



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y CITOTÓXICA DE LA DEFENSINA
 γ -TIONINA DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense*)
PRODUCIDA POR CÉLULAS ENDOTELIALES BOVINAS**

TESIS QUE PRESENTA

M. en C. JOSÉ LUIS ANAYA LÓPEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
EN LA OPCIÓN DE
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA**

ASESORA

DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

COASESOR

DR. VICTOR MANUEL BAIZABAL AGUIRRE

Morelia, Michoacán, México

Octubre del 2006

Este trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y la Coasesoría del Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre. Para su realización se contó con el financiamiento del CONACYT (proyecto J-46400) y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (proyecto CIC/14.1).

Esta tesis esta conformada por una introducción general y los antecedentes del trabajo de investigación, seguidos de una descripción general de las estrategias metodológicas empleadas. Se incluye el artículo publicado de los resultados obtenidos y se anexa un apartado con los resultados que no fueron publicados. Todos los resultados son discutidos en otro apartado y finalmente se presenta una conclusión general del trabajo.

AGRADECIMIENTOS

“La gente se lee a si misma en los libros alterando lo que les conviene a su
manera”.

(Charles Bukowski, 1920-1994)

Con las personas que conocemos pasa lo mismo...

Al comité de asesores, coasesores y tutores

A la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, por brindarle una oportunidad en el camino de la ciencia a un desconocido...

Por tu ayuda, dedicación y ejemplo: ¡Gracias Ale!

A la Dra. Carmen Clapp Jiménez. Gracias por tu amabilidad, sugerencias y comentarios. El tiempo de interacción fue extremadamente corto, pero enriquecedor. Por un momento me sentí en familia...

Al Dr. Alfredo Varela Echavarría, por su ayuda y sugerencias, por el tiempo que ha dedicado en la mejora de esta investigación, y por enriquecerla con su profesionalismo y carácter inquisitivo.

Al Dr. Horacio Cano Camacho. Porque me has demostrado que en el camino que lleva a la ciencia hay más que solo investigación; que la honestidad y la lealtad nos hacen mejores personas. El ejemplo es el mejor de los maestros...

Al Dr. Joel E. López Meza, por tu ayuda imprescindible en la realización de este nuestro trabajo, por motivarme con tu ejemplo, y por la tolerancia y el respeto que has mostrado a esta rebeldía nata que hay en mí...

Al Dr. Luis Salazar Olivo, por su ayuda, sugerencias y observaciones, por representar un modelo para mi formación y porque creo haber entendido que la investigación puede y debe ser sencilla...

Al Dr. Víctor M. Baizabal Aguirre, por sus amables sugerencias, su tolerancia y por mantener siempre una posición crítica, elemento indispensable en el fortalecimiento de este trabajo...

A los profesores del CMEB: Alejandro, Gerardo, Guadalupe, Juan José, Marco y Omar porque siempre tuvieron tiempo para ayudarme u orientarme. ¡Gracias!

Este trabajo representa el producto de nuestro esfuerzo...

Un agradecimiento especial para la Dra. Carmen Clapp y el Dr. Horacio Cano, por su disposición para formar parte de este comité sinodal y por la celeridad en la revisión del escrito.

A mis compañeros del CMEB

A todos los que incondicionalmente me han ofrecido su ayuda.

A las cucarachas: Angelina y Leticia, que por raro que parezca me ayudaron más de lo que me molestaron...

A todos los que en el pasado han colaborado en la formación personal y académica de esta amalgama que soy... Especialmente al Dr. Ramón G. Guevara Gonzalez y al Dr. Irineo Torres Pacheco quienes me iniciaron en este hermoso y estresante camino...

A las instituciones que han apoyado y contribuido a mi formación:

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado para la finalización de mis estudios de Doctorado.

“La educación no siembra semillas en ti, pero hace que germinen tus semillas”.
(Khalil Gibran, 1883-1931)

Alejandra, Joel...
Han sido agua fresca para mi corazón y mente,
¡Gracias...!

DEDICATORIA

Papa, mom siempre han estado aquí...
Soy la manifestación de sus esfuerzos, sus sueños y el potencial genético que me otorgaron. Yo, soy Ustedes...

Kali, saber que te tengo es una dicha para mi corazón, tu esfuerzo me alienta a seguir...

A ti que has sabido permanecer a pesar de la tempestad y has guardado tus alas en espera de tiempos mejores. A ti joe dedico esta pequeña meta...

Con mucho cariño para el eterno luchador. Por que has decidido no claudicar y usar los medios de que dispones para crecer sin olvidar la fuerza de la sangre...
Tío Pedro gracias por tu apoyo!

Buko has traído una dosis extra de alegría a mi vida, por tus cariños durante la escritura de esta tesis, por despertarme siempre puntualmente y por tu eterna lealtad...

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Los péptidos antimicrobianos	2
1.1.1 Diversidad de los péptidos antimicrobianos	3
1.1.2 Clasificación de los péptidos antimicrobianos	3
1.2 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos	4
1.2.1 Interacciones de los péptidos antimicrobianos con receptores específicos	5
1.2.2 Interacciones de los péptidos antimicrobianos con moléculas intracelulares	6
1.3 Péptidos antimicrobianos de bacterias y hongos	7
1.4 Péptidos antimicrobianos de insectos	7
1.5 Péptidos antimicrobianos de anfibios	8
1.6 Péptidos antimicrobianos de mamíferos	8
1.7 Péptidos antimicrobianos de plantas	9
1.7.1 Clasificación de los péptidos antimicrobianos de plantas	10
1.7.2 Defensinas de plantas	12
1.7.3 Clases de defensinas de plantas	12
1.7.4 Distribución y localización de las defensinas de plantas	14
1.7.5 Estructura de las defensinas de plantas	15
1.7.6 Relación entre estructura y función de las defensinas de plantas	17
1.8 Actividad antibacteriana y antifúngica de las defensinas de plantas	20
1.9 Otros efectos de los péptidos antimicrobianos	23
1.9.1 Los péptidos antimicrobianos como moduladores de la inmunidad innata y adquirida	23
1.9.2 Efecto antiinflamatorio de los péptidos antimicrobianos	24
1.9.3 Actividad antitumoral de los péptidos antimicrobianos	25
1.9.4 Efecto de la concentración de los péptidos antimicrobianos	26
1.10 Las células endoteliales	27
1.11 <i>Candida albicans</i>	27
1.11.1 Factores de virulencia de <i>Candida albicans</i>	28
1.11.2 Invasión de las células endoteliales por <i>Candida albicans</i>	29
2. ANTECEDENTES	30
2.1 γ -tionina de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i>)	30
2.2 Expresión heteróloga de las defensinas de plantas	32
2.3 Las células endoteliales como modelo de estudio de las interacciones hospedero-patógeno	33
3. HIPÓTESIS	36
4. OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo general	36
	i

4.2 Objetivos específicos	36
5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	37
5.1 Diagrama general de la estrategia metodológica	37
6. RESULTADOS	38
Fungicidal and cytotoxic activity of a <i>Capsicum chinense</i> defensin expressed by endothelial cells	38
7. RESULTADOS ADICIONALES	47
7.1 ESTRATEGIA	48
7.1.1 Diagrama de la estrategia metodológica	48
7.1.2 Caracterización de las células transfectadas	49
7.1.2.1 Determinación de la concentración de óxido nítrico	49
7.1.2.2 Determinación de la expresión del factor von Willebrand	49
7.1.2.3 Tiempo de duplicación celular	50
7.1.3 Ensayo de viabilidad de los microorganismos	50
7.1.4 Ensayo de endocitosis de <i>Candida albicans</i>	51
7.1.5 Ensayo de citotoxicidad en células HeLa	51
7.1.6 Detección de la γ -tionina en los medios condicionados por SDS-PAGE-Tricina	51
7.2 RESULTADOS	53
7.2. Generación de la construcción para la expresión del ADNc de la γ -tionina	53
7.2.2 Efecto citotóxico y antimicrobiano del medio condicionado	54
7.2.2.1 Efecto del medio condicionado de la población policlonal Co sobre las células BVE-E6E7	54
7.2.2.2 Efecto del medio condicionado de la población policlonal Co sobre los microorganismos	54
7.2.2.3 Efecto del medio condicionado de la población policlonal Co sobre las líneas tumorales	55
7.2.3 Aislamiento de las clonas	56
7.2.4 Endocitosis de <i>Candida albicans</i> en las clonas aisladas	57
7.2.5 Citotoxicidad de los medios condicionados de las clonas sobre las células HeLa	57
7.2.6 Caracterización de las clonas	58
7.2.6.1 Morfología celular y expresión del factor von Willebrand	59
7.2.6.2 Tiempo de duplicación de las clonas	60
7.2.6.3 Producción de óxido nítrico en los medios condicionados de las clonas	61
7.2.7 Detección del péptido γ -tionina por SDS-PAGE en el medio condicionado de la población policlonal Co	62
8. DISCUSIÓN	63
9. CONCLUSIÓN	76
10. BIBLIOGRAFÍA	77
11. ANEXOS (PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TRABAJO DE TESIS)	88

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Clasificación de los péptidos antimicrobianos basada en los aminoácidos que los componen, la carga neta y la estructura secundaria.	4
Cuadro 2	Clasificación de los péptidos antimicrobianos de plantas.	11
Cuadro 3	Secuencia de aminoácidos de la región correspondiente al péptido maduro de algunas defensinas de plantas.	15
Cuadro 4	Origen y actividad de algunas defensinas de plantas.	21
Cuadro 5	Expresión de defensinas de plantas en plantas transgénicas.	22
Cuadro 6	Ejemplos de la actividad antiinflamatoria directa e indirecta de los péptidos antimicrobianos.	24
Cuadro 7	Organismos en los que se han expresado defensinas de plantas.	33
Cuadro 8	Modelos de estudio de interacción hospedero-patógeno utilizando células endoteliales de diversos orígenes.	34
Cuadro 9	Endocitosis de <i>Candida albicans</i> y efecto citotóxico sobre células HeLa de los medios condicionados de las clonas S1 a la S9.	59
Cuadro 10	Tiempos de duplicación celular de la población policlonal Co y las clonas S1 y S2 comparados con el de las células BVE-E6E7.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Estructura y orientación de los aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos de tres diferentes péptidos antimicrobianos. 5
Figura 2	Mecanismo de acción probable del péptido antimicrobiano Rs-AFP2. 6
Figura 3	Acción intracelular de algunos péptidos antimicrobianos. 7
Figura 4	Secuencia de aminoácidos y enlaces disulfuro de las α y β defensinas. 9
Figura 5	Clases de defensinas de plantas. 13
Figura 6	Comparación de las estructuras primarias y secundarias de las 9 defensinas de plantas a las que se les ha determinado su estructura terciaria. 16
Figura 7	Representación de las estructuras terciarias de las defensinas de plantas Rs-AFP1, NaD1 y PhD1 y las defensinas de insecto Defensina A, Drosomicina y Charibdotoxina. 17
Figura 8	Ubicación de los aminoácidos importantes para la actividad antifúngica de Rs-AFP2 mostrados sobre la estructura de Rs-AFP1. 19
Figura 9	Secuencia del ADNc de la γ -tionina de <i>Capsicum chinense</i> clonado en el vector pBluescript SK (+/-). 30
Figura 10	Secuencia putativa de aminoácidos de la γ -tionina de <i>Capsicum chinense</i> predicha a partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc. 31
Figura 11	Comparación de la secuencia de aminoácidos de algunas defensinas de plantas con la γ -tionina de <i>Capsicum chinense</i> . 32
Figura 12	Patrón de restricción de la construcción pTC γ que contiene el ADNc de la γ -tionina. 53
Figura 13	Citotoxicidad del medio condicionado de la población policlonal Co sobre las células BVE-E6E7. 54
Figura 14	Actividad antibacteriana y antifúngica del medio condicionado de la población policlonal Co. 55
Figura 15	Citotoxicidad del medio condicionado de la población policlonal Co sobre las líneas tumorales HeLa, MCF-7 y A549. 56
Figura 16	Evaluación de la endocitosis de <i>Candida albicans</i> en las clonas obtenidas a partir de la población policlonal Co. 57
Figura 17	Citotoxicidad de los medios condicionados de las clonas S1-S9 sobre la línea tumoral HeLa. 58
Figura 18	Morfología celular y expresión del factor von Willebrand por la población policlonal Co, y las clonas S1 y S2. 61
Figura 19	Concentración de óxido nítrico en los medios condicionados de la población policlonal Co, y las

	clonas S1 y S2.	60
Figura 20	Modelo teórico de la secreción de la γ -tionina en las células BVE-E6E7 transfectadas con el ADNc de la γ -tionina.	64
Figura 21	Modelo de las probables interacciones de la γ -tionina secretada por las células BVE-E6E7 transfectadas con el ADNc de la γ -tionina con <i>Candida albicans</i> y HeLa.	71

RESUMEN

Los péptidos antimicrobianos (PA) son componentes importantes de la inmunidad innata de los eucariotes que actúan principalmente sobre las membranas plasmáticas (MP) de las bacterias, los hongos y las células de mamíferos. Las defensinas de plantas (DP) son un grupo de PA con un mecanismo de acción que favorece su actividad en contra de hongos fitopatógenos, aunque algunas DP poseen actividad contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y células tumorales. La selección de cepas de microorganismos resistentes a los antibióticos convencionales y el incremento en el número de individuos inmunocromprometidos, han motivado la búsqueda y el desarrollo de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana o antifúngica que presenten una baja toxicidad para el hospedero. En este sentido las DP representan una alternativa terapéutica contra microorganismos patógenos de mamíferos, particularmente los de humano como *Candida albicans*; sin embargo, existe poca investigación al respecto. En este trabajo se generó la construcción de integración al azar pTC γ que contiene el ADNc de la defensina γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) clonado en el sitio *EcoRI* del vector de expresión para mamíferos pTracerC. Esta construcción se utilizó para transfectar por lipofección la línea celular inmortal de endotelio bovino BVE-E6E7. Las células se seleccionaron por emisión de fluorescencia y resistencia a zeocina, y se obtuvo una población policlonal con integración estable (Co). A partir de esta se aislaron 9 clonas (S1-S9) y se seleccionaron dos: S1 y S2, con base en su actividad antifúngica y citotóxica. En estas clonas se confirmó la expresión del ARNm de la γ -tionina por RT-PCR y secuenciación del fragmento de ADNc amplificado. Se evaluó la actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica de los medios condicionados (MC) de las clonas sobre la cepa del hongo *C. albicans* ATCC 10231, la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, la bacteria Gram negativa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 y las líneas celulares tumorales MCF-7, A549 y HeLa y se evaluó la endocitosis de *C. albicans* en las clonas seleccionadas. En comparación con las células BVE-E6E7, todas las clonas celulares evaluadas mostraron menos

endocitosis de *C. albicans*, sin embargo, Co mostró un 99% de inhibición de la endocitosis. Los MC de Co, S1 y S2 no mostraron actividad antibacteriana, sin embargo, inhibieron de manera dependiente de la concentración la formación de hifas (~80%) y la viabilidad de *C. albicans* (~70%), esta actividad se correlacionó directamente con los niveles de expresión del ARNm de la γ -tionina en Co, S1 y S2. Los MC fueron citotóxicos para las células HeLa en un rango del 80-90%, pero no mostraron citotoxicidad sobre las líneas MCF7 y A549. Estos resultados demuestran que los MC de las células transfectadas con el ADNc de la γ -tionina de *C. chinense* inhiben la viabilidad y la endocitosis de *C. albicans* y son citotóxicos para la línea tumoral HeLa, lo que sugiere que la γ -tionina de *C. chinense* posee efectos antimicóticos y citotóxicos. Ante esto, se abre la posibilidad de usar a las DP en el tratamiento de micosis provocadas por *C. albicans* y en el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer. Además, este modelo de expresión permite el estudio *in vitro* de las interacciones de *C. albicans* con el endotelio.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AP) are important components of the eukaryotic innate immune response. They have effects on the plasmatic membranes (PM) of bacteria, fungi and mammalian cells. Plant defensins (PD) are an AP group which have main activity against phytopathogenic fungi, although some PD have activity against Gram positive, Gram negative bacteria and tumoral cells. The increase in the selection of resistant microorganisms to conventional antibiotics and fungicides has propitiated the development of new antimicrobial or antifungal compounds. In this sense, PD represent a therapeutic alternative against mammalian pathogenic microorganisms, mainly from humans, for example *Candida albicans*. In this work, we generated a construction containing the cDNA of γ -thionin defensin from chile habanero (*Capsicum chinense*) cloned into the *EcoRI* site from the mammalian expression vector pTracerC. This construction was used to transfect by lipofection the immortal bovine endothelial cell line BVE-E6E7 and was named pTC γ . The transfected cells were selected by fluorescence emission and zeocine resistance, and a polyclonal population with a stable integration (Co) was obtained. From this population, 9 clones were isolated (S1-S9) and 2 of them were selected, S1 and S2, in relation to their antifungal and cytotoxic activity. The expression of the mRNA for γ -thionin was confirmed in Co, S1 and S2 clones by RT-PCR and sequence analysis. The conditioned media (CM) from these clones were obtained, and their antifungal, antibacterial and cytotoxic activities were evaluated on the fungi *C. albicans* (ATCC 10231), the Gram positive bacterium *Staphylococcus aureus* (ATCC 27543), the Gram negative bacterium *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) and the tumoral cell lines MCF-7, A549 y HeLa. The endocytosis of *C. albicans* into the selected clones was also tested. All clones showed lower endocytosis of *C. albicans* than non-transfected BVE-E6E7 cells. However, in Co the endocytosis was 100% inhibited. The CM from Co, S1 and S2 did not show antibacterial activity, whereas inhibited the hyphal formation (~80%) and viability of *C. albicans* (~70%). This activity is in agreement with the expression levels of the γ -thionin mRNA in all clones. The CM of clones were cytotoxic for HeLa cells (80-

90% of viability inhibition), but did not have effect on the tumoral cell lines MCF7 and A549. These results demonstrated that the CM from transfected cells with γ -thionin cDNA from *C. chinense* inhibited the viability and the endocytosis of *C. albicans* into endothelial cells, and were cytotoxic for the tumoral cell line HeLa, suggesting that γ -thionin from *C. chinense* has antimycotic and cytotoxic effects. Additionally, these results address the possibility for the use of PD in the treatment of *C. albicans* mycosis and for the development of new anticancer drugs. Finally, the *in vitro* model used in this work allows the study of the interactions between *C. albicans* and endothelium.

1. INTRODUCCIÓN

Los péptidos antimicrobianos (PA) son moléculas multifuncionales que requieren modificaciones postraduccionales o derivan de precursores más grandes, poseen diversas estructuras, mecanismos de acción y actividad. La principal función de los PA es proteger a los organismos que los producen, ya que pueden tener actividad antimicrobiana, antiviral, citotóxica o actuar como moléculas moduladoras de la respuesta inmune. Algunos PA tienen actividad de amplio espectro, y pueden actuar de manera indistinta sobre los microorganismos y las células eucariotas, mientras que otros son selectivos y afectan únicamente a los microorganismos o a las células cancerígenas sin dañar a las células normales. Debido a su actividad y selectividad, algunos PA tienen potencial para ser usados como agentes terapéuticos. Los PA han sido aislados y/o detectados en hongos, bacterias, animales y plantas. En las plantas se han aislado distintas clases de PA, entre estos se encuentran las defensinas de plantas (DP), cuya principal actividad es sobre hongos fitopatógenos a los que afectan mediante la lisis de su membrana plasmática (MP) o inhibiendo la formación de sus hifas. Algunas DP poseen actividad antibacteriana, mientras que otras son citotóxicas para las células tumorales. Hasta la fecha no se ha reportado la citotoxicidad de las DP sobre células normales; sin embargo, sus efectos citotóxicos sobre células tumorales humanas, y los antifúngicos en contra de hongos patógenos de animales han sido poco estudiados. Algunos hongos patógenos de humanos como *Candida albicans* tienen importancia clínica debido a las infecciones superficiales y sistémicas que ocasionan. Para diseminarse de manera sistémica e invadir otros tejidos, *C. albicans* al igual que otros microorganismos patógenos deben atravesar el endotelio, el cual desempeña una actividad importante en la regulación de la respuesta inmune y es el principal sitio de ataque de la mayoría de los microorganismos que se diseminan por el torrente sanguíneo. El endotelio reacciona a una infección mediante la expresión de citocinas y adhesinas que le permiten reclutar leucocitos y combatir a los microorganismos invasores. A excepción del óxido nítrico (ON), hasta ahora no se ha reportado la

producción de PA o de alguna otra sustancia con actividad antimicrobiana en el endotelio, por lo que representa un modelo de expresión heteróloga de PA para evaluar su actividad, el efecto de la producción de un PA sobre el endotelio y las interacciones hospedero-patógeno.

1.1 Los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PA) están ampliamente distribuidos en la naturaleza, desempeñando una función de protección importante en los seres vivos. Se han aislado y/o detectado en animales, plantas, bacterias, hongos y virus. En los organismos eucariotes forman parte importante de la inmunidad innata contra los patógenos, mientras que en los procariotes desempeñan funciones de defensa contra otros microorganismos (Hancock y Chapple, 1999; Brogden, 2005).

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

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

Los PA de plantas y de animales contienen entre 12 y 45 aminoácidos (aa), se expresan de manera constitutiva o inducida, son catiónicos, anfipáticos y derivan de precursores más grandes. Los precursores de los PA tienen una secuencia señal de retículo endoplásmico, sufren modificaciones post-traduccionales como procesamientos proteolíticos y en algunos casos glicosilación y amidación carboxilo terminal (Kaiser y Diamond, 2000; Hancock y Lehrer, 1998; Zasloff, 2002).

Los PA son diversos en el tamaño y en la composición de aa, sin embargo, su molécula se organiza de tal manera que las regiones hidrofóbicas y los aa catiónicos se agrupan en regiones discretas alejadas entre sí, lo que favorece su interacción con los lípidos aniónicos de las MP de los microorganismos (Froy y Gurevitz, 1998; Epand y Vogel, 1999; Zasloff, 2002).

1.1.1 Diversidad de los péptidos antimicrobianos

Hasta el momento se han identificado o predicho a partir de la secuencia de sus ácidos nucleicos más de 880 PA que son producidos en distintos tejidos y tipos celulares de una gran variedad de especies de plantas y animales (Brogden, 2005). Los PA poseen distintas estructuras y mecanismos de acción. Se han descrito péptidos lineales que forman hélices α anfipáticas e hidrofóbicas como la magainina 2 de la piel de la rana *Xenopus laevis*, péptidos cíclicos como la gramicidina S de *Bacillus brevis*, péptidos con hojas β como la lactoferrina de leche bovina, péptidos con una mayor proporción de un aa específico como la histatina de saliva humana que es rico en histidina, y péptidos macrocíclicos como la kalata B1 de la planta africana *Oldenlandia affinis* (Epand y Vogel, 1999; Tam *et al.*, 1999; Bradshaw, 2003).

1.1.2 Clasificación de los péptidos antimicrobianos

Los PA difieren en la secuencia de aa, en la estructura de su molécula, en el tamaño y en la carga. La mayoría son aniónicos o catiónicos, aunque también los hay neutros (Zhao *et al.*, 2003; Brogden, 2005). En el Cuadro 1 se presenta una clasificación de los PA basada en el tipo de aa que los componen,

la estructura secundaria que adoptan y la carga neta (Hancock y Lehrer, 1998; Epand y Vogel, 1999; Zasloff, 2002; Brogden, 2005).

Cuadro 1. Clasificación de los péptidos antimicrobianos basada en los aminoácidos que los componen, la carga neta y la estructura secundaria.

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

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

1.2 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos

La actividad de los PA se lleva a cabo por diferentes mecanismos que dependen del tipo de péptido y del organismo con el que interacciona. Para una revisión detallada revisar Anaya-López *et al.*, 2005 en la sección de “Anexos”. Algunos mecanismos descritos son:

1) La interacción electrostática entre los aa catiónicos de los PA con las cargas negativas de los componentes de las MP (Anaya-López *et al.*, 2005).

2) La interacción del PA con un receptor específico, descrita para la interacción de algunos PA con los hongos (Thevissen *et al.*, 2003; Thomma *et al.*, 2003).

3) La interacción del PA con moléculas intracelulares (Brogden, 2005).

Una característica de los PA es la organización anfipática de su molécula que es el resultado de la conformación espacial de los aa hidrofóbicos y de los aa catiónicos que se agrupan en regiones discretas alejadas entre sí (Figura 1). Esta estructura favorece la interacción específica de las regiones catiónicas del PA con las cargas negativas de los grupos polares de los fosfolípidos (fosfolípidos aniónicos) de las MP o con moléculas que poseen cargas negativas (Froy y Gurevitz, 1998; Epanand y Vogel, 1999; Zasloff, 2002).

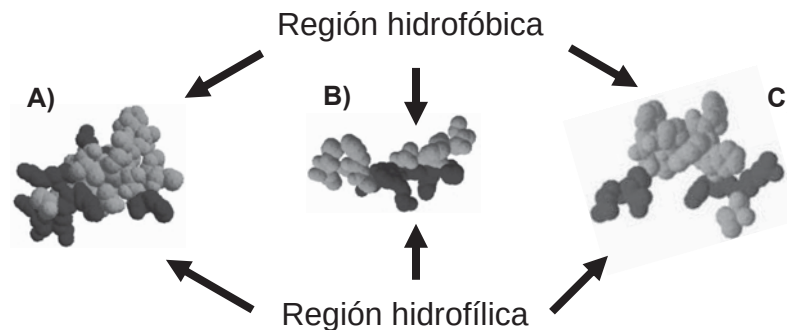


Figura 1. Estructura y orientación de los aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos de tres diferentes péptidos antimicrobianos. La molécula se organiza de manera que los grupos de aa catiónicos (representados en negro) e hidrofóbicos (en gris) se ubican en regiones discretas alejadas entre sí, confiriéndole a la molécula un carácter anfipático. Sin embargo, esta característica no siempre es tan evidente en todos los PA. A) defensina- α 3 de humano; B) magainina 2 de rana; C) indolicidina bovina. Tomada de Zasloff, 2002.

1.2.1 Interacciones de los péptidos antimicrobianos con receptores específicos

La interacción de los PA con receptores específicos sobre las MP de los microorganismos se demostró experimentalmente con la DP Rs-AFP2 de rábano (*Raphanus sativus*). Rs-AFP2 actúa de manera dependiente de la concentración induciendo la ruptura de la MP de la levadura *Pichia pastoris* (~70%); sin embargo, su efecto disminuye hasta un 10% cuando actúa sobre mutantes nulas de *P. pastoris* que carecen del gen *gcs* que expresa las glucosilceramidas (GlcCer). Además, el tratamiento de *P. pastoris* con anticuerpos específicos en contra de GlcCer disminuye 4 veces el efecto antifúngico de la DP Rs-AFP2 en comparación con el control no tratado, por lo

que se propone que esta defensina actúa mediante la interacción con las GlcCer de la MP de esta levadura. Sin embargo, parece ser que la interacción con las GlcCer es necesaria pero no suficiente para producir la ruptura de la MP de *P. pastoris*. Rs-AFP2 (Y38G), que es una variante de Rs-AFP2, es capaz de unirse específicamente a las GlcCer de *P. pastoris*, pero no induce la ruptura de la MP y no posee actividad antifúngica. En la Figura 2 se representa un probable mecanismo para la actividad de Rs-AFP2. Esta evidencia sugiere que además de la interacción de Rs-AFP2 con las GlcCer interviene otro componente que aún no ha sido descrito y que es necesario para la actividad antifúngica de Rs-AFP2 (Thevissen *et al.*, 2004).

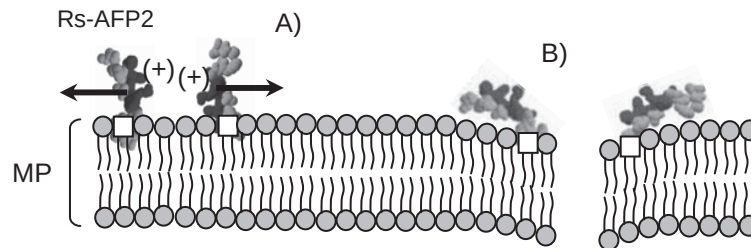


Figura 2. Mecanismo de acción probable del péptido antimicrobiano Rs-AFP2. Las glucosilceramidas de la MP de los hongos (representadas por cuadrados), actúan como receptores de la Rs-AFP2. A) Las cargas positivas del PA se repelen entre sí, y B) la repulsión entre las cargas provoca la formación del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

1.2.2 Interacciones de los péptidos antimicrobianos con moléculas intracelulares

Algunos experimentos han revelado que los PA además de interactuar con las MP pueden translocarse al citoplasma e interactuar con algunas moléculas intracelulares. Por ejemplo, la buforina II del sapo *Bufo bufo gargarizans* no rompe la MP pero entra al citoplasma. Una vez en el citoplasma, los péptidos translocados pueden lisar la MP, inhibir la formación de septos, la síntesis de la pared celular, la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o inhibir la acción de alguna enzima. En la Figura 3 se representa la acción intracelular de algunos PA (Brogden, 2005).

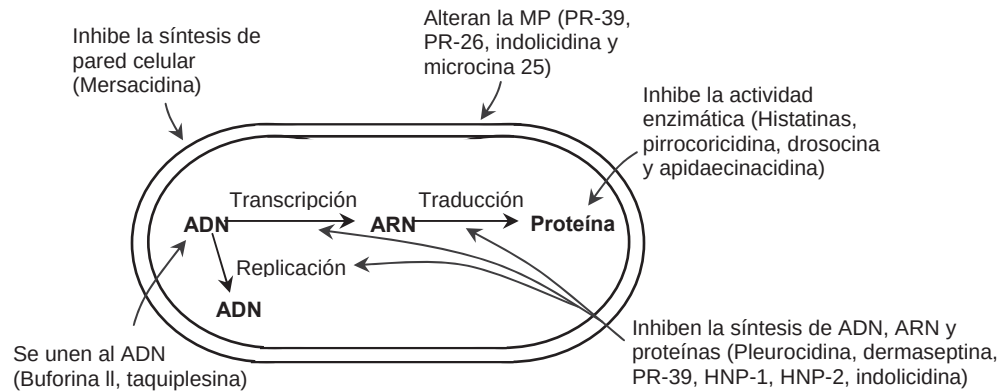


Figura 3. Acción intracelular de algunos péptidos antimicrobianos. En la figura se representa a *Escherichia coli* como célula blanco (Brogden, 2005).

1.3 Péptidos antimicrobianos de bacterias y hongos

En las bacterias se han aislado PA catiónicos o neutros conocidos como bacteriocinas, que presentan diferentes mecanismos de acción. Por ejemplo, la microcina C7 de *Escherichia coli* inhibe la síntesis de proteínas y la mersacidina de *Bacillus* spp. interfiere con la transglicosilación y la síntesis de peptidoglicanos en bacterias Gram positivas. Se ha sugerido que algunas bacteriocinas como la nisina de *Lactococcus lactis* y la subtilina de *Bacillus subtilis*, permeabilizan las MP de los microorganismos Gram negativos. Algunos PA producidos por hongos como las equinocandinas de *Aspergillus nidulans* y *A. rugulosus*, actúan sobre la biosíntesis de la pared celular de otros hongos y son hemolíticos (Hancock y Chapple, 1999; Cherif *et al.*, 2003; De Lucca y Walsh, 2000).

1.4 Péptidos antimicrobianos de insectos

Los PA de los insectos se han aislado de sus hemolinfas y de los venenos que secretan como la cecropina de la palomilla *Hyalophora cecropia* y la melitina de la abeja *Apis mellifera*. Los insectos representan un ejemplo de expresión selectiva de PA en respuesta a la infección de un patógeno específico (Hancock y Chapple, 1999; De Lucca y Walsh, 2000). En *Drosophila melanogaster* se ha detectado la expresión de 7 genes de PA con actividad antifúngica y antibacteriana, que se expresan diferencialmente después de la

infección con distintos microorganismos. Por ejemplo, los PA drosomicina y la metchnikowina, que poseen actividad antibacteriana y antifúngica, se expresan en respuesta a la infección con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*; sin embargo, este mismo hongo no induce la expresión de los PA diptericina y cecropina A1 que tienen únicamente actividad antibacteriana. Con el uso de mutantes de *D. melanogaster* que no expresan receptores Toll, se demostró que la expresión diferencial de la drosomicina y la metchnikowina está regulada por la activación selectiva de estos receptores, ya que en estas mutantes la infección con *B. bassiana* no induce la expresión de estos PA. De esta manera *D. melanogaster* puede discriminar entre diferentes tipos de patógenos y producir el PA adecuado para cada tipo de infección (Lemaitre *et al.*, 1997).

1.5 Péptidos antimicrobianos de anfibios

En los anfibios los PA se han aislado de sus glándulas granulares, de las células de la mucosa gástrica y del tracto intestinal. Algunos ejemplos de estos péptidos son la magainina de *Xenopus laevis*, la dermaseptina de *Phylomedusa sauvagii*, la buforina II de *Bufo bufo gargarizans*, y la ranalexina y la brevinina de *Rana catesbeiana* y *esculenta*. Estos PA tienen generalmente actividad antimicrobiana y antifúngica, como la magainina contra *Candida albicans* (Hancock y Chapple, 1999; De Lucca y Walsh, 2000).

1.6 Péptidos antimicrobianos de mamíferos

Los PA de los mamíferos se han detectado en los neutrófilos, en las mucosas y en las secreciones de las células epiteliales. Los más estudiados son las defensinas, que se clasifican en α y β defensinas, caracterizadas por tener un alto contenido de arginina y 6 cisteínas unidas por enlaces disulfuro. La posición de las cisteínas difiere entre estas dos clases de defensinas (Figura 4), en las α defensinas las cisteínas 1-6, 2-4, 3-5 se unen para formar los puentes disulfuro; mientras que en las β defensinas se unen las cisteínas 1-5, 2-4 y 3-6 (Selsted *et al.*, 1989; Tang y Selsted, 1993; Ganz, 2003). Las α defensinas se encuentran principalmente en los gránulos de los neutrófilos y las células de

Paneth que son células epiteliales con granulos de secreción y se localizan en el fondo de las criptas de Lieberkühn que son glándulas tubulares localizadas entre las vellocidades del intestino delgado, y las β defensinas se producen en las células epiteliales, los neutrófilos y los leucocitos. Las defensinas de mamíferos poseen actividad contra bacterias, hongos y virus (Hancock y Chapple, 1999; De Lucca y Walsh, 2000).

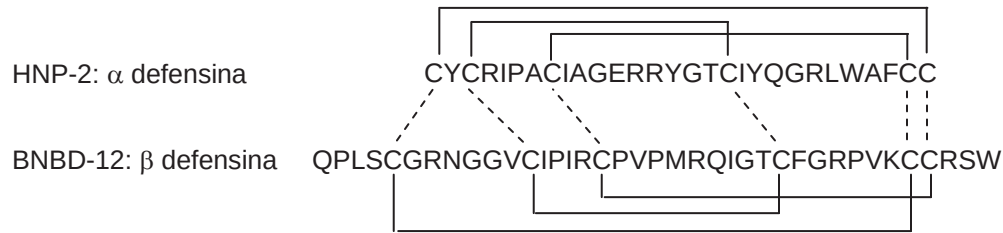


Figura 4. Secuencia de aminoácidos y enlaces disulfuro de las α y β defensinas. Las líneas punteadas indican las cisteínas correspondientes a las α y β defensinas; las líneas continuas representan los enlaces disulfuro que unen a las cisteínas. HNP-2, péptido de neutrófilos humanos; BNBD-12, β defensina de neutrófilos de bovino.

1.7 Péptidos antimicrobianos de plantas

Los PA de las plantas constituyen parte de los mecanismos de defensa de las plantas que pueden expresarse de manera constitutiva o ser inducidos en respuesta al ataque de un patógeno y aunque carecen de la sofisticación de la inmunidad adaptativa de los vertebrados, ofrecen una protección “rápida” contra los patógenos. En comparación con la producción y acción de los metabolitos secundarios, los PA pueden ser liberados inmediatamente después de producirse la infección, son expresados por un solo gen y por lo tanto requieren un menor gasto de biomasa y energía (Thomma *et al.*, 2002; Lay y Anderson, 2005).

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

Las tioninas fueron los primeros PA a los que se les demostró actividad antimicrobiana *in vitro* contra patógenos de plantas (García-Olmedo *et al.*, 2001). Posteriormente en experimentos de sobreexpresión y expresión heteróloga se demostró la actividad y el uso potencial de los PA de plantas en el combate contra microorganismos patógenos. Por ejemplo, la sobreexpresión de la tionina Thi 2.1 de *Arabidopsis thaliana* disminuye los síntomas producidos por el hongo *Fusarium oxysporum* entre 50 y 60%, adicionalmente a este efecto se observó la alteración de la morfología y de la ramificación de las hifas de *F. oxysporum* entre un 3-11% y 6-15%, respectivamente (Epple *et al.*, 1997). La expresión en tabaco de la DP Rs-AFP2 de semillas de rábano reduce ~7 veces el tamaño de las lesiones provocadas por *Alternaria longipes* con respecto a las plantas no transformadas (Terras *et al.*, 1995); de manera similar, la expresión de la tionina viscotoxina A3 del muérdago *Viscum album* en *A. thaliana*, incrementa la resistencia contra el hongo de la raíz *Plasmodiophora brassicae* del 29 a 64%, en relación con las plantas no transformadas (Holtorf *et al.*, 1998).

1.7.1 Clasificación de los péptidos antimicrobianos de plantas

Los PA de las plantas se han clasificado con base en la identidad de la secuencia de sus aa y al número y posición de las cisteínas que forman los puentes disulfuro. Hasta el momento, se han descrito 10 familias de PA de las plantas que se muestran en el Cuadro 2 (García-Olmedo *et al.*, 2001; Lay y Anderson, 2005).

Cuadro 2. Clasificación de los péptidos antimicrobianos de plantas.

Familia	No. a.a.	Representante	Región conservada	Referencia
LTPs	90-95	Ace-AMP1	3-C-9-C-12-CC-18-C-1-C-23-C-15-C-4	García-Olmedo <i>et al.</i> , 2001; Lay y Anderson, 2005
Esnacinas Φ	61-70	StSN2	22-C-3-C-3-C-8-C-3-C-2-C-2-C-1-C-11-C-1-C-12-C	Segura <i>et al.</i> , 1999; Berrocal-Lobo <i>et al.</i> , 2002
Defensinas	45-54	Rs-AFP2	3-C-10-C-5-C-3-C-10-C-8-C-1-C-3-C	García-Olmedo <i>et al.</i> , 2001; Lay y Anderson, 2005
Tioninas	45-47	α -Purotionina	2-CC-7-C-3-C-8-C-3-C-1-C-8-C-6	García-Olmedo <i>et al.</i> , 2001; Lay y Anderson, 2005
Tipo Heveina	43	Ac-AMP2	3-C-4-C-4-CC-5-C-6-C-2	García-Olmedo <i>et al.</i> , 2001; Lay y Anderson, 2005
Tipo Knottina	36-37	Mj-AMP1	1-C-6-C-8-CC-3-C-10-C-3	García-Olmedo <i>et al.</i> , 2001; Lay y Anderson, 2005
Shepherinas **	28 y 38	Sheperina 1 Sheperina 2	GYGGHGGHGGHGGHGGHGGGGHGG GYHGGHGGHGGGYBGGGGHGGHGGYBGGGGHGGGGHGG	Park <i>et al.</i> , 2000
MBP-1 Φ *	33	MBP-1	6-C-3-C-13-C-3-C	Duvick <i>et al.</i> , 1992
Ciclotidas	29-31	Kalata B1	1-C-3-C-4-C-4-C-1-C-4-C-6	Tam <i>et al.</i> , 1999
Ib-AMPs *	20	Ib-AMP1	5-CC-8-C-3-C	García-Olmedo <i>et al.</i> , 2001; Lay y Anderson, 2005

Se indica el número de aa de la región madura, el número y espacio entre cisteínas, así como la localización de los enlaces disulfuro determinados experimentalmente. Φ Enlaces disulfuro predichos con el programa DIANNA 1.1 (Ferre y Clote, 2005); * familia con un sólo miembro; ** familia con dos miembros que derivan de un solo polipéptido precursor.

1.7.2 Defensinas de plantas

Las defensinas de plantas (DP) son PA con un peso molecular aproximado de 5 kDa, están conformados por 45 a 54 aa, son básicos y tienen típicamente 8 cisteínas. La γ -purotionina (γ -1P) y la γ -hordotionina (γ -1H) fueron las primeras DP que se aislaron, se obtuvieron de granos de trigo y cebada. Inicialmente se les clasificó como γ -tioninas por las similitudes en el peso que mostraban con las α y β -tioninas (~5 kDa) y los 4 enlaces disulfuro que tienen. Sin embargo, las cisteínas que forman los enlaces disulfuro en las γ -tioninas tiene un motivo conservado distinto al de las α y β -tioninas (Broekaert *et al.*, 1995). El nombre de DP fue designado por Terras y colaboradores (1995), quiénes aislaron los PA Rs-AFP1 y Rs-AFP2 de semillas de rábano (*Raphanus sativus*) y demostraron que esos péptidos se encontraban más relacionados en su estructura primaria y terciaria con las defensinas de insectos y de mamíferos que con las tioninas (Lay y Anderson, 2005). Actualmente, los términos γ -tioninas y defensinas de plantas se consideran equivalentes.

1.7.3 Clases de defensinas de plantas

Las DP se pueden agrupar en dos clases en función a la estructura de las proteínas precursoras de las que derivan:

1) En la clase A se agrupa a la mayoría de las DP, el precursor o prepéptido está compuesto por la secuencia de un péptido señal (PS) unido a la secuencia del dominio de la defensina madura en el amino terminal (N-terminal), como se muestra en la Figura 5A. Estas proteínas son secretadas y no poseen señales obvias de modificación postraducciona l o localización subcelular.

2) En la clase B se agrupa a las DP cuyo precursor está formado por la secuencia del PS, el dominio de la defensina madura y un prodominio carboxilo terminal (C-terminal) de ~33 aa (Figura 5B), que es removido proteolíticamente durante la maduración del péptido. Esta evidencia ha sido obtenida con las defensinas NaD1 de *Nicotiana glauca*, y PhD1 y PhD2 de *Petunia hybrida* (Lay *et al.*, 2003). La secuencia de los prepéptidos ha sido predicha a partir de sus

secuencias de ADNc. Estas DP son constitutivas y hasta la fecha solo se han aislado del tejido floral y de los frutos de varias especies de solanáceas.

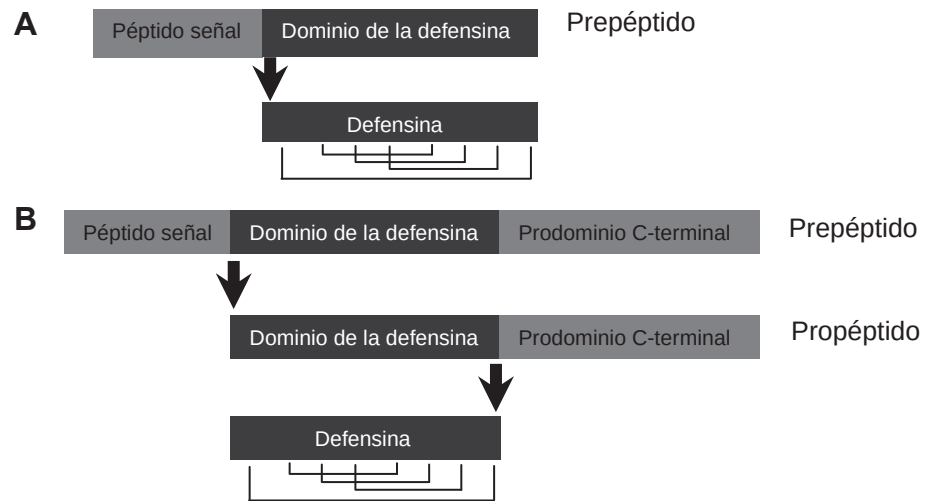


Figura 5. Clases de defensinas de plantas. Todas las DP tienen un PS en el N-terminal. A) DP clase A, el dominio de la defensina madura está unido al extremo carboxilo del PS; B) DP clase B, además del PS unido al dominio de la defensina madura poseen un prodominio ácido en el C-terminal. Los enlaces disulfuro se indican con las líneas bajo la defensina (Lay y Anderson, 2005).

La presencia de la secuencia conservada de un PS hacia el N-terminal en las DP, sugiere que estos PA son secretados (Meyer *et al.*, 1996; Thomma *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2000; Castro y Fontes, 2005). Experimentalmente se ha demostrado que la secuencia del PS de la defensina alfAFP de alfalfa (*Medicago sativa*) regula la secreción del péptido maduro hacia los espacios intercelulares del tallo en papas transgénicas (Gao *et al.*, 2000).

El prodominio C-terminal en las defensinas de las solanáceas tiene un alto contenido de aa hidrofóbicos y ácidos que coincide con otros determinantes de localización vacuolar en plantas (Lay *et al.*, 2003). En un medio con pH neutro la carga negativa del prodominio neutraliza la carga positiva del dominio de la defensina madura. Esta característica se ha observado en las tioninas y en las defensinas de mamíferos y de insectos, en las que el prodominio, a diferencia de las DP, está localizado en el N-terminal de la defensina (Hancock y Diamond, 2000; Lay y Anderson, 2005).

Con respecto a la función del prodominio C-terminal, se han propuesto varias hipótesis (Lay y Anderson, 2005):

1) Que actúa como una secuencia de localización subcelular, por lo que es importante para el tráfico subcelular normal y para el procesamiento postraducciona.

2) Que se relaciona con la maduración de las defensinas, actuando como una chaperona intramolecular.

3) Que protege a la defensina de interacciones con otras proteínas celulares o con lípidos de membrana durante la translocación en la ruta de secreción.

4) Que tiene un efecto citoprotector antes de que sea secretada la defensina.

En apoyo a la primera hipótesis, la DP NaD1 de tabaco con el prodominio C-terminal fue detectada *in situ* en vacuolas, a diferencia de las defensinas de rábano (Rs-AFP2) y alfalfa (alfAFP) que carecen de este prodominio C-terminal y se localizan en el exterior de la célula (Lay *et al.*, 2003). Las otras hipótesis no han sido estudiadas en detalle.

1.7.4 Distribución y localización de las defensinas de plantas

Las DP se han encontrado en todas las plantas estudiadas, incluso se tiene la hipótesis de que son ubicuas en el reino Plantae. Se han aislado del sorgo, el chícharo, el tabaco, la papa, la petunia, la remolacha, el rábano y varios miembros de la familia *Brassicaceae* (García-Olmedo *et al.*, 1998), en haba (*Vicia faba*) (Zhang y Lewis, 1997) y en maíz (*Zea mays*) (Kushmerick *et al.*, 1998). En el Cuadro 3 se muestra la secuencia de aa de algunas defensinas de plantas.

Se han aislado y detectado DP en diversos tejidos, principalmente en los que se encuentran más expuestos al contacto con los patógenos como los primordios foliares, las células colindantes a la cavidad subestoma, la epidermis y los estomas, se han aislado también de semillas, hojas, vainas,

tubérculos, frutos, raíces y cortezas (García-Olmedo *et al.*, 1998; Lay y Anderson, 2005).

Cuadro 3. Secuencia de aminoácidos de la región correspondiente al péptido maduro de algunas defensinas de plantas.

Especie	Péptido	Secuencia
<i>Raphanus sativus</i>	Rs-AFP1	-----ZKLC-ERPSTWVGVCNNAC--KNQCINLEK---ARHGSCNYVFPAAHKCICYFPC
<i>Nicotiana glauca</i>	NaD1	-----REC-KTESNTFPGICITKPPCFTRKACIS-E---KFTDGHG--SKILRRCLCTKPC
<i>Petunia hybrida</i>	PhD1	-----ATC-KAECPTWDSVCINKKPC--VACCKKAK---FSDGHC--SKILRRCLCTKEC
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Ah-AMP1	-----LCNERPSQTWVGNCNTAHC--DKQCQDWE---KASHGACHKRENHWKCFYFNC
<i>Sorghum bicolor</i>	Siα1	-----RVC-MGKSQHHSPFCISDRLC-SNECVKEE--GGWTAGYC----HLRYCRQKAC
<i>Hordeum vulgare</i>	ω-H	-----RIC-TGKSOHHHFPICISDKSC--ARNCVS-EHGAHWTAGYC----HLRRCTCEREC
<i>Triticum aestivum</i>	γ1-P	-----KIC-RRRSAGFKGPCMSNKNK--AQVCQ-QE---GWGGGNC--DGPFRRCCKIRQC
<i>Hordeum vulgare</i>	γ1-H	-----RIC-RRRSAGFKGPCVSNKNK--AQVCM-QE---GWGGGNC--DGFLRRCKCMRRC
<i>Pisum sativum</i>	PsD1	-----KTC-EHLADTYRGVCFTNASC--DDHCKNKA---HLISGTC----HNWKCFCTQNC
* <i>Capsicum chinense</i>	γ-tionina	-----QNNIC-KTTSKHFKGLCFADSKC--RKVC-IQE--DKFEDGHG--SKLQRKCLCTKNC
<i>Nicotiana tabacum</i>	FST	-----REC-KTESNTFPGICITKPPC--RKACIS-E---KFTDGHG--SLLRRCLCTKPC
<i>Spinacia oleracea</i>	So-D2	GIFSSRRKC-KTPSKTFKGICTRDSNC--DTSC-RYE---GYPAGDC--KGIRRRCMCSKPC
<i>Solanum tuberosum</i>	PTH1	-----RHC-ESLSHRFKGPCTRDSNC--ASVC-ETE---RFSGGNC--HGFRRCFCTKPC
<i>Zea mays</i>	γ1-zeationina	-----RVCRRRSAGFK-GVCMDSHNC--AQVC-LQE---GYGGGNC--DGIMRQCKCIRQC
Motivo conservado		-----C-----A-G-C-----C-----C-E-----G-C-----C-C-----C

* Secuencia de aa deducida a partir de la secuencia del ADNc. En el motivo conservado la letra A denota a los aa con anillos aromáticos. Basado en Broekaert *et al.*, 1995; García-Olmedo *et al.*, 1998; Lay y Anderson, 2005.

1.7.5 Estructura de las defensinas de plantas

La estructura secundaria de las DP tiene algunas similitudes con las defensinas de insectos y de mamíferos (Figura 6). Las defensinas de insecto tienen una estructura formada por 1 hélice α y 3 hojas β antiparalelas en una configuración $\beta\alpha\beta\beta$, que se estabilizan mediante enlaces disulfuro formando 2 estructuras características conocidas como:

1) El “motivo de hélice α estabilizado por cisteínas (CSH)”, integrado por 2 enlaces disulfuro que unen a las 2 cisteínas de la hélice α y que están separadas por 3 aa (CXXXC) con las otras 2 cisteínas de la tercer hoja β , las cuales se encuentran separadas por 1 aa (CXC) (Kobayashi *et al.*, 1991).

2) El “motivo de hélice α y hojas β estabilizado por cisteínas ($CS\alpha\beta$)” que contiene al motivo CSH e incluye dos cisteínas adicionales que forman un tercer enlace disulfuro y se puede representar como:

$C1^1...C2^2XXXC3^3...C4^1...C5^2XC6^3$, los superíndices 1, 2 y 3 denotan las cisteínas que se unen por el enlace disulfuro (Thomma *et al.*, 2002).

A diferencia de las defensinas de insectos, las defensinas de mamífero no poseen la hélice α , por lo tanto solo tienen tres puentes disulfuro y carecen del motivo $CS\alpha\beta$. Sin embargo, poseen la triple cadena antiparalela de hojas β que es comparable en tamaño y orientación espacial a las DP (Hill *et al.*, 1991).

La estructura terciaria de las DP se ha obtenido por resonancia magnética nuclear (H-RMN), y hasta ahora se ha determinado la estructura de 9 DP, 7 de las cuales fueron aisladas de semillas y 2 de flores (Lay y Anderson, 2005).

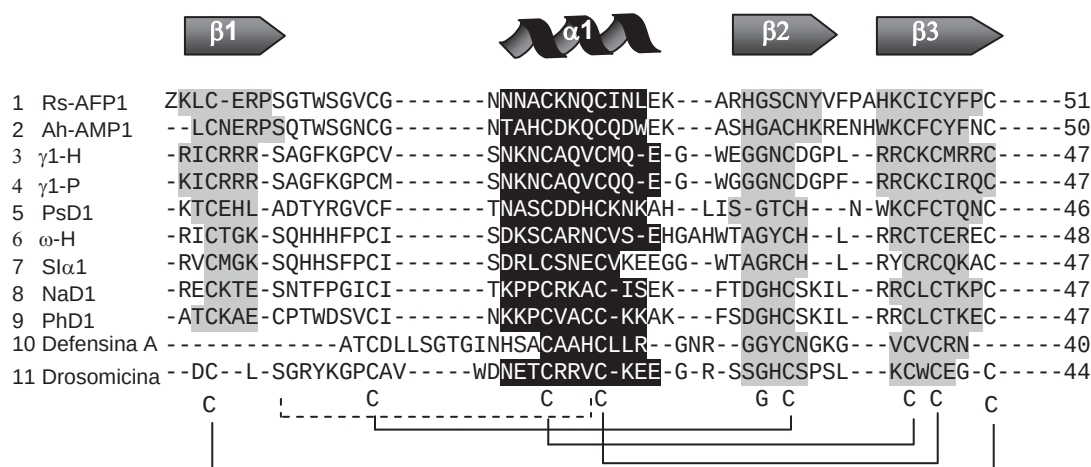


Figura 6. Comparación de las estructuras primarias y secundarias de las 9 defensinas de plantas a las que se les ha determinado su estructura terciaria. Las hojas β y la hélice α se indican en gris y negro, respectivamente. Los puentes disulfuro están representados por las líneas que unen a las cisteínas conservadas, el quinto enlace de PhD1 se indica con líneas punteadas. Las defensinas derivadas de semillas corresponden de la 1 a la 7 y las defensinas derivadas de flores son 8 y 9 (Lay y Anderson, 2005). 10 y 11 corresponden a defensinas de insectos.

La estructura terciaria típica de las DP está representada por la defensina Rs-AFP1 que posee 1 hélice α y 3 hojas β antiparalelas estabilizadas por 4 enlaces disulfuro: 3 pertenecientes al motivo $CS\alpha\beta$ y 1 más que une a las cisteínas que lo delimitan, uniando las hojas β 1 y 3. Algunas defensinas de insecto carecen del dominio correspondiente a la hoja β del N-terminal de las

DP y pueden presentar tres o cuatro puentes disulfuro (Thomma *et al.*, 2002) como se muestra en la Figura 7. El péptido PhD1 posee un quinto enlace disulfuro que refuerza la estabilidad de su molécula (Figura 7) sin alterar su configuración (Lay y Anderson, 2005).

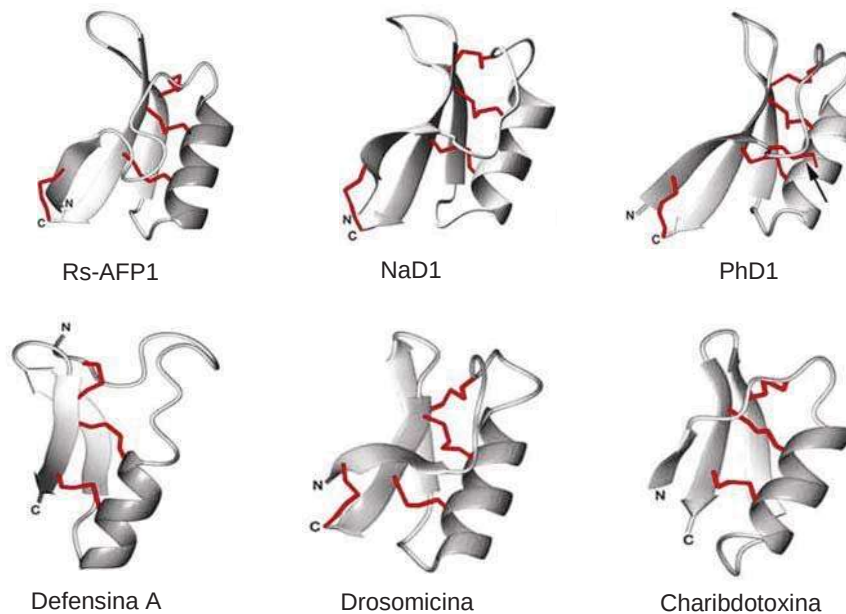


Figura 7. Representación de las estructuras terciarias de las defensinas de plantas Rs-AFP1, NaD1 y PhD1 y las defensinas de insecto Defensina A, Drosomicina y Charibdotoxina. Se indica el C-terminal y N-terminal. Los enlaces disulfuro se indican en color rojo, la flecha indica el quinto enlace disulfuro de la PhD1 (Lay y Anderson, 2005).

1.7.6 Relación entre estructura y función de las defensinas de plantas

Hasta ahora, solo se ha realizado un estudio detallado de mutagénesis dirigida para investigar la relación entre la estructura y la actividad de las DP. Se comparó la secuencia de aa de Rs-AFP2 con tres grupos de DP que tienen diferentes propiedades antifúngicas, en el grupo 1, al cual pertenece la Rs-AFP2, se agruparon DP que exhiben actividad antifúngica contra *Fusarium culmorum* y que provocan un incremento en la ramificación de sus hifas, en el grupo 2 se incluyó a DP con actividad antifúngica, pero que no causan distorsiones morfológicas en las hifas, y en el grupo 3 a DP que carecen de

actividad antifúngica. De esta manera se observó que las DP del grupo 1 y 2 tenían aa conservados que estaban ausentes en las del grupo 3, estos aminoácidos son Gln5, Thr10, Gly16 y Ala31. Además, los aa Tyr38, Phe40 y Pro41 se encuentran en el grupo 1 pero no en el grupo 2, por lo que se sugirió que podrían estar implicados en la deformación de las hifas. Mediante PCR se mutó puntualmente la secuencia de Rs-AFP2 sustituyendo los aa conservados en el grupo 1 y 2 con los aa que correspondían a esas posiciones en la secuencia de la DP Sl α 2 de sorgo que pertenece al grupo 3, y se evaluó su actividad contra *Fusarium culmorum*. De esta manera se obtuvieron variantes de Rs-AFP2 que mostraron una reducción o incremento en la actividad antifúngica. La concentración de proteína a la cual se inhibió el crecimiento del 50% de los hongos tratados (IC₅₀) con la DP Rs-AFP2 no mutada fue de 8.1 μ g/ml, mientras que las DP Rs-AFP2 mutadas mostraron valores de IC₅₀ que variaban entre los 5.4 y 200 μ g/ml. Con base en el hecho de que Rs-AFP2 es más básica y tiene de 2 a 30 veces más actividad antifúngica que su homólogo la DP Rs-AFP1, se produjeron mutantes de Rs-AFP2 en las que se sustituyó un solo aa por el aa básico Arg, de esta manera se encontró que la proteína obtenida por la sustitución de Gly9 o Val39 por Arg, fue 2.5 y 5 veces más activa contra *F. culmorum*, *Nectria hematococca* y *Verticillium dahliae* que la DP Rs-AFP2 sin mutar. Los aa importantes para la actividad antifúngica de Rs-AFP2 se muestran en la Figura 8 (De Samblanx *et al.*, 1997).

Debido a que la secuencia de aa de Rs-AFP1 y RS-AFP2 difieren solo en dos aa (Gln5 es Glu y Arg27 es Asn en Rs-AFP1) y a que se conocía la estructura tridimensional de Rs-AFP1, se asumió que Rs-AFP2 adoptaba la misma configuración tridimensional que Rs-AFP1, por lo que se utilizó la estructura de Rs-AFP1 para determinar la ubicación de los aa esenciales para la actividad antifúngica de Rs-AFP2. Se encontró que estos aa se localizan principalmente en las “asas” que unen las hojas β 2 y β 3, en los que unen la hoja β 1 y la hélice α y en la hoja β 3 (Figura 8B). Espacialmente, estos residuos se agrupan en 2 regiones adyacentes de la estructura tridimensional de RS-AFP2, la primera región está formada por los aa Tyr38, Phe40, Pro41, Ala42, Lys44 e

Ile46, a excepción de Pro-41 y Lys44, los demás aa son hidrofóbicos. La substitución de Lys44 por el aa neutro Gln provoca un decremento del 30% en la actividad antifúngica, mientras que la substitución de Val39 por Arg provoca un incremento de 2.6 veces en la actividad antifúngica, respecto a la Rs-AFP2 no mutada. La segunda región contiene a los aa Thr10, Ser12, Leu28 y Phe49, en este sitio la substitución de Gly9 por Arg incrementó la actividad antifúngica 2.5 veces en relación a la Rs-AFP2 no mutada. Esta evidencia sugiere que la carga positiva es importante para la actividad antifúngica y que estas dos regiones pueden constituir 2 sitios de unión con un receptor putativo, o bien, que cada uno de los sitios tiene una función distinta. Uno de ellos podría ser el sitio de unión al receptor de Rs-AFP2, mientras que el otro sitio podría estar involucrado en la ruptura de la membrana fúngica (De Samblanx *et al.*, 1997).

A)



B)

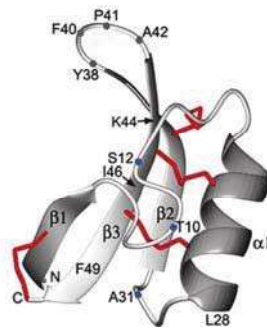


Figura 8. Ubicación de los aminoácidos importantes para la actividad antifúngica de Rs-AFP2 mostrados sobre la estructura de Rs-AFP1. A) Secuencia de aa de Rs-AFP2, las estructuras de hojas β y hélice α determinadas para Rs-AFP1 se muestran subrayadas con una y dos líneas, respectivamente; los puentes disulfuro están representados por las líneas que unen a las cisteínas; los aa esenciales para la actividad antifúngica de Rs-AFP2 se representan con negritas, la localización de estos aa se muestra en la estructura tridimensional de Rs-AFP1 en B). En azul se indican los aa localizados en las asas y en rojo los enlaces disulfuro (Lay y Anderson, 2005).

1.8 Actividad antibacteriana y antifúngica de las defensinas de plantas

Las DP poseen actividad antibacteriana contra patógenos de plantas y animales. Pueden tener actividad de amplio espectro como las fabatinas 1 y 2 que actúan contra las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* K12 y *Pseudomonas aeruginosa* y la bacteria Gram positiva *Enterococcus hirae* (Zhang y Lewis, 1997). La DP SoD1 posee actividad contra la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* y la bacteria Gram negativa *Ralstonia solanacearum* (Segura *et al.*, 1998). La Pth-St1 presenta actividad contra *C. michiganensis* y *Pseudomonas solanacearum* (Moreno *et al.*, 1994) y las DP Pp-AMP1 y Pp-AMP2 de brotes de bambú (*Phyllostachys pubescens*) son activas contra *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium rhizogenes*, *A. radiobacter*, *C. michiganensis* y *Curtobacterium flaccumfaciens* (Fujimura *et al.*, 2005). En el Cuadro 4 se indican algunas DP con actividad antibacteriana; sin embargo, la principal actividad de las DP es la antifúngica. El mecanismo de acción de las DP contra los hongos involucra probablemente la interacción con receptores específicos que pueden ser microdominios de esfingolípidos o glucosilceramidas en las MP. Casi todas las DP tienen actividad contra hongos fitopatógenos como las DP Pp-AMP1 y Pp-AMP2, que además de ser antibacterianas, presentan actividad contra los hongos *Fusarium oxysporum* y *Geotrichum candidum* (Fujimura *et al.*, 2005).

Las infecciones ocasionadas por *Candida albicans* se han incrementado recientemente debido a la aparición de cepas resistentes a los antifúngicos convencionales, por lo que se ha propuesto emplear PA para su tratamiento (Lupetti *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha realizado poca investigación respecto a la actividad *in vitro* de las DP sobre hongos patógenos de humano como *C. albicans*. Hasta el momento, se ha descrito el efecto antifúngico del PA zeamatina de *Zea mays* contra *C. albicans* (De Lucca y Walsh, 1999) y el de las DP Rs-AFP2 de rábano Dm-AMP1 de dahlia (Thevissen *et al.*, 2004).

Cuadro 4. Origen y actividad de algunas defensinas de plantas.

Péptido	Origen	Actividad
Rs-AFP2	Rábano (<i>Raphanus sativus</i>)	AF
MsDef1 y MsDef2	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> y <i>Medicago truncatula</i>)	AF
Ah-AMP1	Castaño de indias (<i>Aesculus hippocastanum</i>)	AF
alfAFP	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	AF
Pp-AMP1 y Pp-AMP2	Bambú (<i>Phyllostachys pubescens</i>)	AF
SPE10	Jícama (<i>Pachyrrhizus erosus</i>)	AF
Psd1	Chicharo (<i>Pisium sativum</i>)	AF
Pp-tionina	<i>Pyrularia pubera</i>	AB
Fabatina 1 y 2	Haba (<i>Vicia faba</i>)	AB
Pth-St1	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	AB
SoD1	Espinaca (<i>Spinaca oleracea</i>)	AB
VaD1	Judía (<i>Vigna angularis</i>)	AF, AB
Fa-AMP1 y Fa-AMP2	<i>Fagopyrum esculentum</i>	AF, AB
Tu-AMP1 y Tu-AMP2	Tulipán (<i>Tulipa gesneriana</i>)	AF, AB
SoD2, 6 y 7	Espinaca (<i>Spinaca oleracea</i>)	AF, AB
Cp-tionina	Frijol caupí (<i>Vigna unguiculata</i>)	IP
CfD2	Lluvia de oro (<i>Cassia fistula</i>)	IP
NaD1	Tabaco (<i>Nicotiana glauca</i>)	AF, IP
γ -hordotionina	Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	IA
Sl α 1-3	Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	AF, IA
γ 1-P	Trigo duro (<i>Triticum turgidum</i>)	ISP
ω -H	Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	ISP
HvAMP1	Trepadora (<i>Hardenbergia violacea</i>)	ISP
γ 1 y γ 2-zeationina	Maíz (<i>Zea mays</i>)	CCA
Sesquina	Habichuela (<i>Vigna sesquipedalis</i>)	AF, AB, CCA

AF, Actividad antifúngica; AB, Actividad antibacteriana; IP, Inhibidor de proteinasa; IA, Inhibidor de α -amilasa; ISP, Inhibidor de la síntesis de proteínas; CCA, Citotóxica para células animales. Wong y Ng, 2005; Pelegrini y Franco, 2005; Lay y Anderson, 2005.

Debido a su mecanismo de acción y a su actividad, una de las potenciales aplicaciones de las DP involucra la sobreexpresión y la generación de plantas transgénicas con una mayor protección contra el ataque de microorganismos fitopatógenos. En el Cuadro 5 se muestran algunos ejemplos de esta aplicación.

Cuadro 5. Expresión de defensinas de plantas en plantas transgénicas.

PA	Origen	Receptor	microorganismo susceptible
WT1	<i>Wasabia japonica</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>
alfAFP	<i>Medicago sativa</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
DRR230-a	<i>Pisum sativum</i>	<i>Brassica napus</i>	<i>Leptosphaeria maculans</i>
RsAFP2	<i>Raphanus sativus</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Alternaria longipes</i>
Spi1	<i>Picea abies</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Erwinia carotovora</i> , <i>Heterobasidion annosum</i>
DRR230-a DRR230-c	<i>Pisum sativum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>L. maculans</i>
BSD1	<i>Brassica campestris</i> L.	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>

Lay y Anderson, 2005.

Otro probable campo de estudio de las DP es el desarrollo de agentes antifúngicos para el control de los hongos patógenos de animales, que presenta el problema de la selección de cepas de hongos y levaduras multiresistentes, además de la generación de nuevas especies que actúan como patógenos oportunistas. Dado lo anterior es necesario encontrar compuestos que posean un mecanismo de acción distinto al de los agentes antifúngicos convencionales (Thomma *et al.*, 2003).

La toxicidad es el mayor obstáculo en el desarrollo de nuevos compuestos antifúngicos, ya que los hongos, a diferencia de las bacterias, presentan similitudes en algunas estructuras y rutas metabólicas con las células de los mamíferos, por lo tanto, la actividad de estos agentes debe ser específica y reconocer únicamente moléculas que estén presentes en los hongos pero que no se encuentren en las células de los mamíferos. En este contexto la MP y la pared celular de los hongos son un blanco atractivo, ya que la generación de resistencia es poco probable dado que involucraría un cambio en un elemento vital para estos microorganismos (Thomma *et al.*, 2003).

Los esfingolípidos son un componente esencial de las MP de los eucariotes y sus estructuras son distintas en las células de mamíferos y en las de los hongos. Se ha demostrado que la DP Dm-AMP1 tiene la capacidad de

lisar las MP de los hongos mediante la interacción específica con los microdominios de esfingolípidos (Thevissen *et al.*, 2003). La DP Rs-AFP2 reconoce específicamente la GlcCer de los hongos y no interacciona con las GlcCer de plantas y de humano. Las GlcCer de varios hongos y levaduras como *Pichia pastoris*, *Candida albicans*, *Lentinus edodes*, *Pseudallescheria boydii* y *Cryptococcus neoformans* son idénticas, y difieren estructuralmente de las GlcCer de mamíferos en un grupo metilo y en la insaturación y la longitud de la cadena del ácido graso (Thevissen *et al.*, 2004). Las DP interaccionan con estructuras específicas en la MP de los hongos, por lo que tienen potencial en el tratamiento de infecciones fúngicas, a diferencia de las defensinas de insectos y de mamíferos que tienen un espectro de acción más amplio, como la heliomicina del insecto *Heliothis virescens* que interacciona con las GlcCer de plantas y hongos (Thomma *et al.*, 2003; Thevissen *et al.*, 2004).

1.9 Otros efectos de los péptidos antimicrobianos

Inicialmente los PA fueron descritos como moléculas capaces de permeabilizar las MP de los microorganismos, e inhibir su crecimiento o matarlos. Sin embargo, poseen algunas otras funciones que permiten clasificarlos como moléculas multifuncionales (Kamysz *et al.*, 2003).

1.9.1 Los péptidos antimicrobianos como moduladores de la inmunidad innata y adquirida

Debido a su actividad antimicrobiana de amplio espectro los PA han sido clasificados como moléculas pertenecientes a la inmunidad innata, pero además de esta propiedad los PA modulan otros componentes de la misma actuando como quimiotácticos. Por ejemplo, en ratones se ha observado que las defensinas atraen células CD3⁺, mientras que en humanos atraen monocitos, células T y células dendríticas inmaduras, y el PA PR-39 atrae neutrófilos. Además, en los humanos las defensinas estimulan la expresión de TNF α e IL-1 en monocitos y de IL-8 en células epiteliales de pulmón. De manera general, la actividad quimiotáctica de las defensinas de mamíferos se

ha observado a concentraciones inferiores a las bactericidas. Dado lo anterior se considera que los PA participan en la respuesta inmune adaptativa (Kamysz *et al.*, 2003).

1.9.2 Efecto antiinflamatorio de los péptidos antimicrobianos

Los PA también inhiben la inflamación producida por bacterias. Este efecto se debe probablemente a una alteración en la producción de citocinas del hospedero, así como a la interacción de los PA con patrones moleculares asociados a los patógenos (PMAP) que son moléculas altamente conservadas de la superficie de los microorganismos patógenos. Entre estos se encuentran los lipopolisacáridos (LPS), el ácido lipoteicoico (ALT) y los peptidoglucanos en las bacterias Gram negativas, Gram positivas y hongos, respectivamente (Guarna *et al.*, 2006). Algunos ejemplos de la actividad antiinflamatoria de los PA mediante la disminución de la producción de citocinas y por interacción con los PMAP se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Ejemplos de la actividad antiinflamatoria directa e indirecta de los péptidos antimicrobianos.

PA	Actividad antiinflamatoria
Actividad antiinflamatoria en respuesta a PMAP	
CEMA (Cecropina-melitina)	Inhibe la expresión inducida por LPS de los genes de TNF- α e IL-1 en macrófagos
LL-37 (PA de humano)	Reduce la producción de TNF- α en macrófagos estimulados con LPS y ALT
CAP18 y CAP11 (Cathelicidina de humano y cuyo)	Inhibe la expresión del ARNm y de la proteína TNF- α inducida por LPS
Actividad antiinflamatoria directa	
LL-37	Regula la expresión de genes mediadores inflamatorios, como la IL-12 y la proteína inflamatoria de macrófagos
CEMA	Induce la expresión del receptor de la citocina antiinflamatoria TGF- β en macrófagos
Cathelicidina PR-39	Inhibe la actividad de la oxidasa NADPH en fagocitos y limita la respuesta proinflamatoria

Guarna *et al.*, 2006.

1.9.3 Actividad antitumoral de los péptidos antimicrobianos

Algunos PA lisan las MP de las células cancerígenas sin afectar a las células normales. Esta citotoxicidad selectiva puede deberse a una mayor interacción electrostática de los PA con algunos de los componentes de las MP. Las células cancerígenas poseen entre 3 y 9% más fosfatidilserina (FS) que las células normales, además la mayoría contienen musinas O-glicosiladas que incrementan la carga negativa de su superficie. Existen algunas otras diferencias en las células cancerígenas que podrían explicar su susceptibilidad a la acción de los PA, como la presencia de un mayor número de microvellosidades en la superficie de las células cancerígenas, lo que incrementa el área superficial de las MP y permite la unión de una mayor cantidad de PA.

Con base en la actividad bactericida y citotóxica de los PA se les puede dividir en dos grupos:

1) Grupo 1, que incluye a los PA que poseen actividad contra bacterias y células cancerígenas pero que no afectan a las células de mamífero normales, como las cecropinas de insecto y las magaininas de la piel de ranas.

2) Grupo 2, que comprende a PA tóxicos para bacterias y a células de mamífero cancerígenas y no cancerígenas, como la melitina del veneno de abeja, la taquiplesina II del cangrejo *Tachypleus gigas* y la defensina de neutrófilos de humanos (Papo y Shai, 2005).

Hasta ahora, únicamente se ha descrito el efecto citotóxico de la DP γ 1-zeationina contra la línea tumoral de rata GH3 mediante la inhibición de canales de sodio (Kushmerick *et al.*, 1998), y de la sesquina contra la línea tumoral MCF-7 de cáncer de mama y células leucémicas M1 humanas. Sin embargo, no se ha descrito el mecanismo de acción para esta DP (Wong y Ng, 2005).

1.9.4 Efecto de la concentración de los péptidos antimicrobianos

Algunos PA poseen distintos efectos biológicos en función de su concentración: a concentraciones bajas pueden influenciar la transducción de señales o la proliferación celular, mientras que a concentraciones altas pueden provocar lisis celular (Kamysz *et al.*, 2003). Por ejemplo, la defensina HNP-1 de neutrófilos de humano estimula el crecimiento de la línea celular de epitelio de pulmón humano A549 a concentraciones inferiores a los 10 µg/ml, mientras que a concentraciones cercanas a los 25 µg/ml estimula la síntesis de ADN en células de carcinoma renal (Hancock y Rozek, 2002). El PA P-Der, un híbrido de pleurocidina y dermaseptina del pez *Pleuronectes americanus* y de la rana *Phyllomedusa sauvagii*, respectivamente, inhibe la síntesis de ARN en *Escherichia coli* a 2 µg/ml, que es la concentración mínima bactericida, y a una concentración 10 veces mayor causa un incremento en el potencial de membrana (Patrzykat *et al.*, 2002).

Hasta este punto de la introducción, se han descrito algunas características generales de los PA respecto a su diversidad, clasificación, mecanismos de acción y actividad. A continuación se describirán algunas características relevantes del modelo de estudio de este trabajo de investigación, que involucra a las células endoteliales y al hongo patógeno de mamíferos *C. albicans*. Como se describió anteriormente, los PA de los mamíferos son producidos principalmente por las células epiteliales, los neutrófilos y las células de Paneth. Sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado la producción de PA por las células endoteliales, que desempeñan una importante función en la respuesta inflamatoria y por lo tanto se desconoce el efecto de la expresión de una DP sobre este tipo celular y sobre las interacciones hospedero-patógeno con *C. albicans*.

1.10 Las células endoteliales

Las células endoteliales forman una monocapa que recubre el interior de los capilares, las venas y las arterias, por lo que constituyen una barrera entre la sangre y los tejidos. Además, sirven como punto de entrada para leucocitos y linfocitos en el tejido normal o inflamado (Lee, 1992).

Se requiere la integridad de las células endoteliales para controlar el flujo de los componentes del plasma y el tráfico celular entre la sangre y las secciones subendoteliales, esta permeabilidad del endotelio comprende principalmente el paso de solutos a través de las uniones paracelulares y la absorción de nutrientes mediada por vesículas y transporte activo del lado apical al lado basal de la célula endotelial (Dejana *et al.*, 1995). Dado lo anterior, las células endoteliales juegan un papel relevante en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos como: el tráfico de leucocitos, la inflamación, la regeneración tisular, la angiogénesis, el establecimiento de tumores y la metástasis. El papel del endotelio en estos eventos, varía dependiendo de su origen macrovascular o microvascular y es influenciado por el tejido al cual está asociado (Augustin *et al.*, 1994).

Hasta el momento, no se ha reportado la producción de péptidos antimicrobianos en células endoteliales. El óxido nítrico (ON) es la única molécula producida por el endotelio con la capacidad de matar patógenos directamente. Este se produce de manera constitutiva en un estado no inducido por la enzima eNOS (Óxido Nítrico Sintasa endotelial) y en respuesta a la inflamación por la enzima iNOS (Óxido Nítrico Sintasa inducible) (Rabelink y Luscher, 2006).

1.11 *Candida albicans*

C. albicans es un hongo oportunista de reproducción asexual que forma parte de la microflora natural de la piel y las mucosas de los humanos, puede existir en dos estados morfológicos distintos:

- 1) Como levadura en gemación.
- 2) Como hifa.

C. albicans tiene la capacidad de adherirse e invadir las células endoteliales y es el responsable de la mayoría de las infecciones micóticas superficiales o sistémicas en pacientes inmunocomprometidos o inmunosuprimidos, ocupando el cuarto lugar entre los organismos causantes de infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo. Su virulencia está influenciada principalmente por su capacidad para cambiar la morfología de levadura a hifa (Filler *et al.*, 1995; Calderone *et al.*, 2000; Phan *et al.*, 2000; Hazan *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2004). *C. albicans* es el hongo aislado con mayor frecuencia de las infecciones nosocomiales ocupando el 54% de los casos, y provoca el 37% de las muertes en los pacientes infectados (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Es responsable de infecciones orales y vaginales, afecta aproximadamente al 75% de las mujeres en algún momento de su vida y entre el 5 y el 12% de ellas presentan infecciones crónicas recurrentes (Cotter y Kavanagh, 2000). Puede invadir el sistema nervioso central de neonatos y pacientes inmunosuprimidos, provocando meningitis (Jong *et al.*, 2001).

1.11.1 Factores de virulencia de *Candida albicans*

C. albicans tiene una amplia variedad de factores de virulencia que le permiten colonizar y sobrevivir en el hospedero, como:

- 1) La adhesión a la superficie de las células del hospedero y a las proteínas de la matriz extracelular del endotelio. Este proceso es dirigido por interacciones electrostáticas inespecíficas e interacciones específicas entre los ligandos de la superficie de *C. albicans* con los del hospedero.

- 2) El cambio morfológico de levadura a hifa que facilita el paso de *C. albicans* entre las capas celulares a través del tejido mediante una propiedad de las hifas denominada tigmotropismo o “sensibilidad de contacto”.

- 3) La producción de enzimas extracelulares que dañan las MP de las células del hospedero como las fosfolipasas A, B y C, y la lisofosfolipasa o la proteinasa ácida que degrada a las inmunoglobulinas IgG e IgA.

4) El cambio de fenotipo o “switch fenotípico” que le permite controlar factores como la resistencia a antifúngicos, la adherencia y la producción de enzimas extracelulares (Cotter y Kavanagh, 2000).

Estos factores de virulencia han sido demostrados en modelos *in vivo* e *in vitro* con ratones y células endoteliales de la vena del cordón umbilical y microvasculares del cerebro de humanos (Filler *et al.*, 1995; Jong *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2004).

1.11.2 Invasión de las células endoteliales por *Candida albicans*

Con la ayuda de las enzimas extracelulares *C. albicans* degrada el tejido y penetra hasta el torrente sanguíneo, donde evade el sistema inmune del hospedero mediante el cambio fenotípico o recubriéndose con plaquetas que se adhieren a sus ligandos de unión a fibrinógeno (Cotter y Kavanagh, 2000). Una vez que se encuentra en el torrente sanguíneo, se adhiere a las células endoteliales y es endocitada por éstas. La endocitosis de *C. albicans* puede ser inducida por factores que se expresan en las primeras etapas de la formación del tubo germinal en la transición de levadura a hifa (Phan *et al.*, 2000). Con la ayuda de estos factores y la fuerza mecánica que ejercen las hifas, *C. albicans* separa el endotelio de la membrana basal y accede a los tejidos adyacentes al vaso o al capilar, provocando una infección sistémica (Cotter y Kavanagh, 2000; Kumamoto y Vincles, 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1 γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*)

El ADNc de γ -tionina de *C. chinense* se obtuvo de una biblioteca de ADNc sintetizado a partir del ARNm aislado del tejido placentario de frutos inmaduros de chile habanero. Está clonado en el sitio de restricción *EcoRI* del vector pBluescript (Aluru *et al.*, 1999). La secuencia del ADNc de la γ -tionina de chile habanero se muestra en la Figura 9. Consta de 559 nucleótidos, 38 de éstos corresponden a una región no traducida en el extremo 5' (UTR), 324 pertenecen a la región traducida y los 197 restantes al UTR en el extremo 3'.

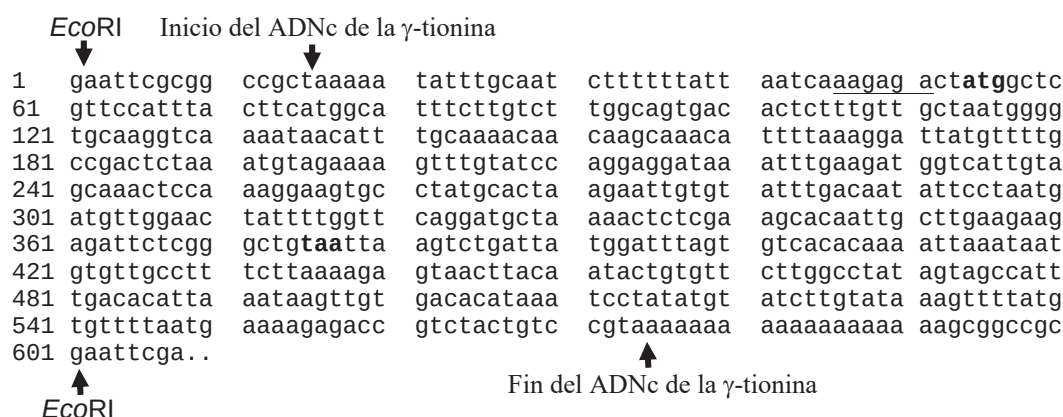


Figura 9. Secuencia del ADNc de la γ -tionina de *Capsicum chinense* clonado en el vector pBluescript SK (+/-). Los sitios de restricción *EcoRI* y la posición de inicio de la secuencia del ADNc de la γ -tionina de *C. chinense* se indican con las flechas. El codón de inicio de la traducción y el de término están marcados en negritas, las bases subrayadas corresponden al sitio Kozak.

Hasta el momento, la proteína γ -tionina no ha sido detectada o aislada, solo se ha sintetizado su ADNc, por lo que su actividad no ha sido descrita anteriormente. La proteína putativa traducida a partir de la secuencia del ADNc se muestra en la Figura 10. Consta de 107 aa, con un peso aproximado de 9 kDa, está organizada en tres regiones: un péptido señal en la región N-terminal entre los aa 1 al 25, predicho mediante el programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), una región central con 8 cisteínas espaciadas y conservadas entre los aa 28 y 75, y una región ácida en el C-terminal, que comprende los aa 76 al 107. Se han detectado transcritos de la

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

MARSIYFMAFLVLAVTLFVANGVQGQNNICKTTSKHFKGLCFADSKCRKVCIQEDKFED
 GHCSKLQRKCLCTKNCFVDNIPNDVGITLVQDAKTLEAQLLEEEILGL
 * * * *

Figura 10. Secuencia putativa de aminoácidos de la γ -tionina de *Capsicum chinense* predicha a partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc. Las letras en cursivas representan la región correspondiente al péptido señal en el extremo N-terminal, la región central marcada en negritas contiene las ocho cisteínas conservadas de las DP indicadas con un asterisco, las letras subrayadas corresponden al dominio ácido C-terminal.

Las DP con las que la γ -tionina de *C. chinense* (Aluru *et al.*, 1999) muestra mayor identidad de aa son la TPP3 de jitomate (*Lycopersicum esculentum*), FST de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y NaD1 de *Nicotiana glauca* con 63, 58 y 57% de identidad, respectivamente. TPP3 y FST no han sido purificadas como proteínas por lo que se desconoce su actividad, solo se ha aislado su ADNc, pero se plantea que desempeñan una función de defensa durante el desarrollo reproductivo. NaD1 fue aislada de flores, posee actividad antifúngica *in vitro* contra *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*. Estas tres defensinas pertenecen a las DP del tipo B. Hasta ahora, la única DP que ha demostrado actividad contra *C. albicans* es la Rs-AFP2 y posee una identidad de aa del 40% con la γ -tionina. Por lo anterior, basándose en la identidad que presenta con estas DP, es posible que la γ -tionina de *C. chinense* presente actividad antifúngica. A continuación se presentan algunas características generales de estas DP y en la Figura 11 se muestra una comparación de las secuencias de la γ -tionina con la TPP3, NaD1 y FST (Milligan y Gasser, 1995; Lay *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 1992; Terras *et al.*, 1995).

γ -tionina	:	MARSIYFMAFLVLAVTLFVANGVQG/QNNICKTTSKHFKGLCFADSKCRKVCTIQE	:	54
TPP3	:	MARSIFFMAFLVLAMMLFVITYEVEA-Q/QICKAPSQTFFGLCFMDSSCRKYCIKE	:	53
NaD1	:	MARSLCFMAFATILAMMLFVAYEVQA/RE--CKTESNTFPGICITKPPCRKACISE	:	52
FST	:	MARSLCFMAFATILAMMLFVAYEVQA/RE--CKTESNTFPGICITKPPCRKACISE	:	52
γ -tionina	:	DKFEDGHCSKLQRKCLCTKNC/VFD-NIPNDVGTILVQDAKTLEAQLLEEETLGL	:	107
TPP3	:	-KFTGGHCSKLQRKCLCTKPC/VFD-KISSEVKATLGEEAKTLSEVVLEEETMME	:	105
NaD1	:	-KFTDGHCSKILRRCLCTKPC/VFDEKMTKTGAETLAEEAKTLAAALLEEETMDN	:	105
FST	:	-KFTDGHCSKILRRCLCTKPC/VFDEKMIKTGAETLVEEAKTLAAALLEEETMDN	:	105

Figura 11. Comparación de la secuencia de aminoácidos de algunas defensinas de plantas con la γ -tionina de *Capsicum chinense*. A partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc de la γ -tionina se dedujo la secuencia de aa de su péptido maduro y se comparó con las secuencias de aa de las DP TPP3, NaD1 y FST. Los aa idénticos se encuentran en los cuadros negros, el dominio del PS está subrayado con una línea sencilla y el C-terminal con dos líneas, las diagonales dividen los tres dominios; el dominio conservado de DP corresponde a la región central.

2.2 Expresión heteróloga de las defensinas de plantas

Con la finalidad de estudiar diversos aspectos básicos y aplicados de los PA se han desarrollado organismos transgénicos que expresan o sobreexpresan estos péptidos (Hancock y Lehrer, 1998). De esta manera, se ha conferido resistencia contra microorganismos patógenos, se ha elucidado su mecanismo de acción o se ha aislado el PA. Por ejemplo, papas transgénicas que expresan la DP alfAFP de alfalfa son resistentes al ataque de *Verticillium dahliae* (Gao *et al.*, 2000). La expresión de Rs-AFP2 de rábano en *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó para evaluar el efecto de mutaciones puntuales sobre su actividad contra *Fusarium culmorum* (De Samblanx *et al.*, 1997). La expresión de la DP NaD1 de tabaco en *E. coli* se usó para generar anticuerpos en conejos y detectar su ubicación intracelular en tabaco (Lay *et al.*, 2003). Sin embargo, las DP que se han expresado en sistemas heterólogos son relativamente pocas. En el Cuadro 7 se resumen la mayoría de los organismos transgénicos expresando DP obtenidos hasta el momento. Cabe resaltar que hasta la fecha, no se han expresado DP en células de animales, el cual es el objetivo de este trabajo. El modelo de expresión heteróloga de la γ -tionina en células endoteliales puede proporcionar información acerca del uso potencial de las células de animales como sistema de expresión y evaluar la actividad de las

DP y el efecto de su expresión sobre la respuesta inflamatoria y las interacciones hospedero-patógeno es estas células.

Cuadro 7. Organismos en los que se han expresado defensinas de plantas.

PA	Origen	Receptor	Referencia
Psd1	<i>Pisum sativum</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Cabral <i>et al.</i> , 2003; Almeida <i>et al.</i> , 2001
SPE10	<i>Pachyrrhizus erosus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Song <i>et al.</i> , 2005
VrD1	<i>Vigna radiata</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Chen <i>et al.</i> , 2004
AX2	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Kristensen <i>et al.</i> , 1999
Rs-AFP2	<i>Raphanus sativus</i> L.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	De Samblanx <i>et al.</i> , 1997
Dm-AMP1	<i>Dalia merckii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Francoise <i>et al.</i> , 2002
RsAFP2	<i>Raphanus sativus</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Francoise <i>et al.</i> , 2002
WT1	<i>Wasabia japonica</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Saitoh <i>et al.</i> , 2001
alfAFP	<i>Medicago sativa</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Gao <i>et al.</i> , 2000
DRR230-a	<i>Pisum sativum</i>	<i>Brassica napus</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999
RsAFP2	<i>Raphanus sativus</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Terras <i>et al.</i> , 1995
Spi1	<i>Picea abies</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Elfstrand <i>et al.</i> , 2001
DRR230-a	<i>Pisum sativum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Lai <i>et al.</i> , 2002
DRR230-c			
BSD1	<i>Brassica campestris</i> L.	<i>Nicotiana tabacum</i>	Park <i>et al.</i> , 2002
BSD1	<i>Brassica campestris</i> L.	<i>Escherichia coli</i>	Park <i>et al.</i> , 2002
NaD1	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Escherichia coli</i>	Lay y Anderson, 2005

2.3 Las células endoteliales como modelo de estudio de las interacciones hospedero-patógeno

Los cultivos *in vitro* de células endoteliales representan una herramienta útil en el estudio de las interacciones de los microorganismos patógenos con el endotelio. En el Cuadro 8 se muestran algunos ejemplos de estudios *in vitro* de la interacción hospedero-patógeno en células endoteliales. Estos modelos permiten elucidar los mecanismos básicos de interacción y en ocasiones correlacionar el efecto observado *in vitro* con el sistema *in vivo*, sobre todo en experimentos en los que no es posible emplear el modelo *in vivo*, como en el estudio de infecciones en humanos.

En un experimento realizado por Sánchez *et al.* (2004) se correlacionó la capacidad de *Candida albicans* para dañar el endotelio de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) *in vitro*, con su capacidad para provocar infecciones letales en ratones *in vivo*, con lo que se comprobó que este modelo *in vitro* puede ser usado como una estrategia para buscar e identificar algunos factores

de virulencia relevantes en la candidiasis diseminada hematógicamente (Sánchez *et al.*, 2004).

Algunos modelos *in vitro* permiten validar los efectos observados en otro modelo de células endoteliales. Por ejemplo, en un modelo *in vitro* de meningitis causada por *Escherichia coli* se validó el efecto observado en células endoteliales microvasculares de cerebro (BMEC) de humanos con BMEC de ratas (Stins *et al.*, 1999). Por lo tanto, los modelos endoteliales pueden ser usados para evaluar diversas interacciones hospedero-patógeno y algunos de los efectos observados en un modelo endotelial *in vitro* pueden ser extrapolados tanto a otros modelos *in vitro* como *in vivo*.

Cuadro 8. Modelos de estudio de interacción hospedero-patógeno utilizando células endoteliales de diversos orígenes.

Patógeno	Origen del endotelio	Referencia
<i>Candida albicans</i>	BAEC de bovino BMEC de humano HUVEC de humano HUVEC de humano	Zink, 1996 Jong <i>et al.</i> , 2001 Phan, 2000; Orozco, 2000 Sánchez <i>et al.</i> , 2004
<i>Staphylococcus aureus</i>	BAEC de bovino BAEC de bovino	Hamill <i>et al.</i> , 1986 Vann y Proctor, 1987
<i>Escherichia coli</i>	BMEC bovinas y humanas BMEC de rata y humano	Huang <i>et al.</i> , 1995 Stins <i>et al.</i> , 1999

BAEC: células endoteliales de aorta de bovino; BMEC: células endoteliales microvasculares de cerebro; HUVEC: células endoteliales de vena del cordón umbilical humano.

Hasta ahora la γ -tionina no ha sido purificada como proteína, por lo que se desconoce su actividad. Sin embargo, debido a que algunas DP poseen actividad antimicrobiana y citotóxica, es probable que la γ -tionina tenga alguno de estos efectos. En este sentido, la expresión heteróloga de proteínas representa una alternativa para evaluar el efecto de esta DP, para lo cual se eligió a las células endoteliales como modelo de expresión, estas células poseen algunas características que las hacen candidatos para la expresión de la γ -tionina:

1) La γ -tionina pertenece a las DP de la clase B, por lo que es necesario un procesamiento postraducciona para producir el péptido maduro, es probable que las células endoteliales, por ser un organismo eucariote, pueda realizar estas modificaciones.

2) Hasta el momento no se ha reportado la actividad citotóxica de una DP sobre células de mamífero normales, es decir que no sean cancerígenas.

3) La expresión heteróloga de una DP en células endoteliales permite estudiar el efecto de un PA sobre la regulación de la respuesta inflamatoria en este tipo celular, que desempeña una función importante en la respuesta inflamatoria en este tipo celular.

4) Algunos microorganismos pueden invadir a las células endoteliales. El modelo de expresión propuesto en este trabajo de investigación permite evaluar el efecto de la expresión de un PA sobre las interacciones hospedero-patógeno en este tipo celular.

5) Debido a que hasta el momento no se ha reportado la expresión de una DP en células de mamífero, este modelo de expresión permitiría evaluar la posibilidad de usar a las células de mamífero como una herramienta biotecnológica para la expresión de PA.

3. HIPÓTESIS

La γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense* L.) producida en células endoteliales tiene actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos, y es citotóxica contra células tumorales humanas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

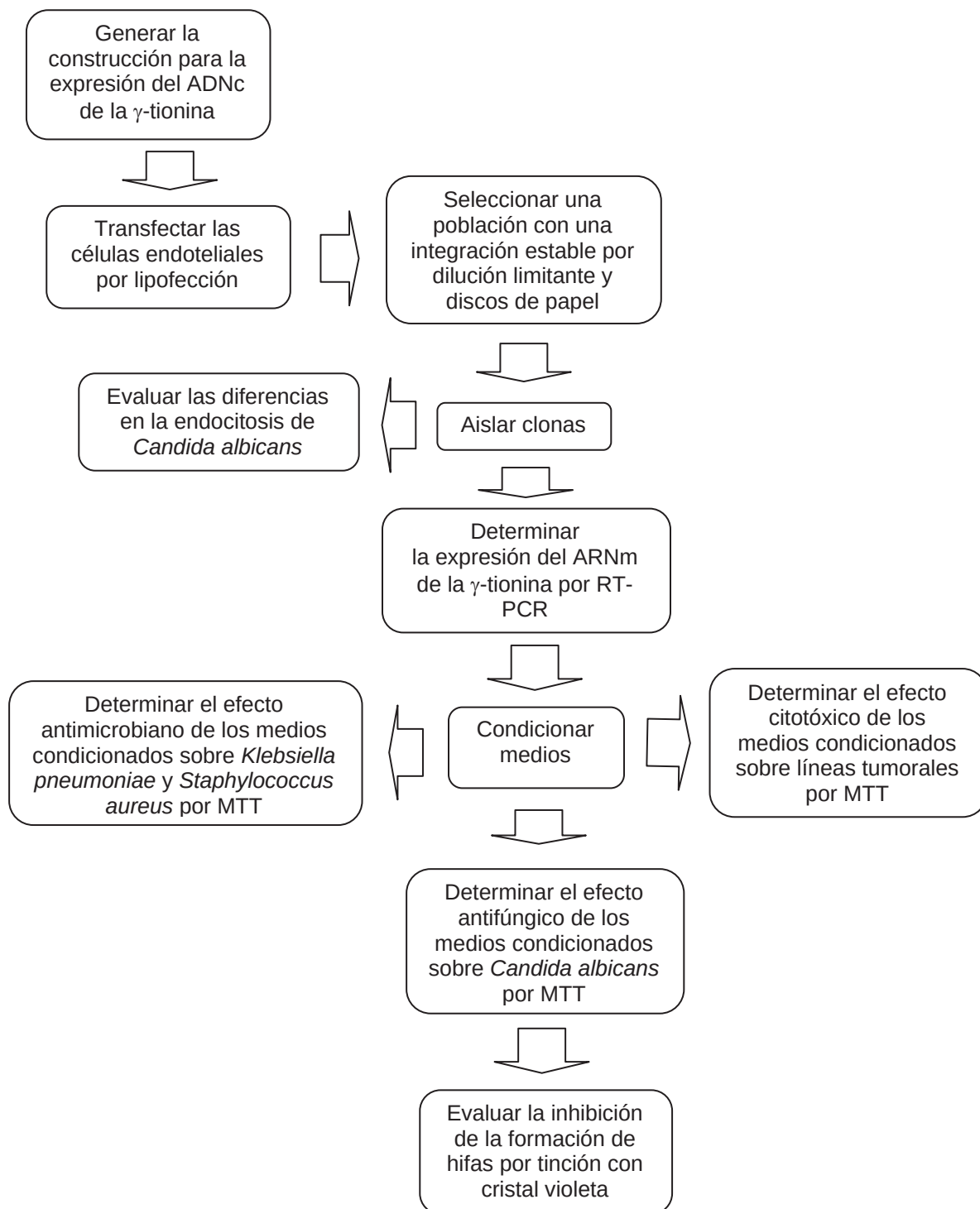
Expresar el ADNc de la γ -tionina de *C. chinense* en células endoteliales bovinas inmortales (BVE-E6E7) y evaluar el efecto del medio condicionado sobre *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* y las líneas tumorales humanas MCF-7, A549 y HeLa.

4.2 Objetivos específicos

1. Obtener una construcción para la expresión del ADNc de la γ -tionina en células de mamíferos.
2. Seleccionar células BVE-E6E7 transfectadas establemente con el ADNc de la γ -tionina de *C. chinense*.
3. Determinar la expresión del ARNm de la γ -tionina de *C. chinense* en las células transfectadas.
4. Evaluar el efecto de los medios condicionados sobre la viabilidad de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* y las líneas tumorales humanas MCF-7, A549 y HeLa.
5. Aislar y caracterizar clones de las células BVE-E6E7 transfectadas establemente con el ADNc de la γ -tionina de *C. chinense*.
6. Evaluar la endocitosis de *C. albicans* en las células transfectadas.
7. Detectar el péptido antimicrobiano γ -tionina en los medios condicionados.

5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

5.1 Diagrama general de la estrategia metodológica



6. RESULTADOS

**Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin
expressed by endothelial cells**

Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells

José L. Anaya-López · Joel E. López-Meza ·
Victor M. Baizabal-Aguirre ·
Horacio Cano-Camacho ·
Alejandra Ochoa-Zarzosa

Received: 21 December 2005 / Accepted: 30 March 2006 / Published online: 23 June 2006
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

Abstract Plant defensins are antimicrobial peptides that exhibit mainly antifungal activity against a broad range of plant fungal pathogens. However, their actions against *Candida albicans* have not been extensively studied. The mRNA for γ -thionin, a defensin from *Capsicum chinense*, has been expressed in bovine endothelial cells. The conditioned medium of these cells showed antifungal activity on germ tube formation (60–70% of inhibition) and on the viability of *C. albicans* (70–80% of inhibition). Additionally, *C. albicans* was not able to penetrate transfected cells. Conditioned medium from these cells also inhibited the viability (~80%) of the human tumor cell line, HeLa.

Keywords Antimicrobial peptides · *Candida albicans* · *Capsicum chinense* · Cytotoxic · Defensin · Endothelial cells

Introduction

Innate immune response of plants, invertebrates and vertebrates shares conserved mechanisms, such as the production of cationic antimicrobial peptides (defensins), which were originally named γ -thionins in plants. They are small basic peptides that have a characteristic three-dimensional folding pattern stabilized by eight disulfide-linked cysteines (Thomma et al. 2002). To date, most plant defensins studied exhibit antifungal activity against a broad range of fungi, mainly plant pathogens. Furthermore, cytotoxic activity of plant defensins against human tumor cell lines has been reported for sesquin from ground beans (Pellegrini and Franco 2005; Wong and Ng 2005). However, the effects of plant defensins on pathogenic fungi of humans, such as *Candida albicans*, have been poorly studied (Pellegrini and Franco 2005).

Candida albicans is an opportunistic fungal pathogen that may be present as a normal component of the human microflora. It is responsible for a variety of diseases in the immuno-compromised or immuno-suppressed hosts ranging from superficial to systemic mycoses (Cotter and Kavanagh 2000). During systemic infections, vascular endothelium plays a critical role, since *C. albicans* is able to adhere, penetrate and damage endothelial cells to gain access to other tissues (Filler et al. 1995). *C. albicans* can exist in two

J. L. Anaya-López · J. E. López-Meza ·
V. M. Baizabal-Aguirre · H. Cano-Camacho ·
A. Ochoa-Zarzosa (✉)
Centro Multidisciplinario de Estudios en
Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás
de Hidalgo, Apdo. Postal 53, Administración
Chapultepec, C.P. 58262 Morelia, Michoacán, México
e-mail: ochoaz@zeus.umich.mx

morphologically distinct forms: budding blastospores or hyphae. The hyphal form may help *C. albicans* to invade the endothelial cells and is considered as one of the *C. albicans* virulence factors (Cotter and Kavanagh 2000). Adhesion, invasion and damage of *C. albicans* to endothelial cells have been demonstrated using in vivo and in vitro models (Jong et al. 2001; Sánchez et al. 2004). On the other hand, the frequency of *C. albicans* infections has increased with the emergence of strains resistant to currently used antifungal drugs. Therefore, antimicrobial peptide such as plant defensins, are promising candidates for the treatment of *C. albicans* infections (Lugetti et al. 2002; Thevissen et al. 2004).

In this work we obtained clones of transfected bovine endothelial cells that express different levels of the mRNA for the defensin, γ -thionin, from *Capsicum chinense*. The conditioned media from these clones showed antifungal activity against germ tube formation and viability of *C. albicans*, which correlates with the level of expression for the defensin γ -thionin. Additionally, we detected cytotoxic activity in the conditioned media from the clones over the viability of HeLa cells.

Materials and methods

Organisms

The human clinical isolate *C. albicans* ATCC 10231 was used.

Cell cultures

All the reagents for the cell cultures were purchased from Gibco/BRL. The bovine endothelial cell line, BVE-E6E7, immortalized with the human papillomavirus type 16 E6E7 oncogen, was used to express γ -thionin (Cajero-Juárez et al. 2002). The human tumor cell line, HeLa, was obtained from ATCC. Cells were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 100 U penicillin and streptomycin/ml and grown in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

Construction of expression vector

γ -Thionin cDNA from *Capsicum chinense* cloned into the pBluescript vector was kindly donated by Jeanne Curry (Aluru et al. 1999). For transfection assays the γ -thionin cDNA was cloned into the mammalian expression vector pTracer-EF/V5-His (pTC, Invitrogen), and the construction was denominated pTC γ . To obtain the construction, the γ -thionin cDNA was excised from pBluescript with *EcoRI*. Then, the fragment was subcloned into the *EcoRI* site of pTC. This vector contains the resistance gene for zeocin and the reporter gene for the green fluorescent protein (GFP), which allows the selection of transfected cells by antibiotic resistance and fluorescence microscopy, respectively. The fusion was confirmed by sequencing.

Transfection of BVE-E6E7 cells with pTC γ

BVE-E6E7 cells were stably transfected with pTC γ by lipofection using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Transfected cells were selected in Optimem medium containing 500 μ g zeocin/ml (Invitrogen) for 2 weeks. BVE-E6E7 cells were also transfected with pTC and used as negative control. In both cases, the selected cells were maintained with 200 μ g zeocin/ml. The final selection step was performed by expression of GFP. From this polyclonal population, colonies stably transfected were sub cloned by limiting dilution and cloning discs (Sigma). The polyclonal population (C₀) and two stable clones (S₁ and S₂) were selected and analyzed through this study.

Reverse transcription-polymerase chain reaction and sequencing

Expression of γ -thionin by transfected BVE-E6E7 cells was analyzed by reverse transcription PCR (RT-PCR). Total RNA of transfected clones was extracted with Trizol (Invitrogen) according to manufacturer's instructions and genomic DNA contamination was removed from RNA sample by DNase I treatment (Sigma). RT reaction was performed as previously described (Ochoa et al. 2001). The primers (Invitrogen)

used to amplify the complete coding region of the γ -thionin transcript were: forward 5'-ATG GCT CGT TCC ATT TAC TTC-3' and reverse 5'-TTA CAG CCC GAG AAT CTC TTC-3', which amplify a product of 324 bp. Primers to amplify β -actin (Torner et al. 1999) were used to verify the integrity of the RNA as well as the efficiency of the RT. The amplification programs for each primer combination consisted of 25 cycles and an annealing temperature of 55°C. The PCR products were sequenced to confirm specific amplification of γ -thionin with a BigDye terminator sequencing kit v 3.1 (Applied Biosystems) and an automated ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Sequencer (Perkin-Elmer). RNA as template (control without RT) and cDNA synthesized from BVE-E6E7 cells non-transfected or transfected only with pTC vector were used as negative controls. The densitometric analysis of PCR products was performed using the RFLPScan software (v. 2.1, Scanalytics) at a resolution setting of 300–600 dpi.

Transfected cells conditioned media

C₀, S₁ and S₂ clones and non-transfected BVE-E6E7 cells were grown at confluence in p100 Petri dishes (Costar). Culture medium was replaced with 5 ml of Optimem medium without serum and antibiotics, and the cells were cultured during 24 h. Conditioned media (CM) were clarified by centrifugation (10 min, 1200g). The concentration of protein was determined by the Bradford method and pH was adjusted at 7.5.

Fungicidal activity by germ tube formation assay

Germ tube formation assay was performed according to Brayman and Wilks (2003). A synchronized 48 h culture of *C. albicans* maintained at 25°C without shaking was centrifuged (10 min, 400g) to collect the cells (1×10^5) which were resuspended in different concentrations of CM, and cultured in 96-well flat bottom polystyrene plates at 37°C for 4 h. The medium was discarded by inverting the plates. The cells were washed once by immersion in 70% (v/v) ethanol, which was discarded, and then 200 μ l 0.25% SDS was

added to each well. The SDS was decanted and the plates were washed three times by immersion in distilled water. Germ tubes, attached to the wells, were stained for 15 min with 100 μ l 0.02% Crystal Violet dissolved in phosphate-buffered saline (PBS). The dye solution was removed by inverting the plates, and the plates were washed three times with water, once with 0.25% SDS, and twice with water. After the plates were dried, 200 μ l 2-propanol containing 0.04 M HCl and 50 μ l 0.25% SDS were added to the wells and mixed briefly. Absorbance was determined at 590 nm using a microplate spectrophotometer. Optimem medium was used as positive control of *C. albicans* germ tube formation and 1 ng amphotericin B/ml as a negative control. All assays were run in triplicates.

Fungicidal activity by MTT colorimetric method

C. albicans cells (1×10^5) were incubated with different concentrations of CM for 24 h at 37°C in a 96-well flat-bottom plate. Then, 10 μ l of 5 mg MTT/ml PBS was added to each well and incubated for 4 h at 37°C. Finally, 100 μ l 2-propanol/1 M HCl (19:1 v/v) was added to dissolve the formazan crystals. Measurements were done with a microplate spectrophotometer at 595 nm (Jahn et al. 1995). Wells containing Optimem medium were used as background controls. Amphotericin B (1 ng/ml) was used as negative control of viability. All assays were run in triplicates.

Endocytosis assays

Confluent clones and non-transfected BVE-E6E7 cells were plated on 6-well plates and washed three times with PBS prior to infection with *C. albicans*. About 1×10^6 yeast cells/well from an overnight culture were used as inoculum and were incubated with the endothelial cells in RPMI medium for 4 h in 5% CO₂ at 37°C. Then, the cells were washed three times with PBS and incubated with 1 ng amphotericin B/ml by 2 h. Finally, transfected and non-transfected BVE-E6E7 monolayers were detached with trypsin-EDTA (Sigma) and lysed with 250 μ l of sterile distilled water. Endothelial cell lysates were

diluted 100-fold, plated in triplicate on YPD agar and incubated overnight at 37°C. The number of CFU was determined by the standard colony counting technique.

Cytotoxic assays

The human tumor cell line HeLa was plated in 96-well flat-bottom plates at a density of 1×10^4 cells/well with different concentrations of CM during 24 h at 37°C. Measurement of viability was performed as described above for viability of *C. albicans*. All assays were run in triplicates.

Data analysis

Data were obtained from three independent experiments performed each in triplicate and were compared by analysis of variance and Student's *t* test. The results are reported as means $\pm$ the standard errors (SE).

Results and discussion

The pTC γ construction used in this study is shown in Fig. 1A. The expression of γ -thionin is directed

by the human elongation factor 1- α (EF1- α) promoter, while the expression of the GFP-zeocin resistance gene fusion is directed by the human cytomegalovirus promoter (CMV). EM7 promoter allows the expression of GFP-zeocin in *Escherichia coli*. The γ -thionin cDNA contains its own polyadenylation sequence.

A polyclonal population of BVE-E6E7 cells (C_0) transfected with pTC γ and selected with zeocin observed under fluorescence microscopy is shown in Fig. 1B. Fluorescence of the clone S_1 is shown in Fig. 1C, which was detected in 100% of the cells and also indicates the stable transfection in this clone.

In order to analyze the expression of γ -thionin in the clones, RT-PCR analysis was performed. Integrity and efficiency of RT was confirmed by the amplification of beta actin in BVE-E6E7 cells only transfected with pTC vector, and in C_0 , S_1 and S_2 clones (Fig. 2A, lanes 2, 3, 4, and 5, respectively). Negative controls using RNA as templates from these cells were also used (Fig. 2A, lanes 6, 7, 8 and 9, respectively). The expression of γ -thionin was confirmed by RT-PCR analysis. Figure 2B shows the amplification of the 324 bp γ -thionin fragment corresponding to the cDNA from pTC γ (lane 2,

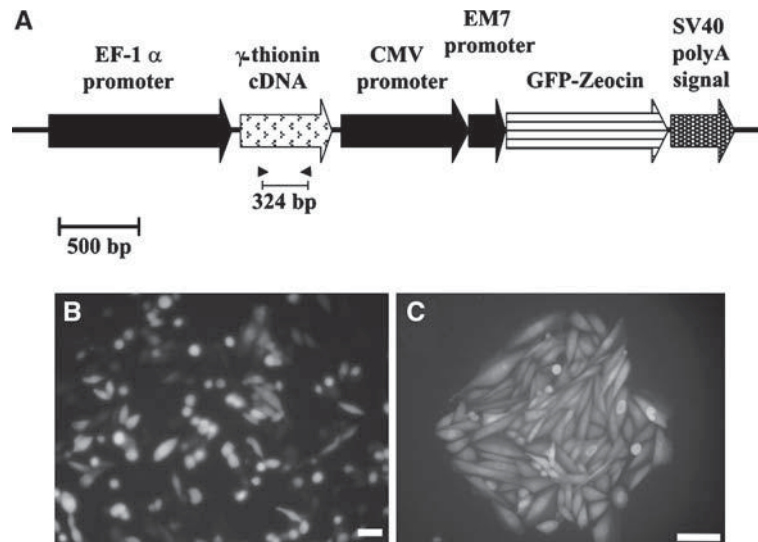


Fig. 1 The pTC γ construction and expression of GFP in transfected endothelial cells. **(A)** pTC γ construction used to transfect BVE-E6E7 cells. This construction contains the EF1- α promoter, γ -thionin cDNA, CMV promoter, EM7 promoter, GFP-zeocin resistance gene and SV40

polyadenylation sequence. **(B)** Polyclonal population of BVE-E6E7 cells transfected with pTC γ visualized under fluorescence, which was named C_0 . **(C)** Clone S_1 analyzed in this study, which was obtained from C_0 . The 100% of the cells from S_1 express the GFP. Scale bar = 20 μ m

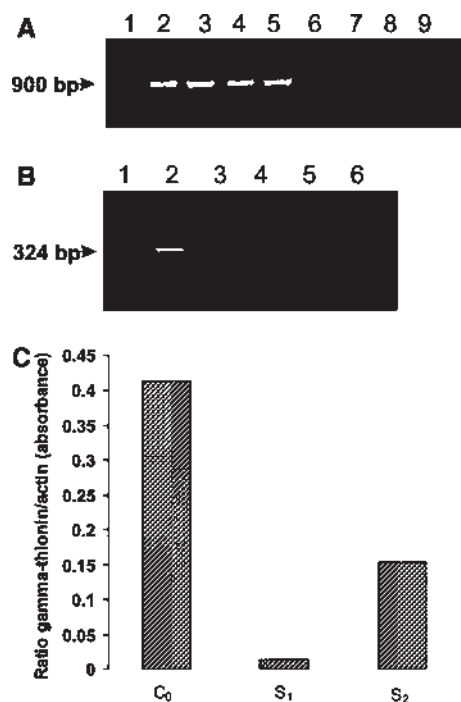


Fig. 2 Expression of γ -thionin by transfected endothelial cells. **(A)** RT-PCR analysis that shows the amplification of beta actin in BVE-E6E7 cells transfected and non-transfected. The amplification of beta actin from the cDNA of non-transfected BVE-E6E7 cells and from the clones C₀, S₁ and S₂ is shown in lanes 2, 3, 4, and 5. The lack of β -actin amplification is shown in negative controls using total RNA as template from non-transfected BVE-E6E7 cells and from the clones C₀, S₁ and S₂ (lanes 6, 7, 8 and 9, respectively). The 1 kb molecular weight marker (Invitrogen) was also included (lane 1). **(B)** RT-PCR analysis that shows the amplification of γ -thionin in different endothelial cell clones. Lane 1 corresponds to the 1 kb molecular weight marker (Invitrogen), lane 2 contains the positive control which consisted in the pTC γ construction. The lack of the expression of γ -thionin mRNA in non-transfected BVE-E6E7 cells is shown in lane 3. The expression of γ -thionin mRNA in the clones C₀, S₁ and S₂ is shown in lanes 4, 5 and 6, respectively. **(C)** Densitometric analysis for γ -thionin mRNA expression in each clone. Each bar shows the relative γ -thionin mRNA expression in relation to beta actin mRNA expression

positive control), and from the C₀, S₁ and S₂ clones (lanes 4, 5 and 6, respectively). Specific amplification was confirmed by sequencing of the PCR products (data not shown) and by the absence of amplification in the negative control [BVE-E6E7 cells only transfected with pTC vector (Fig. 2B, lane 3)]. The relative amount of γ -thionin mRNA produced by the C₀, S₁ and S₂ clones is shown in Fig. 2C. The polyclonal popu-

lation C₀ showed the higher level of γ -thionin mRNA expression (~3-fold) in relation to S₁ and S₂ clones. These differences can be attributable that C₀ clone is composed by an heterogeneous population of transfected cells, which may contain several copies of the transgene.

In order to analyze the fungicidal activity, CM from C₀, S₁ and S₂ clones and non-transfected BVE-E6E7 cells were tested on viability and germ tube formation of *C. albicans*. The fungicidal activity of different concentrations of the CM produced by the transfected clones is shown in Table 1. The highest fungicidal activity was detected in the CM from C₀ cells, which correlates with the γ -thionin mRNA expression detected by RT-PCR analysis (Fig. 2C). The same concentrations of CM from S₁ and S₂ showed lower and moderate fungicidal activity, respectively, in relation to C₀ cells.

In *C. albicans*, hyphal development is first observed by the induction of germ tube formation, which is regulated by several environmental stimuli including serum, nitrogen concentration, pH and temperature (Calderone et al. 2000). This event requires de novo synthesis of mRNA and protein (Imanishi et al. 2004). The γ -thionin cDNA used to transfect BVE-E6E7 cells encodes for a signal peptide of 25 amino acids located at the N-terminal of the mature peptide (Aluru et al. 1999), suggesting that defensin might be secreted by the C₀, S₁ and S₂ clones to culture medium, and inhibits the *C. albicans* development according to crystal violet staining and MTT analysis. MTT assay has been widely used to evaluate the viability of *C. albicans* in response to antifungal drugs (Jahn et al. 1995). The possible mechanisms by which *C. chinense* γ -thionin produced by the analyzed clones inhibits germ tube formation and viability of *C. albicans* remain unknown. Recently has been reported the antifungal activity of the radish defensin RsAFP2 against the growth of *C. albicans* in liquid medium (Thevissen et al. 2004). Additionally, there is evidence suggesting the specific interaction of RsAFP2 and other defensins from insects (heliomicin) with glucosylceramides located on the fungal plasma membrane (Thevissen et al. 2004).

The endocytosis of *C. albicans* in C₀, S₁ and S₂ clones was reduced in relation to non-transfected

Table 1 Effect of conditioned media from transfected endothelial cells on viability and germ tube formation of *Candida albicans*

Cells	Total Protein (μ g)	Viability ^a		Germ tube formation ^b	
		Absorbance	Inhibition (%) ^c	Absorbance	Inhibition (%) ^c
BVE-E6E7	1.8	0.22 $\pm$ 0.014		0.44 $\pm$ 0.006	
	0.9	0.27 $\pm$ 0.010		0.47 $\pm$ 0.021	
	0.45	0.25 $\pm$ 0.018		0.43 $\pm$ 0.028	
C ₀	1.8	0.07 $\pm$ 0.002	69 ^d	0.07 $\pm$ 0.006	84 ^d
	0.9	0.11 $\pm$ 0.012	58 ^d	0.12 $\pm$ 0.033	73 ^d
	0.45	0.11 $\pm$ 0.003	56 ^d	0.14 $\pm$ 0.011	68 ^d
S ₁	1.8	0.17 $\pm$ 0.006	22 ^e	0.32 $\pm$ 0.025	27 ^e
	0.9	0.22 $\pm$ 0.010	12	0.37 $\pm$ 0.007	20 ^e
	0.45	0.22 $\pm$ 0.013	12	0.28 $\pm$ 0.031	36 ^e
S ₂	1.8	0.13 $\pm$ 0.004	41 ^d	0.14 $\pm$ 0.007	68 ^d
	0.9	0.22 $\pm$ 0.011	19 ^e	0.16 $\pm$ 0.010	66 ^d
	0.45	0.19 $\pm$ 0.020	21 ^e	0.16 $\pm$ 0.010	64 ^d

^aData represent the mean value $\pm$ SE of three independent experiments of MTT reduction

^bData represent the mean value $\pm$ SE of three independent experiments of crystal violet staining

^cPercentage of inhibition considering the effect of BVE-E6E7 cells as 0%

^d $P < 0.001$ in relation to the effects of CM from BVE-E6E7 cells

^e $P < 0.01$ in relation to the effects of CM from BVE-E6E7 cells

cells. A comparison of the CFU of *C. albicans* internalized in C₀ and in non-transfected cells is shown in Fig. 3. Table 2 shows the endocytosis of *C. albicans* by C₀, S₁ and S₂ clones. The inhibition of internalization detected in C₀, S₁ and S₂ clones may be the consequence in the alteration of *C. albicans* membrane by the γ -thionin, which in turn can modify the binding proteins to endothelial cells (Phan et al. 2005). It has been suggested that *C. albicans* hyphae are able to promote their own

internalization (Kumamoto and Vences 2005). Thus, the inhibition of endocytosis is in agreement with the inhibition detected in germ tube formation.

The cytotoxicity effect of CM against HeLa cells is shown in Fig. 4. All clones exhibited a dose-dependent effect on HeLa viability. The cytotoxic effect against tumor cell lines of other plant antimicrobial peptides has been reported elsewhere (Pellegrini and Franco 2005; Wong and Ng 2005).

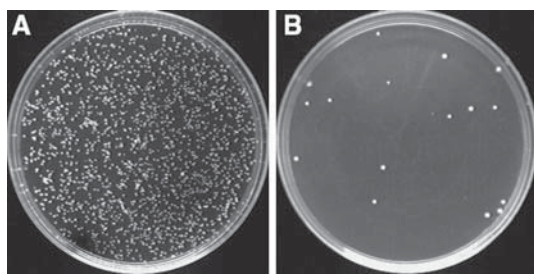


Fig. 3 The CFU recovered of endocytosed *C. albicans* by C₀ and non-transfected cells. **(A)** *C. albicans* CFU recovered after the invasion assay in non-transfected BVE-E6E7 cells using the invasion conditions described in Material and methods. **(B)** *C. albicans* CFU recovered after the invasion assay in C₀ cells using the same invasion conditions that non-transfected cells. Dilutions 1:100 from lysates are shown in both clones

Table 2 Endocytosis of *Candida albicans* in transfected cells

Cells	c.f.u./Cell ^a	Inhibition (%) ^b
BVE-E6E7	0.100 $\pm$ 0.005	
C ₀	0.001 $\pm$ 0.0007	99 ^c
S ₁	0.013 $\pm$ 0.003	87 ^c
S ₂	0.018 $\pm$ 0.002	82 ^c

^aData represent the mean value $\pm$ SE of three independent experiments, and are presented as the ratio of internalized fungi to the number of cells

^bPercentage of inhibition considering the effect of BVE-E6E7 cells as 0%

^c $P < 0.01$ in relation to the uptake of *C. albicans* by BVE-E6E7 cells

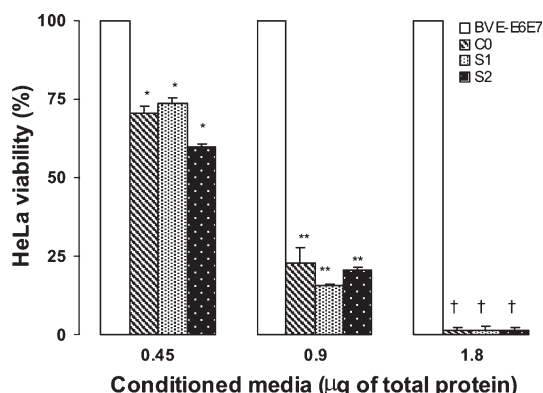


Fig. 4 HeLa viability in the presence of CM from transfected endothelial cells. Different concentrations of CM from non-transfected BVE-E6E7 cells and from the clones C₀, S₁ and S₂ were used to test the viability of the human tumor cell line HeLa, by measuring the reduction of MTT to formazan. The inhibition of viability of HeLa cells was dose dependent of the CM from the clones C₀, S₁ and S₂. The effect of CM from non-transfected BVE-E6E7 cells was considered as 100% for each concentration. Bars represent the mean value $\pm$ SE of three independent experiments of MTT reduction. * $P < 0.001$, ** $P < 0.005$ y † $P < 0.05$ in relation to the effect of the same concentration of CM from non-transfected BVE-E6E7 cells

The presence of a high affinity receptor for plant defensins on fungal membrane has been previously suggested (Thevissen et al. 2004; Pellegrini and Franco 2005), which may explain the different effects detected of CM from transfected cells. The antifungal activity of CM may involve the interaction of the γ -thionin with receptors located on *C. albicans*, whereas the cytotoxic activity may be the consequence of membrane alteration and disruption of HeLa cells.

In conclusion, this work reports the establishment of endothelial cell clones that have different levels of expression of the defensin γ -thionin mRNA from *Capsicum chinense*. CM from these clones exhibited inhibitory properties against germ tube formation, viability and internalization of *C. albicans*, and cytotoxic effects against the human tumor cell line, HeLa. The level of γ -thionin mRNA expression correlates with the antifungal activity of CM. Results from this work point to the potential use of defensins from plants in the treatment of *C. albicans* mycoses, in the

in vitro study of *C. albicans*–endothelial cell interaction, and in the development of new anti-cancer drugs.

Acknowledgments Authors thank the invaluable support of Elsa Karina Aragón Delgado in the germ tube formation assays. J.L.A.L. was supported by scholarships from CONACyT and UMSNH. This work was supported by grants from Coordinación de la Investigación Científica (UMSNH, 14.1) and CONACyT (J-46400) to A.O.Z.

References

- Aluru M, Curry J, O'Connell MA (1999) Defensin or gamma-thionin-like gene (Accession No. AF128239) from Habanero Chile. *Plant Physiol* 120:633
- Brayman T, Wilks W (2003) Sensitive assay for antifungal activity of glucan synthase inhibitors that uses germ tube formation in *Candida albicans* as an end point. *Antimicrob Agents Chem* 47:3305–3310
- Cajero-Juárez M, Avila B, Ochoa A, Garrido-Guerrero E, Varela-Echavarría A, Martínez de la Escalera G, Clapp C (2002) Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur J Cell Biol* 81:1–8
- Calderone R, Suzuki S, Cannon R, Chos T, Boyd D, Caleras J, Chibana H, Herman D, Holmes A, Jeng HW, Kaminishi H, Matsumoto T, Mikami T, O'Sullivan JM, Sudoh M, Suzuki M, Nakashima Y, Tanaka T, Tompkins GR, Watanabe T (2000) *Candida albicans*: adherence, signaling and virulence. *Med Mycol* 28:125–137
- Cotter G, Kavanagh K (2000) Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *Br J Biomed Sci* 57:241–249
- Filler SG, Swerdloff JN, Hobbs C, Luckett PM (1995) Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect Immun* 63:976–983
- Imanishi Y, Yokoyama K, Nishimura K (2004) Inductions of germ tube and hyphal formations are controlled by mRNA synthesis inhibitor in *Candida albicans*. *Jpn J Med Mycol* 45:113–119
- 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. *J Clin Microbiol* 33:661–667
- Jong A, Stins M, Huang S, Chen S, Kim K (2001) Transversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro. *Infect Immun* 69:4536–4544
- Kumamoto CA, Vences MD (2005) Contributions of hyphae-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 7:1546–1554
- Lupetti A, Danesi R, Van't Wout JW, Van Dissel JT, Senesi S, Nibbering PH (2002) Antimicrobial peptides: therapeutic potential for the treatment of *Candida* infections. *Expert Opin Investig Drugs* 11:309–318

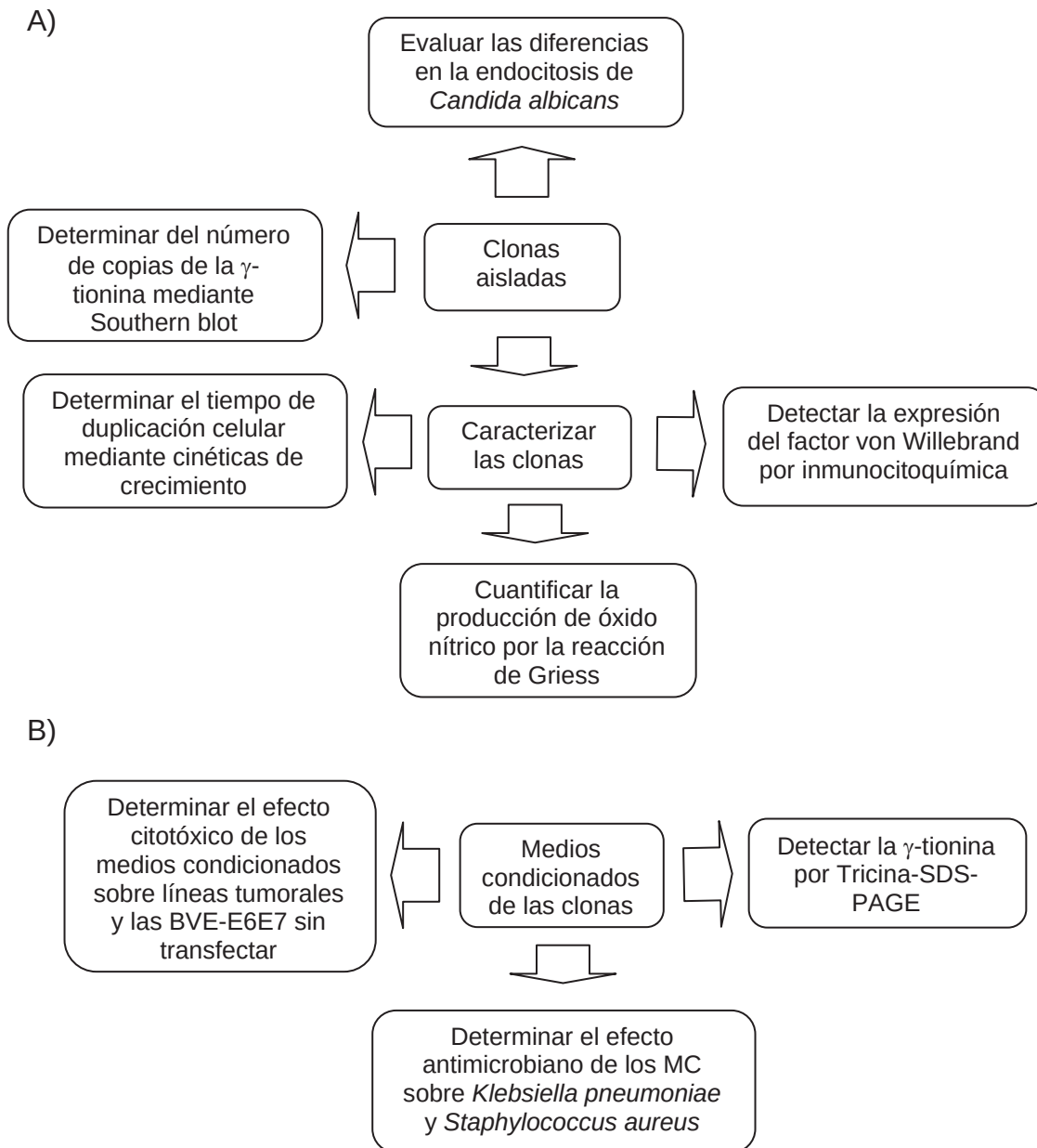
- Ochoa A, Montes de Oca P, Rivera JC, Dueñas Z, Nava G, Martínez de la Escalera G, Clapp C (2001) Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1639–1645
- Pellegrini PB, Franco OL (2005) Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell B* 37:2239–2253
- Phan QT, Fratti RA, Prasadarao NV, Edwards JE, Filler SG (2005) N-cadherin mediates endocytosis of *Candida albicans* by endothelial cells. *J Biol Chem* 280:10455–10461
- Sánchez A, Johnston DA, Myers C, Edwards J, Mitchell A, Filler SG (2004) Relationship between *Candida albicans* virulence during experimental hematogenously disseminated infection and endothelial cell damage in vitro. *Infect Immun* 72:598–601
- Thevissen K, Warnecke D, Francois I, Leipelt M, Heinz E, Ott C, Zahringer U, Thomma BP, Fereket K, Cammue BP (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J Biol Chem* 279:3900–3905
- Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002) Plant defensins. *Planta* 216:193–202
- Torner L, Nava G, Dueñas Z, Corbacho A, Mejía S, López F, Cajero M, Martínez de la Escalera G, Clapp C (1999) Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *J Endocrinol* 161:423–432
- Wong JH, Ng TB (2005) Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides* 26:1120–1126

7. RESULTADOS ADICIONALES

Esta sección comprende los resultados no abordados o parcialmente abordados en la sección 6 de “Resultados” y que fueron obtenidos para el cumplimiento de los objetivos específicos, y por cuestiones de espacio, enfoque y edición de la revista no pudieron ser incluidos en el artículo. Por lo tanto, solo se indica la parte del diagrama general y las metodologías que no se habían desarrollado anteriormente, dando énfasis a la caracterización de las clonas seleccionadas.

7.1 ESTRATEGIA

7.1.1 Diagrama de la estrategia metodológica



7.1.2 Caracterización de las células transfectadas

La población policlonal Co (Co) y las clonas S1 y S2 aisladas a partir de Co (Anaya-López *et al.*, 2006) fueron caracterizadas comparando su morfología celular, determinando la presencia del factor von Willebrand, cuantificando la producción de óxido nítrico (ON) en los medios condicionados (MC) y determinando el tiempo de duplicación celular, tomando como referencia las características de las células sin transfectar BVE-E6E7.

7.1.2.1 Determinación de la concentración de óxido nítrico

La determinación del ON en los MC se realizó mediante una modificación a la reacción de Griess. El reactivo de Griess fue preparado con una mezcla 1:1 de la solución A (sulfanilamida 10% y ácido fosfórico 40%, Sigma) y la solución B (N-(1-naftiletilendiamida dihidroclorada 1%, Sigma). En una placa de 96 pozos se mezcló el MC con el reactivo de Griess en una relación de 1:7 y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Como blanco de la reacción se utilizó el medio de condicionamiento Optimem (Gibco), sin suero ni antibiótico. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad) a 595 nm y se compararon con los valores de la curva estándar que se generó con concentraciones desde 0 a 1 mM de nitrito de sodio en amortiguador salino de fosfatos (PBS), con intervalos de 0.1 mM.

7.1.2.2 Determinación de la expresión del factor von Willebrand

Se sembraron ~30,000 células sobre cubreobjetos recubiertos con gelatina (2%, PBS) en cajas de cultivo celular de 12 pozos (Costar). Se dejaron crecer durante 2 días en medio F12K (Sigma) y luego se lavaron con PBS. Se fijaron las células con paraformaldehído (4%, PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS. Se bloquearon con suero de ternera diluido 1:10 en PBS durante 2 h a 37 °C en una cámara húmeda. Se lavaron 3 veces más con PBS. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-von Willebrand humano (Acurate Chemical and Scientific Corporation) diluido 1:100 en PBS-tritón al 3% toda la noche a 37 °C en una

cámara húmeda. Se lavaron las células 1 vez con PBS-tritón y 3 veces con PBS. Se incubaron 2 h con el anticuerpo secundario acoplado a rodamina anti-IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch) diluido 1:100 en PBS-tritón al 3% a 37°C en una cámara húmeda. Se lavaron 1 vez más con PBS-tritón y 3 veces con PBS y se montaron en el portaobjetos con una solución 1:1 de PBS-glicerol. Las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Leica, modelo DMLB).

7.1.2.3 Tiempo de duplicación celular

Para determinar el tiempo de duplicación se sembraron 50,000 células/pozo de cada clona en placas de cultivo celular de 24 pozos (Costar). Se cultivaron con medio F12K (Sigma), suplementado con 10% de suero de ternera (Equitech-Bio), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Gibco) y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Cada 24 h se despegaron las células con una solución de 0.25% tripsina-0.02% EDTA (Sigma) y se contaron con un hemocitómetro. Se utilizó un pozo para cada día del conteo con la finalidad de reducir el número de células dañadas por efecto de la tripsina, cada conteo se realizó por triplicado. Los datos obtenidos se graficaron relacionando el número de células vs tiempo y se realizó una regresión exponencial del tipo $y=ae^{bx}$, correspondiente a la región de crecimiento logarítmica. Se calculó el ln de esta ecuación con lo que se obtuvo una regresión lineal que permitió deducir el tiempo de duplicación por sustitución del tiempo en la ecuación del tipo $y=ax+b$.

7.1.3 Ensayo de viabilidad de los microorganismos

Se incubaron 1×10^5 organismos de *Candida albicans* y 5×10^4 unidades formadoras de colonia (UFC) de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* con distintas concentraciones de la proteína total (Pt) de los MC en platos de fondo plano de 96 pozos. Se determinó la viabilidad de los microorganismos midiendo la reducción del bromuro 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-

difenil-2H-tetrazolio (MTT, Sigma) a formazán en un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad) a 595 nm.

7.1.4 Ensayo de endocitosis de *Candida albicans*

Se utilizaron monocapas confluentes de las células BVE-E6E7 transfectadas y sin transfectar en placas de 6 pozos y se incubaron con 1×10^6 organismos de *C. albicans*. Las levaduras adheridas a la superficie de las células se eliminaron incubando las células infectadas con anfotericina y lavándolas con PBS. Se despegaron las células infectadas, se lisaron con agua desionizada estéril y se distribuyó una dilución 1/100 sobre placas de agar de papa-dextrosa-extracto de levadura (PDY), luego se incubaron a 37°C durante 24 h y se contaron las UFC de *C. albicans* en cada caso.

7.1.5 Ensayo de citotoxicidad en células HeLa

La citotoxicidad de los MC se evaluó por reducción de MTT, incubando las células con distintas concentraciones de Pt de los MC en platos de fondo plano de 96 pozos y determinando la absorbancia del lisado de las células. Se usó como control negativo el MC de las células BVE-E6E7 sin transfectar.

7.1.6 Detección de la γ -tionina en los medios condicionados por SDS-PAGE-Tricina

Para detectar el péptido γ -tionina en los MC se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio-tricina (SDS-tricina) (Schägger y von Jagow, 1987), diseñada para la separación de proteínas en un rango de 1 a 100 kDa. Se utilizó una solución para el ánodo compuesta por Tris 0.2 M, pH 8.9 y una para el cátodo Tris 0.1 M, tricina 0.1 M y SDS 0.1%, pH 8.25. Las mezclas de acrilamida-bisacrilamida fueron 49.5% acrilamida, 3% bisacrilamida para el gel de concentración y 49.5% acrilamida, 6% bisacrilamida para el gel de separación.

Se desnaturalizaron las muestras de los MC con concentraciones de 1.8, 3.6 y 6 μ g de Pt a 40°C durante 30 minutos con 1 volumen del amortiguador de

desnaturalización compuesto por SDS 4%, glicerol 12%, Tris 50 mM, mercaptoetanol 2% y azul G 0.01% a un pH de 6.8 ajustado con ácido clorhídrico. Las condiciones de la electroforesis fueron 30 V durante 1 h y 105 V durante 4 h. El gel se fijó con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 30 minutos. Se tiñó con una solución de ácido acético al 10% y azul G al 0.025% durante 2 h. Para desteñirlo se agitó el gel en ácido acético durante 2 h cambiándolo cada 30 minutos.

7.2 RESULTADOS

7.2.1 Generación de la construcción para la expresión del ADNc de la γ -tionina

El vector de expresión para mamíferos pTracer EF/V5 His C (pTC, Invitrogen) fue utilizado como vector de integración al azar. En el se clonó el ADNc de la γ -tionina que fue donado por la Dra. Jane Curry de la Universidad del Estado de Nuevo México (Las cruces, New Mexico, U.S.A), que se encontraba clonado en el vector pBluescript y se obtuvo mediante digestión con la enzima *EcoRI* (carril 2, Figura 12). Posteriormente el fragmento de ~600 pb fue purificado por "Gene clean" (carril 3, Figura 12) y clonado en el sitio *EcoRI* del vector pTC (carril 5, Figura 12), a esta construcción se le denominó pTC γ . La inserción, orientación y marco de lectura del ADNc de la γ -tionina en el vector pTC fue corroborada mediante secuenciación utilizando el oligonucleótido T7, cuya secuencia se encuentra hacia el 5' del sitio *EcoRI* en el vector pTC (datos no mostrados).

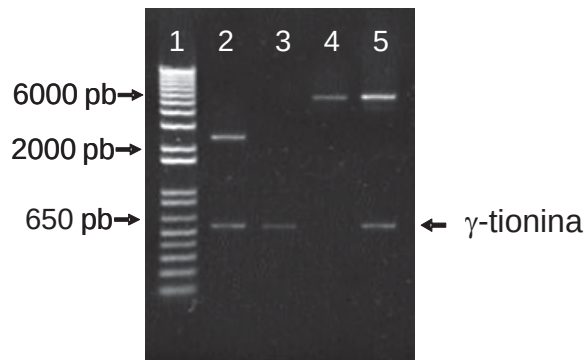


Figura 12. Patrón de restricción de la construcción pTC γ que contiene el ADNc de la γ -tionina. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); carril 2) Liberación por digestión con *EcoRI* del ADNc de la γ -tionina clonado en el vector pBluescript; carril 3) Fragmento correspondiente al ADNc de la γ -tionina (~600 pb); carril 4) Vector pTC linearizado con *EcoRI* (~6000 pb); carril 5) Digestión de la construcción pTC γ con *EcoRI*.

7.2.2 Efecto citotóxico y antimicrobiano del medio condicionado

Para determinar si el MC poseía actividad citotóxica, antibacteriana o antifúngica se utilizó el MC de la población policlonal Co para evaluar su actividad sobre las células sin transfectar BVE-E6E7, los microorganismos *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y las líneas tumorales HeLa, MCF-7 y A549.

7.2.2.1 Efecto del medio condicionado de la población policlonal Co sobre las células BVE-E6E7

Con el objetivo de evaluar si existía un efecto de la expresión de la γ -tionina sobre las células utilizadas como modelo de expresión, las células BVE-E6E7 se trataron con el MC de la población policlonal Co. No se observó un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las células BVE-E6E7 en comparación con el MC de las células BVE-E6E7 sin transfectar, en ambos casos los valores de absorbancia fueron de ~ 0.7 (Figura 13).

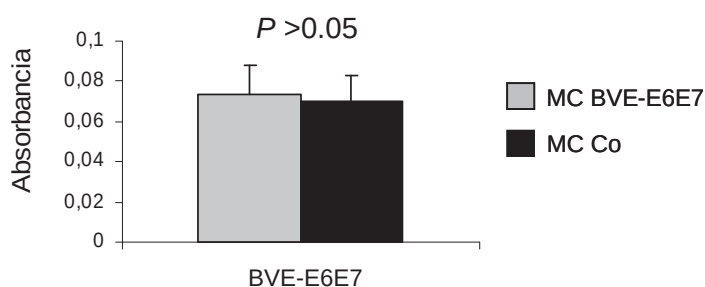


Figura 13. Citotoxicidad del medio condicionado de la población policlonal Co sobre las células BVE-E6E7. La gráfica muestra los valores de absorbancia obtenidos mediante el ensayo de reducción de MTT. La barra de color gris representa el efecto del MC de BVE-E6E7 usado como control y la barra negra el correspondiente al MC de Co. Se utilizaron 1.8 μ g de Pt del MC. Cada barra representa el promedio de triplicados con su respectivo error estándar. Se indica el valor de significancia p .

7.2.2.2 Efecto del medio condicionado de la población policlonal Co sobre los microorganismos

Una vez determinado que no existía efecto citotóxico del medio condicionado de la población policlonal Co sobre las células BVE-E6E7, se evaluó el efecto antimicrobiano y antifúngico del MC de Co sobre *K*.

pneumoniae, *S. aureus* y *C. albicans*. Los resultados del ensayo de reducción del MTT mostraron que no existía actividad antimicrobiana del MC de Co sobre las bacterias evaluadas. Sin embargo, el MC de Co mostró actividad antifúngica, debido a que la viabilidad de *C. albicans* se redujo en ~70% en relación al MC de las células sin transfectar BVE-E6E7 (Figura 14).

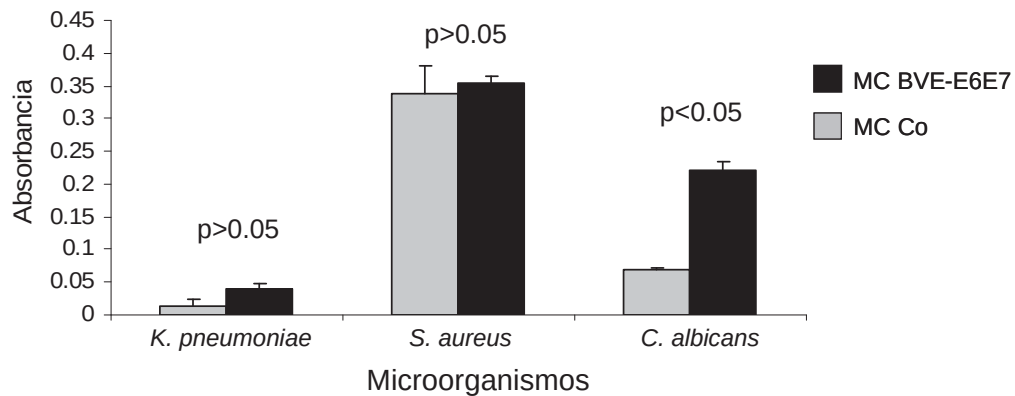


Figura 14. Actividad antibacteriana y antifúngica del medio condicionado de la población policlonal Co. En la gráfica se muestran los valores de absorbancia obtenidos mediante el ensayo de reducción de MTT para cada uno de los microorganismos evaluados. La barra gris representa el valor de la actividad del MC de Co y la barra negra el correspondiente al MC de las células BVE-E6E7 usado como control. Se utilizaron 1.8 μ g de Pt del MC. Cada barra representa el promedio de triplicados con su respectivo error estándar. Se indica el valor de significancia p . Las diferencias en los valores de absorbancia para cada uno de los microorganismos pueden ser atribuidas a su capacidad para reducir el MTT a formazan.

7.2.2.3 Efecto del medio condicionado de la población policlonal Co sobre las líneas tumorales

De acuerdo a los resultados mostrados, el MC de Co no posee un efecto sobre las células usadas como modelo de expresión, no afecta el crecimiento de las 2 bacterias evaluadas pero sí se observó un efecto sobre *C. albicans*. A continuación se evaluó el efecto citotóxico del MC de Co contra las líneas tumorales HeLa, MCF-7 y A549. Como control se utilizaron las células BVE-E6E7 y su MC. En la Figura 15 se muestra que el MC de Co fue citotóxico para la línea tumoral HeLa debido a que inhibió su viabilidad (~80%), pero no tuvo efecto significativo sobre las otras líneas tumorales. Las diferencias observadas

en los valores de absorbancia podrían deberse a la distinta capacidad de cada línea celular para reducir el MTT a formazán.

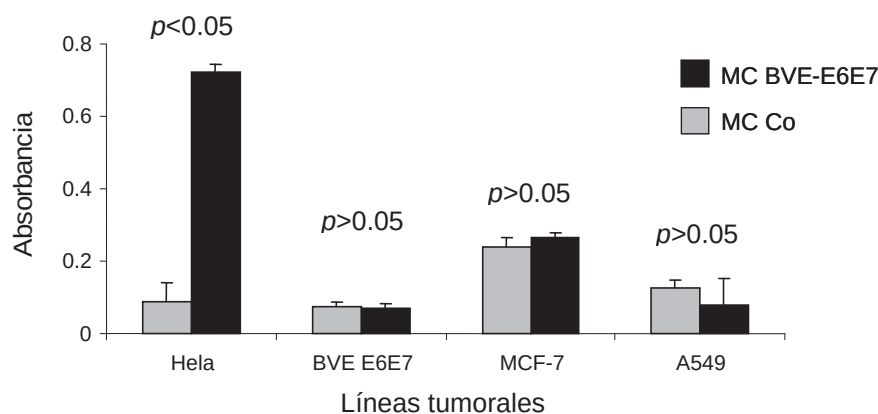


Figura 15. Citotoxicidad del medio condicionado de la población policlonal Co sobre las líneas tumorales HeLa, MCF-7 y A549. En la gráfica se muestran los valores de absorbancia obtenidos mediante el ensayo de reducción de MTT para cada una de las líneas tumorales evaluadas. La barra gris representa el valor obtenido de la actividad del MC de Co y la barra negra del MC de BVE-E6E7 usado como control. Se utilizaron 1.8 μ g de Pt del MC. Cada barra representa el promedio de triplicados con su respectivo error estándar. Se indica el valor de significancia p . Las diferencias en los valores de absorbancia para cada uno de las líneas celulares pueden ser atribuidas a su capacidad para reducir el MTT a formazán.

7.2.3 Aislamiento de las clonas

Con base en el conocimiento previo de que la población policlonal Co expresa el ARNm de la γ -tionina y su medio condicionado tiene efectos citotóxicos sobre la línea tumoral HeLa y actividad antifúngica sobre *C. albicans* (Anaya-López *et al.*, 2006), se decidió aislar clonas a partir de esta población policlonal. Por dilución limitante y discos de papel filtro se obtuvieron 9 clonas a las que se denominó S1-S9. Debido a que Co no presentó efectos antibacterianos ni citotóxicos contra A549 y MCF-7, en las clonas aisladas se evaluó solo la endocitosis de *C. albicans* y se determinó la citotoxicidad de sus MC sobre la línea tumoral HeLa.

7.2.4 Endocitosis de *Candida albicans* en las clonas aisladas

La endocitosis de *C. albicans* en las clonas celulares se determinó mediante la comparación del número de UFC recuperadas en cada una de las clonas y las UFC de las células BVE-E6E7 sin transfectar. La población policlonal Co mostró la reducción más grande en la endocitosis de *C. albicans* (99%), el resto de las clonas mostraron una disminución superior al 70% a excepción de la clona S7, que redujo la endocitosis solo en un 36% (Figura 16).

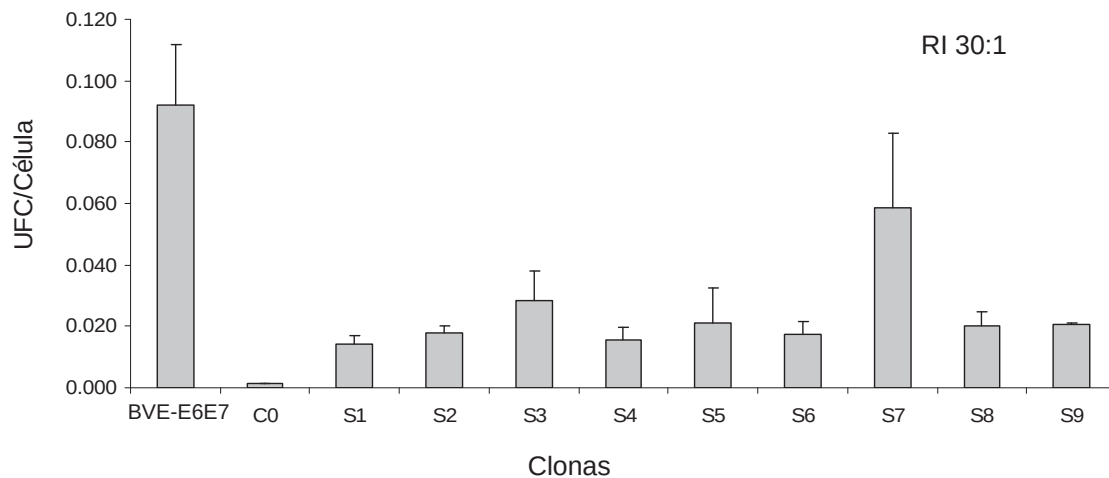


Figura 16. Evaluación de la endocitosis de *Candida albicans* en las clonas obtenidas a partir de la población policlonal Co. La gráfica muestra los valores de UFC/célula recuperados de cada una de las 9 clonas obtenidas. Se utilizó una relación de infección (RI) de 30 organismos de *C. albicans* por célula. Como control se utilizaron las células BVE-E6E7. Cada barra representa el promedio de triplicados con su respectivo error estándar. Todos los tratamientos tuvieron un valor de significancia $p < 0.05$ con respecto al MC de BVE-E6E7, excepto S7 que tuvo un valor de $p > 0.05$.

7.2.5 Citotoxicidad de los medios condicionados de las clonas sobre las células HeLa

Una vez que se determinó la disminución de la endocitosis de *C. albicans* en la población policlonal Co y en las clonas S1-S9, se evaluó la citotoxicidad de sus MC sobre la línea tumoral HeLa mediante el ensayo de reducción del MTT. Se observó un comportamiento diferencial entre las clonas evaluadas (Figura 17). De manera similar a lo observado en la endocitosis, la población policlonal Co mostró el mayor efecto citotóxico (~90%), aunque el MC de las

clonas S1 y S2 mostró una inhibición de la viabilidad de HeLa similar al observado en la población Co. Los MC de las clonas S3 y S9 tuvieron valores de inhibición cercanos al 50%, pero los MC de las clonas restantes presentaron valores inferiores al 50%; siendo los MC de las clonas S5 y S6 los que presentaron el menor efecto citotóxico (<10%).

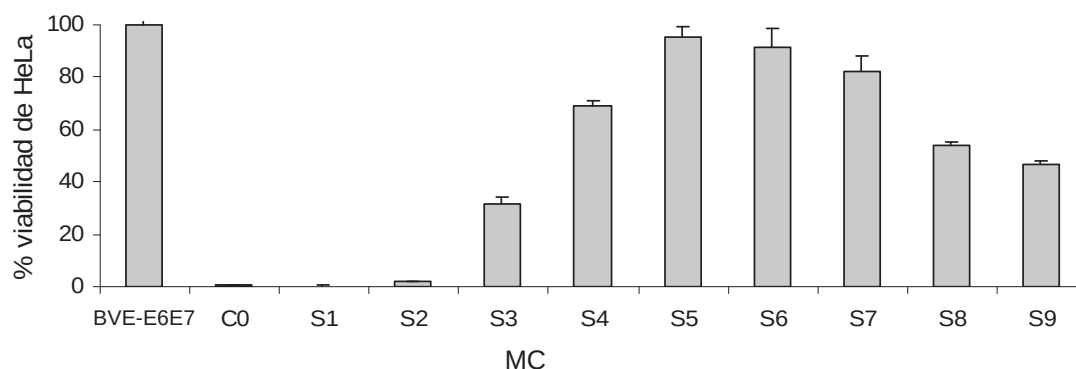


Figura 17. Citotoxicidad de los medios condicionados de las clonas S1-S9 sobre la línea tumoral HeLa. La gráfica muestra los valores porcentuales de la viabilidad de HeLa por efecto de los MC de las 9 clonas obtenidas a partir de Co. Los valores porcentuales fueron normalizados con base en el efecto sobre las células BVE-E6E7, se utilizaron 1.8 μ g de Pt en el MC. Cada barra representa el promedio de triplicados con su respectivo error estándar. A excepción de S5 y S6 que mostraron un valor de $p > 0.005$, todas las clonas tienen un valor de significancia $p < 0.005$.

En el Cuadro 9 se presenta un resumen de los valores numéricos de la endocitosis y el efecto citotóxico del MC de las clonas seleccionadas. De acuerdo a estos criterios las clonas S1 y S2 poseen los valores más altos en ambos y se seleccionaron para realizar una caracterización más detallada, la cual se presenta a continuación.

7.2.6 Caracterización de las clonas

El vector pTC γ utilizado para transfectar las células BVE-E6E7 es de integración al azar, y para determinar si la inserción del transgen provocó algún cambio evidente en las células transfectadas se realizó una caracterización mayor a la población policlonal Co y a las clonas S1 y S2. Los criterios de caracterización fueron: la morfología de las células, la expresión del factor von Willebrand (producido específicamente por las células endoteliales), el tiempo

de duplicación celular y la producción de ON. Las características evaluadas se compararon con aquellas de las células BVE-E6E7.

Cuadro 9. Endocitosis de *Candida albicans* y efecto citotóxico sobre células HeLa de los medios condicionados de las clonas S1 a la S9.

Clona	Endocitosis (% de inhibición)	Viabilidad de HeLa (% de inhibición)
Co	98.7	99.3
S1	84.7	99.8
S2	80.4	98.3
S3	69.2	68.5
S4	82.9	30.6
S5	77.0	04.4
S6	81.1	08.9
S7	36.1	17.6
S8	78.0	45.8
S9	77.3	53.2

Se muestra el promedio de 3 repeticiones en 3 experimentos independientes. Los datos fueron estandarizados tomando como 100% de endocitosis el número de UFC/célula recuperadas del ensayo de endocitosis de *C. albicans* con BVE-E6E7, y el efecto del MC de BVE-E6E7 fue considerado como el 100% de viabilidad de las células HeLa.

7.2.6.1 Morfología celular y expresión del factor von Willebrand

La morfología celular fue evaluada observando las células con microscopía de campo claro. Se observaron cambios morfológicos en las células de la población policlonal Co, las cuales son ~1.6 veces más grandes en relación con las células BVE-E6E7. No se observaron cambios morfológicos en las clonas S1 y S2. La expresión del factor von Willebrand en Co, S1 y S2, fue detectada por inmunocitoquímica, la cual se observa como pequeños puntos en el citoplasma de las células (Figura 18). No existen diferencias notorias en el patrón de expresión entre las células transfectadas y el control. Estos resultados sugieren que las clonas S1 y S2 conservan sus características del origen celular.

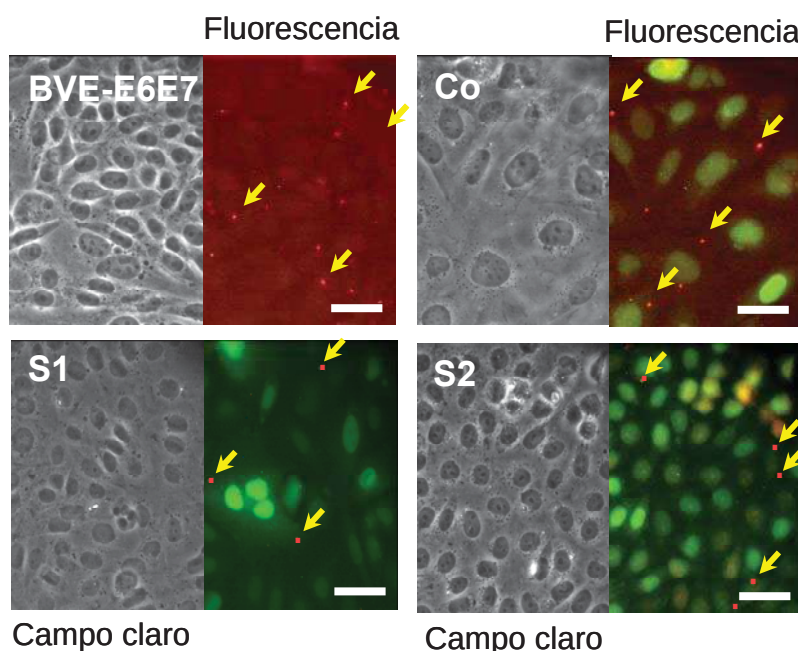


Figura 18. Morfología celular y expresión del factor von Willebrand por la población policlonal Co, y las clonas S1 y S2. Micrografías en campo claro y de fluorescencia de la inmunocitoquímica realizada a monocapas confluentes crecidas sobre cubreobjetos tratados con gelatina al 2%. Se observa la morfología típica de las células BVE-E6E7 y la de Co, S1 y S2; las flechas amarillas indican el sitio donde se detectó el factor von Willebrand. Barra de escala = 20 μm .

7.2.6.2 Tiempo de duplicación de las clonas

El tiempo estimado que tardan las clonas Co, S1 y S2 en duplicar su número fue de ~ 20 h (Cuadro 10) y fue similar al de las células BVE-E6E7. No se detectaron diferencias significativas entre ellas. Los tiempos de duplicación celular calculados corresponden a los valores promedio de tres experimentos analizados por una regresión exponencial y fueron ajustados a una recta a partir de la ecuación exponencial, el valor de regresión para todas las ecuaciones lineales obtenidas fue de $R \approx 1$.

Cuadro 10. Tiempos de duplicación celular de la población policlonal Co y las clonas S1 y S2 comparados con el de las células BVE-E6E7.

Clona	t de duplicación (h)
BVE-E6E7	21
Co	19
S1	20
S2	23

7.2.6.3 Producción de óxido nítrico en los medios condicionados de las clonas

La producción de ON se determinó por la reacción de Griess. Se observó una disminución en la concentración de ON en la población Co (~50%). El valor calculado para las clonas S1 y S2 fue inferior al 30%, respecto a la concentración de ON cuantificada en el MC de las células BVE-E6E7 (Figura 19).

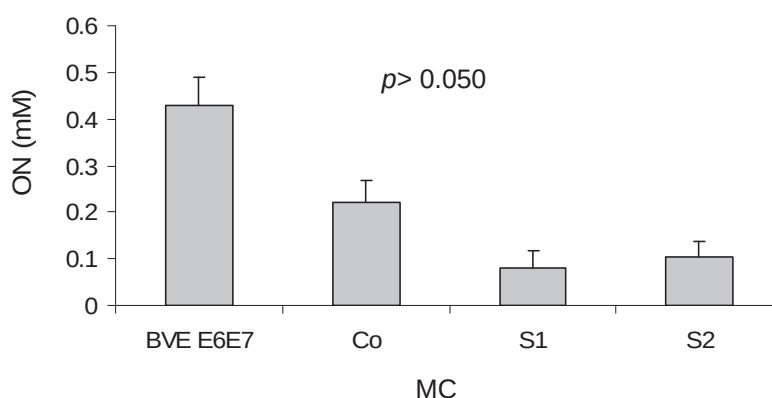


Figura 19. Concentración de óxido nítrico en los medios condicionados de la población policlonal Co, y las clonas S1 y S2. La gráfica muestra la concentración de óxido nítrico expresada en milimoles de nitrato para cada uno de los MC. Se indica el valor de significancia p . Cada barra representa el promedio de triplicados con su respectivo error estándar.

7.2.7 Detección del péptido γ -tionina por SDS-PAGE en el medio condicionado de la población policlonal Co

Para la detección de la γ -tionina en el MC se utilizó el medio de Co y se empleó la técnica de Tricina-SDS-PAGE. Se sometieron a electroforesis tres concentraciones de Pt (1.8, 3.6 y 6 μ g) del MC. Sin embargo, no fue posible obtener una resolución adecuada en la zona de 5-10 kDa que permitiera identificar una banda diferencial y observar el péptido de acuerdo al peso molecular predicho para la γ -tionina (~5 kDa) y la γ -tionina sin procesar (~9 kDa).

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se expresó el ADNc de la γ -tionina de *C. chinense* en la línea celular BVE-E6E7 y se evaluó la actividad antimicrobiana del MC de las células transfectadas sobre *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, además de la actividad antifúngica sobre *Candida albicans* y el efecto citotóxico contra las líneas tumorales humanas MCF-7, A549 y HeLa.

Una vez que se generó la construcción pTC γ (Figura 1A, Anaya-López *et al.*, 2006), se utilizó para transfectar establemente la línea celular BVE-E6E7. Las células transfectadas se seleccionaron por resistencia al antibiótico zeocina, que corta al ADN causando la muerte celular. De esta manera se obtuvo una población policlonal a la que se denominó Co y en la que aproximadamente el 40% emitía fluorescencia correspondiente con la expresión de la GFP (Figura 1B, Anaya-López *et al.*, 2006).

Para determinar si en la población Co se encontraban células que integraron el ADNc de γ -tionina, se realizó un RT-PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar 324 pb de la secuencia que codifica para esta defensina. Esta secuencia incluye el N-terminal, la región central y el C-terminal correspondientes al péptido señal (PS), al péptido maduro y al dominio ácido del péptido. La amplificación y secuenciación del fragmento de 324 pb (Figura 2B, carril 4, Anaya-López *et al.*, 2006) demostró que esta población expresa el ARNm de la γ -tionina. A partir de esta población policlonal, se aislaron 9 clonas por dilución limitante y discos de papel filtro, las cuales fueron nombradas con la letra S seguida por el número de la clona (S1 hasta S9).

Debido a que la secuencia de aa de la γ -tionina contiene un PS en el N-terminal, es probable que el péptido maduro sea secretado al medio de crecimiento. La función de secreción de este PS en otras DP ha sido comprobada ampliamente (Meyer *et al.*, 1996; Thomma *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2000; Castro y Fontes, 2005). En la Figura 20 se propone un modelo teórico del mecanismo de traducción y secreción de la γ -tionina en las células transfectadas. En este, una vez que el ADNc se ha integrado establemente en algún sitio del genoma de las BVE-E6E7 es transcrito en el núcleo, y el ARNm

maduro es dirigido hacia el retículo endoplásmico (RE), donde el PS traducido es reconocido por los translocadores en la superficie del RE y es retenido. Conforme el ARNm de la γ -tionina va siendo traducido por los ribosomas, el péptido se introduce en el lumen del RE (Figura 20A). La secuencia de la γ -tionina que consta del dominio del péptido maduro unida al dominio ácido del C-terminal es transportada mediante el sistema de vesículas al aparato de Golgi, donde es plegada adecuadamente. Probablemente el dominio ácido del C-terminal (Figura 20B) es eliminado, aunque se desconoce la función de este dominio en las DP. Algunas de las hipótesis proponen que puede actuar como una señal para que el péptido sea almacenado en vesículas (Lay *et al.*, 2003), en cuyo caso su vía de secreción estaría regulada (Figura 20C) por una señal extracelular, que podría ser algún patrón molecular asociado a los patógenos (PMAP). Otra hipótesis propone que el péptido sea secretado de manera constitutiva y que las vesículas viajen a través del citoplasma y se integren a la membrana plasmática (MP) donde liberen el contenido hacia el exterior de la célula (Figura 20D).

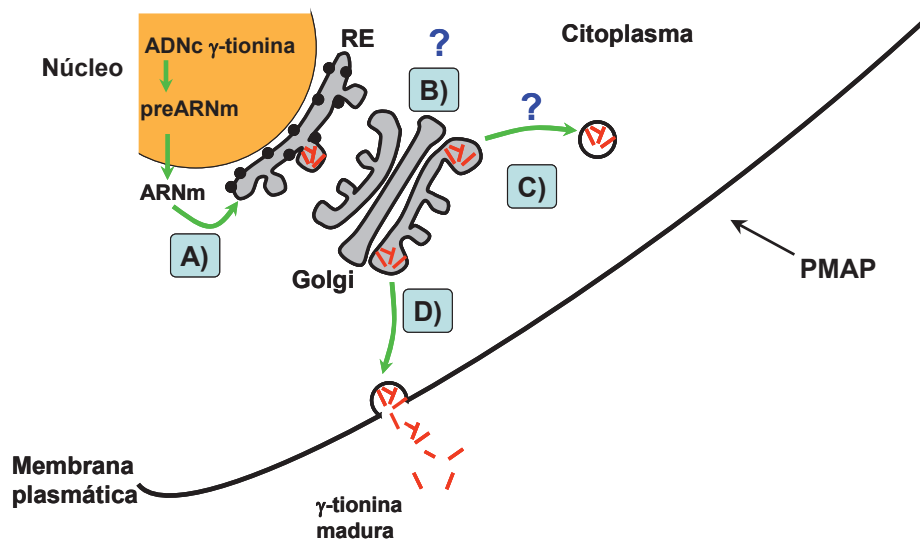


Figura 20. Modelo teórico de la secreción de la γ -tionina en las células BVE-E6E7 transfectadas con el ADNc de la γ -tionina. A) Traducción de la γ -tionina en el retículo endoplásmico (RE) y corte del péptido señal; B) Formación de vesículas de secreción en el aparato de Golgi y posible corte del dominio ácido C-terminal; C) Posible ruta de secreción regulada de la γ -tionina; D) Ruta de secreción constitutiva de la γ -tionina.

Debido a que la secuencia del ADNc de la γ -tionina posee una secuencia para un PS, es probable que la γ -tionina producida por las células BVE-E6E7 transfectadas sea secretada al medio de cultivo, por lo que en este trabajo se condicionó el medio para evaluar sus efectos. Para determinar el efecto citotóxico de la γ -tionina sobre las células que la producen se realizó un ensayo de viabilidad en respuesta al MC de la población policlonal Co (Figura 13), determinado por la reducción del MTT. No se detectaron diferencias significativas entre el efecto del MC de las células BVE-E6E7 sin transfectar y el MC de Co que expresa el ADNc de la γ -tionina. El hecho de no detectar efectos citotóxicos en BVE-E6E7, valida el uso de estas células como modelo de expresión de la γ -tionina, y permite evaluar las interacciones hospedero-patógeno en las células transfectadas con el ADNc de la γ -tionina. Debido a la participación que desempeña el endotelio en la respuesta inmune, el modelo de expresión planteado en este trabajo de tesis permite determinar y valorar en el futuro la contribución de la γ -tionina en la regulación de la respuesta inflamatoria, y encontrar un posible uso terapéutico para esta DP. Cabe resaltar que hasta la fecha, no se ha reportado el efecto citotóxico de las DP sobre células de mamífero no cancerígenas.

Para elucidar la actividad antimicrobiana del MC, se evaluó el efecto antibacteriano y antifúngico del MC de la población policlonal Co, al cual no se le detectó actividad antibacteriana, pero si antifúngica (Figura 14), ya que inhibió la viabilidad de *C. albicans* (~70%), y la formación y elongación de sus hifas (Tabla 1, Anaya-López *et al.*, 2006). Esta evidencia es soportada con base en que las DP tienen principalmente actividad antifúngica (Hancock y Chapple, 1999; Thomma *et al.*, 2002; Thomma *et al.*, 2003; Castro y Fontes, 2005; Lay y Anderson, 2005; Pelegrini y Franco, 2005). Además, el efecto sobre la morfología de las hifas es una característica del modo de acción de las DP, el cual ha permitido clasificarlas también en dos grupos: 1) DP que causan distorsiones morfológicas en las hifas, y 2) DP que no provocan distorsiones morfológicas en las hifas (De Lucca y Walsh, 1999; Hancock y Chapple, 1999; Thomma *et al.*, 2002).

De manera general, los PA con actividad antifúngica interactúan con los hongos de dos maneras distintas: 1) lisando la MP, esto puede ocurrir por varios mecanismos, la mayoría de ellos regidos por interacciones electrostáticas inespecíficas, o por la unión a receptores específicos; ó 2) interfiriendo con la síntesis de la pared celular o la biosíntesis de componentes celulares esenciales como la glucana o la quitina (Figura 21) (De Lucca y Walsh, 1999). Recientemente, se reportó la acción antifúngica de la DP Rs-AFP2 contra *C. albicans* y se demostró que su mecanismo de acción involucra una interacción específica con las GlcCer de la MP de este hongo. Sin embargo, la evidencia sugiere que interviene otro componente necesario para su actividad que aún no ha sido descrito. Además de este reporte, se ha demostrado la actividad antifúngica de la DP Dm-AMP1 sobre *C. albicans*, sin embargo, su mecanismo de acción no involucra la interacción de GlcCer (Thevissen *et al.*, 2004).

El efecto de las DP sobre la viabilidad y la formación de hifas de hongos patógenos representa una ventaja importante para su posible uso terapéutico en mamíferos, puesto que la transición de *C. albicans* de levadura a hifa es uno de los factores de virulencia más importantes para la invasión de los tejidos y de las células endoteliales en las infecciones superficiales y sistémicas (Filler *et al.*, 1995; Cotter y Kavanagh, 2000; Jong *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2004). En este sentido, los resultados aquí mostrados apoyan el posible uso terapéutico de la γ -tionina en el combate contra hongos patógenos de mamíferos como *C. albicans*.

Con el propósito de evaluar la capacidad de *C. albicans* para endocitarse en las células transfectadas con el ADNc de la γ -tionina, se realizó un ensayo de endocitosis. Las UFC recuperadas de los ensayos con las células BVE-E6E7 se usaron como control para compararlas con las células transfectadas, la población policlonal Co redujo la endocitosis de *C. albicans* en 99%, mientras que las demás clonas mostraron una reducción aproximada del 70% (Figura 3, Anaya-López *et al.*, 2006). Este es el primer reporte del efecto de la expresión de un PA sobre la endocitosis de un patógeno en células de mamífero. Esta disminución en las UFC de *C. albicans* recuperadas sugiere que las células

transfectadas con el ADNc de la γ -tionina disminuyen la capacidad de *C. albicans* para endocitarse. Debido a que el mecanismo de acción de las DP involucra la lisis de la MP de los hongos susceptibles, como en el caso de la Rs-AFP2, es probable que el efecto sobre la reducción de la endocitosis de *C. albicans* en las células transfectadas con el ADNc de la γ -tionina se deba a una acción conjunta entre la alteración de la MP y a la inhibición de la formación de hifas de *C. albicans*, provocada por la actividad de los MC (Figura 21). La alteración de la MP puede modificar las moléculas de adhesión de *C. albicans* necesarias para adherirse a las células endoteliales. De igual forma, se ha sugerido que las hifas pueden promover la endocitosis, por lo que la disminución en las UFC de *C. albicans* endocitadas puede deberse a estos efectos (Phan *et al.*, 2005; Kumamoto y Vincens 2005). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el MC cause la muerte de *C. albicans* antes o durante el proceso de endocitosis, ya que debido a las características de la técnica empleada sólo se pudo cuantificar a las células de *C. albicans* viables que se endocitaron, por lo que es necesario realizar mas experimentación que permita elucidar este mecanismo. Por ejemplo podría incubarse a *Candida albicans* con los MC durante 4 h (que es el tiempo que se utiliza para evaluar la endocitosis en las células endoteliales) y evaluar su actividad antifúngica.

Con respecto al posible efecto citotóxico y/o antitumoral de la γ -tionina, se evaluó el MC de la población policlonal Co sobre las líneas tumorales HeLa, A549 y MCF-7, y se demostró actividad únicamente contra la línea HeLa (Figura 15). La diferencia en la susceptibilidad de las líneas tumorales a la γ -tionina puede estar relacionada con las distintas composiciones de las MP de cada línea tumoral. Sin embargo, no se ha descrito un mecanismo de acción específico para este fenómeno. De manera general se considera que los PA que tienen actividad contra células cancerígenas interaccionan con algunos componentes de sus MP que las diferencian de las células normales, como una mayor cantidad de fosfatidilserina, la presencia de glicoproteínas de alto peso molecular y un mayor número de microvellosidades en su superficie (Figura 21) (Papo y Shai, 2005). A la fecha sólo existen dos reportes sobre la actividad

antitumoral de las DP. Uno correspondiente a la γ 1Z y la γ 2Z de *Zea mays*, las cuales bloquean canales de sodio en las células tumorales de rata GH3 (Kushmerick *et al.*, 1998), y otro correspondiente a la sesquina de *Vigna sesquipedalis* que inhibe la proliferación de la línea tumoral humana MCF-7 y de células leucémicas M1. No obstante, los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo este efecto aún no han sido elucidados (Wong y Ng, 2005).

Hasta el momento, se ha descrito el efecto antifúngico y citotóxico de la población policlonal Co que expresa el ARNm de la γ -tionina. Sin embargo, esta población está compuesta por células donde pudieron ocurrir distintos eventos de integración del ADNc y con diferencias en la producción de la γ -tionina, que dificulta la evaluación de los efectos. Por lo tanto, es importante tener poblaciones homogéneas que permitan dilucidar claramente el efecto antifúngico y/o citotóxico de la γ -tionina en células con altos niveles de expresión. Con este fin, se aislaron clonas a partir de la población Co y se seleccionaron 2 de ellas (S1 y S2) con base en la disminución en la endocitosis de *C. albicans* y el efecto citotóxico de sus MC sobre la línea HeLa (Figura 16 y 17, respectivamente). Es importante señalar que las otras 7 clonas (Cuadro 9) que no fueron incluidas en este trabajo de investigación representan modelos de estudio interesantes en el sentido que pueden brindar información importante para elucidar el mecanismo de acción de la γ -tionina, puesto que hay clonas que inhiben la endocitosis de *C. albicans*, pero no la viabilidad de HeLa, como es el caso de las clonas S5 y S6. En ese sentido, se podría tratar de relacionar el nivel de expresión del ARNm de la γ -tionina mediante un RT-PCR con la actividad citotóxica y antifúngica. Aunque no se descarta la posibilidad de que los efectos detectados en este trabajo se deban al sitio de integración del transgen, y a que se haya interrumpido la expresión de algún elemento importante para la adhesión o la endocitosis de *C. albicans* en estas células.

La determinación de la expresión del ARNm de la γ -tionina en las clonas S1 y S2 demostró que poseen diferentes niveles de expresión respecto a la población heterogénea de donde se obtuvieron. La población policlonal Co presentó un nivel de expresión mayor en comparación con las clonas S1 y S2

(20 y 3, veces respectivamente; Figuras 2B y 2C, Anaya-López *et al.*, 2006). Estas diferencias pueden ser atribuidas al origen policlonal de Co en la que pueden ocurrir diversos eventos de integración, y por lo tanto es probable que una parte de las células que la componen posean múltiples copias del transgen, o bien, que se haya insertado en un sitio que favorece su expresión. Sin embargo, como se ha demostrado en otros modelos de expresión heteróloga o de sobreexpresión, no siempre existe una relación directa entre el número de copias del transgen que se insertan en el genoma y la expresión de la proteína para la que codifica, como se demostró con la sobreexpresión de la tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* en donde no se encontró una correlación entre el número de copias del transgen y la expresión del ARNm y de la proteína Thi2.1 (Epple *et al.*, 1997). Es probable que estos fenómenos se deban a que en un evento de recombinación ilegítima, el ADN extracromosomal puede modificarse antes, durante e incluso después de su integración en el genoma del organismo receptor. Entre estas modificaciones destaca la formación de concatámeros, que pueden estar integrados por repetidos directos o invertidos del transgen, lo que da como resultado la presencia de un determinado número de copias que no necesariamente serán traducidas. Dado lo anterior, se ha sugerido que el nivel de expresión de un transgen puede estar mayormente influenciado por el sitio de inserción que por el número de copias insertadas. La recombinación ilegítima puede alterar el arreglo del ADN integrado y algunas otras características celulares, como los patrones de metilación del genoma, y por lo tanto, los niveles de expresión de un gen pueden ser modificados por la metilación de los promotores. El mecanismo por el que se lleva a cabo este tipo de procesos no está totalmente elucidado (Würtele *et al.*, 2003). Debido a que el aislamiento de las clonas evaluadas en este trabajo de investigación, se realizó de manera aleatoria, es probable que no se lograra aislar alguna proveniente de una célula con una mayor actividad.

El efecto de los MC de la población policlonal Co, y de las clonas S1 y S2 sobre la viabilidad y la formación de hifas de *C. albicans* fue dependiente de la concentración y se correlacionó directamente con el nivel de expresión del

ARNm de la γ -tionina (Figura 2 y Tabla 1, Anaya-López *et al.*, 2006). Cabe señalar que aunque S1 expresa menos ARNm de la γ -tionina, y presentó menor inhibición de la viabilidad y la formación de hifas que S2, disminuyó de manera similar la endocitosis de *C. albicans* (Tabla 2, Anaya-López *et al.*, 2006). Hasta ahora, no existen reportes sobre la influencia de las DP en la endocitosis de microorganismos patógenos en células de mamíferos. Sin embargo, es probable que los mecanismos por los cuales la γ -tionina inhibe la viabilidad y la endocitosis de *C. albicans* sean distintos, y que la concentración necesaria para inhibir la endocitosis sea menor a la que se requiere para producir un efecto antifúngico o citotóxico. En este sentido, es interesante resaltar el hecho de que los ensayos de actividad antifúngica y citotóxica de los MC se realizaron con medios que se condicionaron durante 24 h y que, en los ensayos de endocitosis *C. albicans* permaneció en contacto solo durante 4 h con las células transfectadas, por lo que la concentración de los productos de secreción en los ensayos de endocitosis es inferior a la concentración de los MC. Lo anterior hace necesario realizar más investigación respecto al mecanismo por el cual se inhibe la endocitosis de *C. albicans* en las células transfectadas.

La viabilidad de la línea tumoral HeLa fue dependiente de la concentración de los MC de Co, S1 y S2 y no se observaron diferencias significativas entre cada una de las clonas (Figura 4, Anaya-López *et al.*, 2006). Los mecanismos de acción por los cuales el MC de la población policlonal Co, y las clonas S1 y S2 inhiben la formación de hifas, la viabilidad de *C. albicans* y la viabilidad de las células HeLa se desconocen. Sin embargo, es probable que en cada caso los mecanismos sean distintos. La evidencia disponible hasta el momento sugiere la presencia de un receptor específico sobre la superficie de los hongos susceptibles. En este sentido, la presencia de este receptor en *C. albicans* ya ha sido evidenciada para el efecto de la DP Rs-AFP2 (Thevissen *et al.*, 2004). En el caso de la actividad antitumoral, existen pocos trabajos que describan un probable mecanismo de acción y hasta ahora sólo se ha relacionado la actividad de una DP con la inhibición de los canales de sodio en las células GH3 (Thevissen *et al.*, 2004; Kushmerick *et al.*, 1998). Respecto a la

actividad diferencial de los PA, se han propuesto algunas hipótesis basadas en las diferencias en la composición de las MP de las células cancerígenas respecto a las células normales, como una mayor cantidad de microvellosidades y la presencia de musinas O-glicosiladas en las células cancerígenas (Papo y Shai, 2003). Debido a ello, la diferencia en la susceptibilidad de las líneas tumorales evaluadas en este trabajo, pudo deberse a diferencias en la composición de sus MP.

En la Figura 21 se muestra un modelo que representa la probable acción de la γ -tionina secretada sobre la citotoxicidad a la línea tumoral HeLa, y sobre la endocitosis, la viabilidad y la formación de hifas de *C. albicans*.

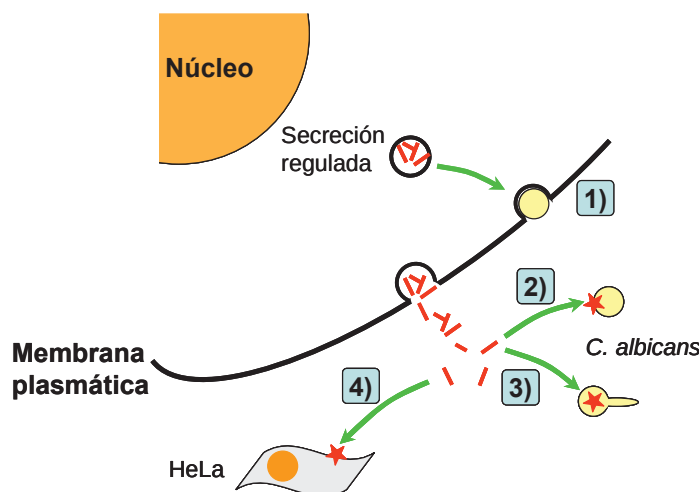


Figura 21. Modelo de las probables interacciones de la γ -tionina secretada por las células BVE-E6E7 transfectadas con el ADNc de la γ -tionina con *Candida albicans* y HeLa. 1) *C. albicans* interacciona con la γ -tionina secretada y con la que se encuentra en el citoplasma; 2) Interacción de la γ -tionina con los receptores de la superficie de la MP de *C. albicans*, probablemente GlcCer; 3) Interacción de la γ -tionina con moléculas intracelulares de *C. albicans* que regulan la síntesis de glucanos o quitina, o bien con la síntesis *de novo* de ARNm; 4) Interacción electrostática inespecífica de la γ -tionina con los fosfolípidos y lisis de la MP de las células HeLa.

Para elucidar si la actividad antifúngica y citotóxica de la γ -tionina contra *C. albicans* y HeLa es similar al reportado para las DP Rs-AFP2 y γ 1Z y γ 2Z, es necesario realizar más investigación. Para ello, puede hacerse uso de cepas de *C. albicans* con mutaciones nulas en el gen *gcs* que codifica para las GlcCer (Thevissen, 2004) y por otro lado, valorar electrofisiológicamente a las células tumorales (Kushmerick *et al.*, 1998).

Cualquier evento de integración al azar de una secuencia de ADN en el genoma de un organismo implica la posibilidad de que se interrumpa o se modifique la expresión génica o bien de que existan modificaciones en los genes insertados (Würtele *et al.*, 2003). Por lo tanto, es necesario caracterizar el mayor número de propiedades de las células transfectadas para obtener un modelo que represente de manera adecuada las funciones *in vivo* del tipo celular que se desea estudiar. Con excepción de la población Co que mostró un cambio en la morfología celular, las clonas S1 y S2 mantuvieron una morfología similar a las células BVE-E6E7. Todas las clonas producen el factor von Willebrand que se expresa únicamente en células endoteliales y que es utilizado como un criterio de caracterización de este tipo celular, este fue detectado mediante inmunocitoquímica. Sin embargo, no se detectó en todas las células de manera homogénea, probablemente como resultado de que el anticuerpo empleado es específico para el factor von Willebrand humano (Figura 18). Con respecto al tiempo de duplicación celular, no se apreciaron diferencias significativas entre las diferentes clonas y las células sin transfectar (Cuadro 10), estos resultados sugieren que las clonas S1 y S2 conservan sus características del origen celular.

Otro criterio evaluado fue la producción de ON. El ON es la única molécula de defensa reportada con actividad antimicrobiana producida por el endotelio. En general, la población Co y las clonas S1 y S2 producen menos ON que las células BVE-E6E7 (Figura 19). Sin embargo, en la población policlonal Co se detectó una mayor concentración de ON en comparación con las clonas S1 y S2, es probable que este efecto se deba a la naturaleza heterogénea de Co, donde puede haber distintos eventos de integración. El

efecto global de la disminución de ON en las células que expresan el ARNm de la γ -tionina se desconoce, y a pesar de que se ha descrito que algunas defensinas, principalmente de mamífero, poseen efectos antiinflamatorios (Hancock y Diamond, 2000; Bowdish *et al.*, 2005; Guarna *et al.*, 2006), no se puede descartar el hecho de que la disminución de ON en las células transfectadas pudiera deberse a un efecto del sitio integración del transgen. No obstante, existe poca investigación relacionada con el efecto de los PA sobre la expresión del ON. Los trabajos relacionados con esta área de estudio, evalúan el efecto de PA sintéticos o de mamíferos sobre la expresión y producción de la enzima iNOS, principalmente bajo 2 condiciones: 1) determinando la expresión de iNOS en macrófagos estimulados con PA, en donde se ha observado un incremento en la expresión de esta enzima, lo que sugiere que el ON producido puede actuar como un compuesto de defensa en contra de microorganismos patógenos (Arias *et al.*, 2003; Hancock y Diamond, 2000); y 2) evaluando el efecto de los PA sobre macrófagos estimulados con endotoxinas como LPS y lipooligosacáridos (LOS), donde se ha demostrado la disminución de los niveles de expresión de iNOS y de ON inducidos por estas endotoxinas. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción (Motobu *et al.*, 2004; Zughaier *et al.*, 2005). Hasta el momento, solo existe un reporte en donde se ha elucidado el mecanismo por el cual se inhibe la expresión de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) en ratas. Este mecanismo describe que el PA citropina 1.1 de la rana *Litoria citropa* interacciona con la calmodulina dependiente de Ca^{2+} modificando su estructura, impidiendo de esta manera la interacción de la nNOS con el sitio de unión a calmodulina (Doyle *et al.*, 2003).

Debido a la diversidad de efectos que presentan los PA es relevante el estudio del mecanismo de acción mediante el cual el MC de las células transfectadas con el ADNc de la γ -tionina inhibe la viabilidad y formación de hifas de *C. albicans* y como se relaciona esta actividad con su capacidad para inhibir su endocitosis en las células transfectadas. De igual manera, es importante elucidar cual es el mecanismo que dirige la citotoxicidad selectiva sobre la línea tumoral HeLa. Otro aspecto relevante es evaluar el efecto de

estos MC sobre la respuesta inflamatoria de las células transfectadas y sobre la regulación de las óxido nítrico sintasas.

En un intento por detectar el péptido γ -tionina en los MC se realizó una electroforesis de proteínas con distintas concentraciones de Pt del MC de la población policlonal Co. Sin embargo, no fue posible detectar una banda diferencial entre el MC de las células sin transfectar y las modificadas genéticamente. Este resultado puede deberse a la sensibilidad de la técnica de SDS-PAGE y a la concentración en la que puede encontrarse el péptido en el MC, en otros sistemas de expresión heteróloga de PA, como en la expresión de cecropina A2 de *Drosophila melanogaster* en la línea celular V79 de fibroblastos de pulmón de hamster fueron necesarios 200 μ g del extracto celular de proteína total, además de un anticuerpo específico para detectar a la proteína (Pore y Pal, 2000), mientras que en la expresión de la DP Psd1 de Chicharo (*Pisium sativum*) en la levadura *Pichia pastoris* se utilizaron 7.5 μ g de Psd1 recombinante purificada por columnas de afinidad y cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para su detección (Almeida *et al.*, 2001). En referencia a la expresión heteróloga como una estrategia biotecnológica para la producción de PA, se han utilizado varios modelos encaminados a la búsqueda de un sistema que permita expresar concentraciones del PA superiores a las que se podrían aislar a partir de la fuente original, y que posean algunas ventajas como la facilidad de manejo, cultivo y purificación del PA producido. Además del ejemplo mencionado del chícharo en el que se produjeron entre 0.4 y 13.8 mg/ml en el medio de cultivo (Almeida *et al.*, 2001), también se encuentra el de la expresión del PA CHP de camarón (*Litopenaus vannamei*) en *Pichia pastoris*, en la que se obtuvieron 108 mg/l de CHP recombinante en el medio de cultivo (Li *et al.*, 2005).

A pesar de que el PA γ -tionina no se logró detectar en los MC, la evidencia obtenida sugiere que esta DP está siendo secretada al medio de crecimiento, debido a que el MC de las células BVE-E6E7 sin transfectar no posee ningún tipo de actividad, mientras que los MC de la población policlonal Co y las clonas S1 y S2 presentan actividad antifúngica y citotóxica con un

efecto dependiente de la concentración. Además, el efecto de los MC evaluados sobre la viabilidad y la formación de hifas de *C. albicans* se correlaciona de manera directa con la expresión del ARNm de la γ -tionina.

Este es el primer trabajo que reporta la expresión de una DP en células de mamífero, y que demuestra la disminución de ON en células endoteliales por efecto de esta expresión.

9. CONCLUSIÓN

El medio condicionado de las células endoteliales BVE-E6E7 transfectadas con el ADNc de la γ -tionina de *Capsicum chinense* no mostró actividad bactericida contra *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, disminuyó la viabilidad de *Candida albicans* y la formación y ramificación de las hifas. Además, inhibió la viabilidad de la línea tumoral HeLa, lo que sugiere que la γ -tionina de *C. chinense* posee efectos antimicóticos y citotóxicos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., de Medeiros, L.N., Valente, A.P., Almeida, F.C., Kurtenbach, E., 2001. cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Ps1 in the yeast *Pichia pastoris*. Arch. Biochem. Biophys. 395 (2): 199-207.
- Aluru, M., Curry, J., O'Connell, M.A., 1999. Nucleotide sequence of a defensin or γ -thionin-like gene (accesión no. AF128239) from habanero chilli. Plant Physiol. 120, 633.
- Anaya-López, J.L., López-Meza, J.E., Baizabal-Aguirre, V.M., Ochoa-Zarzosa, A., 2005. Interacciones de los péptidos antimicrobianos con las membranas celulares. Ciencia Nicolaita. 41, 83-96.
- Anaya-López, J.L., López-Meza, J.E., Baizabal-Aguirre, V.M., Cano-Camacho, H., Ochoa-Zarzosa, A., 2006. Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. Biotechnol. Lett. 28 (14): 1101-1108.
- Arias, G., Guizy, M., Luque-Ortega, J.R., Guerrero, E., de la Torre, B.G., Andreu, D., Rivas, L., Valenzuela, C., 2006. The induction of NOS2 expression by the hybrid cecropin A-melitin antibiotic peptide AC(1-8)M(1-18) in the monocytic line RAW 264.7 is triggered by a temporary and reversible plasma membrana permeation. Biochim. Biophys. Acta. 1763 (1): 110-119.
- Augustin, H.G., Kozian, D.H., Johnson, R.C., 1994. Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cells phenotypes. Bioessays. 16, 901-906.
- Bowdish, D.M.E., Davidson, D.J., Hancock, R.E.W., 2005. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. Curr. Protein Pept. Sci. 6, 35-51.
- Bradshaw, J.P., 2003. Cationic antimicrobial peptides issues for potential clinical use. Biodrugs. 17 (4): 233-240.
- Brayman, T.G., Wilks, J.W., 2003. Sensitive assay for antifungal activity of glucan synthase inhibitors that uses germ tube formation in *Candida*

- albicans* as an end point. Antimicrob. Agents Chemother. 47 (10): 3305-3310.
- 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 Physiol. 108, 1353-1358.
- Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. Nat. Rev. Microbiol. 3, 238-250.
- Cabral, K.M., Almeida, M.S., Valente, A.P., Almeida, F.C., Kurtenbach, E., 2003. Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. Protein Expr. Purif. 31 (1): 115-122.
- Cajero-Juárez, M., Avila, B., Ochoa, A., Garrido-Guerrero, E., Varela-Echavarria, A., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., 2002. Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. Eur. J. Cell Biol. 81, 1-8.
- Calderone, R., Suzuki, S., Cannon, R., Cho, T., Boyd, D., Calera, J., Chibana, H., Herman, D., Holmes, A., Jeng, H.W., Kaminishi, H., Matsumoto, T., Mikami, T., O'Sullivan, J.M., Sudoh, M., Suzuki, M., Nakashima, Y., Tanaka, T., Tompkins, G.R., Watanabe, T., 2000. *Candida albicans*: Adherence, signal and virulence. Med. Mycol. 38 (1): 125-137.
- Castro, M.S., Fontes, W., 2005. Plant defense and antimicrobial peptides. Protein Pept. Lett. 12, 11-16.
- Chen, J.J., Chen, G.H., Hsu, H.C., Li, S.S., Chen, C.S., 2004. Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD1 in *Pichia pastoris*. J. Agric. Food Chem. 52 (8): 2256-2261.
- Cherif, A., Chehimi, S., Limem, F., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., Daffonchio, D., Boudabous, A., 2003. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. Entomocidus HD9. J. Appl. Microbiol. 95, 990-1000.
- Cotter, G., Kavanagh, K., 2000. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. Br. J. Biomed. Sci. 57, 241-249.

- De Lucca, A., Walsh, T.J., 1999. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1): 1-11.
- De Lucca, A., Walsh, T.J., 2000. Antifungal peptides: Origin, activity, and therapeutic potential. *Rev. Iberoam. Micol.* 17, 116-120.
- De Samblanx, G.W., Goderis, I.J., Thevissen, K., Raemaekers, R., Fant, F., Borremans, F., Acland, D.P., Osborn, R.W., Patel, S., Broekaert, W.F., 1997. Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. *J. Biol. Chem.* 272 (2): 1171-1179.
- Dejana, E., Corada, M., Lampugnani, M.G., 1995. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.* 9, 910-918.
- Doyle, J., Brinkworth, C.S., Wegener, K.L., Carver, J.A., Llewellyn, L.E., Olver, I.N., Bowie, J.H., Wabnitz, P.A., Tyler, M.J., 2003. nNOS inhibition, antimicrobial and anticancer activity of the amphibian skin peptide, citropin 1.1 and synthetic modifications. The solution structure of a modified citropin 1.1. *Eur. J. Biochem.* 279, 1141-1153.
- Duvick, J.P., Rood, T., Rao, A.G., Marshak, D.R., 1992. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from Maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Biol. Chem.* 267 (26): 18814-18820.
- Elfstrand, M., Fossdal, C.G., Swedjemark, G., Clapham, D., Olsson, O., Sitbon, F., Sharma, P., Lonneborg, A., von Arnold, S., 2001. Identification of candidate genes for use in molecular breeding: A case study with the Norway spruce defensin-like gene, *spi1*. *Silvae Genet.* 50, 45-92.
- Epand, R.M., Vogel, H.J., 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462, 11-28.
- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H., 1997. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell.* 9, 509-520.
- Filler, S., Swerdloff, J., Hobbs, C., Luckett, P., 1995. Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63, 976-983.

- 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 Physiol.* 128, 1346-1358.
- Froy, O., Gurevitz, M., 1998. Membrane potential modulators: a thread of scarlet from plants to humans. *FASEB J.* 12, 1793-1796.
- Fujimura, M., Ideguchi, M., Minami, Y., Watanabe, K., Tadera, K., 2005. Amino acid sequence and antimicrobial activity of chitin-binding peptides, Pp-AMP1 and Pp-AMP2, from japanese bamboo shoots (*Phyllostachys pubescens*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (3): 642-645.
- Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 710-720.
- Gao, A.G., Hakimi, S.M., Mittanck, C.A., Wu, Y., Woerner, B.M., Stara, D.M., Shah, D.M., Liang, J., Rommens, C.M.T., 2000. Fungal pathogen protection in potato by expresión of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* 18, 1307-1310.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, M.J., Rodríguez-Palenzuela, P., 1998. Plant defense peptides. *Biopolymers.* 47, 479-491.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J.M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., Poza-Carrión. C., 2001. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. *FEBS Lett.* 498, 219-222.
- Guarna, M.M., Coulson, R., Rubinchik, E., 2006. Anti-inflammatory activity of cationic peptides: application to the treatment of acne vulgaris. *FEMS Microbiol. Lett.* 257, 1-6.
- Hamill, R.J., Vann, J.M., Proctor, R.A., 1986. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by culture bovine aortic endothelial cells: Model for postadherence events in endovascular infections. *Infect. Immun.* 54, 833-836.
- Hancock, R.E.W., Chapple, D.S., 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (6): 1317-1323.

- Hancock, R.E.W., Diamond, G., 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends Microbiol.* 8 (49): 402-410.
- Hancock, R.E.W., Lehrer, R., 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16, 82-88.
- Hancock, R.E.W., Rozek, A., 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 143-149.
- Hancock, R.E.W., Scott, M.G., 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (16): 8856-8861.
- Hazan, I., Sepulveda-Becerra, M., Liu, H., 2002. Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* 13, 134-145.
- Hill, C.P., Yee, J., Selsted, M.E., Eisenberg, D., 1991. Crystal structure of defensin HPN-3, an amphiphilic dimer: Mechanism of membrane permeabilization. *Science.* 251, 1481-1485.
- Holtorf, S., Ludwig-Müller, J., Apel, K., Bohlmann, H., 1998. High-level expression of a viscotoxin in *Arabidopsis thaliana* gives enhanced resistance against *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Mol. Biol.* 36, 673-680.
- Huang, S.H., Wass, C., Fu, Q., Prasadaraao, N.V., Stins, M., Kim, K.S., 1995. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*: Molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe 10*. *Infect. Immun.* 63 (11): 4470-4475.
- Jong, A., Stins, M., Huang, S., Chen, S., Kim, K., 2001. Transversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier *in vitro*. *Infect. Immun.* 69, 4536-4544.
- Kaiser, V., Diamond, G., 2000. Expression of mammalian defensin genes. *J. Leukoc. Biol.* 68, 779-784.
- Kamysz, W., Okrój, M., Lukasiak, J., 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim. Pol.* 50 (2): 461-9.
- Kobayashi, Y., Sato, A., Takashima, H., Tomaoki, H., Nishimura, S., Kyogoku, Y., Ikenaka, K., Kondo, T., Mikoshiba, K., Hojo, H., Aimoto, S., Moroder, L., 1991. A new helix- α motif in membrane active peptides. *Neurochem. Int.* 18, 523-534.

- Kristensen, A.K., Brunstedt, J., Nielsen, J.E., Mikkelsen, J.D., Roepstorff, P., 1999. Processing, disulfide pattern, and biological activity of a sugar beet defensin, AX2 expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 16 (3): 377-387.
- Kumamoto, C.A., Vences, M.D., 2005. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell. Microbiol.* 7 (11): 1546-1554.
- Kushmerick, C., Souza-Castro, M., Santos-Cruz, J., Bloch, C., Beirao, S.L., 1998. Functional and structural features of γ -zeathionins, a new class of sodium channel blockers. *FEBS Lett.* 440, 302-306.
- Li, L., Wang, J.X., Zhao, X.F., Kang, C.J., Liu, N., Xiang, J.H., Li, F.H., Sueda, S., Kondo, H., 2005. High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 39 (29): 144-151.
- Lai, F.M., DeLong, C., Mei, K., Wignes, T., Fobert, P.R., 2002. Analysis of the DRR230 family of pea defensins : gene expression pattern and evidence of broad host-range antifungal activity. *Plant Sci.* 163, 855-864.
- Lay, F.T., Brugliera, F., Anderson, M.A., 2003. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiol.* 13, 1283-1293.
- Lay, F.T., Anderson, M.A., 2005. Defensins: Components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6, 85-101.
- Lee, L.R., 1992. Endothelial cells: adhesión and tight junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 830-833.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1997. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 14614-14619.
- Lupetti, A., Danesi, R., Van't Wout, J.W., Van Dissel, J.T., Senesi, S., Nibbering, P.H., 2002. Antimicrobial peptides: therapeutic potencial for the treatment of *Candida* infections. *Expert Opin Investig Drugs.* 11 (2): 309-318.

- Meyer, B., Houlné, G., Pozueta-Romero, J., Schantz, M.L., Schantz, R., 1996. Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper Plant Physiol. 112, 615-622.
- Milligan, S.B., Gasser, C.S., 1995. Nature and regulation of pistil-expressed genes in tomato. Plant Mol. Biol. 28 (4): 691-711.
- Moreno, M., Segura, A., García-Olmedo, F., 1994. Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. Eur. J. Biochem. 223, 135-139.
- Motobu, M., Amer, S., Yamada, M., Nakamura, K., Saido-Sakanak, H., Asaoka, A., Yamakawa, M., Hirota, Y., 2004. J. Vet. Med. Sci. 66 (3): 319-322.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., Heijne, G.V., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng. 10, 1-6.
- Orozco, A.S., Zhou, X., Filler, S.G., 2000. Mechanism of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. Infect. Immun. 68 (3): 1134-1141.
- Papo, N., Shai, Y., 2005. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. Cell. Mol. Life Sci. 62, 784-790.
- Papo, N., Shai, Y., 2003. New lytic peptides based on the D, L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. Biochem. 42, 9346-9354.
- Park, C.J., Park, C.B., Hong, S.S., Lee, H.S., Lee, S.Y., Kim, S.C., 2000. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. Plant Mol. Biol. 44, 187-197.
- Park, H.C., Kang, Y.H., Chun, H.J., Koo, J.C., Cheong, Y.H., Kim, C.Y., Kim, M.C., Chung, W.S., Kim, J.C., Yoo, J.H., Koo, S.C., Lim, C.O., Lee, S.Y., Cho, M.J., 2002. Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in Chinese cabbage. Plant Mol. Biol. 50 (1) 59-69.
- Patrzykat, A., Friedrich, C.L., Zhang, L., Mendoza, V., Hancock, R.E.W., 2002. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit

- macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 46 (3): 605-614.
- Pelegri, P.B., Franco, O.L., 2005. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 2239-2253.
- Phan, Q.T., Belanger, P.H., Filler, S.G., 2000. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. Infect. Immun. 68 (6): 3485-3490.
- Phan, Q.T., Fratti, R.A., Prasadara, N.V., Edwards, J.E., Filler, S.G., 2005. N-cadherins mediate endocytosis of *Candida albicans* by endothelial cells. J. Biol. Chem. 280, 10455-10461.
- Pore, N., Pal, S., 2000. Expression of the antibacterial peptide, cecropin, in cultured mammalian cells. Biotechnol. Lett. 22, 151- 155.
- Rabelink, T.J., Luscher, F., 2006. Endothelial nitric oxide synthase host defense enzyme of the endothelium?. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26, 267-271.
- Risso, A., 2000. Leukocyte antimicrobial peptides: Multifunctional effector molecules of innate immunity. J. Leukoc. Biol. 68, 785-792.
- Saitoh, H., Kiba, A., Nishihara, M., Yamamura, S., Suzuki, K., Terauchi, R., 2001. Production of antimicrobial defensin in *Nicotiana benthamiana* with a potato virus X vector. Mol. Plant Microbe Interact. 14 (2): 11-115.
- Sánchez, A.A., Johnston, D.A., Myers, C., Edwards, J.E., Mitchell, A.P., Filler, S.G., 2004. Relationship between *Candida albicans* virulence during experimental hematogenously disseminated infection and endothelial cell damage *in vitro*. Infect. Immun. 72 (1): 598-601.
- Schägger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166, 368-379.
- Segura, A., Moreno, M., Molina, A., García-Olmedo, F., 1998. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*) FEBS Lett. 435, 159-162.

- Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A., Garía.Olmedo, F., 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12 (1): 16-23.
- Selsted, M.E., Harwig, S.S.L., 1989. Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. *J. Biol. Chem.* 264 (7): 4003-4007.
- Sitaram, N., Nagaraj, R., 1999. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462, 29-54.
- Song, X., Wang, J., Wu, F., Li, X., Teng, M., Gong, W., 2005. cDNA cloning functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from *Pachyrrhizus erosus* seeds. *Plant Mol. Biol.* 57 (1): 13-20.
- Stins, M.F., Nemani, P.V., Wass, C., Kim, K.S., 1999. *Escherichia coli* binding to and invasion of brain microvascular endothelial cells derived from humans and rats of different ages. *Infect. Immun.* 67 (10): 5522-5525.
- Tang, Y.Q., Selsted, M.E., 1993. Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial β -defensin peptide from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268 (9): 6649-6653.
- Tam, J.P., Lu, Y.A., Yang, J.L., Chiu, K.W., 1999. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8913-8918.
- Terras, F.R.G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torreken, S., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F., 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. *Plant Cell.* 7, 573-588.
- Thevissen, K., Francois, I.E.J.A., Takemoto, J.Y., Ferket, K.K.A., Meert, E.M.K., Cammue, B.P.A., 2003. DmAMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 169-173.
- Thevissen, K., Warnecke, D., Francois, I., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zahringer, U., Thomma, B., Fereket, K., Cammue, B.P., 2004. Defensins

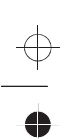
- from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. J. Biol. Chem. 279, 3900-3905.
- Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., Thevissen, k., 2002. Plant defensines. Planta. 216, 193-202.
- Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., Thevissen, K., 2003. Mode of action of plant defensins suggest therapeutic potential. Curr Drug Targets Infect Disord. 3, 1-8.
- Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., Thevissen, K., 2002. Plant defensins. Planta. 216, 193-202.
- Torner, L., Nava, G., Dueñas, Z., Corbacho, A., Mejía, S., López, F., Cajero, M., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., 1999. Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. J. Endocrinol. 161, 423-432.
- Vann, J.M., Proctor, R.A., 1987. Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time- and inoculum-dependent damage to endothelial cell monolayers. Infect. Immun. 55, 2155-2163.
- Wang, Y., Nowak, G., Culley, D., Hadwiger, L., Fristensky, B., 1999. Constitutive expression of a pea defense gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*). Mol. Plant Microbe Interact. 12, 410-418.
- Wisplinghoff, H., Bishoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, B., 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Abalysis of 24,179 cases from a prospectivenationwide surveillance study. Clin. Infect. Dis. 39, 309-317.
- Wong, J.H., Ng, T.B., 2005. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. Peptides. 26, 1120-1126.
- Würtele, H., Little, K.C.E., Chartrand, P., 2003. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. Gene Ther. 10, 1791-1799.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicelular organism. Nature. 415, 389-395.

- Zhang, Y., Lewis, K., 1997. F abatins: new antimicrobial plant peptides. FEMS Microbiol. Lett. 149, 59-64.
- Zhao, H.X., Rinaldi, A.C., Rufo, A., Bozzi, A., Kinnunen, P.K.J., Di Giulio, A., 2003. Structural and charge requirements for antimicrobial peptide insertion into biological and model membranes. In: Menestrina, G. Dalla-Serra, M. Lazarovici, P. Cellular and Molecular Mechanisms of Toxin Action. Pore-Forming Peptides and Protein Toxins. First edition. Taylor & Francis Group. 5, 151-177.
- Zink, S., Naß, T., Rösen, P., Ernst, J.F., 1996. Migration of the fungal pathogen *Candida albicans* across endothelial monolayers. Infect. Immun. 64 (12): 5085-5091.
- Zughaier, S.M., Shafer, W.M., Stephens, D.S., 2005. Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory Bursa response in human and murine macrophages. Cell. Microbiol. 7 (9): 1251-1262.

11. ANEXOS (PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TRABAJO DE TESIS)

Anaya-López, J.L., López-Meza, J.E., Baizabal-Aguirre, V.M., Ochoa-Zarzosa, A., 2005. Interacciones de los péptidos antimicrobianos con las membranas celulares. *Ciencia Nicolaita*. 41, 83-96.

Anaya-López, J.L., Contreras-Guzmán, O.E., Carabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V.M., López-Meza, J.E., Valdéz-Alarcón J.J., Ochoa-Zarzosa, A., 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 81, 358-361.



Interacciones de los péptidos antimicrobianos con las membranas celulares

José Luis Anaya-López, Joel Edmundo López-Meza, Victor Manuel Baizabal-Aguirre y Alejandra Ochoa-Zarzosa

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH

Resumen

Las plantas y los animales comparten mecanismos básicos de defensa inespecíficos que constituyen la primera barrera contra los patógenos, como lo es la producción de péptidos que inactivan a diferentes microorganismos. Estos péptidos presentan entre sí similitudes en estructura y actividad biológica y su principal blanco de acción son las membranas plasmáticas (MP) de bacterias, hongos y células de mamíferos. Se han propuesto varios mecanismos para explicar su actividad antimicrobiana como: 1) la formación de poros en la MP que ocasiona la salida del contenido celular; 2) la redistribución de los lípidos de la bicapa; y 3) la interacción del péptido con componentes intracelulares necesarios para el funcionamiento celular. El estudio de la interacción entre los péptidos antimicrobianos (PA) y los lípidos de la MP es fundamental para entender su actividad biológica y selectividad. El objetivo de esta revisión es analizar los modelos propuestos que explican las interacciones entre los PA y las MP microbianas.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, membrana plasmática, fosfolípidos.

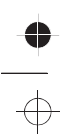
Abstract

Interactions between antimicrobial peptides and cellular membranes

Ciencia Nicolaita No. 41

83

Agosto de 2005



Plants and animals share common inespecific defense mechanisms against pathogens such as the production of antimicrobial peptides which are able to kill or inactivate different microorganisms. These peptides have a similar structure and biological activity, and their main targets are bacterial, fungal, or even mammalian cellular membranes. The possible mechanisms of action of these peptides include: 1) the creation of pores in target membranes; 2) the alteration in the distribution of lipids forming the bilayer; and 3) the damage of intracellular targets through peptide internalization. The study of the interactions among antimicrobial peptides and membrane lipids are a key element for the understanding of their biological activity and selectivity. In this review we analyze the models proposed to explain the interactions between antimicrobial peptides and cellular membranes.

Keywords: Antimicrobial peptides, plasmatic membrane, phospholipids

Introducción

Hasta el momento se han descrito más de 900 péptidos aniónicos y catiónicos con actividad antimicrobiana, los cuales son producidos por bacterias, plantas y animales (Hancock y Chapple, 1999; Brogdem 2005). El objetivo de esta revisión es analizar los modelos que explican las interacciones de estos péptidos con las membranas celulares.

CUADRO 1		
Clasificación y características de algunos péptidos antimicrobianos.		
Grupo	Péptido	Origen
Péptidos aniónicos	Dermacidina	Glándulas sudoríparas humanas
Péptidos catiónicos lineales con estructura de hélice α	Melitina Magainina 2 Cecropina A Dermaseptina	Veneno de abeja Piel de anfibios Insectos Piel de anfibios
Péptidos catiónicos ricos en ciertos aa	Histatina-5 (ricos en histidina) PR-39 (ricos en prolina y arginina)	Saliva humana Neutrófilos de cerdo
Péptidos aniónicos y catiónicos que contienen cisteína y forman puentes disulfuro	Defensinas Tioninas Péptido antimicrobiano de tráquea (TAP) Defensina humana- β 2 (hBD-2) Drosomicina α defensina HNP-1	Epitelios de mamíferos e insectos Plantas Mucosa respiratoria de bovino Mucosa oral y glándulas salivales humanas Mosca Neutrófilos humanos
Péptidos catiónicos y aniónicos fragmentos de proteínas más grandes	Lactoferricina	Leche bovina
Modificado de: Eband y Vogel, 1999; Bradshaw 2003; Brogdem 2005.		

Interacciones de los péptidos antimicrobianos...

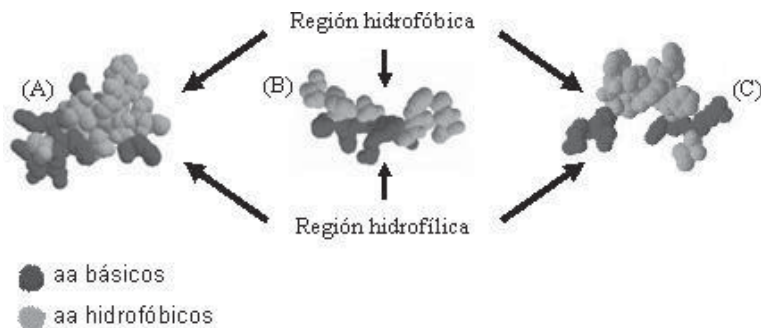


Figura 1. Estructura y orientación de los aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos de tres diferentes péptidos antimicrobianos. El PA se organiza de manera que los grupos de aa básicos (catiónicos) e hidrofóbicos se ubican en regiones específicas, confiriéndoles un carácter “anfipático”. Sin embargo, esta característica no siempre es tan evidente en todos los PA. Los aa básicos están representados en negro y los aa hidrofóbicos en gris. Panel A, defensina- $\alpha 3$ de humano; panel B, magainina 2 de rana; panel C, indolicidina bovina. Basado en: Zasloff 2002.

La amplia distribución de los péptidos antimicrobianos (PA) en las plantas y los animales sugiere que desempeñan una función importante en la evolución de los organismos multicelulares complejos (Zasloff 2002). Los PA difieren en la secuencia de aminoácidos (aa), en la estructura, en el tamaño (tienen de 12 a 50 aa) y en la carga, siendo la mayoría aniónicos o catiónicos, aunque también los hay neutros. En el Cuadro 1 se presenta la clasificación reciente de los PA que se basa principalmente en: 1) el tipo de aa que los componen, 2) la estructura secundaria que adoptan, y 3) la carga (Hancock y Lehrer, 1998; Epand y Vogel 1999; Zasloff 2002; Brogdem 2005). El empleo de la resonancia magnética nuclear (RMN) ha contribuido a la clasificación de los PA (Zhao *et al.*, 2003; Brogdem 2005). Mediante RMN se ha determinado el carácter anfipático de los PA, como se muestra en la Figura 1. Esta característica resulta de la conformación de la molécula, en la que los aa hidrofóbicos y los catiónicos (básicos) se agrupan en regiones espaciales discretas. Esta estructura favorece la interacción específica de las regiones catiónicas del PA con las cargas negativas de los grupos polares de los fosfolípidos (fosfolípidos aniónicos) de las membranas plasmáticas (MP) (Froy y Gurevitz, 1998; Epand y Vogel, 1999; Zasloff 2002).

En los vertebrados superiores, los PA se producen principalmente en la piel y en los epitelios del tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, donde son secretados por células y glándulas especializadas. Algunos PA se almacenan en gránulos, vesículas y células fagocíticas móviles, y se liberan en el sitio de la infección microbiana (Kamysz *et al.*, 2003). En las plantas, los PA se producen preferentemente en sitios en los que se puede llevar a cabo el primer contacto con los patógenos como son: los primordios foliares, las células colindantes a la cavidad subestomal, la epidermis y los estomas (García-Olmedo *et al.*, 1998). Las bacterias producen PA catiónicos o neutros que se conocen como bacteriocinas (Hancock y Chapple, 1999).

Los PA de plantas y animales se expresan de manera constitutiva o inducida (Epple *et al.*, 1995; Vignutelli *et al.*, 1998). Por ejemplo, en respuesta a un proceso infeccioso o inflamatorio se incrementa la concentración del ARNm del péptido antimicrobiano de tráquea de bovino (TAP) y de la defensina humana β -2 (hBD-2) en bovinos y humanos, respectivamente (Kaiser y Diamond, 2000).

El principal blanco de acción de los PA es la MP de células procariotes y eucariotes, con la cual interaccionan mediante diversos mecanismos. Dentro de éstos destaca la formación de poros en la MP blanco, que permite la salida de iones y de otras moléculas desde el interior de la célula (Eppand y Vogel, 1999). La actividad y selectividad de los PA están determinadas por el número de aa que contienen, su secuencia, estructura y carácter anfipático (Brogdem 2005). Los modelos que intentan explicar la permeabilización de la MP por acción de los PA comprenden: 1) el modelo de “palo de barril”, que describe el efecto de los péptidos con estructuras de hélice α que se agrupan para formar un poro transmembranal; 2) el de “tapizado” propone que diversos péptidos con estructura de hélice α actúan cooperativamente y se acumulan sobre la MP semejando un “tapiz” antes de formar los poros (Shai 1999); y 3) el modelo “toroidal” o de “dos etapas”, que describe la unión del PA a los fosfolípidos de la MP mediante la transición de un estado inactivo a uno activo; este modelo explica el mecanismo de acción de los PA de hélice α y de los que contienen hojas β , ricos en residuos de cisteína (Huang 2000; Brogdem 2005).

Aunque la interacción de los PA con la MP ocasiona la lisis celular, este no es el único mecanismo mediante el que lisan células. Los PA ejercen efecto sobre otros blancos intracelulares, además de la MP. Debido a la diversidad de PA y de microorganismos sensibles a los mismos, los mecanismos de interacción con las MP son variados (Eppand y Vogel, 1999).

Interacción de los péptidos antimicrobianos con las membranas celulares

Una de las características más estudiadas de los PA es su capacidad para interaccionar de manera electrostática con las cargas negativas de los fosfolípidos aniónicos localizados en la membrana externa de las bacterias Gram negativas y Gram positivas, como el fosfatidilglicerol (FG), la fosfatidilserina (FS), la cardiolipina (CL) y los lipopolisacáridos (LPS) polianiónicos. De manera contraria muchos PA no interactúan con la MP de los mamíferos porque están constituidas principalmente por lípidos zwitteriónicos, con carga neta neutra como la fosfatidilcolina (FC) y la esfingomielina (EM) (Zhao *et al.*, 2003). En el Cuadro 2 se muestran las diferencias en la composición de lípidos de las MP de algunas bacterias, hongos y células de mamífero representativos. La selectividad de muchos PA por MP bacterianas también se debe a que éstas carecen de colesterol y las cabezas polares aniónicas de los fosfolípidos están orientadas hacia el exterior (Hancock y Lehrer, 1998), a diferencia de las MP de plantas y animales en las que la mayoría de las cabezas polares con carga ne-

Interacciones de los péptidos antimicrobianos...

gativa de los fosfolípidos se localizan en la capa interna de la membrana, de cara al citoplasma. En la Figura 2 se muestra la orientación de las cabezas polares de diferentes fosfolípidos en distintas MP representativas. De manera general, la presencia de colesterol en la MP de los mamíferos reduce la actividad de los PA, debido probablemente a que la interacción electrostática entre los aa catiónicos de los PA y las cabezas polares de los fosfolípidos aniónicos se debilita (Zaslöff 2002). Se desconoce cual es el mecanismo que origina que la interacción se debilite, sin embargo se conoce el hecho de que el colesterol afecta la fluidez y el potencial dipolo de las membranas formadas por fosfolípidos, y por lo tanto modula la actividad de los péptidos insertados en la membrana. Por ejemplo, la adición de colesterol en membranas de fosfolípidos retrasa los efectos líticos del PA cecropina (producido por diversos insectos), sugiriendo que el péptido se inserta de manera más lenta en las membranas que contienen colesterol (Bechinger 1999), y en membranas modelo se ha observado que la presencia de colesterol disminuye la actividad lítica del PA gramicidina S de *Bacillus brevis* (Prenner *et al.*, 1999). Otro posible mecanismo puede deberse al hecho de que el colesterol interacciona con los fosfolípidos zwitteriónicos FC y EM incrementando su longitud, lo que ocasiona un aumento en el grosor de la bicapa de la MP que podría interferir en su interacción con el PA (Sprong *et al.*, 2001). En la Figura 3 se representan las interacciones electrostáticas que tienen los PA catiónicos con las MP de bacterias y mamíferos.

CUADRO 2

Composición porcentual de los principales lípidos que componen las membranas celulares.

Organismo	Lípidos zwitteriónicos (±)			Lípidos con carga negativa neta			Esteroles
	FE	FC	EM	FS	FG	CL + lisoFG	Colesterol
<i>Escherichia coli</i>	82	---	---	---	6	12	---
<i>Salmonella typhimurium</i>	60	---	---	---	33	7	---
<i>Pseudomonas cepacia</i>	82	---	---	---	18	---	---
<i>Staphylococcus aureus</i>	---	---	---	---	57	43	---
<i>Candida albicans</i>	70	4	15	11	---	---	---
<i>Candida neoformans</i>	29	51	---	16	---	4	---
Eritrocito	---	40	40	---	---	---	20
Mamíferos	17	36	15	8	4	1	19

Notas. FE, fosfatidiletanolamina; FC, fosfatidilcolina; EM, esfingomielina; FS, fosfatidilserina; FG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolipina; lisoFG, lisofosfatidilglicerol. Modificado de: Graham y Higgins, 1997; Zhao *et al.*, 2003.

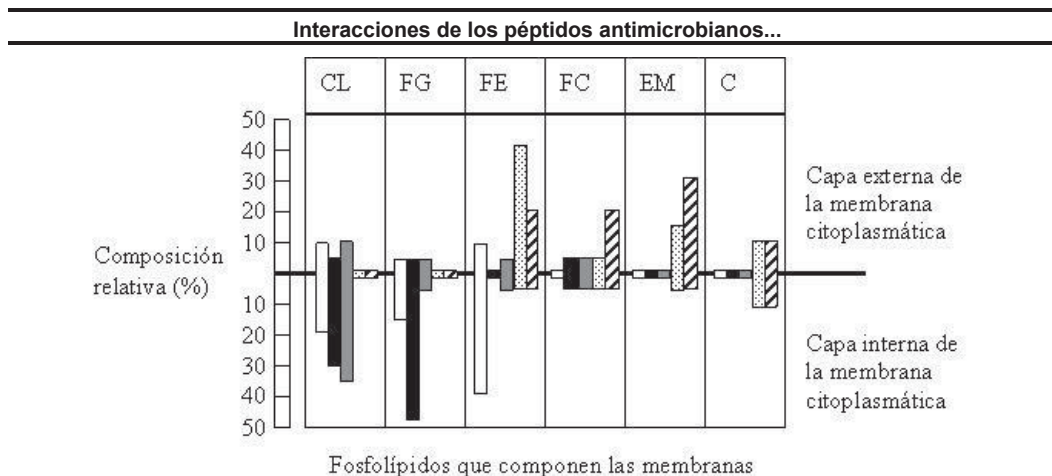


Figura 2. Comparación de la arquitectura de las membranas citoplasmáticas de bacterias, hongos y células humanas. Se muestra la composición (%) y distribución relativos de los fosfolípidos aniónicos cardiolipina (CL) y fosfatidilglicerol (FG); de los fosfolípidos zwitteriónicos fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilcolina (FC) y esfingomielina (EM), y de los esteroides colesterol o ergosterol (C) en las capas internas y externas de la membrana citoplasmática de las bacterias *Escherichia coli* (barras blancas), *Staphylococcus aureus* (barras negras), *Bacillus subtilis* (barras grises), del hongo *Candida albicans* (barras punteadas) y de eritrocitos humanos (barras con diagonales). Basado en: Yeaman y Yount, 2003.

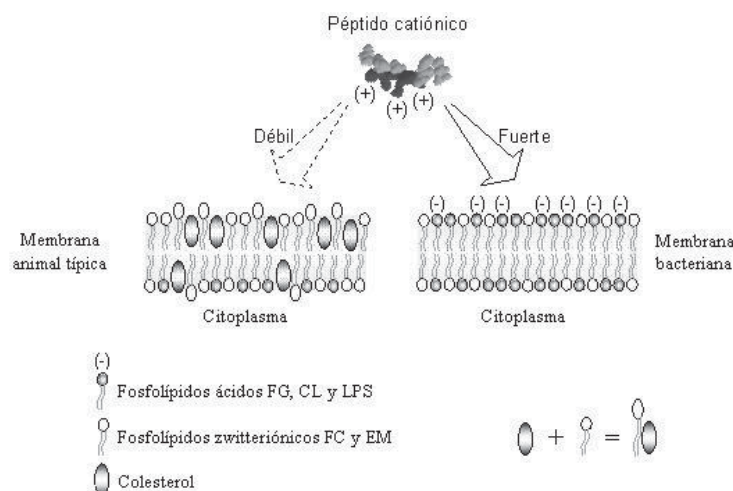


Figura 3. Representación de las interacciones de los péptidos antimicrobianos con las membranas animales y con las membranas bacterianas. Los aa catiónicos de los PA (negro) interaccionan electrostáticamente con las cargas negativas de las “cabezas polares” de los fosfolípidos, debido a esta interacción los PA tienen mayor afinidad por las MP bacterianas que están compuestas principalmente por fosfolípidos aniónicos, mientras que la cara exterior de la MP de las células animales está compuesta en mayor proporción por fosfolípidos zwitteriónicos (como la fosfatidilcolina y la esfingomielina). Se ha demostrado que la presencia de colesterol disminuye la actividad de algunos PA al incrementar el grosor de la bicapa de la MP mediante el aumento en la longitud de algunos fosfolípidos. Basado en: Matsuzaki, 1999; Sprong, *et al.*, 2001 y Zasloff, 2002.

Modelos de estudio de la interacción de los péptidos antimicrobianos con las membranas celulares

El estudio de la interacción entre los PA y los lípidos de la MP es clave para comprender la actividad biológica y la selectividad de estos péptidos. Esta interacción puede ser analizada *in vivo* con células intactas, o *in vitro* con membranas aisladas o artificiales. Debido a las interacciones complejas que se producen entre los lípidos y las proteínas de las membranas celulares, los estudios realizados con células completas sólo permiten caracterizar el daño global causado a la MP. Por lo tanto, la mayor parte de los conocimientos sobre la interacción entre los lípidos de la MP con los PA proviene de estudios en membranas modelo. Entre los modelos membranales más utilizados destacan los liposomas, que son vesículas de tamaño y composición fosfolipídica diferente que permiten evaluar mezclas de fosfolípidos. Sin embargo, estas estructuras no logran mimetizar adecuadamente a la membrana lipídica. Esta desventaja se solventa con el empleo de monocapas, que son estructuras homogéneas, estables, poseen una geometría plana y los lípidos tienen una orientación específica, por lo que proveen una buena aproximación para el estudio de las interacciones péptido-membrana (Brockman 1999). Sin embargo, se sabe que la acción de un péptido varía dependiendo del modelo de membrana empleado (Shai 1999).

Modelos de interacción de los péptidos antimicrobianos con las membranas celulares

La interacción de los PA con las membranas se ha evaluado principalmente con los péptidos catiónicos con estructuras de hélice α . Aunque el mecanismo de interacción puede ser diferente para cada tipo de péptido, su principal acción involucra la formación de poros o canales que permiten la salida del contenido citoplasmático o bien el flujo de iones específicos (Bradshaw 2003). Estos mecanismos se explican en los modelos de “palo de barril”, “toroidal” y “tapizado”, que a continuación se describen.

A) Modelo de “palo de barril”

Este se presenta en la Figura 4, propone que inicialmente un grupo de moléculas de péptidos catiónicos con estructuras de hélice α interaccionan entre sí sobre la superficie de la MP para formar un complejo (Figura 4A). Posteriormente los péptidos se orientan perpendicularmente al plano de la MP (Figura 4B), permitiendo que la región hidrofóbica del péptido interaccione con la región hidrofóbica de la bicapa, mientras que la superficie hidrofílica del péptido se orienta hacia el interior formando un canal (Figura 4C). De esta manera, el complejo proteico formado se comporta como un poro insertado en la MP. La formación de estos canales, ocasiona alteraciones en el potencial de membrana, salida de solutos y finalmente la lisis celular (Zhao *et al.*, 2003). Se ha propuesto que se requiere de al menos tres moléculas del péptido para la formación del canal (Papo y Shai, 2003). En este modelo se sugiere

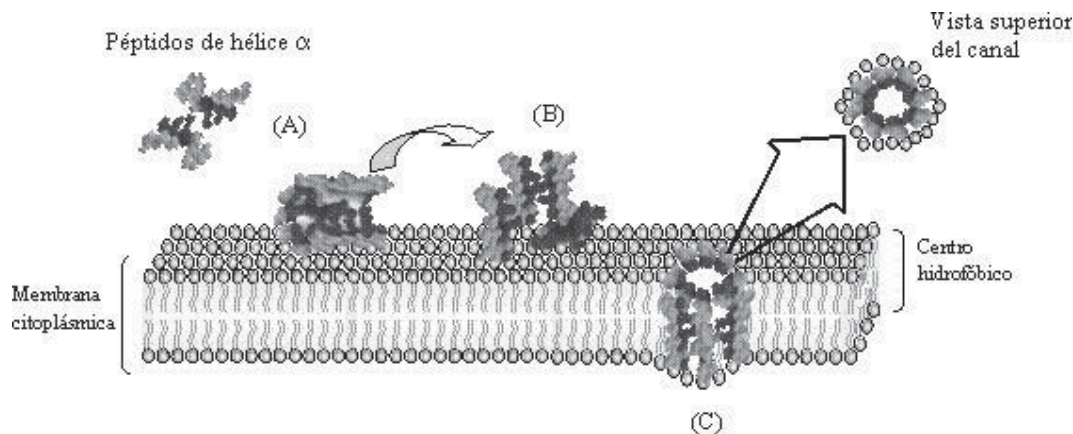


Figura 4. Representación esquemática del modelo de “palo de barril” para explicar la interacción de los péptidos antimicrobianos con las membranas bacterianas. En un primer paso (reclutamiento), los monómeros del péptido se unen entre sí sobre la superficie de la membrana externa de la bicapa. Este proceso está dirigido principalmente por la interacción de las regiones hidrofílicas del péptido (mostradas en negro), los péptidos reclutados se orientan de manera paralela al plano de la bicapa (panel A), cuando se reclutan suficientes péptidos (al menos tres de ellos), el complejo péptido sufre una reorientación de manera perpendicular a la MP (panel B), y finalmente el complejo penetra a través de la región hidrofóbica de la bicapa (inserción) formando un canal (panel C). Modificado de Zhao *et al.*, 2003.

que el proceso de inserción del péptido está dirigido principalmente por interacciones hidrofóbicas y la carga de las cabezas polares de los fosfolípidos es un factor poco relevante ya que el péptido interacciona tanto con los fosfolípidos zwitteriónicos de la MP como con aquellos que poseen carga negativa (Oren y Shai, 1998). Este modelo explica el mecanismo de acción de péptidos líticos no selectivos, es decir, que lisan microorganismos y células de mamífero, como los eritrocitos (Shai 1999). La melitina, un PA de veneno de *Apis mellifera* (abeja) posee un mecanismo de acción que puede ser explicado mediante el modelo de palo de barril (Zhao *et al.*, 2003).

B) Modelo de “tapizado”

En este modelo se propone que los PA catiónicos se unen a los fosfolípidos de la capa externa de la MP cubriendo la bicapa como un “tapiz”. Al inicio de la interacción los péptidos se orientan paralelamente sobre la MP (Figura 5A). Cuando el péptido alcanza cierta concentración crítica, los monómeros rotan y se reorientan hacia el núcleo hidrofóbico de la MP (Figura 5B) produciendo la formación de micelas y el colapso de la MP (Figura 5C) (Shai 1995). Las primeras etapas del enlace del péptido con la MP están basadas en las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas del péptido y las cargas negativas de las cabezas de los fosfolípidos de la MP (Shai 1995, 1999), mientras que la formación del poro está regida principalmente por interacciones entre la región hidrofóbica del PA y el centro hidrofóbico de la bicapa (Papo y Shai, 2003). Los péptidos que se caracterizan por tener un

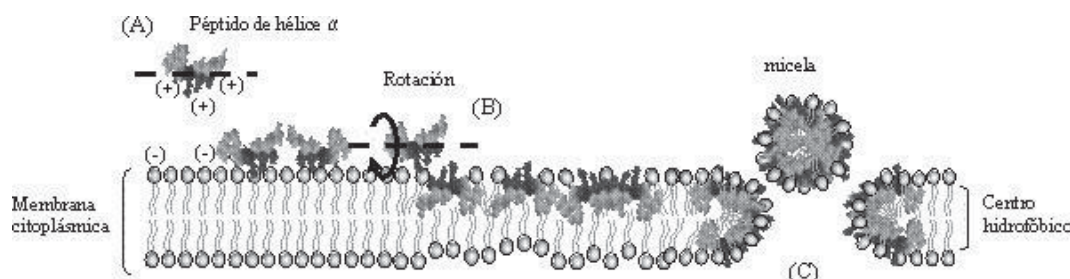


Figura 5. Representación esquemática del modelo de “tapizado” para explicar la interacción de los péptidos antimicrobianos con las membranas bacterianas. Este modelo describe la interacción que se da entre las cargas positivas de los péptidos catiónicos de hélice α con las cargas negativas de las cabezas polares de los fosfolípidos que se encuentran orientados hacia el exterior de las membranas. Los péptidos enlazados permanecen paralelos a la membrana externa de la bicapa (panel A), cuando se alcanza una concentración crítica, los péptidos rotan sobre su propio eje, provocando que los fosfolípidos unidos a ellos se reorienten (panel B), esta reorientación produce el colapso de la estructura de la MP y la formación de micelas con un núcleo hidrofóbico, formando un poro en la MP (panel C). Modificado de Zhao *et al.*, 2003.

mecanismo de acción del tipo “tapizado” presentan una afinidad baja por los lípidos zwitteriónicos en comparación con los lípidos ácidos (Zhao *et al.*, 2003). Este modelo describe el mecanismo de acción de la mayoría de los PA catiónicos, incluyendo a la dermaseptina de piel de anfibios y a las cecropinas de insectos. El modelo de “tapizado” puede explicar el mecanismo de acción de péptidos con un tamaño inferior a los 23 ó 24 aa que no atraviesan la MP y cuyo mecanismo de acción no se puede explicar por el modelo de “palo de barril” (Zhao *et al.*, 2003).

C) Modelo “toroidal”

El modelo “toroidal” explica el mecanismo de acción de los péptidos catiónicos con estructuras de hélice α y de aquellos que forman puentes disulfuro. Inicialmente el péptido se orienta paralelamente al plano de la MP y se une en la región de las cabezas polares de los fosfolípidos en un estado funcionalmente inactivo (Figura 6A). Cuando se supera una relación molar límite péptido-lípido (por ejemplo: 1:30 para la magainina 2, Cuadro 1), los péptidos se reorientan perpendicularmente al plano de la bicapa y con varios lípidos circundantes se invierten hacia el interior de la región hidrofóbica de la MP (Figura 6B). Esto forma un “complejo dinámico supramolecular péptido-lípido” (Figura 6B'), que produce la ruptura irreversible de la MP. La transición entre el estado inactivo y el activo del péptido unido a la MP depende de la concentración del PA y la composición de los fosfolípidos de la bicapa (Huang 2000).

De acuerdo con el modelo “toroidal” los poros están conformados por hileras de lípidos interpuestos a los péptidos, los cuales se orientan perpendicularmente a la superficie de la MP, permitiendo así la interacción de las regiones hidrofílicas del poro con las cabezas polares de los fosfolípidos, lo que provoca que las cabezas de los lípidos y la cara polar de las

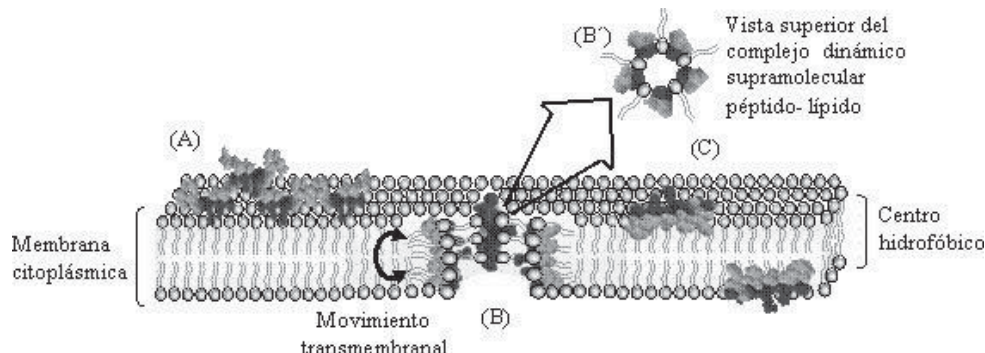


Figura 6. Representación esquemática del modelo “toroidal” para explicar la interacción de los péptidos antimicrobianos con las membranas bacterianas. Este modelo conocido también como de “dos etapas”, describe la transición del péptido de un estado inactivo a un estado activo. A bajas concentraciones (estado inactivo), los péptidos se orientan de forma paralela al plano de la bicapa (panel A). Cuando se alcanza una concentración crítica. Las moléculas del péptido se reorientan perpendicularmente penetrando la región hidrofóbica de la bicapa (estado activo) y junto con algunas moléculas del lípido adoptan un estado transitorio de multiporo, conocido como complejo dinámico supramolecular péptido-lípido (panel B’), esto produce la ruptura irreversible de la MP y un incremento en el “movimiento transmembranal” de los lípidos (flecha de dos cabezas) (panel B). Como resultado del incremento del “movimiento transmembranal” de los lípidos se puede producir una orientación de moléculas del péptido hacia la capa interna de la bicapa (panel C). Modificado de Zhao *et al.*, 2003.

hélices α en el caso de los péptidos catiónicos, se orienten hacia el interior del poro. De esta manera, las caras exterior e interior de la bicapa se convierten en una capa continua que delimita el interior del poro. El poro recién formado permite un transporte acoplado de lípidos y péptidos a través de la bicapa con un incremento del movimiento transmembranal de fosfolípidos o “flip-flop” (Figura 6B) y eventualmente la orientación de monómeros del péptido hacia el interior de la bicapa (Figura 6C). Este arreglo difiere del clásico canal que se explica en el modelo de “palo de barril”, en donde las interacciones se dan principalmente entre la cara hidrofóbica del poro con las cadenas acilo del núcleo lipídico de la bicapa (Zhao *et al.*, 2003). La magnitud, duración y concentración requerida para la formación del poro depende del péptido, pero en general se considera que el estado de multiporo es la estructura más estable y se forma cuando existen altas concentraciones del péptido. Sin embargo, los poros individuales pueden tener un tiempo de vida corto y permitir la difusión de iones (Matsuzaki *et al.*, 1997).

Otros mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos

Algunos PA poseen mecanismos diferentes a la ruptura de la MP para su efecto antimicrobiano: pueden unirse al ADN o inhibir la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Es por esto que la capacidad de algunos PA para permeabilizar las MP puede ser solo una manera de llegar a blancos intracelulares. Con base en lo anterior, la actividad antimicrobiana de estos péptidos puede estar basada en las diferencias de interacción con las membranas, lo que puede generar distintas velocidades de transporte del péptido al interior de las células

(Epand y Vogel, 1999; Thomma *et al.*, 2002). Algunos ejemplos de otros mecanismos de acción son los que ejercen la pirocoricina de varias especies de insectos y la apidaecina de *Apis mellifera* que se unen a la proteína de choque térmico de *E. coli* DnaK (Powers y Hancock, 2003; Markossian *et al.*, 2004), o la lactoferricina B de leche bovina que se une a regiones específicas de ADN humano alterando la transcripción (He y Furmansk, 1995). El PA atacina del gusano de seda gigante *Hyalophora cecropia* se une a los LPS e inhibe la síntesis de proteínas de la cara exterior de la MP; la PR-39, una defensina de neutrófilos de cerdo rica en arginina, impide la síntesis de ADN en *E. coli* (Kamysz *et al.*, 2003).

Otros efectos de los péptidos antimicrobianos

Se ha demostrado que algunos PA presentan distintos efectos biológicos en función de su concentración. Por ejemplo, la defensina α de neutrófilos humanos (HNP-1) estimula el crecimiento de la línea celular A549 de células epiteliales humanas de pulmón a concentraciones inferiores a los 10 $\mu\text{g/ml}$ y a concentraciones cercanas a los 25 $\mu\text{g/ml}$ estimula la síntesis de ADN en células de carcinoma renal. Otro ejemplo es el del PA híbrido P-Der (pleurocidina del pez *Pleuronectes americanus* y dermaseptina de anfibios) que a la concentración mínima bactericida inhibe la síntesis de ARN en *Escherichia coli* y a una concentración 10 veces mayor causa un incremento en el potencial de membrana (Hancock y Rozek, 2002).

Aplicación de los péptidos antimicrobianos

El creciente problema de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos y la necesidad de encontrar nuevos tratamientos para las infecciones, estimula el interés de emplear a los PA como agentes terapéuticos. La selectividad y el amplio espectro de acción de estos péptidos, los hace candidatos atractivos para su aplicación clínica contra bacterias y hongos. Un número importante de estos péptidos actúan sobre la estructura principal de la MP y no sobre un receptor o enzima específicos por lo que se espera que las bacterias y los hongos no desarrollen resistencia fácilmente, debido a que es menos viable el cambiar la composición total de la MP que la mutación de un receptor específico o una sola proteína (Bradshaw 2003).

Conclusiones

A pesar de que en los últimos años el conocimiento de los PA se ha incrementado, aún quedan por responder preguntas sobre su mecanismo de acción. Se sabe que su selectividad y capacidad para matar bacterias y hongos son el resultado de diversas propiedades como su tamaño, la secuencia de aa, su estructura y propiedades hidrofóbicas y anfipáticas. Las bases de las diferencias en la susceptibilidad de las bacterias y los hongos en respuesta a un péptido en particular aún no han sido explicadas, por lo que, la dilucidación de los meca-

nismos que regulan las interacciones entre estos péptidos y su blanco es importante pues proporcionará información para conocer, modificar e incluso predecir la actividad o selectividad de un péptido.

A pesar de la diversidad de PA y de sus múltiples mecanismos de acción la interacción con las MP parece ser una propiedad esencial, ya que uno de sus principales efectos es la permeabilización de la MP de diversos microorganismos. Las interacciones dinámicas entre estos péptidos y las MP son un elemento clave en el entendimiento de su actividad biológica y selectividad. Los estudios realizados hasta el momento sugieren que estas interacciones dependen de la secuencia del péptido y de las características de la MP blanco, cuya composición de fosfolípidos es un parámetro crucial que determina la susceptibilidad de una célula a un determinado PA.

El mecanismo de acción de los PA los hace candidatos atractivos para el desarrollo de terapias clínicas, por su selectividad y actividad de amplio espectro contra bacterias, resultado de las diferencias en la estructura y en los componentes de la MP de las células procariotas y eucariotas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la UMSNH y al CONACyT la beca otorgada a J. L. Anaya López, y a la CIC de la UMSNH por el apoyo al proyecto 14.1.

Bibliografía

- Bechinger, B. 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 157-183.
- Bradshaw, P. J. 2003. Cationic antimicrobial peptides issues for potential clinical use. *Bio-drugs* 17: 233-240.
- Brockman, H. 1999. Lipid monolayers: why use half of a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 438-443.
- Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238-250.
- Epand, R. M. y H. J. Vogel. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 11-28.
- Eppe, P., K. Apel y H. Bohlmann. 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 109: 813-820.
- Froy, O. y M. Gurevitz. 1998. Membrane potential modulators: a thread of scarlet from plants to humans. *FASEB J.* 12: 1793-1796.

Interacciones de los péptidos antimicrobianos...

- García-Olmedo, F., A. Molina, M. J. Alamillo y P. Rodríguez. 1998. Plant defense peptides. *Biopolymers* 47: 479-491.
- Graham, J. M. y J. A. Higgins. 1997. *Membrane analysis*. BIOS Scientific Publishers limited. Springer-Verlag New York Inc. New York. 208 pp.
- Hancock, R. E. W. y A. Rozek. 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 206: 143-149.
- Hancock, R. E. W. y D. S. Chapple. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1317-1323.
- Hancock, R. E. W. y R. Lehrer. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16: 82-88.
- He, J. y P. Furmanski. 1995. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* 376: 721-724.
- Huang, H. W. 2000. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39: 8347-8352.
- Kaiser, V. y G. Diamond. 2000. Expression of mammalian defensin genes. *J. Leukoc. Biol.* 68: 779-784.
- Kamysz, W., M. Okrój y J. Lukasiak. 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim. Pol.* 50: 461-469.
- Markossian, K. A., A. A. Zamyatnin y B. L. Kurganov. 2004. Antibacterial proline-rich oligopeptides and their target proteins. *Biochemistry* 69: 1028-1091.
- Matsuzaki, K., K. Sugishita, M. Haranda, N. Fuji y K. Miyajima. 1997. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1376: 391-400.
- Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 1-10.
- Oren, Z. y Y. Shai. 1998. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47: 451-463.
- Papo, N. y Y. Shai. 2003. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides* 24: 1693-1703.
- Powers, J. P. S. y R. E. W. Hancock. 2003. The relationship between peptides structure and antibacterial activity. *Peptides* 24: 1681-1691.
- Prenner, E. J., R. N. A. H. Lewis y R. N. McElhaney. 1999. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 201-221.
- Shai, Y. 1995. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem. Sci.* 20: 460-465.

Interacciones de los péptidos antimicrobianos...

- Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 55-70.
- Sprong, H. P. V. D. Sluijs y G.V. Meer. 2001. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 504-513.
- Thomma, B. P. H. J., B.P.A. Cammue y K. Thevissen. 2002. Plant defensins. *Planta* 216: 193-202.
- Vignutelli, A., C. Wasternack, K. Apel y H. Bohlmann. 1998. Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant J.* 14: 285-295.
- Yeaman, M. R. y N. Y. Yount. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55: 27-55.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.
- Zhao, H. X., A. C. Rinaldi, A. Rufo, A. Bozzi, P. K. J. Kinnunen y A. Di Giulio. 2003. Structural and charge requirements for antimicrobial peptide insertion into biological and model membranes. p. 151-177. En: *Cellular and Molecular Mechanism of Toxin Action. Pore-Forming Peptides and Protein Toxins.* (Menestrina, G., Dalla-Serra, M. y Lazarovici, P.) Taylor & Francis Group.



Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis

José L. Anaya-López ^a, Oscar E. Contreras-Guzmán ^a, Alfonso Cáramez-Trejo ^b,
Victor M. Baizabal-Aguirre ^a, Joel E. López-Meza ^a, Juan J. Valdez-Alarcón ^a,
Alejandra Ochoa-Zarzosa ^{a,*}

^a Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Apartado Postal 53, Administración Chapultepec Oriente, C.P. 58262 Morelia, Michoacán, México

^b Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 76230, Querétaro, Querétaro, México

Accepted 17 February 2006

Abstract

This work describes differences in the invasive ability of bacterial isolates associated with mastitis. Invasion ability was determined by the uptake and survival in a primary culture of bovine mammary epithelial cells (BMEC). BMEC were isolated from a healthy lactating cow and characterized by their morphology, immunostaining for cytokeratin and the detection of β - and κ -casein mRNAs. Ten bacterial isolates comprising the staphylococcal species *Staphylococcus aureus* (3), *Staphylococcus epidermidis* (1), *Staphylococcus haemolyticus* (1), *Staphylococcus equorum* (2), *Staphylococcus xylosus* (1) and *Brevibacterium stationis* (2) obtained from raw milk of cows with mastitis from backyard farms were assayed for their ability to invade BMEC. Only two *S. aureus* and one *S. epidermidis* isolates were able to invade BMEC, at similar levels to the *S. aureus* control strain ATCC 27543. In conclusion, using the in vitro model of infection used in this study, differences in bacterial invasion capability may be detected.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Invasion; Mastitis; Mammary epithelium; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*

Bovine mastitis is a multifactorial disease responsible for serious economic losses worldwide in dairy farms. One of the main causes of mastitis in dairy cows is the infection by bacteria, some of which have the ability to invade the mammary epithelium (Watts, 1988; Yancey, 1999). Bacterial invasion into epithelial cells is an important pathogenic mechanism for the establishment of the disease (Wanasin-ghe, 1981). The invasive ability of bacteria can be evaluated in vitro by measuring their capacity to invade isolated bovine mammary epithelial cells (BMEC). Few bacteria, associated with mastitis, have been analyzed in primary BMEC cultures as well as in a bovine mammary epithelial cell line (MAC-T) (Huynh et al., 1991). Internalization into

BMEC has been reported for *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hyicus* (Hensen et al., 2000; Almeida and Oliver, 2001) and *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* (Matthews et al., 1994; Almeida and Oliver, 1995). These studies were carried out with bacteria obtained from extensive production systems or from commercially available sources.

In developing countries, backyard farms are very important for milk production. The main purpose of this work was to establish a primary culture of BMEC to evaluate the invasive ability of 10 bacterial isolates associated with subclinical intramammary infection in this small scale dairy system.

The isolation of BMEC was performed according to Pantschenko et al. (2000). Tissue fragments were obtained from a healthy slaughtered Holstein lactating cow (2

* Corresponding author. Tel./fax: +52 443 295 8029.

E-mail addresses: ochoaz@zeus.umich.mx, alecho@hotmail.com (A. Ochoa-Zarzosa).

months postpartum) with udders free of infection. Isolated cells were plated in Petri dishes (Costar) at a density of 1×10^5 cells/ml in growth medium (GM) composed by Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Equitech-Bio), 5 mM sodium acetate, 10 μ g/ml insulin (Sigma), 5 μ g/ml hydrocortisone (Sigma), 100 U/ml penicillin and streptomycin and 1 μ g/ml amphotericin B (Invitrogen). At 72 h of culture, primary mammary epithelial cells formed monolayer island aggregates free of fibroblasts, which were eliminated by selective trypsinization (Fig. 1A). In all invasion assays, BMEC were used between the 2nd and 10th passages. To characterize the cells, monolayers fixed with paraformaldehyde were incubated with a monoclonal antibody against cytokeratin (1:300, Sigma clone 11) or with a monoclonal antibody against vimentin (1:400, Santa Cruz clone V9). Then, the cells were incubated with goat anti-mouse antibodies coupled to rhodamine (1:100, Jackson Immunoresearch). All BMEC analyzed by fluorescence microscopy (Leica Microsystems) were positive for cytokeratin (Fig. 1B), and negative for vimentin (data not shown). In addition to the presence of cytokeratin in BMEC, the cells were evaluated for the expression of bovine β - and κ -casein mRNAs. BMEC total RNA (5 μ g) was obtained with Trizol (Invitrogen) and used to synthesize cDNA. Reverse transcription (RT) reaction was performed in 20 μ l containing 25 μ g/ml Oligo d(T) (Invitrogen) and 500 nM dNTPs (Invitrogen). The reaction was incubated at 65 °C for 5 min, and the tube was immediately transferred to ice. Then, 1X First Strand Buffer (Invitrogen), 10 mM dithiothreitol and 2 U/ μ l RNase inhibitor (Invitrogen) were added to the reaction mixture and incubated at 37 °C for 2 min. Then, 10 U/ μ l M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) was added and the mixture was incubated again at 37 °C for 50 min, followed by 90 °C for 2 min. The primers (Invitrogen) used to amplify bovine β -casein transcripts were: forward 5'-ATT CAG CTC CTC CTT CAC TTC-3' and reverse 5'-TTG CCA TAT TTC CAG TCG CAG-3' and for bovine κ -casein: forward 5'-AGC AAG AGCTGA CGG TCA CAA-3' and reverse 5'-TGG CAG GCA CAG TAT

TTG ACA-3'. Primers to amplify β -actin (Torner et al., 1999) were used to verify the integrity of the RNA as well as the efficiency of the RT reaction. Each polymerase chain reaction (PCR) contained 2 μ l of cDNA, 200 nM dNTPs, 0.4 μ mol of each primer, 0.5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) and 1X PCR Buffer (Invitrogen). The next amplification programs were run for each primer combination: 25 cycles and an annealing temperature of 57 °C for bovine β -casein, 40 cycles and an annealing temperature of 58 °C for bovine κ -casein and 25 cycles and an annealing temperature of 55 °C for β -actin. RT-PCR analysis showed the amplification of fragments of 790 and 350 bp, corresponding to bovine β - and κ -caseins, respectively (Fig. 1C, lanes 4 and 5). The RT-PCR products were sequenced with a BigDye terminator sequencing kit v 3.1 (Applied Biosystems) in an automated ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Sequencer (Perkin-Elmer) to confirm the specificity of the reaction. The nucleotide sequence data were deposited in the GenBank (Accession no. AY899917 and AY899918). These results confirm the mammary epithelial origin of the culture established. BMEC were further used in the invasion assays.

In a regional program for the study of mastitis, 10 bacterial isolates were collected from raw milk samples of 10 cows with subclinical mastitis maintained at 9 different backyard farms in Morelia, Michoacán, México. Bacterial isolates used in this study are described in Table 1. Bacteria were identified with standard bacteriological tests and ribotyping (Loeza-Lara et al., 2004). All isolates were susceptible to 10 μ g of gentamicin (Sigma). The American Type Culture Collection (ATCC) *S. aureus* subsp. *aureus* (27543) strain isolated from a case of clinical mastitis was included as a positive control. Bacterial suspensions in Luria-Bertani broth (LB) were grown overnight, and used to infect confluent BMEC monolayers (2×10^5 cells per well, in 24-well plates) by 2 h with a multiplicity of infection (MOI) of 30:1 bacteria per cell. BMEC monolayers were washed three times with PBS and then incubated in GM without serum. To eliminate extracellular bacteria, BMEC were treated with 50 μ g/ml gentamicin for 2 h at 37 °C. Then, BMEC monolayers were detached with

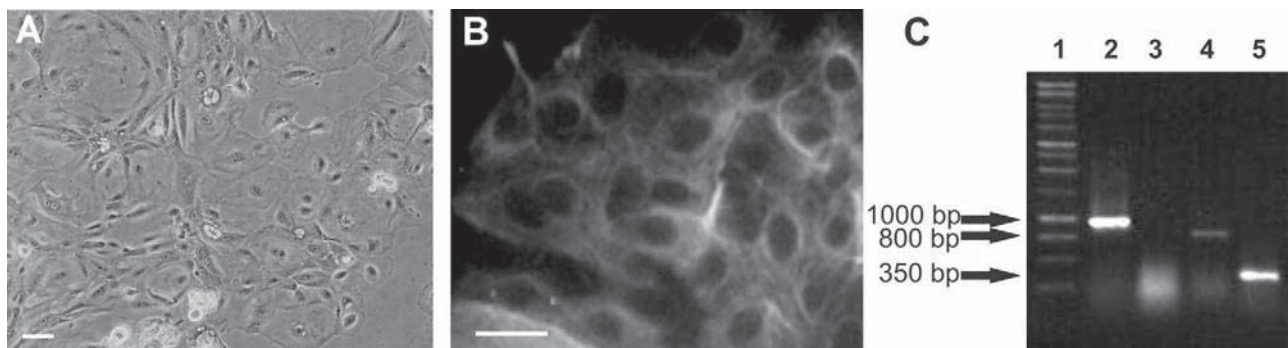


Fig. 1. Culture and characterization of BMEC: (A) Monolayer island of BMEC cultured on plastic and growth medium after selective trypsinization; (B) Positive immunostaining of BMEC using a monoclonal antibody against cytokeratin; (C) RT-PCR analysis that shows the amplification of β -actin in BMEC (lane 2), and bovine β - and κ -caseins (lanes 4 and 5). A negative control of β -casein expression using RNA as template was incorporated (lane 3). The 1 kb molecular weight marker (Invitrogen) was also included (lane 1). Scale bar: 20 μ m.

Table 1
Invasive ability of bacterial isolates associated with mastitis in BMEC

Isolate		Number of internalized bacteria (CFU) per well ^a	Reference
SA2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<5	This study
SA4	<i>Brevibacterium stationis</i>	<5	This study
SA7	<i>Staphylococcus equorum</i>	<5	This study
SA11	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<30	This study
SA12	<i>Brevibacterium stationis</i>	<5	This study
SA20	<i>Staphylococcus equorum</i>	<5	This study
SA29	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3500	This study
SA31	<i>Staphylococcus aureus</i>	22,300	This study
SA35	<i>Staphylococcus aureus</i>	<5	Loeza-Lara et al. (2004)
SA37	<i>Staphylococcus aureus</i>	29,300	This study
ATCC 27543	<i>Staphylococcus aureus</i>	23,850	

^a Average of triplicates of three independent experiments is presented.

trypsin–EDTA and lysed with 250 µl of sterile distilled water. BMEC lysates were diluted 100-fold, then plated by triplicate on LB agar and incubated overnight at 37 °C. The number of CFU was determined by the standard colony counting technique. Only isolates SA29, SA31 and SA37 showed a high invasive ability into BMEC, when were compared to the *S. aureus* control strain ATCC (Table 1). The number of CFU of these isolates were 3500, 22,300 and 29,300, respectively. Isolates SA31 and SA37 were identified as *S. aureus*, whereas SA29 as *S. epidermidis*. The internalization of these isolates into BMEC was also demonstrated by electron transmission microscopy. It required actin microfilaments since it was inhibited in the presence of cytochalasin D (data not shown). The CFU recovered for the other isolates evaluated in this study were <30 (Table 1). The other *S. aureus* isolate (SA35), which contains a plasmid encoding a lincomycin resistance determinant, showed low invasive ability into BMEC (Loeza-Lara et al., 2004).

Although *S. aureus* is the most frequently isolated pathogen causing clinical or subclinical mastitis worldwide, in vitro studies have shown the invasive ability of a few isolates into bovine mammary epithelial cells (Almeida et al., 1996; Hensen et al., 2000). Our results are in agreement with these evidences, that can be explained because the pathogenesis of *S. aureus* depends on multiple mechanisms which may be classified in: (1) mechanisms that regulate the adhesion of bacteria to host cells or tissues, (2) mechanisms that promote tissue damage and spread, and (3) mechanisms that protect the bacteria from the host immune system (Kerro-Dego et al., 2002).

In spite of the fact that all the strains evaluated in this study were obtained from cows with subclinical mastitis, not all were able to invade BMEC. These results suggest that the bacterial invasion is not a necessary mechanism for the establishment and persistence of mastitis. Accordingly, *S. aureus* adhesion has been demonstrated in bovine mammary gland in vivo, but its intracellular presence has only been demonstrated in isolated bovine mammary cells (Kerro-Dego et al., 2002).

Furthermore, the differences in adhesion and invasive ability recorded among *S. aureus* strains have been attributable to growth medium, growth phase and the origin of mammary epithelial cells (Hensen et al., 2000; Sears and McCarthy, 2003). On the other hand, a high density of bacterial inoculum is utilized in in vitro models of infection, compared to the low density of bacteria able to cause mastitis in vivo (Brouillette et al., 2004). In this sense, only a few bacteria adherent to the epithelium might be sufficient to maintain the infection within the udder and serve as a reservoir for spreading to other sites.

The ability of *S. epidermidis* to invade into mammary epithelial cells has been reported previously (Almeida and Oliver, 2001). This organism is considered as a minor pathogen with a low virulence potential (Kwok and Chow, 2003). However, the proportion of coagulase negative staphylococci (CNS) associated with mastitis has increased in recent years (Forsman et al., 1997). Because *S. epidermidis* is frequently isolated from cows with mastitis (Aarestrup et al., 1995), it is appropriate to reconsider this species as a potential pathogen due to its invasive capacity.

The primary epithelial cell culture established in this work may be useful in evaluating the invasive ability of bacteria associated with bovine mastitis.

Acknowledgments

The authors thank the excellent technical support of Irma Morelia Soto Huipe. J.L.A.L. and O.E.C.G. were supported by scholarships from CONACyT and UMSNH, respectively. This work was supported by a Grant from Coordinación de la Investigación Científica (UMSNH, CIC 14.1-2005) to A.O.Z.

References

- Aarestrup, F.M., Wegener, H.C., Rosdahl, V.T., Jensen, N.E., 1995. Staphylococcal and other bacterial species associated with intramammary infections in Danish dairy herds. Acta Vet. Scand. 36, 475–487.
- Almeida, R.A., Oliver, S.P., 1995. Invasion of bovine mammary epithelial cells by *Streptococcus dysgalactiae*. J. Dairy Sci. 78, 1310–1317.

- Almeida, R.A., Oliver, S.P., 2001. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb. Pathog.* 31, 205–212.
- Almeida, R.A., Matthews, K.R., Cifrian, E., Guidry, A.J., Oliver, S.P., 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 79, 1021–1026.
- Brouillette, E., Grondin, G., Lefebvre, C., Talbot, B.G., Malouin, F., 2004. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.* 101, 253–262.
- Forsman, P., Tilsala-Timisjarvi, A., Alatossava, T., 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S–23S rRNA spacer regions. *Microbiology* 143, 3491–3500.
- Hensen, S.M., Pavičić, M.J.A.M.P., Lohuis, J.A.C.M., Poutrel, B., 2000. Use of a bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Dairy Sci.* 83, 418–429.
- Huynh, H.T., Robitaille, G., Turner, J., 1991. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Exp. Cell Res.* 197, 191–199.
- Kerro-Dego, O., van Dijk, J.E., Nederbragt, H., 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet. Quart.* 24, 181–198.
- Kwok, A.Y., Chow, A.W., 2003. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 87–92.
- Loeza-Lara, P.D., Soto-Huipé, M., Baizabal-Aguirre, V.M., Ochoa-Zarzosa, A., Valdez-Alarcón, J.J., Cano-Camacho, H., López-Meza, J.E., 2004. pBMSa1, a plasmid from a dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus*, encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling-circle mechanism. *Plasmid* 52, 48–56.
- Matthews, K.R., Almeida, R.A., Oliver, S.P., 1994. Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*. *Infect. Immun.* 62, 5641–5646.
- Pantschenko, A.G., Woodcock-Mitchell, J., Bushmich, S.I., Yang, T.J., 2000. Establishment and characterization of a caprine mammary epithelial cell line (CMEC). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 36, 26–37.
- Sears, P.M., McCarthy, K.K., 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. Food Anim.* 19, 171–185.
- Torner, L., Nava, G., Dueñas, Z., Corbacho, A., Mejía, S., López, F., Cajero, M., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., 1999. Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *J. Endocrinol.* 161, 423–432.
- Wanasinghe, D.D., 1981. Adherence as a prerequisite for infection of the bovine mammary gland by bacteria. *Acta Vet. Scand.* 22, 109–117.
- Watts, J.L., 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 16, 41–66.
- Yancey, R.J., 1999. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. *Adv. Vet. Med.* 41, 257–273.