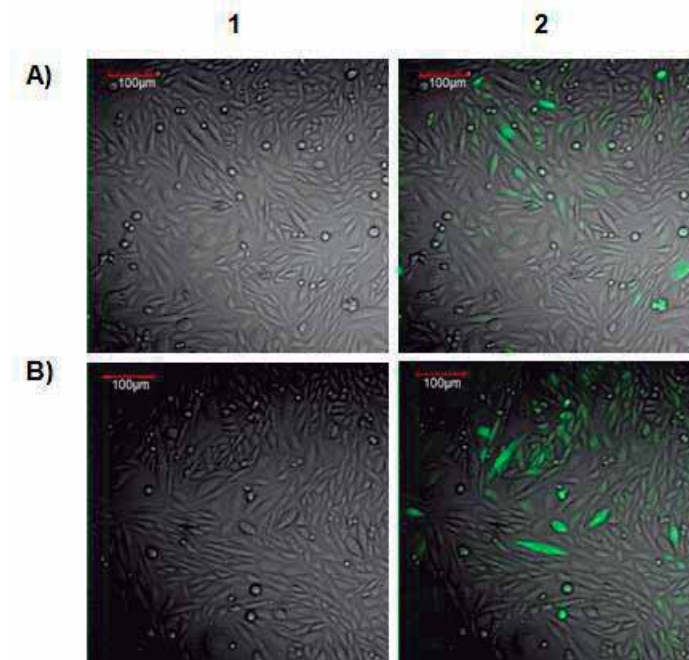


Figura 13. Expresión de la proteína GFP en: A) población policlonal de células control (pTracer EF/V5-HIS A); y B) población policlonal de células transfectadas con el vector E3pTracer. Fotografía tomada en campo claro (1) o con fluorescencia (2). En ambos casos 1 y 2 corresponde al mismo campo.

9.4. Selección de poblaciones monoclonales

Una vez obtenida la población policlonal, se realizó la selección de 10 clonas por dilución limitante, esto con el objetivo de tener una población proveniente de una sola célula (Figura 14).

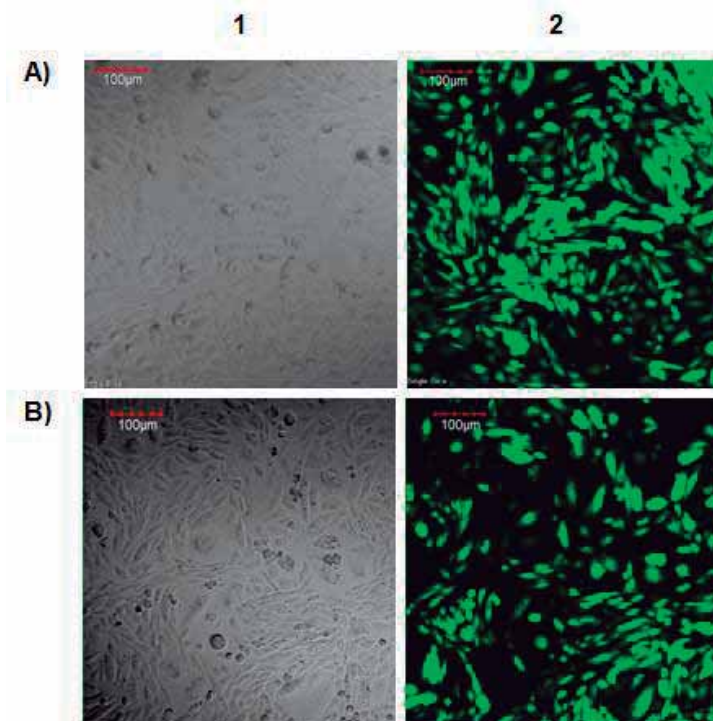


Figura 14. Expresión de la proteína GFP en: A) población monoclonal de células control (pTracer/BVE-E6E7); y B) población monoclonal de células transfectadas con el vector pTracer E3. Fotografía tomada en campo claro (1) o con fluorescencia (2). En ambos casos 1 y 2 corresponde al mismo campo.

De las clonas obtenidas se seleccionaron las 9 poblaciones que presentaron mayor intensidad de fluorescencia

9.5. Determinación de la expresión del ARNm del PA E3

Se realizó una extracción de ARN total de la población policlonal de las células BVE-E6E7 transfectadas y por medio de una RT-PCR se determinó la expresión del mensajero del péptido E3 usando los oligonucleótidos diseñados previamente. Se utilizó como control negativo el ADNc de las células transfectadas con el vector pTracer EF/V5-HIS A (pTracer/BVE-E6E7) y de las células sin transfectar (BVE-E6E7); como control interno se empleó el gen constitutivo de la enzima gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) (Yonezawa *et al.*, 2009) para verificar la integridad del ADNc analizado (Figura 15).

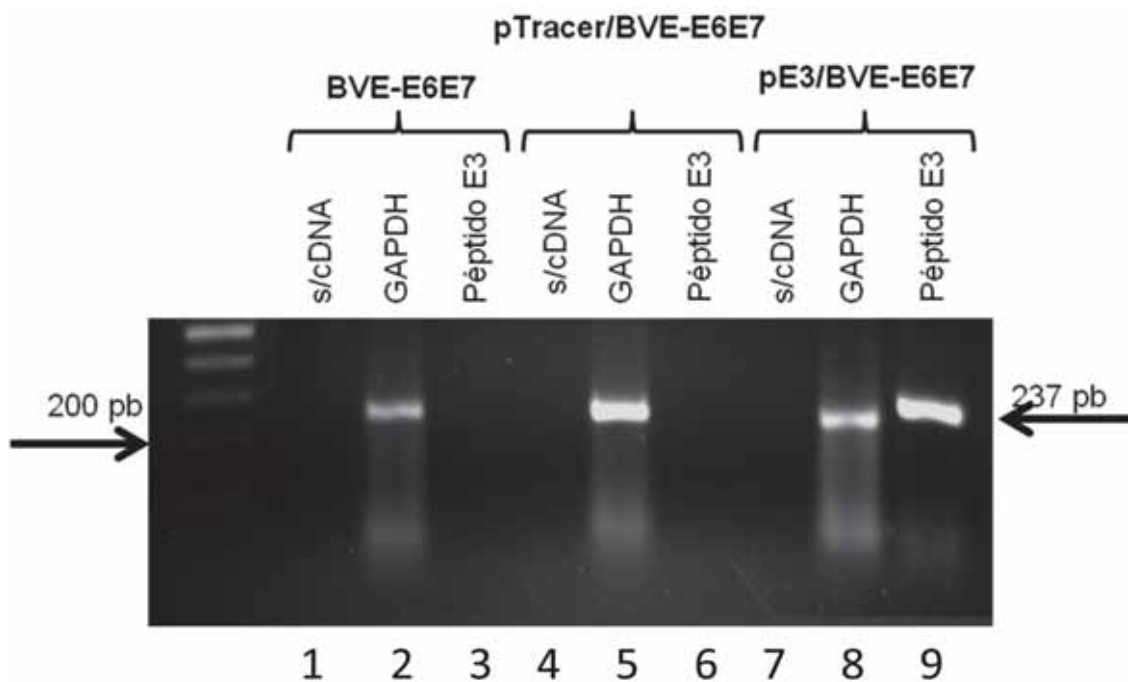


Figura 15. Demostración de la expresión del ARNm del PA E3 en las células BVE-E6E7. Carriles 1-3 ADNc de células sin transfectar (BVE-E6-E7), carriles 4-6 ADNc de células transfectadas con el vector pTracer EF/V5-HIS A (pTracer/BVE-E6E7) y carriles 7-9 células transfectadas con la construcción pTracerE3 (pE3/BVE-E6-E7).

Los carriles 1, 4 y 7 de la figura 15 fueron designados como controles negativos, en dichas reacciones no se adicionó ADNc con lo que se demostró que la reacción está libre de contaminación. También se observó la banda correspondiente al producto de amplificación del gen constitutivo GAPDH en las tres poblaciones de células (carril 2, 5 y 8), confirmando así, la integridad del ADNc que se está trabajando. Cuando se utilizaron los oligonucleótidos específicos para E3 en las tres poblaciones celulares (carril 3, 6 y 9), el único carril que presentó un producto de amplificación fue el correspondiente al ADNc de las células pE3/BVE-E6E7 (carril 9).

De esta manera se demostró que la construcción pTracer E3 se está transcribiendo en las células transfectadas y es un indicador preliminar de que el péptido E3 se está expresando.

Una vez determinada la presencia del ARNm del péptido E3 en la población policlonal, se realizó la síntesis de ADNc de las diferentes poblaciones monoclonales para determinar, por medio de RT-PCR y densitometría óptica, la expresión relativa del péptido E3 utilizando el gen constitutivo de β -actina para normalizar los datos (Figura 16).

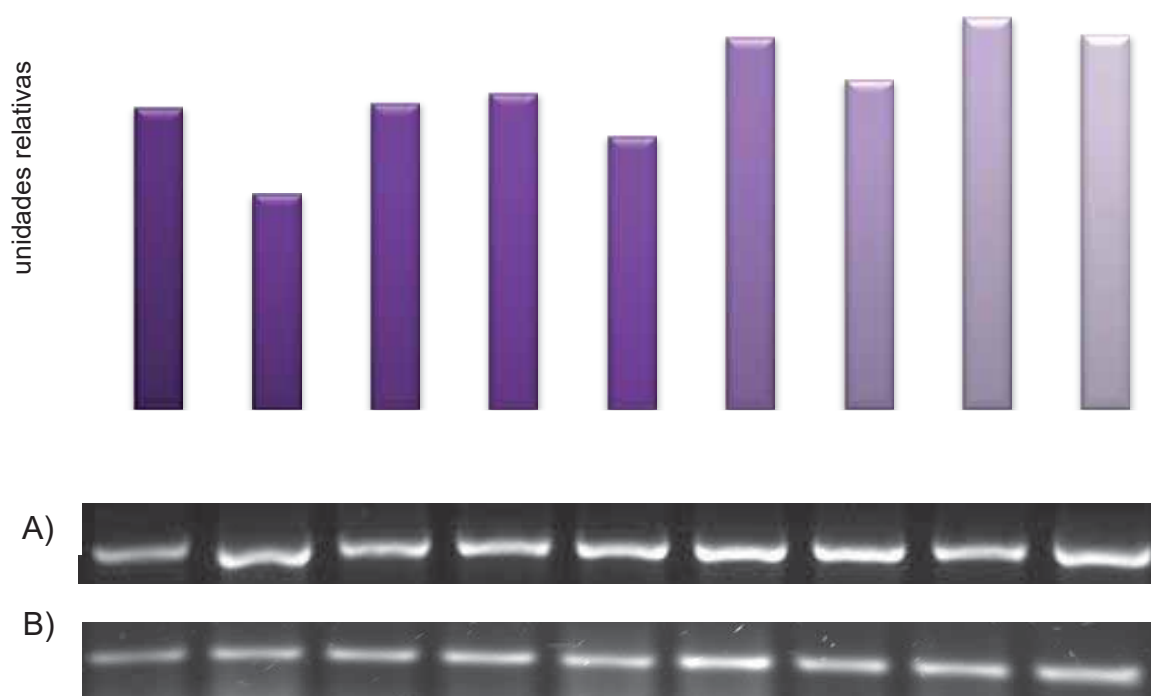


Figura 16. Expresión relativa del péptido E3 en las diferentes clonas. Ensayo realizado por densitometría óptica. A) Productos de amplificación correspondientes a β -actina y B) Productos de amplificación correspondientes al péptido E3.

Los resultados obtenidos muestran que en todas las monoclonas el ARNm del péptido E3 está expresándose de manera uniforme, con una variación máxima

en la expresión de 1.1 unidades relativas, lo que podría tener alguna correlación con la actividad antimicrobiana que se observó con el medio condicionado de cada monoclonal.

9.6. Preparación de medios condicionados

La secuencia de la proteína recombinante E3 contiene un péptido señal que permite que la proteína se excrete al medio de cultivo, por lo cual, se recuperó el medio condicionado de las 9 clonas así como de los controles (pTracer/BVE-E6E7 y BVE-E6E7). Todos los medios se centrifugaron por 10 min a 1500 rpm y se decantaron para eliminar los posibles restos celulares. Los MC se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

9.7. Determinación de la proteína total

Se midió la cantidad de proteína total del MC de cada clona por el método Bradford, que está fundamentado en que el colorante azul de Coomassie G-250 en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

El rango de proteína total calculada para cada clona fue de 0.3-0.4 µg/µl. El péptido E3 no es la única proteína liberada al medio, las células endoteliales liberan varios factores de crecimiento, enzimas y hormonas; debido a esto, en estudios previos donde se utilizó el mismo modelo de expresión para PA, se calculó que la proteína recombinante corresponde aproximadamente al 2% de a la proteína total liberada al medio (Loeza *et. al.* 2008).

9.8. Ensayo de viabilidad de las células BVE-E6E7

Una vez obtenidos los MC y cuantificada la proteína total, se evaluó el efecto de éstos sobre la viabilidad de las células BVE-E6E7 para descartar la

posibilidad de que el péptido E3 *per se*, tenga un efecto negativo en la viabilidad de las células sanas.

Se realizó un recuento de células vivas íntegras por exclusión del azul tripano; este método está basado en que las células vivas (viables) no captan el colorante mientras que las células muertas (no viables) si lo hacen. Las células muertas se tiñen de azul y las vivas son refringentes.

En la figura 17 se muestran los resultados de dos recuentos realizados a las 24 y 48 h de tratamiento con el MC de las células control (pTracer/BVE-E6E7) y de la P7 que expresa el péptido E3, por separado; la concentración de proteína total utilizada fue de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Una vez analizados los datos se observó que ninguno de los tratamientos disminuyó la viabilidad de las células de manera significativa.

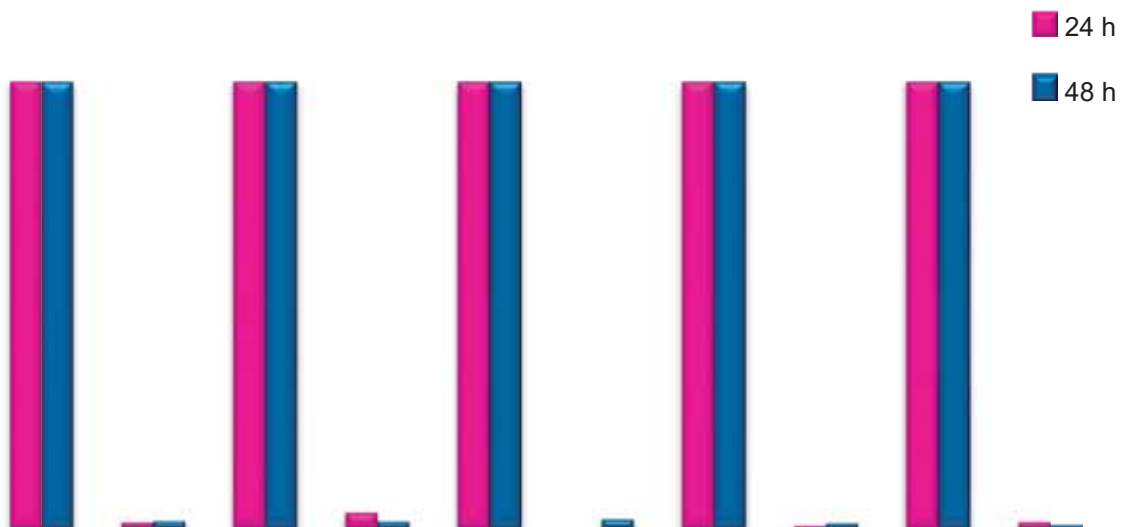


Figura 17. Ensayo de viabilidad de las células BVE-E6E7. Experimentos realizados a las 24 h y 48 h de tratamiento. CT= células totales y CM= células muertas.

9.9. Medición de la actividad antimicrobiana del péptido E3

Debido a que este trabajo se plantea realizar la primera evaluación de la expresión y la actividad del PA E3 de aguacate, se seleccionaron cepas certificadas de microorganismos representativos de los tres principales grupos que son: bacterias Gram negativas (*E. coli* 0111), bacterias Gram positivas (*S. aureus* ATCC 27543) y hongos (*C. albicans* ATCC 10231). La actividad antimicrobiana se midió con la técnica colorimétrica conocida como MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán), permitiendo determinar la integridad funcional de la mitocondria de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado para evaluar la actividad de los MC de las 9 poblaciones monoclonales seleccionadas, incluyendo los MC de los controles negativos (pTracer/BVE-E6E7 y BVE-E6E7) y gentamicina (40 µg/ml) como control positivo. También se incluyó en el ensayo el MC de la población policlonal (E3Policlonal). De esta manera se compararon los resultados con las monoclonas para establecer si la selección de las clonas provee de una mayor cantidad de proteína recombinante y por lo tanto una mayor actividad. Se utilizó un rango de concentraciones de proteína total de 10-100 µg/ml (Figura 15).

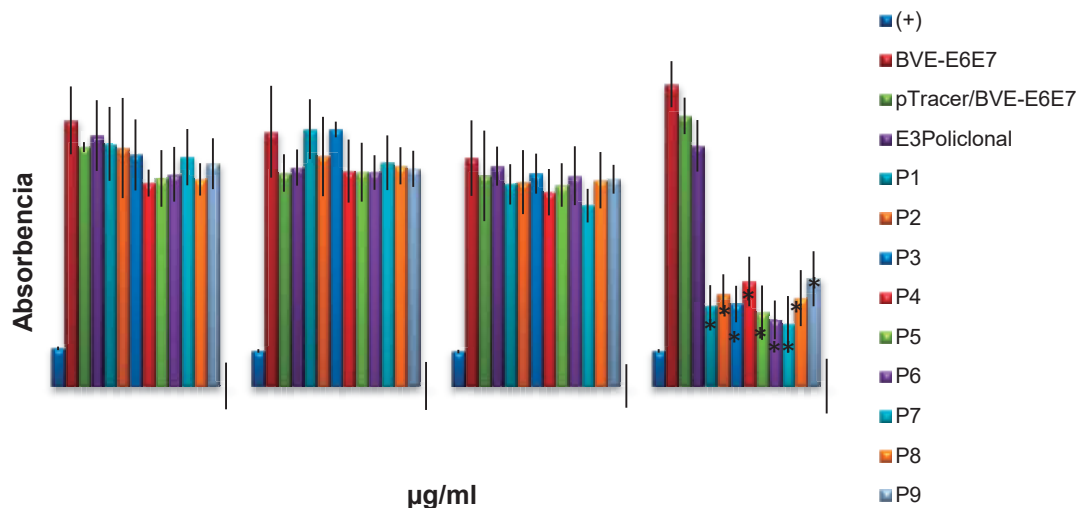


Figura 18. Ensayo de viabilidad de *E. coli* por MTT. Evaluación de los MC de las poblaciones monoclonales (P1-P9), la población policlona (E3Policlona), los controles negativos (BVE-E6E7 y pTracer/BVE-E6E7), y gentamicina a una concentración de 40 µg/ml como control positivo de inhibición. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado; * muestran diferencias significativas con respecto a los controles ($P < 0.05$).

Tabla 9. Inhibición del crecimiento de *E. coli* con el MC (100 µg/ml) de las células BVE-E6E7 que producen el péptido E3.

	E3Policlona	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
% Inhibición	32.0	85.2	81.3	84.6	76.9	87.2	89.6	91.1	82.4	76.3

A concentraciones de 10, 25 y 50 µg/ml los MC de las poblaciones poli y monoclonas no mostraron diferencias significativas con respecto al control (pTracer/BVE-E6E7) (Figura18). La actividad antimicrobiana de los MC de las monoclonas se ve reflejada a la concentración mayor (100 µg/ml) la cual provocó un máximo de inhibición de *E. coli* del 91.1% (Tabla 9).

Los resultados del ensayo de viabilidad de *S. aureus* se muestran en la figura 19. Para este microorganismo las concentraciones de 10 y 25 µg/ml no presentaron disminuciones significativas respecto al control; sin embargo, la

disminución del crecimiento fue significativa a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ alcanzando un máximo de inhibición del 56% (Tabla 10). En la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ los porcentajes de inhibición se incrementaron considerablemente, llegando a un máximo de 85.6% (Tabla 10).

Tanto en el ensayo con *E. coli* y *S. aureus*, se mostraron diferencias significativas entre la población policlonal y las 9 monoclonas, con lo que se confirmó que la selección de las poblaciones clonales de células permite obtener mayor cantidad de la proteína recombinante.

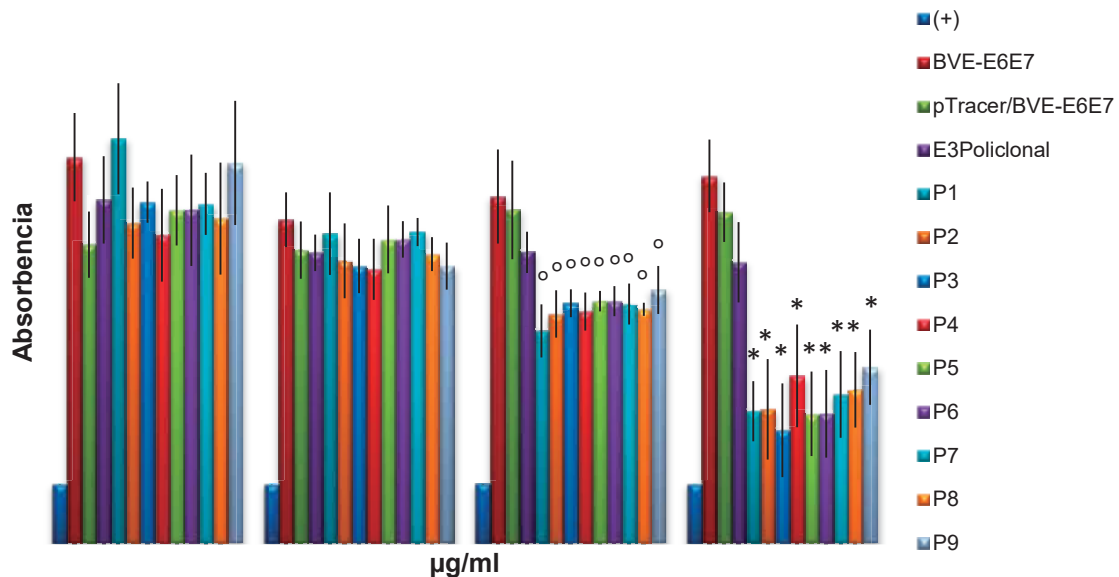


Figura 19. Ensayo de viabilidad de *S. aureus* por MTT. Evaluación de los MC de las poblaciones monoclonales (P1-P9), la población policlona (E3Policlona), los controles negativos (BVE-E6E7 y pTracer/BVE-E6E7), y gentamicina a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ como control positivo de inhibición. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado; ° y * muestran diferencias significativas con respecto a los controles ($P < 0.05$).

Tabla 10. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* con MC de las células BVE-E6E7 que producen el péptido E3.

Clona	% de Inhibición	
	50 µg/ml	100 µg/ml
E3Policlonal	33.2	39.4
P1	56.0	80.1
P2	50.9	79.7
P3	47.8	85.6
P4	50.0	70.4
P5	51.6	80.1
P6	48.3	79.7
P7	47.8	75.5
P8	49.6	74.4
P9	42.7	68.1

En la figura 20 se muestra el resultado de los ensayos de viabilidad de *C. albicans*, se utilizó el mismo rango de proteína total que para las bacterias analizadas (10-100µg). Sin embargo los MC de las células que expresan el péptido E3 no presentó inhibición del crecimiento del hongo con ninguno de los tratamientos aplicados.

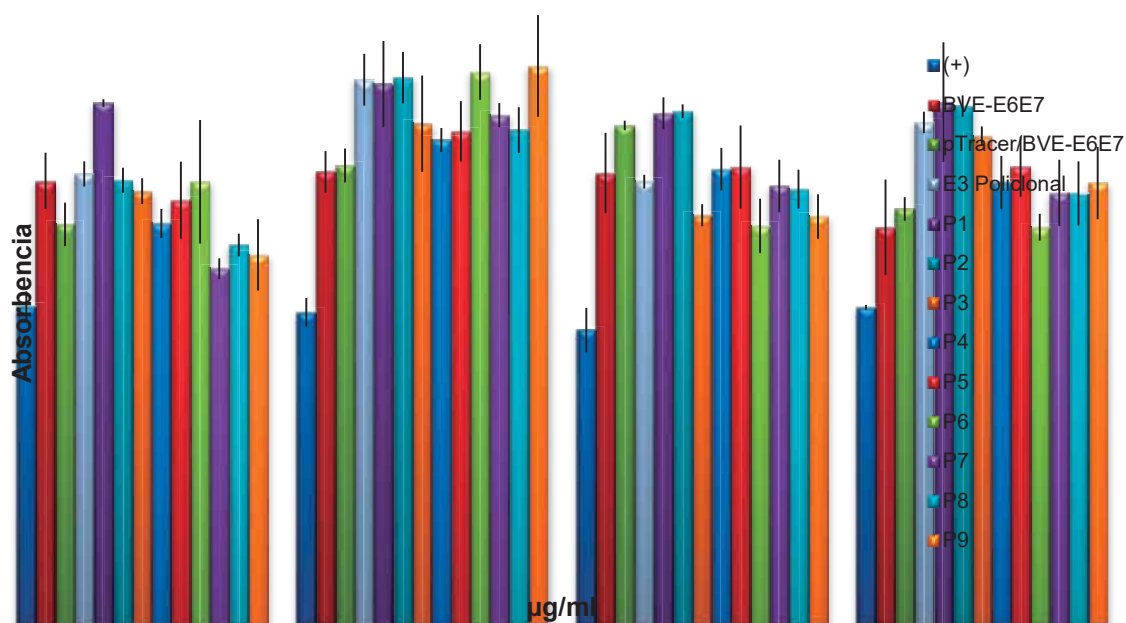


Figura 20. Ensayo de viabilidad de *C. albicans* por MTT. Evaluación de los MC de las poblaciones monoclonales (P1-P9), los controles negativos (BVE-E6E7 y pTracer/ BVE-E6E7), la población policlonal (E3Policlonal) y anfotericina (1 ng/ml) como control positivo. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado.

10. DISCUSIÓN

El cultivo de aguacate es uno de los más importantes en México, el cual es el principal productor a nivel mundial (FAOSTAT, 2009). El aguacate (*P. americana* Mill.) tiene su origen en un área geográfica que se extiende desde el centro y oriente de México, pasando a través de Guatemala, hasta la costa del Océano Pacífico en Centroamérica (Smith 1966, 1969). Como resultado de la amplia distribución del germoplasma de aguacate hacia regiones distantes de sus sitios de origen ocurrió un cruzamiento interracial, a tal grado que en la actualidad los cultivares económicamente importantes, tanto en áreas tropicales como subtropicales donde se cultivan, son resultado de la hibridación entre razas.

Actualmente, Michoacán es el mayor productor de aguacate del país, con una producción de alrededor de 0.8 a 1 millón de toneladas (Quero *et al.*, 2003) y un porcentaje importante de esta producción es de *P. americana* Mill Var. *drymifolia* o aguacate criollo mexicano. A pesar de su importancia económica poco se sabe de su genoma y es bien sabido que la mayoría de los problemas de producción tienen una base genética. En este sentido, López-Gómez en 2007 realizó un proyecto de ESTs (Expressed Sequence Tags) generados a partir del fruto de aguacate criollo mexicano, encontrando que un porcentaje significativo de los genes identificados están relacionados con la defensa de la planta. Este resultado es congruente con un estudio previo que demuestra que el aguacate criollo presenta mayor resistencia al ataque por patógenos, en relación a otras variedades (Sánchez-Pérez 2007). Dentro de los genes identificados relacionados con la defensa de la planta se encontraron varias secuencias homólogas con inhibidores de proteasas, una de ellas presentó una alta similitud con las defensinas de plantas, la cual fue denominada péptido E3.

La familia de las defensinas de plantas es numerosa y está ampliamente distribuida tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas (Thomma *et al.*, 2002). Estos péptidos antimicrobianos están constituidos por un dominio característico, el

cual contiene 8 cisteínas altamente conservadas que forman 4 enlaces disulfuro que estabilizan su estructura terciaria (Thomma *et al.*, 2002; Ceroni *et al.*, 2006). En base a estos elementos se utilizó la secuencia deducida del péptido E3 para llevar a cabo un análisis en la base de datos del NCBI con la herramienta BLAST. Se encontró que el péptido E3 posee una similitud superior al 80% con el grupo de defensinas de plantas, y que este posee el dominio de las 8 cisteínas, por lo cual se definió a este péptido antimicrobiano (PA) como una posible defensina. Otro aspecto que caracteriza a las defensinas es su clasificación estructural, en este trabajo se realizó un alineamiento de la secuencia del péptido E3 con las secuencias de defensinas de tipo 1 y 2 con el que se determinó que el péptido E3 pertenece al primer grupo, como la mayor parte de las defensinas, ya que las defensinas de tipo 2 han sido aisladas solamente de las flores de diferentes especies de solanaceas, como la defensina NaD1 de *Nicotiana alata* (Lay *et al.*, 2005).

Una vez que se estableció que el péptido E3 posee los elementos básicos para definirlo como una defensina, se realizó un análisis filogenético con las secuencias de defensinas de plantas reportadas en el EMBL-EBI. Se obtuvieron 370 secuencias y se observó que muchas de ellas provienen de la misma especie vegetal; esto ya es conocido, incluso se ha reportado que muchas de las especies vegetales presentan en su genoma entre 15 y 50 defensinas (Silverstein *et al.*, 2005). Más aún, existe también un reporte donde se identificaron más de 300 secuencias tipo defensinas en *Arabidopsis thaliana* (Silverstein *et al.*, 2005). El aguacate es una dicotiledónea; sin embargo, se observó que la defensina E3 se encuentra relacionada con las defensinas de monocotiledóneas (*Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa*) (Figura 4). Este resultado no es extraño ya que está documentado que PA similares pueden encontrarse distribuidos en ambos grupos de plantas (Thomma *et al.*, 2002).

La presencia de los 8 residuos de cisteínas conservados en las defensinas de plantas es una característica fundamental que define a estos PA, ya que son

importantes tanto en el aspecto estructural como funcional. La conservación del dominio de los puentes disulfuro les permite a las defensinas presentar una gran variabilidad en su secuencia de aminoácidos pero poseer estructuras terciarias conservadas (Padovan *et al.*, 2010). En el caso de la defensina E3, se observó que posee una identidad de 43.1% con 25 defensinas con las que está relacionada filogenéticamente (Figura 5). Esta variación en la estructura primaria puede explicar en parte las diferentes actividades biológicas de las defensinas de plantas, que incluyen la actividad antimicótica, antibacteriana y de proteasa (Padovan *et al.*, 2010).

En este trabajo se utilizó el vector de expresión pTracer-EF/V5-HisA al cual se le introdujo el ADNc de la defensina E3 para obtener el vector pTracerE3 con el cual se transformó a células de *E. coli*. Las colonias se seleccionaron con zeocina y las transformantes se analizaron por minipreparaciones y PCR (Figura 9). Se seleccionaron 10 clonas; sin embargo, no se logró obtener productos de amplificación en todas; esto puede ser debido a que el ADN con el que se realizó la transformación aún contenía moléculas del vector pTracer-EF/V5-HisA que no fueron digeridas con las enzimas de restricción, y por lo tanto, se obtuvieron bacterias con los elementos necesarios para resistir la selección con zeocina, pero que no poseen el inserto del ADNc del péptido E3.

La elección de células de mamífero como modelo de expresión heteróloga presenta ventajas importantes en comparación con otros modelos como las bacterias, ya que estas células garantizan modificaciones postraduccionales como los puentes disulfuro, glicosilación y amidación que son importantes para garantizar la actividad de la defensina (Tossi y Sandri, 2002). La línea celular BVE-E6E7 ofrece estas características y en el inicio del presente trabajo no se había reportado la expresión de PA en ellas. Sin embargo, recientemente se demostró la expresión del PA β -defensina-2 humana en células de endotelio de cordón umbilical humano (HUVECs) (Kawsar *et al.*, 2010). Para descartar que los posibles efectos antimicrobianos pudieran estar dados por la expresión de PA propios de

las células BVE-E6E7, en los experimentos de evaluación de la actividad se incluyó como control negativo los MC de las células BVE-E6E7 sin transfectar.

La transfección de las células de mamífero se realizó por el método de lipofección que es un método de alta eficiencia, de 5 a 100 veces más que otras técnicas dependiendo del tipo celular. Es una técnica simple, altamente reproducible y efectiva para transfecciones estables (Felgner *et al.*, 1987). La eficiencia de transfección de las células BVE-E6E7 por este método fue del 30% aproximadamente, lo que coincide con trabajos previos que obtienen una eficiencia de $35\% \pm 3.3$ en células endoteliales (Oua *et al.*, 2003). La construcción pTracerE3, con la que fueron transfectadas las células, contiene los genes necesarios para conferir a las células varias características necesarias para su selección, como son la resistencia al antibiótico zeocina y la expresión del gen reportero de la proteína verde fluorescente GFP. La primera selección se realizó con el antibiótico, además de un proceso de enfriamiento a 4°C por 2 h, con el cual se detiene el ciclo celular por un corto tiempo, lo que permite que la zeocina actúe dando como resultado la muerte de las células poco resistentes a este antibiótico (Manual Zeocina Invitrogen). El segundo método de selección fue identificar la fluorescencia de las células transfectadas (Figura 10). Se observó que las células de la población policlonal presentaban diferencias en la intensidad de la fluorescencia, esta variación puede ser atribuida a que la transfección es un proceso al azar y se pueden integrar más de una molécula de pTracerE3 al genoma de la célula. Sin embargo, para demostrar esto es necesario determinar el número de copias que se integraron en las células. Para disminuir las posibles variaciones en la expresión de la defensina E3 en las células endoteliales transfectadas, se obtuvieron poblaciones monoclonales por el método de dilución limitante. Se seleccionaron 9 clonas las cuales no mostraron diferencias en la intensidad de fluorescencia. También se analizó la posible variación en la expresión del ARNm de la defensina E3 en cada clona, resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas, lo que coincide con las evaluaciones de la

actividad que presentó cada clona. Por lo anterior se puede inferir que existe cierta correlación entre la expresión del ARNm de la defensina E3 y la actividad antimicrobiana que presenta.

La obtención de los MC se realizó a partir de las poblaciones monoclonales que mostraron una mayor intensidad de fluorescencia, esto con el fin de incrementar la probabilidad de obtener una mayor cantidad de la proteína recombinante (Figura 11).

Para probar la actividad antibacteriana de la defensina E3, se recuperó el medio condicionado (MC) de 9 clonas y se evaluó su efecto sobre la viabilidad de las bacterias por el método de MTT (Figuras 15 y 16). En ninguno de los experimentos se encontraron diferencias significativas entre la actividad antibacteriana que presentan las monoclonas, lo que se relaciona directamente con el hecho de que la expresión del ARNm también es homogénea en las 9 poblaciones analizadas.

En el ensayo de viabilidad de *E. coli* los MC presentaron un claro efecto inhibitorio (hasta un 91.1%) a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteína total. Para *S. aureus* se presentó un efecto dependiente de concentración, que llegó a un máximo de inhibición del 86% con 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteína total. Estos resultados demuestran la actividad antibacteriana de la defensina E3. Sin embargo, la concentración de proteína utilizada en los ensayos contiene todas las proteínas expresadas por las células BVE-E6E7 de manera natural, como factores de crecimiento, enzimas y hormonas. En estudios previos donde se utilizó el mismo modelo de expresión para PA se estimó que la proteína recombinante corresponde aproximadamente al 2% de la proteína total liberada al medio (Loeza *et. al.*, 2008). Aunque en este trabajo no se determinó la cantidad de proteína que corresponde a la defensina E3, de acuerdo a los datos previos se puede estimar que la concentración de la defensina E3 que se utilizó en los ensayos es similar 2 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, esta concentración es mucho menor a la concentración de la

defensina Cp-thionin II de *Vigna unguiculata* necesaria para inhibir el crecimiento de las mismas especies bacterianas, *E. coli* y *S. aureus* ($>60 \mu\text{g/ml}$) (Franco *et al.*, 2006). No obstante, se puede inferir que los niveles de expresión de la defensina E3 con el modelo utilizado en este trabajo son menores a los obtenidos con otros modelos, por ejemplo en la expresión del PA histonina en *E. coli* se obtuvieron 167 mg del péptido por cada litro del cultivo (Jung *et al.*, 2008). Sin embargo, en modelos eucariotas, como las plantas que permiten garantizar las modificaciones postraduccionales de la proteína recombinante se obtienen bajos rendimientos, como los obtenidos en la expresión de las defensinas DmAMP1 y RsAFP2 procedentes de semillas de *Dahlia merckii* y *Raphanus sativus*, respectivamente, las cuales al ser expresadas en *Arabidopsis thaliana* se obtuvieron valores que correspondían al 0.62% de la proteína total soluble (Francois *et al.*, 2002).

El hecho de que los MC de las poblaciones monoclonales presenten actividad a una concentración de proteína total menor para *S. aureus* que para *E. coli* (50 y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente), puede estar dado por las diferencias en la estructura de la membrana y la pared celular de ambos microorganismos. El umbral de la concentración efectiva de la defensina puede variar en función de la composición general de la membrana que es característica de cada especie bacteriana; como la composición de fosfolípidos, la fluidez y la carga neta que posee la pared celular (Yeaman y Yount, 2003). Existen componentes específicos, y particularmente aniónicos en las membranas Gram positivas y negativas, que también juegan un papel importante en la interacción de la defensina con el patógeno; por ejemplo el lipopolisacárido en Gram negativas y el ácido teicoico en Gram positivas (Brabosa *et al.*, 2011). Estas interacciones pueden ser determinantes en el efecto que produce la defensina E3 en *E. coli* y *S. aureus*.

Hasta este punto del estudio se demostró la actividad antibacteriana de la defensina E3. Sin embargo, es pertinente señalar que se ha establecido que la principal actividad que poseen las defensinas de plantas es la antifúngica (Thomma *et al.*, 2002). Interesantemente, los resultados obtenidos bajo las

condiciones evaluadas en este trabajo no permitieron detectar esta actividad en los MC evaluados contra *Candida albicans*. Existen en la literatura algunos trabajos que coinciden con los resultados encontrados con la defensina E3 de aguacate. Se han reportado defensinas que presentan actividad antibacteriana pero no antimicótica, como es el caso de algunos miembros de la familia de defensinas de espinaca So-D1, 2, 6, 7 que tienen una DE_{50} de 1-15 μM con bacterias como *Clavibacter michiganensis* y *Ralstonia solanacearum* pero no presentan efecto con hongos como *Fusarium culmorum* y *F. solani* (Segura *et al.*, 1998). Sin embargo, otro aspecto importante a considerar para que la defensina actúe como antifúngico es la concentración, ya que existen reportes en los que se utiliza la defensina pura a rangos de concentración muy amplios (1 a $<6 \mu\text{M}$) (Sagaram *et al.*, 2011). No obstante, las concentraciones de defensina E3 que se utilizaron en este trabajo son 10 veces menores a las reportadas por Sagaram y col (2011), lo que podría explicar el hecho de que no se detectó efecto inhibitorio de la defensina E3 contra *C. albicans*. Sin embargo, no se puede descartar que la defensina E3 tenga actividad antifúngica, para ello se requiere probar los MC contra un grupo más amplio de hongos, entre ellos los patógenos fúngicos del aguacate. En este sentido, existen referencias que señalan la posible participación de receptores específicos de unión a defensinas presentes en la superficie de la hifa fúngica (De Samblanx *et al.*, 1997). De ser así, cabe la posibilidad de que no todas las especies de hongos posean estos receptores y que los hongos patógenos propios de la planta sean blancos específicos para las defensinas de la misma especie. No obstante, estos receptores no han sido caracterizados como tales, el indicio de su existencia está dado en función de sitios de unión específicos en la molécula de la defensina que son esenciales para su actividad, así como su interacción con componentes específicos de la pared celular fúngica como son los esfingolípidos que actúan como receptores (Ramamoorthy *et al.*, 2009). Por todo lo anterior, queda establecida la necesidad de realizar estudios más profundos acerca del mecanismo de acción de las defensinas de plantas, entre ellas la defensina E3.

Finalmente, en este trabajo se logró establecer que existen PA en el fruto de aguacate criollo (*P. americana* var. *drymifolia*), particularmente una defensinas. Esto abre la posibilidad de desarrollar posibles herramientas biotecnológicas para su uso en farmacología, además de que se pueden emplear estos PA en el mejoramiento genético de las plantas, incluyendo el aguacate, e influir de esa manera a la optimización de los procesos de producción. También abre la posibilidad de encontrar otros PA en la planta de aguacate.

11.- CONCLUSIÓN

El péptido E3 de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) producido por células endoteliales de bovino presentó actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y no mostró efecto contra *Candida albicans* bajo las condiciones analizadas.

12.- REFERENCIAS

- Anaya L. J. L., López M. J. E., Baizabal A. V. M., Cano C. H., Ochoa Z. A., 2006. “Fungicidal and Cytotoxic Activity of a *Capsicum chinense* Defensin Expressed by Endothelial Cells”. *Biotechnology Letters*, 28:1101–1108.
- Arya R., Bhattacharya A., Kulvinder Singh Saini, 2008. “*Dictyostelium discoideum*—A Promising Expression System for the Production of Eukaryotic Proteins”. *The FASEB Journal*, 22:4055–4066.
- Barbosa P. P., Perseghini del S. R., Nascimento S. O., Luiz F. O., Grossi-de-Sa M. F., 2011. “Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work”. *Biochemistry Research International*, 2011:1-9.
- Blanco L. A., Aguirre M., 2002. “Proteínas Involucradas en los Mecanismos de Defensa de Plantas”. *Acta Universitaria*, 12:3-28.
- Broekaert W. F., Terras F. R. G., Cammue B. P. A., Osborn R. W., 1995. “Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System”. *Plant Physiology*, 108: 1353-1358.
- Broekaert, W. F., Cammue B. P. A., Debolle M. F. C., Thevissen K., Desamblanx G. W., Osborn R. W., 1997. “Antimicrobial Peptides from Plants”. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16:297–323.
- Brogden K. A., 2005. “Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?”. *Nature Reviews Microbiology*, 3:238-250.
- Cajero J. M., Avila B., Ochoa A., Garrido G. E., Varela E. A., Martínez de la E. G., Clapp C., 2002. “Immortalization of Bovine Umbilical Vein Endothelial

Cells: A Model for the Study of Vascular Endothelium". *European Journal of Cell Biology*, 81:1-8.

- Ceroni, A. Passerini, A. Vullo and P. Frasconi, 2006. "DISULFIND: a Disulfide Bonding State and Cysteine Connectivity Prediction Server". *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server issue):W177--W181.
- Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T., Felix G., 2006. "The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception". *The Plant Cell*, 18: 465–476.
- Chu L., Robinson D. K., 2001. "Industrial Choices for Protein Production by Large-Scale Cell Culture". *Current Opinion in Biotechnology*, 12:180–187.
- De Samblanx G. W., Goderis I. J., Thevissen K., Raemaekers R., Fant F., Borremans F., Acland D. P., Osborn R. W., Pateli S., Broekaert W. F., 1997. "Mutational Analysis of a Plant Defensin from Radish (*Raphanus sativus* L.) Reveals Two Adjacent Sites Important for Antifungal Activity". *The Journal of Biological Chemistry*, 2:1171-1179.
- Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M., 1987. "Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure". *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 84:7413-7417.
- Fernández de C. R., Gonzalez P. B., Garcia O. F., Carbonero P., 1972. "Susceptibility of Phytopathogenic Bacteria to Wheat Purothionins in Vitro". *Applied Microbiology*, 23:998–1000.
- Franco O. L., Pelegrini P. B., 2005. "Plant γ -thionins: Novel Insights on the Mechanism of Action of a Multi-Functional Class of Defense Proteins". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37:2239–2253.

- Franco O. L., Murad A. M., Leite J. R., Mendes P. A. M., Prates M. V., Bloch C., 2006. "Identification of a Cowpea γ -thionin with Bactericidal Activity". *FEBS Journal*, 273:3489–3497.
- Francois I. E.J.A., De Bolle M. F.C., Dwyer G., Goderis I. J.W.M., Woutors P. F.J., Verhaert P. D., Proost P., Schaaper W. M.M., Cammue B. P.A., Broekaert W. F., 2002. "Transgenic Expression in Arabidopsis of a Polyprotein Construct Leading to Production of Two Different Antimicrobial Proteins". *Plant Physiology*, 128:1346–1358.
- García O. F., Rodríguez P. P., Molina A., Alamillo J. M., López S. E., Berrocal L. M., Poza C. C., 2001. "Antibiotic Activities of Peptides, Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite in plant defence". *FEBS Letters*, 498:219-222.
- García P. E., Castro M. E., 2008. "El Aguacate en México, Origen y Amenazas". *Revista Ciencia y Desarrollo*, 34, 225:16-22.
- Giffoni L. J. J., Salles B. E. H., Aguiar C. R., Nogueira B. R. S., Costa S. J. J., Medeiros-Bertini L., Maia de Moraes S., Gadelha Rocha M. F., 2009. "Chemical Composition, Toxicity and Larvicidal and Antifungal Activities of *Persea americana* (avocado) Seed Extracts". *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2):110-113.
- Gomez F. R., Arzate Q. C., Quintanilla L. R., Tamez G. P., Tamez G. R., Monreal C. E., Rodríguez P. C., 2008. "Antimicrobial Activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) Leaf Extracts and Active Fractions Against *Mycobacterium tuberculosis*". *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 3 (2): 188-194.

- Gordon Y. J., Romanowski E. G., 2005. "A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs". *Current Eye Research*, 30(7): 505–515.
- Guaní G. E., Santos M. T., Lugo R. S. O., Terán L. M., 2010. "Antimicrobial Peptides: General Overview and Clinical Implications in Human Health and Disease". *Clinical Immunology*, 135(1):1-11.
- Hancock R. E. W. and Chapple D. S. 1999 "Peptide Antibiotics". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6):1317-1323.
- Hancock R. E. W., Sahl H. G., 2006. "Antimicrobial and Host-Defense Peptides as New Anti-Infective Therapeutic Strategies". *Nature Biotechnology*, 24, 12: 1551-1557.
- Ingham A. B. and Moore R. J., 2007. "Recombinant Production of Antimicrobial Peptides in Heterologous Microbial Systems". *Biotechnology Applied Biochemistry*, 47:1–9.
- Jahn B., Martin E., Stueben A., Bhakdi S., 1995, "Susceptibility Testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* Species by a Simple Microtiter Menadione-Augmented 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay". *Journal of Clinical Microbiology*, 33:661–667.
- Jenssen H., Hamill P., Hancock R. E. W., 2006. "Peptide Antimicrobial Agents". *Clinical Microbiology Reviews*, 491–511.
- Jung M. K., Su A. J., Byung J. Y., Bong H. S., Ju H. C., Sun C. K., 2008. "High-Level Expression of an Antimicrobial Peptide Histoinin as a Natural form by Multimerization and Furin-Mediated Cleavage". *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 78:123–130.

- Kawsar H. I., Ghosh S. K., Hirsch S. A., Koon H. B., Weinberg A., Jin G. 2010. "Expression of Human β -defensin-2 in Intratumoral Vascular Endothelium and in Endothelial Cells Induced by Transforming Growth Factor β ". *Peptides*, 31:195–201.
- Lau Y. E., Rozek A., Scott M. G., Goosney D. L., Davidson D. J., Hancock R. E. W., 2005. "Interaction and Cellular Localization of the Human Host Defense Peptide LL-37 with Lung Epithelial Cells". *Infection and Immunity*, 73(1): 583–591.
- Lay F. T., Anderson M. A., 2005. "Defensins – Components of the Innate Immune System in Plants". *Current Protein and Peptide Science*, 6:85-101.
- Lobo D. S., Pereira L. B., Fragel-Madeira L., Medeiros L. N., Cabral L. M., Faria J., Bellio M., Campos R. C., Linden R., Kurtenbach E., 2007. "Antifungal *Pisum sativum* Defensin 1 Interacts with *Neurospora crassa* Cyclin F Related to the Cell Cycle". *Biochemistry*, 46:987-996.
- Loeza A. H., Sagrero C. E., Lara Z. L., Villagómez G. E., López M. J. E., Ochoa Z. A., 2008. "Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* Expressed in Endothelial Cells Shows Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activity". *Biotechnology Letters*, 30:1713–1719.
- López G. R., Ibarra L. E., Suárez R. L. M, Hernández G., Salgado G. R., Martínez P. M., Chávez M. M., Rodríguez Z. L. C., Jiménez M. B., Herrera E. L. 2010, "First Insights into the Avocado Fruit Transcriptome". *28th International Horticultural Science Congress*, 22-27 de agosto. Lisboa, Portugal.
- Malina A., Shai Y., 2005. "Conjugation of Fatty Acids with Different Lengths Modulates the Antibacterial and Antifungal Activity of a Cationic Biologically Inactive Peptide". *Biochemistry Journals*, 390:695–702.

- McPhee J. B., Scott M. G., Hancock R. E. W., 2005. "Design of Host Defence Peptides for Antimicrobial and Immunity Enhancing Activities". *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 8:257-272.
- Montes B. R., 2009. "Diversidad de Compuestos Químicos Producidos por las Plantas contra Hongos Fitopatógenos". *Revista Mexicana de Micología*, 29:73-82.
- Moreno M., Segura A. Garcia-Olmedo F., 1994. "Pseudothionin-Stl, a Potato Peptide Active Against Potato Pathogens". *FEBS Letters*, 223:135-139.
- Murray D. R., Chun Q. Liu. 2008. "Properties and Applications of Antimicrobial Peptides in Biodefense Against Biological Warfare Threat Agents". *Critical Reviews in Microbiology*, 34:89–107.
- Mygind P. H., Fischer R. L., Schnorr K. M., Hansen M. T., Sönksen C. P., Ludvigsen S., Raventós D., Buskov S., Christensen B., De Maria L., Taboureau O., Yaver D., Elvig-Jørgensen S. G., Sørensen M. V., Christensen B. E., Kjærulff S., Frimodt-Møller N., Lehrer R. I., Zasloff M., Kristensen H. H., 2005. "Plectasin is a Peptide Antibiotic with Therapeutic Potential from a Saprophytic Fungus". *Nature*, 437(13):975-980.
- Nagaraj M., Sandhya V., Supriya G., Manju R., Kumari P., Shivaji Bole, Lalitha V., Kiran B., 2010. "Antioxidant and Antibacterial Activity of Avocado (*Persea gratissima* Gaerther) Seed Extract". *World Applied Sciences Journal*, 9(6):695-698.
- Neeman I., Lifshitz A., Kashman Y., 1970. "New Antibacterial Agent Isolated from the Avocado Pear". *Applied Microbiology*, 19:470-473.

- Oberlies N. H., Rogers L. L., Martin J. M., McLaughlin J. L., 1998. "Cytotoxic and Insecticidal Constituents of the Unripe Fruit of *Persea americana*". *Journal of Natural Products*, 61: 781-785.
- Ochoa A., Montes de Oca P., Rivera J. C., Dueñas Z., Nava G., Martínez de la Escalera G., Clapp C., 2001. "Expression of Prolactin Gene and Secretion of Prolactin by Rat Retinal Capillary Endothelial Cells". *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42:1639-1645.
- Oua J., Geigera T., Oua Z., Ackermana A. W., Oldhama K. T., Pritchard K. A., 2003. "AP-4F, Antennapedia Peptide Linked to an Amphipathic α -Helical Peptide, Increases the Efficiency of Lipofectamine-mediated Gene Transfection in Endothelial Cells". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305:605–610.
- Padovan L., Scocchi M., Tossi A., 2010. "Structural Aspects of Plant Antimicrobial Peptides". *Current Protein and Peptide Science*, 11:210-219.
- Peng J. and J. Xu, 2011. "RaptorX: Exploiting Structure Information for Protein Alignment by Statistical Inference". *Proteins*, 79, 161-171.
- Quero G. E., Robles M. J. C., Rivera G. J. M., Gallegos E. R., 2003. "El Cultivo del Aguacate en Michoacán: Estado del Arte". *Congreso Mundial del Aguacate V., Resúmenes*, A-187 pg. 424-425.
- Rai M., Padh H., 2001. "Expression Systems for Production of Heterologous Proteins". *Current Science*, 80, 9:1121-1128.
- Ramamoorthy V., Cahoon E. B., Li J., Thokala M., Minto R. E., Shah D. M., 2007. "Glucosylceramide Synthase is Essential for Alfalfa Defensin-Mediated Growth Inhibition But not for Pathogenicity of *Fusarium graminearum*". *Molecular Microbiology*, 66(3):771–786.

- Ramamoorthy V., Cahoon E. B., Thokala M., Kaur J., Li J., Shah D. M., 2009. “Sphingolipid C-9 Methyltransferases Are Important for Growth and Virulence but Not for Sensitivity to Antifungal Plant Defensins in *Fusarium graminearum*”. *Eukaryotic Cell*, 8:217–229.
- Reichhart Jean-Marc, 2003. “TLR5 Takes Aim at Bacterial Propeller”. *Nature Immunology*, 4:1159 – 1160.
- Risso A., 2000. “Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity”. *Journal of Leukocyte Biology*, 68:785–792.
- Rodríguez S. C., Millar J. G., Trumble J. T., 1997. “Growth Inhibitory, Insecticidal, and Feeding Deterrent Effects of (12Z,15Z)-1-Acetoxy-2-Hydroxy-4-oxo-Heneicosa-12,15-Diene, a Compound From Avocado Fruit To *Spodopera Exigua*”. *Journal of Chemical Ecology*, 23:7.
- Rosenblat G., Meretski S., Segal J., Tarshis M., Schroeder A., Zanin-Zhorov A., Lion G. A. I., Malka H., 2011. “Polyhydroxylated Fatty Alcohols Derived from Avocado Suppress Inflammatory Response and Provide Non-Sunscreen Protection Against UV-Induced Damage in Skin Cells”. *Archives Dermatological Reserch*, 303:239–246.
- Rotem S., Mor A., 2009. “Antimicrobial Peptide Mimics for Improved Therapeutic Properties”. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788:1582–1592.
- Sagaram U. S., Pandurangi R., Kaur J., Smith T. J., Shah D. M. 2011, “Structure-Activity Determinants in Antifungal Plant Defensins MsDef1 and MtDef4 with Different Modes of Action against *Fusarium graminearum*”. *Plos-One*, 6:1-13.

- Sagrero C. E., 2007. Actividad Antimicrobiana y Antifúngica de la Tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* Producida por Células Endoteliales Bovinas. Tesis de Licenciatura. Morelia Mich., Facultad de Biología. UMSNH.
- Sánchez P. J., 2007. "Identificación de Marcadores Asociados a la Resistencia del Aguacate Raza Mexicana (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de Doctorado. Morelia Mich., UMSNH.
- Segura A., Moreno M., Molina A., García-Olmedo F., 1998. "Novel Defensin Subfamily from Spinach (*Spinacia oleracea*)". *FEBS Letters*, 435:159-162.
- Silverstein K. A.T., Graham M. A., Paape T. VandenBosch., K. A., 2005. "Genome Organization of More Than 300 Defensin-Like Genes in *Arabidopsis*". *Plant Physiology*, 138: 600–610.
- Silverstein K. A.T., Moskal Jr W. A., Wu Hank C., Underwood B. A., Graham M. A., Town C. D. and VandenBosch K. A., 2007. "Small Cysteine-Rich Peptides Resembling Antimicrobial Peptides Have Been Under-Predicted in Plants". *The Plant Journal*, 51, 262–280.
- Steven M. D., Chunhua H., Li P., A. Kinghorn D, Ding H.. 2011, "Aliphatic Acetogenin Constituents of Avocado Fruits Inhibit Human Oral Cancer Cell Proliferation by Targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 Pathway". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409:465–469.
- Sussmann P. O. A., Lorenzo M. A., 2008. "Resistencia Bacteriana" *Unidad de Infectología*, Hospital Universitario San Ignacio, <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>. Fecha de consulta julio 2010.
- Tang X., Nakata Y., Li H-O., Zhang M., Gao H., Fujita A., Sakatsume O., Ohta T., Yokoyama K., 1994. "The Optimization of Preparations of

Competent Cells for Transformation of *E.coli*". *Nucleic Acids Research*, 22(14):2857-2858.

- Terra F. R. G., Schoofs H. M. E, De Bolle M. F. C., Van Leuvenll F., Rees S. B., Vanderleyden J., Cammue B. P. A., Broekaert W. F., 1992. "Analysis of Two Novel Classes of Plant Antifungal Proteins from Radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds". *The Journal of Biological Chemistry*, 267(22):15301-15309.
- Thevissen K., Warnecke D. C., Francois I. E. J. A., Leipelt M., Heinz E., Ott C., Zähringer U., Thomma B. P. H. J., Ferket K. K. A., and Cammue B. P. A., 2004. "Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides". *The Journal f Biological Chemistry*, 279, 6:3900-3905.
- Thomma B., Cammue P.A. K., Thevissen-Bart P. H. J., 2002. "Plant Defensins". *Planta*, 216:193-202.
- Tossi A., Sandri L., 2002. "Molecular Diversity in Gene-Encoded, Cationic Antimicrobial Polypeptides". *Current Pharmaceutical Design*, 8: 743-761.
- Wong J. H., Bun N. T., 2005. "Vulgarinin, a Broad-Spectrum Antifungal Peptide from Haricot Beans (*Phaseolus vulgaris*)". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37:1626–1632.
- Wurm F. M., 2004. "Production of Recombinant Protein Therapeutics in Cultivated Mammalian Cells". *Nature biotechnology*, 22(11):1393-1398.
- Yasir M., Das S., Kharya M. D., 2010. "The Phytochemical and Pharmacological Profile of *Persea americana* Mill". *Pharmacognosy Reviews*, 4:77-84.
- Yeaman M. R., Yount N. Y., 2003. "Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance". *Pharmacology Review*, 55:27–55.

- Yonezawa, T., Haga, S., Kobayashi, Y., Katoh, K. and Obara, Y., 2009. “Short-Chain Fatty Acid Signaling Pathway in Bovine Mammary Epithelial Cells”. *Regulatory Peptides*, 153: 30-36.
- Yount N. Y., Yeaman M. R., 2004. “Multidimensional Signatures in Antimicrobial Peptides”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(19):7363–7368.
- Zhang, L., and Falla, T.J. 2006. “Antimicrobial Peptides: Therapeutic Potential”. *Expert Opin Pharmacother*, 7, 653–663.
- Zhang Y., Lewis K., 1997. “Fabatins: New Antimicrobial Plant Peptides”. *FEMS Microbiology Letters*, 149:59-64.
- Zhang J., Yang Y., Teng D., Tian Z., Wang S., Wang J., 2011. “Expression of Plectasin in *Pichia pastoris* and its Characterization as a New Antimicrobial Peptide Against *Staphylococcus* and *Streptococcus*”. *Protein Expression and Purification*, 78(2):189-196.
- Zipfel C., 2008. “Pattern-Recognition Receptors in Plant Innate Immunity”. *Current Opinion in Immunology*, 20:10–16.