

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**CARRERA DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**Aislamiento de péptidos antimicrobianos de  
hojas de *Amaranthus hypochondriacus***

**Que para obtener el Título de  
Químico Farmacéutico Biólogo**

**Presenta:**

**Otoniel Ramírez García**

**Director de Tesis: Dr. Manuel Soriano García**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

- Al Laboratorio 2 de Bioquímica del Dpto. de Bioquímica del Instituto de Química, UNAM, por el uso de sus instalaciones durante todo este proyecto.
- Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa del Dpto. de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM, por el uso de su laboratorio y por el método de *agar envenenado*.
- Al Dpto. de Micología General del Hospital GEA González, Cd. de México, por proporcionar las cepas de hongos.
- Al Dpto. de Microbiología General de la torre de investigación de la Facultad de Medicina, UNAM, por la ayuda en la realización de pruebas antibacterianas.
- A Fermín Cruz, estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, por su apoyo en SDS-PAGE.
- A la *Universidad Nacional Autónoma de México* y en especial a la *Facultad de Estudios Superiores Zaragoza* por su nobleza como institución y por ser mi segunda casa.

## Tabla de Contenido

<u>Tabla de Contenido</u>	1
<u>Introducción</u>	2
<u>1. Marco teórico</u>	3
<u>1.1 Generalidades del amaranto</u>	3
<u>1.2 Estructura del enlace peptídico en los residuos de aminoácidos</u>	5
<u>1.2.1 Propiedades químicas</u>	6
<u>1.3 Estructura de la pared celular fúngica</u>	7
<u>1.4 Estructura de la célula bacteriana</u>	8
<u>1.5 Generalidades de los péptidos antimicrobianos</u>	10
<u>1.6 Clasificación de los péptidos antimicrobianos</u>	12
<u>1.7 Mecanismo de acción de los PAM lineales anfipáticos <math>\alpha</math>-helicoidales</u>	24
<u>1.7.1 Ruptura de membrana vía el mecanismo “parecido a tapetes”</u>	25
<u>1.7.2 Formación del poro transmembrana por el mecanismo “duela de barril”</u>	27
<u>1.7.3 Mecanismo del poro toroidal o “tornillo de agujero”</u>	28
<u>1.8 Péptidos antimicrobianos de animales</u>	29
<u>1.8.1 Permeabilización de membrana</u>	30
<u>1.8.2 Mecanismos alternativos a la permeabilización de membrana</u>	31
<u>1.9 Mecanismos de resistencia hacia los PAM</u>	31
<u>1.10 Modificaciones postranslacionales</u>	34
<u>1.11 Cuantificación de proteínas con ácido bicinconírico</u>	35
<u>1.12 Método de Kirby-Bauer</u>	36
<u>1.13 Cromatografía de intercambio iónico</u>	37
<u>1.14 Electroforesis en gel de poliacrilamida</u>	38
<u>2. Planteamiento del problema</u>	43
<u>3. Objetivo general</u>	44
<u>3.1 Objetivos particulares</u>	44
<u>4. Hipótesis</u>	45
<u>5. Materiales y métodos</u>	46
<u>5.1 Medios de cultivo</u>	46
<u>5.2 Material biológico</u>	46
<u>5.3 Equipos, reactivos y materiales</u>	47
<u>5.4 Procedimiento</u>	48
<u>5.4.1 Aislamiento de proteínas</u>	48
<u>5.4.2 Determinación de proteínas totales</u>	49
<u>5.4.3 Pruebas antibacterianas</u>	50
<u>5.4.5 Electroforesis. SDS-PAGE</u>	54
<u>6. Resultados</u>	56
<u>7. Discusión de resultados</u>	68
<u>8. Conclusiones</u>	71
<u>9. Perspectivas</u>	72
<u>10. Anexos</u>	73
<u>11. Referencias</u>	83

## Introducción

Debido a la importancia que tienen los péptidos antimicrobianos ya sea de plantas o de animales, en este trabajo se pretende ampliar el conocimiento de esos péptidos, dando a conocer una nueva fuente de obtención, la de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto).

Cabe mencionar que en la literatura se ha reportado la existencia de dos péptidos antimicrobianos de semillas de amaranto que son los Ac-AMP1 y Ac-AMP2 encontrados en *Amaranthus caudatus*, otra especie de amaranto [1].

Es de todos bien conocido que a pesar de los distintos modos de vida de las plantas y animales, estos tienen elementos en común en sus mecanismos de defensa contra patógenos. En un principio se sabía que las plantas tenían un sistema no específico de defensa activo y pasivo y que, los animales tenían un sistema inmune específico; pero esto ha cambiado y ahora se conoce que las plantas también tienen un sistema específico sin autovigilancia y que los animales tienen un sistema no específico para la inmunidad innata, además del sistema inmune adaptativo específico [2,3].

El objetivo de este trabajo fue aislar péptidos de hojas de *Amaranthus hypochondriacus*. con actividad biológica en hongos y bacterias. El espectro de hongos utilizado está basado en tres grupos: hongos filamentosos como *Aspergillus sp.* *Alternaria sp.* (dematiáceo negro) y *Rhizopus sp.*; el hongo levaduriforme *Candida albicans* y el hongo patógeno *Trichophyton mentagrophytes* (un hongo dermatofito) entre otros. En cuanto a bacterias, se probaron gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 incluyendo los aislamientos *Streptococcus sp.* y *Staphylococcus sp*) y gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 / ATCC 35218 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Los métodos utilizados para medir la inhibición de crecimiento bacteriano fue el de Kirby-Bauer (método semicuantitativo) y para la inhibición de crecimiento fúngico se utilizó el del agar envenenado (semicuantitativo) y el espectrofotométrico (cuantitativo).

Finalmente, las fracciones con actividad antimicrobiana obtenidas por columna de intercambio iónico, se les realizó una cromatografía en gel (SDS-PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato) para conocer su peso molecular. De esta manera, el amaranto representaría una buena fuente de obtención de péptidos biológicamente activos, ya que es una planta con producción suficiente y su costo es relativamente bajo en nuestro país.

## 1. Marco teórico

### 1.1 Generalidades del amaranto

Nombre latín: *Amaranthus hypochondriacus* L.

Castellano: Amaranto, amaranta.

Francés: Amarante.

Inglés: Amaranth, prince's feather, lovely bleding, red cockscomb, velvet flower

Familia: Amarantácea

Su hábitat: Aunque su origen es algo incierto, parece ser originaria de Asia, pero algunos se detractan hacia América del Sur y otros de África. Crece en varios climas.



FIGURA 1. Foto de *Amaranthus hypochondriacus*

Altura: 1,80 m

Parte utilizada: hojas

Tipo de planta: anual

Hojas: oblongas-lanceoladas. Color verde, teñidas de un moteado de color púrpura.

Flores: diversos colores. Florece en agosto. En la especie *A. hypochondriacus* son de color rojo brillante agrupándose en racimos compuestos y erectos.

Las hojas son astringentes y reguladoras menstruales. Por vía externa se emplean en forma de lavados y gargarismos en casos de aftas y ulceraciones bucales. También es utilizada por vía externa en irrigaciones vaginales en caso de leucorrea (flujo inflamatorio vaginal).

El amaranto o huautli se cultivaba en América desde hace 5 000 ó 7 000 años, probablemente los primeros en utilizarlo como un cultivo altamente productivo fueron los mayas, de quienes otros pueblos de América, entre ellos los aztecas y los incas aprendieron su consumo. Se estima que ellos producían de 15 a 20 000 toneladas por año y, además formaba parte de los tributos que cobraban a los pueblos sometidos.

Diversos autores han reportado contenidos de proteína en amaranto que van de 15 a 17%, pero su importancia no radica sólo en la cantidad sino en la calidad de la proteína, ya que presenta un excelente balance de aminoácidos. Tiene un contenido importante de lisina, aminoácido esencial en la alimentación humana y que comúnmente es el aminoácido más limitante en otros cereales.

El contenido de lípidos es de 7 a 8%. Estudios recientes han encontrado un contenido relativamente alto de escualeno (aproximadamente 8% del aceite de la semilla). El escualeno es un excelente aceite para la piel, lubricante y precursor del colesterol que se obtiene comúnmente del hígado de ballena y tiburón.

El valor nutritivo de las hojas de amaranto ha sido también ampliamente estudiado. Se ha encontrado que la hoja contiene altos valores de calcio, hierro, fósforo y magnesio, así como ácido ascórbico, vitamina A y fibra.

En las últimas décadas el cultivo del amaranto se ha difundido de manera exponencial en varios países del mundo. India y China son los países que han adoptado el amaranto más decididamente.

Otro producto que se encuentra en desarrollo es una bebida de amaranto a la que, por sus propiedades nutritivas semejantes a las de la leche, le llaman "leche de amaranto". Esta bebida representa una opción viable y más económica para personas que presentan intolerancia a la leche. Un proyecto dirigido por el Dr. Manuel Soriano es el desarrollo de una bebida de fibra dietética y laxante a partir de las hojas de amaranto. Los productos que se encuentran hasta ahora en el mercado son elaborados con *Psyllium plantago*, una planta que no se produce en México y que para la elaboración de estos laxantes se importa de la India. La bebida preparada con las hojas de amaranto resulta hasta 40% más barata que las que actualmente se encuentran en el mercado.

Contiene proteínas de alto valor biológico, es decir aquellas que realmente el organismo asimila como son la lisina y la metionina, de ahí que su aprovechamiento proteico llegue al 74% (en la carne es del 60%), es además rico en fósforo, fibra, hierro, calcio, potasio y vitamina E.

La familia Amarantácea se compone de 60 géneros y alrededor de 800 especies, 60 de estas especies son cosmopolitas y crecen particularmente en sitios perturbados por el hombre. Existe una amplia variación en las diferentes especies del género. Solo tres de ellas son cultivadas: *Amaranthus hypochondriacus*, originario de México, *A. cruentus*, originario de Guatemala y el sureste de México y *A. caudatus*, cuyo origen es América del Sur. Asociadas a éstas existen tres especies de "hierbas malas": *A. powelli*, *A. hybridus* y *A. quitensis*, de éstas solo una—*A. hybridus*— se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo [4-7].

## 1.2 Estructura del enlace peptídico en los residuos de aminoácidos

Un péptido es un polímero de aminoácidos. Un polímero es una cadena de unidades básicas unidas entre sí por enlaces químicos covalentes. Los aminoácidos poseen en común dos grupos funcionales distintos: el grupo  $\alpha$ -amino y el carboxilato (Figura 2).

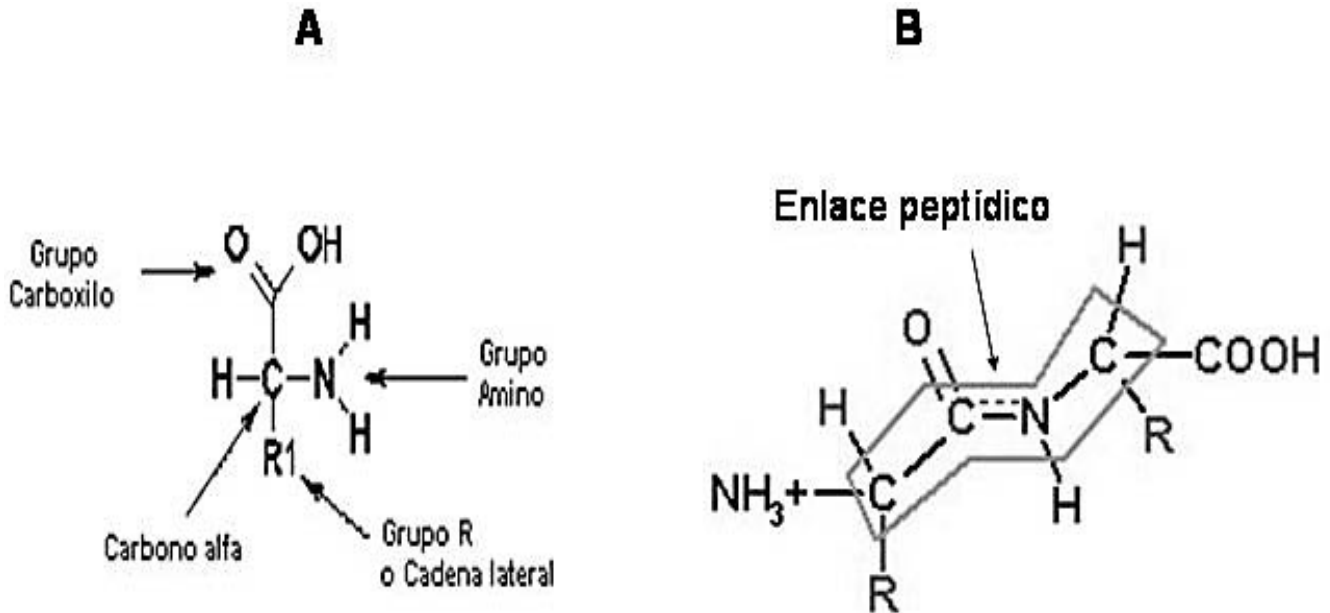


FIGURA 2. **A:** estructura básica de un aminoácido señalando el carbono  $\alpha$  y los grupos amino, carboxilo y R. **B:** posición *trans* del enlace peptídico. Los enlaces peptídicos generalmente se encuentran en posición *trans* en lugar de *cis* y esto se debe en gran parte a la interferencia estérica (de tamaño) de los grupos R cuando se encuentran en posición *cis*.

Al reaccionar un ácido carboxílico con una amina, el enlace resultante se denomina una amida. El enlace amida formado entre dos  $\alpha$ -aminoácidos recibe el nombre de enlace peptídico. Un enlace peptídico en otras palabras se forma por la eliminación de 1 mol de agua entre el grupo  $\alpha$ -amino de un aminoácido y el grupo  $\alpha$ -carboxilo de un segundo aminoácido. Los aminoácidos unidos por enlaces peptídicos ya no pueden llamarse aminoácidos. La cadena formada por varios aminoácidos unidos recibe el nombre de polipéptido y el conjunto de átomos formado por un nitrógeno imídico,  $C\alpha$ , un carbonilo y su grupo R se le llama residuo de aminoácido.



### 1.2.1 Propiedades químicas

Los péptidos al formarse pierden un grupo amino y un carboxilato por cada enlace que se forma, por lo tanto, sólo el primer grupo funcional amino y el último grupo funcional carboxilato, que no han reaccionado pueden ionizarse. Sin embargo, muchos grupos R poseen funciones químicas ionizables que pueden participar en las propiedades ácido base de un péptido. Así, los grupos R pueden contener otros grupos funcionales de ácidos débiles tales como hidroxilos, sulfidrilos, guanidinos e imidazoles. Estos grupos y los dos anteriores determinan que la carga neta de un aminoácido varíe con el pH, confiriendo así un carácter anfótero al aminoácido. El pKa de estos grupos determinará la carga neta a un pH dado. Por tanto, todos los péptidos poseen tantos pKa's como aminoácidos con grupos R ionizables. Por otra parte, el punto isoeléctrico es el pH en el cual un aminoácido tiene una carga neta igual a cero y por lo tanto no se mueve en un campo eléctrico de corriente directa.

Gracias a que los péptidos conservan cierta polaridad poseen solubilidad en agua, a pesar de que la formación de la amida elimina los grupos cargados ( $-\text{COO}^-$  y  $-\text{NH}_3^+$ ) y reduce por tanto la polaridad. Sin embargo, dicha solubilidad es marginal ya que su estructura electrónica de dobles enlaces resonantes, aunada a la presencia de los carbonos  $\alpha$  en las esquinas del plano son regiones bastante apolares. Consecuentemente, los enlaces peptídicos en solución pueden presentar un carácter polar o apolar y el balance dependerá en gran medida de la naturaleza de los sustituyentes laterales de los aminoácidos que lo forman.

Desde el punto de vista químico, el enlace peptídico es bastante estable y no se hidroliza con facilidad. Para promover la reacción de hidrólisis se requiere un medio ácido (HCl 6N por ejemplo) y alta temperatura ( $90^\circ\text{C}$ ) por tiempos prolongados (24-72 h). Estas condiciones son tan drásticas que destruyen algunos aminoácidos cuyos grupos R son sensibles.

### 1.3 Estructura de la pared celular fúngica

La pared celular fúngica (Figura 3) protege al organismo de un ambiente hostil y libera señales para la invasión e infección de un huésped como la planta, el animal o el humano. La pared de hongos y levaduras se sintetiza en cada hifa en una compleja secuencia de ensamble.

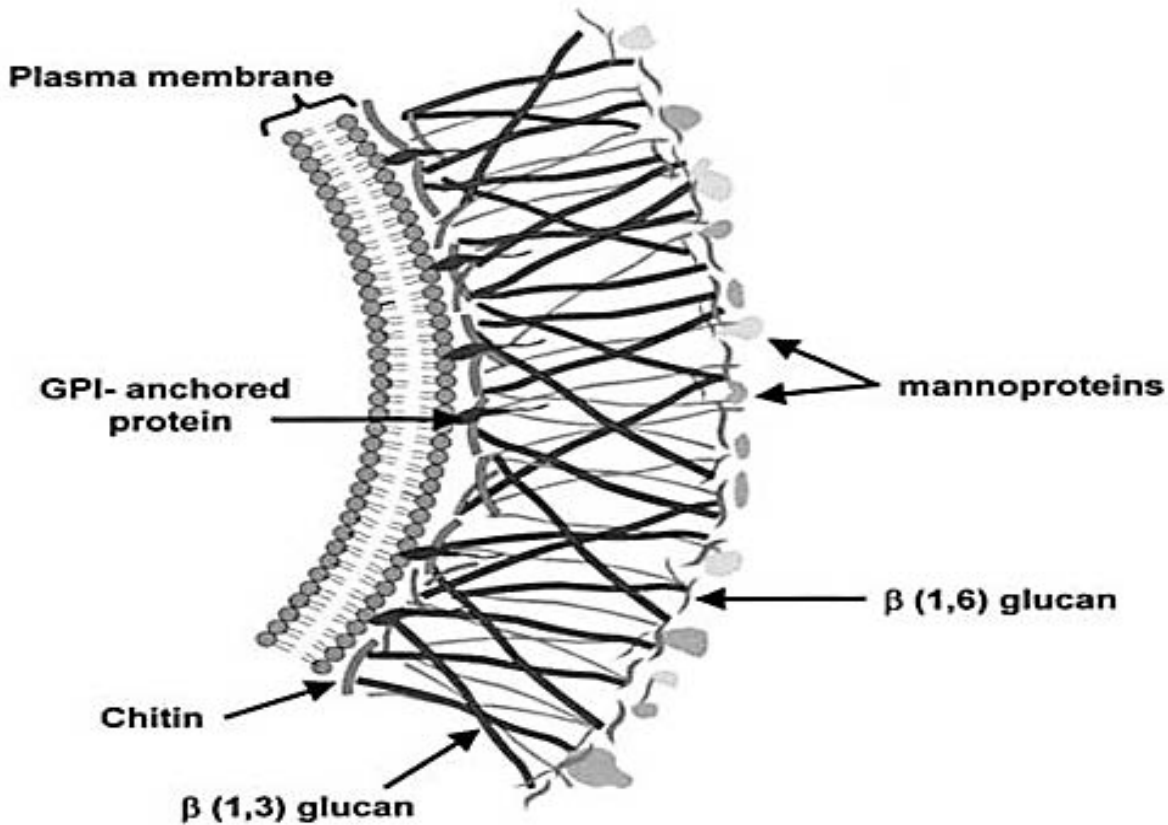


FIGURA 3. Esquema de una típica pared celular fúngica [8]. Así, las paredes de *Neurospora crassa* y *Candida albicans* están compuestas de quitina, (1-3)β-D-glucanas, (1,6)β-glucanas, lípidos y péptidos envueltos en una proteína matriz. Cabe mencionar que el hongo tiene una presión interna significativa de tal manera que una ligera perturbación de la pared celular provoca lisis celular fúngica [8].

## 1.4 Estructura de la célula bacteriana

Las bacterias son microorganismos unicelulares que carecen de membrana nuclear, son metabólicamente activas y se reproducen por fisión binaria. Las bacterias gram positivas (Figura 4) y gram negativas (Figura 5) poseen péptidoglucanos en la pared celular los cuales confieren la forma celular característica y proporcionan a la célula una protección mecánica.

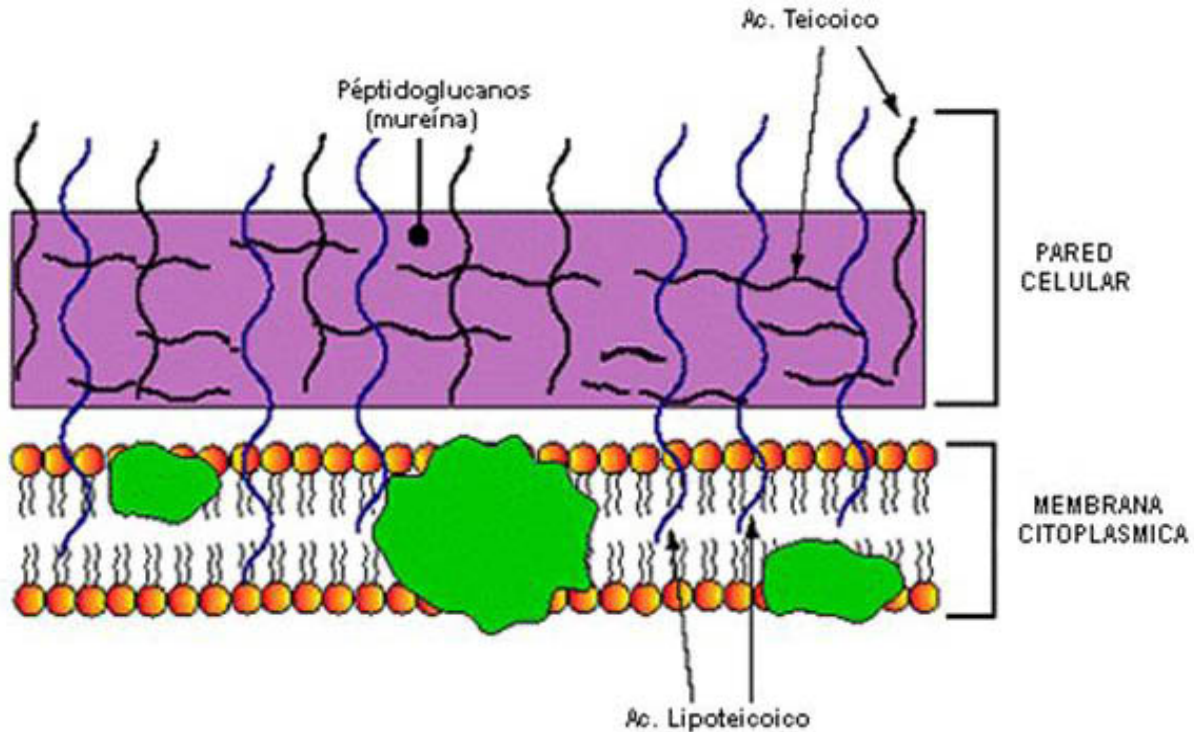


FIGURA 4. **Célula Gram Positiva.** Tiene una capa gruesa de péptidoglucano (mureína) y dos clases de ácidos teicoicos: el Ácido lipoteicoico que está en la superficie, empotrado en la capa de peptidoglucano y unido a la membrana citoplásmica y, el ácido teicoico de la pared que está en la superficie y se une sólo a la capa de peptidoglucano. El ácido teicoico es el responsable del determinante antigénico del organismo [9].

Los péptidoglucanos son únicos para organismos procarióticos y consisten de una columna de glucano de ácido murámico y glucosamina y, cadenas de péptidos altamente unidos en forma de cruz en las bacterias gram positivas (como *S. aureus*) o parcialmente unidos en bacterias gram negativas (como *E. coli*). Las enzimas transpeptidasas unidas en cruz son algunos de los blancos de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Los ácidos teicoicos son polímeros de fosfato de polirol asociados con una fuerte carga negativa, se unen covalentemente a los péptidoglucanos de algunas bacterias gram positivas y generalmente están ausentes en las bacterias gram negativas. Los ácidos lipoteicoicos son polímeros de glucofosfatos anfipáticos con el glucolípido lipofílico y fijados en la membrana citoplasmática. El lipopolisacárido (endotoxina) es uno de los componentes principales de la membrana externa de las bacterias gram negativas, el cual es una molécula compleja que consiste de un lípido A anclado, un polisacárido central y cadenas de carbohidratos [10].

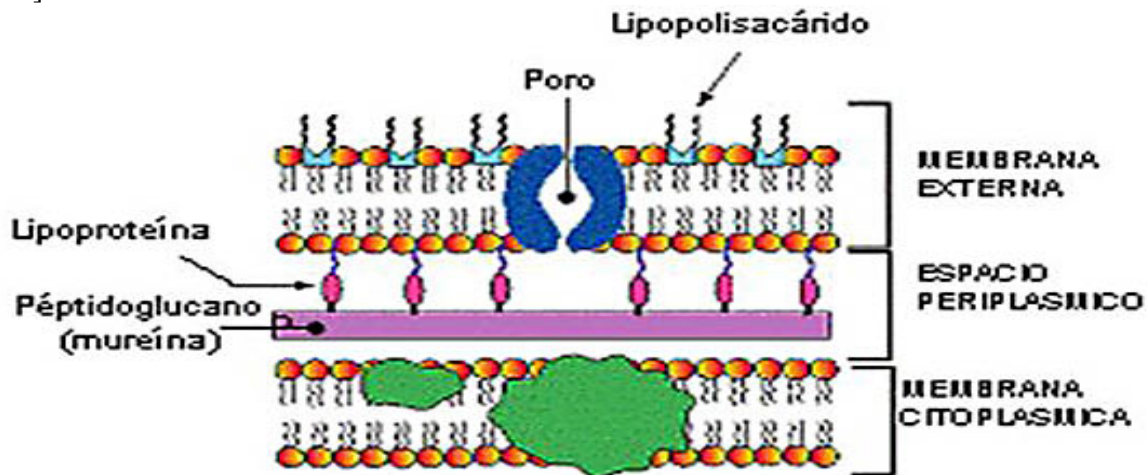


FIGURA 5. **Célula Gram Negativa**. Tiene una capa delgada de péptidoglucano (mureína) unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido. En el lipopolisacárido, la porción de lípido está embebida en el fosfolípido y el antígeno O polisacárido está en la superficie. El lípido se llama Lípido A y es tóxico, pero el lipopolisacárido entero se llama endotoxina. La pared de la célula tiene poros llamados Porinas para el transporte de sustancias de peso molecular bajo. Entre la membrana citoplásmica y la pared celular hay un espacio periplásmico con enzimas hidrolíticas, enzimas inactivadoras de antibióticos y proteínas de transporte [11].

## 1.5 Generalidades de los péptidos antimicrobianos

Después de un panorama general de las características de los péptidos, se describirá un espectro de los péptidos antimicrobianos y más específicamente de los que participan en la defensa de las plantas que son los de interés en este trabajo.

La demostración de la actividad biológica de defensa para un tipo dado de péptidos involucra observaciones de distinta naturaleza, ninguna de las cuales puede ser definitiva por sí sola. Algunos criterios relevantes son los siguientes: a) actividad antimicrobiana *in vitro*, b) expresión de genes, distribución y concentración de péptidos en la planta (antes o después de la infección) que son congruentes con un papel de defensa, c) correlación de la variación de los niveles de expresión (natural o genéticamente modificada) con la variedad de los síntomas y d) correlación de la variación de la resistencia patógena a los péptidos de las plantas (natural o genéticamente modificada) con la virulencia. Aun con todo este trabajo se han obtenido avances importantes de acuerdo a esos criterios [2].

Todos los organismos vivientes han desarrollado varios mecanismos para defenderse de invasores microbianos, incluyendo a los mismos microorganismos. Además, los organismos multicelulares a pesar de sus diferencias estructurales y funcionales comparten características en sus sistemas de defensa y sobrevivencia contra patógenos. Por ejemplo, la síntesis de inmunoglobulinas contra blancos microbianos que se da en una minoría relativa de especies vivientes llamados vertebrados superiores. Sin embargo, una defensa más antigua y extensa es la de la producción de péptidos pequeños con propiedades antimicrobianas. Los péptidos catiónicos pequeños con propiedades antimicrobianas son parte de la respuesta de inmunidad innata de insectos, anfibios y mamíferos. Estos péptidos antimicrobianos (PAM) son producto de genes simples que pueden ser sintetizados de una manera rápida y debido a su tamaño pequeño pueden ser producidos por el huésped con un gasto mínimo de energía y biomasa. Otros ejemplos de PAM son las cecropinas que se acumulan en el hemolinfa de varios invertebrados en respuesta a la infección y las magaininas que son secretadas por glándulas en la piel de anfibios. Las cecropinas se aislaron en un inicio de la mariposa nocturna *Hyalophora cecropia* y luego del intestino grueso de cerdo. Estas contienen de 31 a 39 residuos de aminoácidos, son catiónicas, anfipáticas y se cree que actúan por ruptura de la membrana celular resultando en lisis y muerte de ésta. El modo de interacción péptido-lípido de las magaininas de piel de rana encontradas como hélices  $\alpha$  es fuertemente dependiente de las propiedades fisicoquímicas no solamente del péptido sino también de la membrana blanco [12-16].

Los péptidos antimicrobianos de plantas se han reportado inicialmente desde la década de los setentas con propiedades antifúngicas y antibacterianas. Pero fue hasta la siguiente década que se acumularon conocimientos a cerca de dichos péptidos. Así, alrededor de los noventas se descubrieron algunos péptidos con actividad antimicrobiana. Sin embargo, se discute el papel de estos acerca de que causan inmunidad no específica. No obstante, los PAM recobran importancia en el potencial de sus aplicaciones terapéuticas cuando surge la resistencia microbiana que plantea preocupaciones acerca del futuro de la terapia antibiótica. Debido a que algunos péptidos antibióticos tienen sensibilidad hacia el colesterol (un constituyente principal de la membrana celular de mamíferos) no son tóxicos para células de mamíferos. Así, parece ser difícil para los microorganismos adquirir resistencia haciendo a estos péptidos muy atractivos para el uso terapéutico como antibióticos. Los péptidos antimicrobianos juegan un papel clave en la defensa de las plantas, tanto como barreras preexistentes desarrollados reguladamente o como un resultado de la respuesta inducida bajo una infección [2,8,17,18]].

Las plantas han desarrollado una variedad de potentes mecanismos de defensa, aunque no tienen un sistema inmune, incluyendo la síntesis de compuestos de bajo peso molecular, proteínas y péptidos que tienen actividades antimicrobianas. Así, bajo percepción de moléculas de signos microbianos las plantas inducen la producción de sustancias microbianas tales como peróxido de hidrógeno, enzimas hidrolíticas, y péptidos y proteínas antimicrobianas. Algunas de estas moléculas de defensa se producen constitutivamente en ciertos tipos de células especializadas o tejidos [19,20]

Similarmente, bacterias, insectos, moluscos, hongos y mamíferos sintetizan un número de proteínas y péptidos que son antifúngicos. El mecanismo de acción de estas proteínas incluye degradación del polímero de la pared celular fúngica, formación de poros y canal de membrana, daño a ribosomas celulares, inhibición de la síntesis de ADN e inhibición del ciclo celular. Estas proteínas parecen estar involucradas en la resistencia constitutiva o inducida al ataque fúngico [8,21].

Entre los péptidos antimicrobianos de plantas las tioninas fueron las primeras cuya actividad contra patógenos de planta fue demostrada *in vitro*. Consecuentemente, varias familias de péptidos ricos en cisteína se han caracterizado incluyendo las defensinas, LTPs (proteínas de transferencia de lípidos), péptidos del tipo heveína y knotina, entre otros. Cabe mencionar que se ha hecho una clasificación de las proteínas antifúngicas como proteínas relacionadas a patogénesis (PR-1, -2, -3, -4 y -5) ya que cuando las plantas se exponen a patógenos (hongos y virus) producen compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular tales como fitoalexinas, péptidos antimicrobianos y proteínas pequeñas (tioninas, defensinas, proteínas parecidas a heveína y péptidos parecidos a knotina) y otras proteínas antimicrobianas [2,8].

## 1.6 Clasificación de los péptidos antimicrobianos

### 1.6.1 Tioninas

Las tioninas son una familia de péptidos homólogos que incluyen purotioninas y sus homólogos tales como viscotoxinas, poratoxinas y crambinas mostrando variantes cada una. Son pequeños (3 a 5 kDa) péptidos ricos en cisteína que son tóxicos para los hongos. Así, se han aislado dos nuevos péptidos antimicrobianos activos contra bacterias gram positivas y gram negativas, las fabatinas, de habas de la planta *Vicia faba* relacionados a la familia de las  $\gamma$ -tioninas, tienen 47 residuos de aminoácidos con carga total positiva y 8 cisteínas que probablemente forman 4 puentes disulfuro característicos de las  $\gamma$ -tioninas.

Los péptidos de tionina tienen de 45 a 47 aminoácidos de longitud y se pueden clasificar en cinco tipos de acuerdo a su secuencia de aminoácidos, solo que un tipo (el tipo V) carece del carbono terminal del nonapéptido. La purotionina original aislada de endosperma de trigo tiene cuatro enlaces disulfuro y es altamente básica con residuos sin carga negativa. Secuencias conocidas de este tipo (I) comprenden 45 residuos de aminoácidos. Las tioninas tipo II se han aislado de hojas de *Pyralia pubera* y de cebada, tienen cuatro puentes disulfuro en las mismas posiciones de aquellas del tipo I, pero son menos básicas, con algunos residuos cargados negativamente. El tercer tipo incluye las viscotoxinas y poratoxinas de muérdago (Loranthaceae), las cuales tienen tres puentes disulfuro conservados respecto a los tipos previos, contienen pocos residuos de aminoácidos básicos y su secuencia tiene 46 residuos, nueve de los cuales están en el asa central de disulfuro. Las crambinas aisladas de la col abisiniana (Cruciferae) representan el IV tipo. Las cuales tienen la misma longitud de secuencia y arreglos de puentes disulfuro como las tioninas tipo II, solo que las moléculas son neutras, con una baja proporción de residuos de aminoácidos cargados. Las tioninas tipo V también son neutras, tienen tres puentes disulfuro y se han identificado en granos de trigo [8,22].

A pesar de las extremas divergencias entre las tioninas tipo I, III y IV estas tienen esencialmente la misma estructura 3D en solución y en el estado sólido cristalino. Estas moléculas son anfipáticas y de estructura rígida. La rama larga está formada por dos hélices  $\alpha$  antiparalelas y la rama corta por una hoja  $\beta$  que consiste de dos cortas hebras  $\beta$  antiparalelas. Los residuos hidrofóbicos están agrupados en la superficie externa de la rama larga, mientras que los residuos hidrofílicos se dan principalmente en su superficie interna. Se ha propuesto que las tioninas tipo I tienen un sitio de enlace para fosfolípidos, el cual puede estar implicado en su actividad tóxica.

La capacidad de las tioninas para inducir filtración de material intracelular se demostró primero en bacterias y levaduras. Este efecto puede ser reversible por ciertos cationes divalentes tal como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , o  $\text{Fe}^{2+}$ . Este efecto en membranas fúngicas se ha investigado en *Neurospora crassa*, donde las concentraciones mínimas requeridas para causar filtración e inhibición de crecimiento fueron similares. También se ha investigado la toxicidad de las tioninas en patógenos de plantas. Efectos citotóxicos en células cultivadas de mamíferos se han reportado para diferentes tipos de tioninas. Los patógenos bacterianos y fúngicos fueron inhibidos por tioninas a concentraciones en el rango de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  moles/litro [2].

## 1.6.2 Defensinas

Las defensinas son un diverso grupo de proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína que se encuentran en mamíferos, hongos, insectos y plantas. La expresión de genes de defensina en algunos tejidos de planta por ejemplo, es inducida en respuesta a la infección mientras que en otros tejidos se da constitutivamente. Las defensinas de insectos y mamíferos son pequeñas (3 a 5 kDa) y forman canales iónicos dependientes de voltaje en las membranas plasmáticas [2,23].

### *Propiedades estructurales y generalidades*

La síntesis de péptidos antimicrobianos y antifúngicos conocidos como defensinas se presentan en diversos organismos tales como escorpiones, plantas, insectos, garrapatas, mejillones [24] y mamíferos que comparten características estructurales y funcionales, lo que sugiere un origen ancestral conservado. Estos pequeños péptidos (3 a 5 kDa) catiónicos tienen de 6 a 8 residuos de cisteína conectados por 3 ó 4 enlaces disulfuro intramoleculares. En las defensinas de insectos (Figura 6. Insect defensin A) se distinguen tres regiones distintas: un asa N-terminal, una hélice  $\alpha$  y una lámina  $\beta$  antiparalela doble en el carbono terminal. De hecho, la estructura de las defensinas de plantas es similar a la estructura de las defensinas antimicrobianas de insectos [25]. La estructura de las defensinas de las plantas (Figura 6. Rs-AFP1) está dominada por una lámina  $\beta$  antiparalela triple y una hélice  $\alpha$  paralela a la estructura  $\beta$ . En las defensinas de mamíferos (Figura 6. HNP-3) predominan las láminas  $\beta$  estabilizadas por tres puentes disulfuro y no contienen hélices [2,8,12].

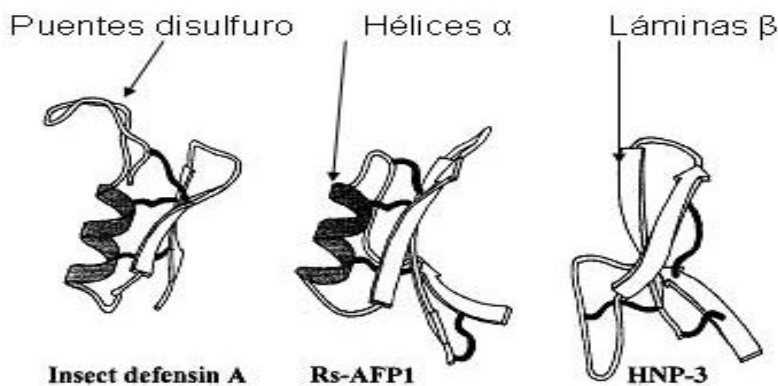


FIGURA 6. Representación esquemática de la estructura tridimensional de una defensina de insecto (Insect defensin A), una defensina de planta (Rs-AFP1) y una defensina de mamífero (HNP-3) [12].

Algunos de estos péptidos son inhibidores de amilasas  $\alpha$  de insectos y mamíferos los cuales posiblemente evolucionaron para la defensa de la planta contra herbívoros [12].

Las defensinas de plantas son una familia de péptidos antimicrobianos de 45 a 54 residuos de aminoácidos de longitud y todos los miembros de esta familia tienen 8 cisteínas (residuos conservados en todas las secuencias) unidas por disulfuros incluyendo una en el carbono terminal. Están cargadas positivamente y la mayoría son altamente oligoméricas (varias subunidades de 4 a 5 kDa) *in situ*.



La estructura tridimensional determinada por espectroscopia de RMN de las defensinas de plantas consiste de una hoja  $\beta$  antiparalela triple y una hélice  $\alpha$  que es estabilizada por enlaces disulfuro. La distribución de estas es amplia ya que se encuentra en las hojas, raíces, flores, vainas y semillas. Son preferencialmente localizadas en capas celulares periféricas. Los genes de defensina inducidos bajo infección de patógenos se han identificado en chícharo, tabaco y rábano. En algunos de estos casos la inducción es sistémica, ya que se detectaron también en hojas no infectadas de la planta infectada. La propiedad biológica más relevante es la capacidad para inhibir hongos y bacterias [8,19].

### *Clasificación de las defensinas*

Cuatro grupos de defensinas se establecen de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y al parecer las diferencias estructurales están correlacionadas con cambios en la especificidad antimicrobiana. Las defensinas del grupo I (defensinas morfogénicas) causan inhibición de bacterias gram positivas y hongos. La inhibición fúngica ocurre con reducida elongación de hifas y con un concomitante incremento en la ramificación de estas (ejemplos: Rs-AFP1 y Rs-AFP2 de semillas de rábano); aquellas del grupo II son activas contra hongos disminuyendo paulatinamente la extensión de hifas pero no causan marcados cambios morfológicos (tentativamente llamadas no morfogénicas) y son generalmente inactivas contra bacterias con algunas excepciones tal como *Bacillus subtilis*, la cual es inhibida por el péptido Ct-AMP1 de semillas de *Clitoria ternatea* y, *Pseudomonas solanacearum* y *Clavibacter michiganensis* las cuales son susceptibles a una defensina de raíz de papa (Pth-St1); aquellas del grupo III son activas contra bacterias gram positivas y gram negativas, pero inactivas contra hongos e inhiben amilasas  $\alpha$  *in vitro*; y aquellas del grupo IV son activas contra bacterias gram positivas y gram negativas, también son activas contra hongos sin causar ramificación de hifas. Las defensinas son ampliamente activas ya que inhiben un gran número de patógenos fúngicos de plantas y de humanos que incluyen *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Candida albicans* a niveles micromolares [2,8,12].

### *Inhibición de crecimiento fúngico*

En contraste a las defensinas de mamíferos e insectos, las defensinas de plantas no forman canales en bicapas artificiales o en liposomas artificiales, ni muestran actividad substancial permeabilizante de membranas de hifas, sino que causan alcalinización del medio de incubación y cambios en el potencial de membrana. El mecanismo de acción de las defensinas aún no es completamente elucidado, aunque se ha mostrado que ellas inducen una serie de respuestas rápidas de membrana incluyendo una entrada sostenida de  $\text{Ca}^{2+}$  y una salida sostenida de  $\text{K}^{+}$  mediante el enlace a receptores específicos de membrana cuando se agregaron defensinas antifúngicas (Rs-AFP2 o Dm-AMP1) de plantas a hifas del hongo *Neurospora crassa*, y que, en contraste con las tioninas, ellas no causan permeabilización al ácido isoaminobutírico o no tienen algún efecto sobre las corrientes eléctricas en membranas artificiales. Parece que estas respuestas de membrana son iniciadas a través de la interacción con un receptor que puede transducir una señal a los canales iónicos endógenos en la membrana o alternativamente, facilitar la inserción de la defensina de planta dentro de la membrana con subsecuente formación de canal iónico. Ejemplos de proteínas formadoras de poros que se insertan dentro de los fosfolípidos de membrana después de interactuar con receptores de membrana específicos son las colicinas antibacterianas de *Escherichia coli* y la toxina letal antifúngica K1 de *S. cerevisiae*.

Además, se ha encontrado un sitio de enlace específico y de alta afinidad para una defensina de planta en células fúngicas, sugiriendo que el enlace del péptido a un sitio de enlace específico es un prerrequisito para la actividad antifúngica. La actividad antifúngica de defensinas de plantas, morfogénicas o no, es antagonizada por el incremento de la fuerza iónica y mayoritariamente por cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) que con monovalentes. Sin embargo, el efecto antagónico es fuertemente dependiente del hongo. Estas observaciones implican que el crecimiento fúngico no es inhibido por interacción directa péptido-lípido. Así que es posible que operen diferentes mecanismos de acción entre las diferentes defensinas. Se ha investigado que no hay toxicidad de las defensinas de plantas en células de animales y de plantas. Las diferencias estructurales de los componentes de membrana entre células de hongos y plantas probablemente expliquen la actividad selectiva de las defensinas de plantas contra patógenos fúngicos y sus propiedades no fitotóxicas [2,8,19,23,26].

### *Defensinas de plantas y su papel de protección en semillas y tejidos vegetativos*

Además de la respuesta de algunos genes de defensina a infección patógena, un número de observaciones *in planta* soportan su considerado papel de defensa. Experimentos con semillas de rábano han demostrado que las defensinas representan más del 30% de las proteínas liberadas durante la germinación (cerca de  $1\mu\text{g}/\text{semilla}$ ) y que la liberación de defensinas es suficiente para la inhibición fúngica. Estos experimentos indicaron que las defensinas de planta, Rs-AFPs, son liberadas de las semillas de rábano cuando la cubierta de estas es perforada en condiciones naturales por la germinación del embrión o artificialmente. La expresión del gene codificador de Pth-St1 y la defensina antimicrobiana de raíces de papa mostraron ser más abundantes en la capa celular epidérmica. El mismo o un gen relacionado también se expresa en flores, tallos y hojas. Así, las defensinas de plantas se expresan de una manera constitutiva y específica del órgano, las cuales son más abundantes en capas celulares periféricas de aquel órgano; o de una manera modulada por patógenos, asociada a especificidad de tejido alterada. La expresión constitutiva de defensinas de plantas en células periféricas de semillas (caso del rábano), órganos de flores (caso del tabaco) o raíces (caso de la papa) es consistente con un papel en la primera línea de defensa de tejidos vulnerables [8,12].

Las defensinas de plantas corresponden a una superfamilia de PAM similarmente unidos que tienen representantes en vertebrados, invertebrados y plantas, sugiriendo que estas moléculas de defensa precedieron la divergencia evolutiva de animales y plantas [12].

### 1.6.3 Proteínas de Transferencia de Lípidos (LTPs)

Las proteínas de transferencia de lípidos no específicas son una familia de péptidos previamente consideradas a estar involucradas en el transporte de lípidos entre organelos y han estado recientemente implicadas en la defensa de plantas. Son proteínas pequeñas de 90 residuos de aminoácidos estabilizados por cuatro puentes disulfuro con una cavidad central hidrofóbica parecida a un túnel. Las LTPs de plantas son polipéptidos de 90 a 95 residuos de aminoácidos que se han identificado en varios tejidos de muchas especies mono y dicotiledóneas. Inicialmente se reportaron en hojas de espinacas, en granos de maíz y aleurona de cebada. Más tarde se descubrió que estaban distribuidas en toda la planta, externamente asociadas con la pared celular y cutícula de capas celulares epidérmicas y periféricas. También se han aislado de mamíferos, hongos y bacterias.

La proteína tiene una estructura globular, tanto en estado cristalino como en solución. Consiste de un paquete de cuatro hélices  $\alpha$  unidas por asas flexibles con una cavidad hidrofóbica que puede acomodar una variedad de lípidos. También se ha demostrado que los genes de LTPs responden a infección de patógenos de una manera compleja.

La actividad antimicrobiana de LTPs se ha reportado por todos los miembros de la familia examinada, incluyendo aquellos aislados de espinacas, maíz, cebada, rábano y brócoli. Las actividades relativas de diferentes LTPs varían entre patógenos sugiriendo que tienen un grado de especificidad. A pesar de que estas proteínas son de diversas fuentes, tienen homologías sorprendentes del 37 al 90% en su secuencia de aminoácidos.

El posible papel de defensa de LTPs se basa en la observación de que las plantas de tabaco transgénico y *Arabidopsis* con sobreexpresión de una LTP de cebada, mostraron drástica reducción de síntomas de enfermedad después de infectar las hojas con la bacteria patógena *Pseudomonas syringae*. Las LTPs son activas contra algunas bacterias y hongos *in vitro*; solo que el mecanismo de acción se desconoce. Puede ser que estas proteínas se inserten en la cavidad central hidrofóbica de la membrana celular fúngica y formen un poro, permitiendo el flujo de iones intracelulares y por tanto conduzcan a la muerte celular. Sin embargo, como están relacionadas a su función de transferir lípidos no queda claro su papel de defensa contra patógenos [8,27-29].

#### 1.6.4 Péptidos Parecidos a Heveína y Knotina

La heveína es la proteína más abundante en el látex de árboles de caucho, tiene 43 residuos y es rica en cisteína. El PAM parecido a heveína de pimienta dulce, contiene las mismas cisteínas unidas a 8 disulfuros que están presentes en el péptido del látex, mientras que en el PAM de amaranto no están presentes las dos últimas cisteínas debido a una supresión del C-terminal. Las características tridimensionales más importantes de la estructura de heveína, determinadas por RMN de protón son: tres hebras de hojas  $\beta$ , un giro de hélice  $\alpha$  que une a la segunda y tercer hebras.

Los PAM que conforman el modelo así llamado knotina tienen 36 a 37 residuos de aminoácidos de longitud y se han aislado de *Mirabilis jalapa*. Tienen 6 cisteínas unidas por disulfuros.

Tanto los péptidos parecidos a heveína y como los de knotina inhiben un amplio rango de hongos y bacterias gram positivas *in vitro* pero sus actividades son revertidas por cationes divalentes [8].

#### 1.6.5 Proteínas PR-1

Se acumulan a niveles altos después de la infección por patógenos. Se han encontrado en arroz, trigo, maíz, tabaco y otras plantas. Tienen actividad antifúngica a niveles micromolares contra varios hongos patógenos de planta. Tienen masas moleculares de 15 a 17 kDa y tienen homología a la superfamilia de proteínas ricas en cisteína. El mecanismo no se conoce pero una proteína parecida a PR-1, la helotermina de lagartija mexicana, interactuó con proteínas de canal de membrana de células blanco inhibiendo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  [8].

#### 1.6.6 Proteínas PR-2 (glucanasas $\beta$ )

Tienen actividad de (1,3) $\beta$ -endoglucanasa *in vitro* y se han dividido en tres clases de acuerdo a su secuencia de aminoácidos. Las glucanasas clase I son proteínas básicas de aproximadamente 33 kDa encontradas en la vacuola de la planta. Las de clase II y III incluyen proteínas ácidas extracelulares de cerca de 36 kDa. Se han encontrado en granos, frutas y tabaco. Son activas a una concentración de aproximadamente 50  $\mu\text{g/mL}$  contra patógenos fúngicos de plantas y humanos.

La actividad antifúngica de (1,3) $\beta$ -glucanasas de planta, que ocurre por PR-2, se logra hidrolizando la estructura (1,3) $\beta$ -glucano presente en la pared celular fúngica, particularmente en el vértice de la hifa donde los glucanos están más expuestos resultando en una pared celular débil que a su vez lleva a la lisis y después a la muerte celular [8].

### **1.6.7 Proteínas PR-3 (quitinasas)**

La mayoría tiene masas moleculares de 23 a 46 kDa. Las quitinasas se dividen en cinco clases. La clase I contiene un dominio N-terminal rico en cisteína de aproximadamente 40 aminoácidos, un dominio parecido a heveína enlazante de quitina, una porción central altamente conservada y una región capital. La mayoría es de 32 kDa. La clase II, similar en secuencia de aminoácidos a la clase I, carece del dominio N-terminal rico en cisteína y tiene masas moleculares de 27-28 kDa. La clase III no comparte homología en secuencia de aminoácidos con las otras clases y tiene masas moleculares de 28-30 kDa. La clase IV se parece a la clase I pero son mucho más pequeñas debido a cuatro principales supresiones.

La clase V tiene masas moleculares de 41 a 43 kDa. Las quitinasas se han aislado de hongos, plantas (tabaco, granos, pepino, haba y otras), bacterias y tienen potente actividad antifúngica contra patógenos de plantas y humanos. El modo de acción es que las PR-3 son endoquitinasas que cortan los polímeros de quitina de la pared celular *in situ*, resultando en una pared celular debilitada y reflejando células fúngicas osmóticamente sensibles. No es sorprendente que las  $\beta$ -glucanasas y las quitinasas actúen sinérgicamente en la inhibición del crecimiento fúngico [8,30].

### **1.6.8 Proteínas (enlazantes de quitina) PR-4**

Son proteínas enlazantes de quitina, tienen masas moleculares de 13 a 14.5 kDa y se han clasificado en dos grupos. El grupo I tiene homología en su secuencia de aminoácidos con la heveína y pertenece a la superfamilia de lectinas enlazantes de quitina. El grupo II carece del dominio enlazante de quitina. Ambos grupos se han aislado de papa, tabaco, tomate, cebada y otras plantas y tienen potente actividad antifúngica contra una variedad de patógenos de plantas y humanos (por ejemplo, *Trichoderma harzianum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *B. cinerea*).

La actividad antifúngica de las proteínas clase I resulta del enlace de la proteína a la quitina  $\beta$  de la pared celular fúngica. Esto resulta en la alteración de la polaridad de la célula llevando a inhibición del crecimiento fúngico. El mecanismo de las de clase II no se conoce bien. También hay proteínas y péptidos enlazantes de quitina con actividad antifúngica que no son proteínas PR, que se han aislado de bacterias, plantas, insectos y crustáceos. Incluyen las proteínas taquistatinas de 6.8 a 7.4 kDa, penaeidinas de 5.5 a 6.6 kDa, proteína antifúngica 1 de 9.8 kDa y otras. Los hongos inhibidos por estas proteínas incluyen patógenos de plantas y humanos. Su mecanismo es igual a las de clase I [8].

#### **1.6.9 Proteínas (TL) PR-5**

Tienen homología a la taumatina (proteína dulce de fresa del Sur de África) y por ello se conocen como proteínas TL. La mayoría tiene masas moleculares de aproximadamente 22 kDa y son estabilizadas por 8 puentes disulfuro. Estas estructuras altamente estabilizadas permiten a las PR-5 ser muy resistentes a la degradación por proteasas. El mecanismo de acción preciso se desconoce [8].

#### **1.6.10 Péptidos Antimicrobianos de Cuatro Cisteínas**

Se han reportado dos familias con cuatro cisteínas. La de MBP-1 que es un péptido de 33 residuos aislado de maíz y la de Ib-AMPs que es un grupo de péptidos de 20 residuos aislados de semillas de *Impatiens balsamina*. El primer péptido es activo contra hongos y bacterias gram positivas y gram negativas, mientras que los Ib-AMPs inhiben hongos y bacterias gram positivas [8].

#### **1.6.11 Péptidos de 12 Cisteínas**

Las snakinas (St-SN) son un nuevo tipo de PAM de doce cisteínas. La St-SN1 se ha descubierto en raíces de papa, este péptido tiene 63 residuos de longitud y es activo a concentraciones menores de 10  $\mu$ M contra hongos, bacterias gram positivas y gram negativas, no tiene algún efecto sobre membranas artificiales de lípidos [8].

### 1.6.12 Proteínas Parecidas a Ciclofilinas

Las ciclofilinas son proteínas altamente conservadas en su composición y son los receptores intracelulares de la ciclosporina. Se han aislado de bacterias, plantas, animales y hongos. Se ha aislado una proteína de 18 kDa con actividad contra *F. oxysporum*, *B. cinerea* y *Rhizoctonia solani*. Esta proteína se le llamó mungina y mostró significativa homología a las ciclofilinas. Sin embargo el mecanismo de acción de la mungina se desconoce [8].

### 1.6.13 Proteínas Ricas en Glicina/Histidina

Los insectos sintetizan proteínas y polipéptidos antifúngicos ricos en glicina e histidina, como la holotriquina (84 aminoácidos), proteínas antifúngicas (67 aminoácidos) y tenecina (44 aminoácidos). Por ejemplo, la tenecina inhibió al patógeno humano más común *Candida albicans* a una concentración media de aproximadamente 8 µg/mL. El mecanismo de acción de estas proteínas no se ha elucidado [8].

### 1.6.14 RIPs

Las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) son *N*-glicosidasas de RNA donde el rRNA depurinado resulta en la detención de síntesis de proteínas debida a daño ribosomal. Las RIPs de plantas inhiben la síntesis de proteínas de mamíferos, bacterias, hongos y plantas *in vitro* e *in vivo*. Se han clasificado en tres tipos. Las del tipo I son *N*-glicosidasas de cadena simple con masas moleculares de 11 a 30 kDa. Las del tipo II contienen dos cadenas, una lectina enlazante de la célula y una *N*-glicosidasa, con masas moleculares de aproximadamente 60 kDa. Estas incluyen miembros tóxicos (ricina) y no tóxicos (ebulina 1 y nigrina b). Las del tipo III consisten de cuatro cadenas organizadas como dos dímeros de RIPs del tipo II. Las del tipo I y II muestran amplia actividad contra un número de patógenos fúngicos para humanos y plantas [8].

### **1.6.15 Proteínas Letales (killer toxins)**

Un número de levaduras secretan proteínas que son letales a células fúngicas sensibles. Las células fúngicas que secretan una toxina letal son resistentes a su propia toxina pero son sensibles a otras toxinas. Más de 20 toxinas letales individuales se han identificado y varían en su masa molecular de 10.7 a 156.5 kDa. Aunque tienen mecanismos de acción variados, el primer paso involucra el enlace de la proteína a receptores superficiales específicos de la célula. Una vez unida, las proteínas letales son internadas y pueden interrumpir la síntesis de pared celular, de ADN y la actividad del canal de  $K^+$ . Inhiben la síntesis de 1, 3- $\beta$ -glucanos o detienen el ciclo celular. Alguno de estos efectos lleva a la inhibición de crecimiento y muerte celular fúngica [8].

### **1.6.16 Inhibidores de Proteasas**

Las proteínas inhibidoras de serina (tripsina, quimotripsina) y proteasas de cisteína surgen como una clase de proteínas antifúngicas con potente actividad en patógenos de animales y plantas. Los inhibidores de proteasa de serina con actividad antifúngica también tienen la propiedad de inhibir la actividad de amilasas  $\alpha$  de insectos pero no las de origen mamífero o bacteriano. Estas proteínas son bifuncionales porque inhiben enzimas y el crecimiento de hongos e insectos. Por su parte, los inhibidores de proteasa de cisteína forman un cuarto grupo de cistatinas, las fitocistatinas que son polipéptidos de 10 a 12 kDa activos contra patógenos de planta como *F. solani*. El mecanismo de ambos inhibidores se desconoce [8].



## 1.7 Mecanismo de acción de los PAM lineales anfipáticos $\alpha$ -helicoidales

Los PAM son sintetizados de manera rápida a un bajo costo metabólico y se pueden almacenar fácilmente en grandes cantidades y estar disponibles rápidamente después de una infección. Se pueden dividir en cuatro grupos:

- a) PAM lineales, la mayoría helicoidales, sin cisteínas
- b) Péptidos lineales sin cisteínas y con ciertos residuos abundantes como prolina y arginina.
- c) Péptidos con un enlace disulfuro.
- d) Péptidos que tienen dos o más puentes disulfuro y que forman principal o únicamente las hojas  $\beta$  antiparalelas.

Algunas diferencias entre los PAM son la variación en su longitud de cadena, hidrofobicidad y distribución de cargas. Las similitudes entre los PAM son sus formas lineales (como ocurren en la naturaleza), están cargados positivamente y presentan un gran momento hidrofóbico y son propensos a adoptar una conformación  $\alpha$ -helicoidal en un medio hidrofóbico. Es decir, cuando los PAM interactúan con la membrana blanco se doblan en una estructura anfipática  $\alpha$ -helicoidal [31-32].

Aunque el mecanismo exacto por el cual esta familia de péptidos destruye bacterias no está claramente elucidado, se ha demostrado que las interacciones péptido-lípido en vez del reconocimiento mediado por el receptor, juegan un papel importante en sus funciones.

La permeabilización de membrana por péptidos anfipáticos  $\alpha$ -helicoidales (PA $\alpha$ H) se ha propuesto para proceder vía uno de los dos mecanismos:

- a) destrucción/solubilización de membrana vía el mecanismo “parecido tapetes” o
- b) formación del poro transmembrana vía el mecanismo de “duela de barril”.

### 1.7.1 Ruptura de membrana vía el mecanismo “parecido a tapetes”

El mecanismo de tapetes (Figura 7) describe una situación en la cual los péptidos  $\alpha$ -helicoidales inicialmente se enlazan a la superficie de la membrana blanco y después la cubren o la parten a manera de tapetes. La membrana blanco puede ser permeable solo después de haber alcanzado la concentración umbral. El péptido no se inserta en el centro hidrofóbico de la membrana, sino que se enlaza a la cabeza de los grupos de fosfolípidos.

La interacción inicial con la membrana blanco cargada negativamente es manejada electrostáticamente ya que los péptidos activos están cargados positivamente. Los posibles cuatro pasos involucrados en este modelo son:

- a) enlace preferencial de monómeros de péptidos con cargas positivas a los fosfolípidos con cargas negativas,
- b) colocación de los monómeros anfipáticos  $\alpha$ -helicoidales sobre la superficie de la membrana para que las cargas positivas de los aminoácidos básicos interactúen con las cabezas de los grupos de fosfolípidos con cargas negativas o con las moléculas de agua,
- c) rotación de la molécula conduciendo a reorientación de los residuos hidrofóbicos hacia el centro hidrofóbico de la membrana y
- d) desintegración de la membrana, rompiendo la curvatura de la bicapa que ayuda a la formación de micelas.

Un paso inicial antes del colapso de la membrana puede incluir agujeros momentáneos en la membrana. Agujeros como estos pueden facilitar el pasaje de moléculas de bajo peso molecular antes de completar la lisis de la membrana. Estos agujeros difieren del modelo de duela de barril en que los lípidos doblados se apoyan en si mismos. Como se ve en la Figura 7, estos agujeros pueden permitir el pasaje de moléculas de péptidos de la membrana externa hacia la membrana interna de las bacterias gram negativas [33-37].

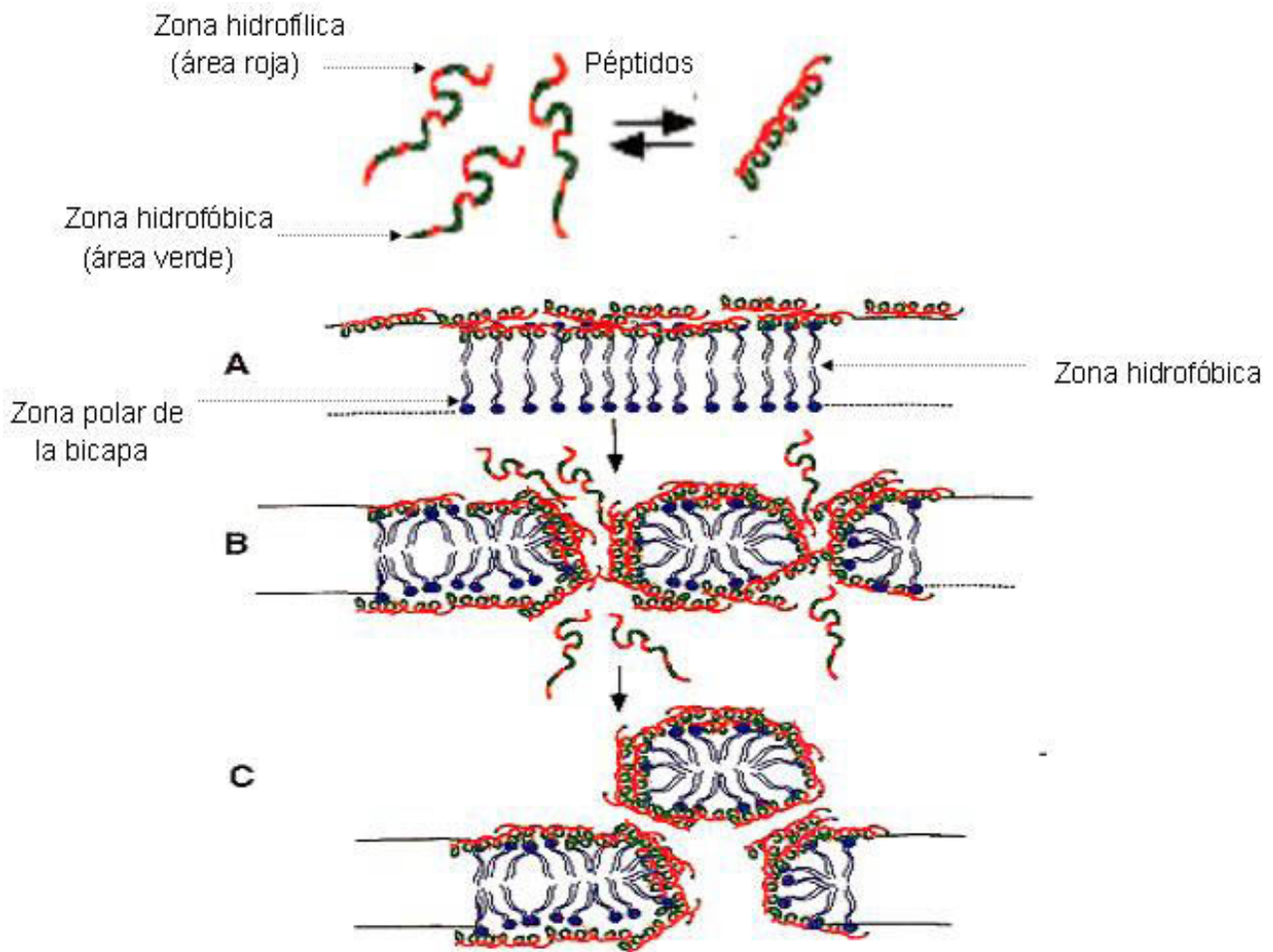


FIGURA 7. Ilustración del modelo "parecido a tapetes" sugerido para la permeabilización de membrana. En este modelo los péptidos están enlazados a la superficie de la membrana con sus superficies hidrofóbicas (área verde) de frente a la membrana y sus superficies hidrofílicas (área roja) frente al disolvente (paso A). Cuando una concentración umbral de monómeros de péptidos se alcanza, la membrana cae en piezas (pasos B y C). En esta etapa se forma un poro momentáneo [33].

### **1.7.2 Formación del poro transmembrana por el mecanismo “duela de barril”**

Un clásico poro transmembrana se puede describir por un modelo de “duela de barril” (Figura 8) en el cual las hélices  $\alpha$  anfipáticas de los péptidos forman envolturas, donde las superficies hidrofóbicas de las hélices interactúan con el centro del lípido de membrana y las superficies hidrofílicas apuntan hacia adentro produciendo un poro.

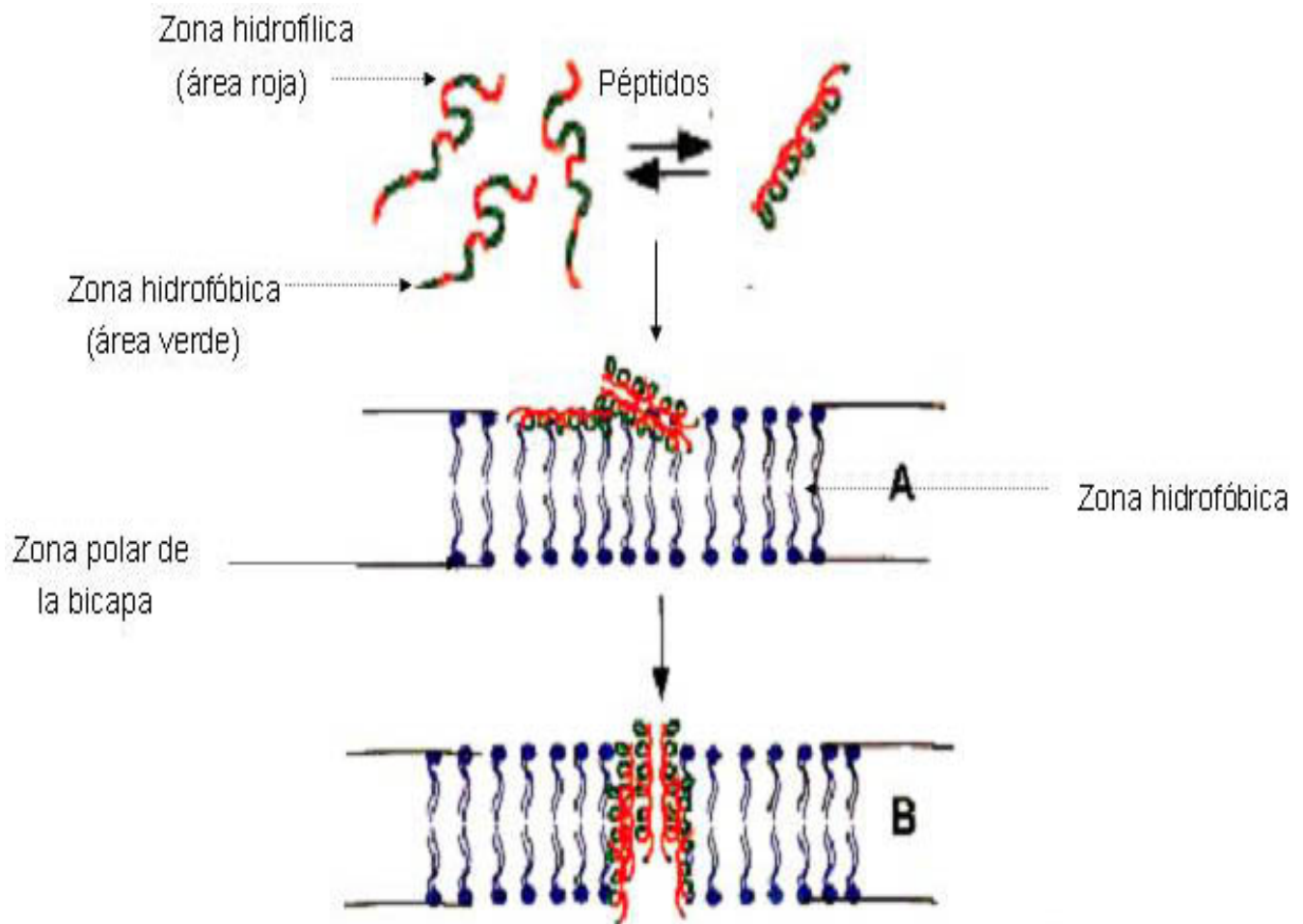


FIGURA 8. Ilustración del modelo "duela de barril" sugerido para la permeabilización de membrana [33].

Dado que estos péptidos se insertan en el centro hidrofóbico de la membrana, su enlace a ella es manejado predominantemente por interacción hidrofóbica. Como una consecuencia, los péptidos pueden enlazarse a fosfolípidos de membrana cargados y zwitteriónicos. Debido a que las superficies hidrofílicas de varios péptidos  $\alpha$ -helicoidales anfipáticos están de frente una a otra mientras forman un poro transmembrana, es improbable que tales hélices estén cargadas altamente homogéneas.

El mecanismo involucra cuatro pasos principales:

- a) enlace de los monómeros a la membrana en una estructura helicoidal,
- b) reconocimiento molecular entre monómeros enlazados a membrana que conduzca a su ensamble a baja densidad superficial del péptido enlazado,
- c) inserción de por lo menos dos monómeros ensamblados en la membrana para iniciar la formación de un poro y
- d) reclutamiento progresivo de monómeros adicionales para incrementar el tamaño del poro.

Un prerrequisito para tal mecanismo es que el ensamble inicial de monómeros en la superficie de la membrana debe ocurrir antes de que el péptido sea insertado, ya que es energéticamente desfavorable para una hélice  $\alpha$  anfipática cruzar la membrana como un monómero. En el último de los casos, la baja constante dieléctrica y la incapacidad para establecer puentes de hidrógeno no permitirán a la región acilgrasa de una bicapa lipídica estar en contacto directo con la superficie polar de una hélice  $\alpha$  anfipática simple [33-36].

### **1.7.3 Mecanismo del poro toroidal o “tornillo de agujero”**

Este mecanismo es una de las interacciones de péptido-membrana mejor caracterizado. Una diferencia primaria entre los modelos de poro toroidal y duela de barril es que en el segundo, los lípidos son intercalados con el péptido en el canal transmembrana. Así, esta estructura ha sido referida como un complejo supramolecular y representa un poro extendido de membrana alineado con superficies de péptidos polares así como también con grupos de cabezas de fosfolípidos. El modelo del poro toroidal se ha deducido de experimentos usando péptidos  $\alpha$  helicoidales, incluyendo magaininas.

En este modelo los péptidos en el ambiente extracelular toman una estructura  $\alpha$  helicoidal cuando interactúan con la membrana bacteriana cargada e hidrofóbica. Las hélices son inicialmente orientadas en paralelo a la superficie de membrana como lo confirma la resonancia magnética nuclear y apagamiento de fluorescencia. Los residuos hidrofóbicos de los péptidos enlazados desplazan los grupos de cabezas polares, creando una abertura en la región hidrofóbica e induciendo a la deformación de la curvatura en la membrana. La introducción de la deformación y adelgazamiento promueve desestabilización de la integridad de superficie de membrana haciéndola más vulnerable a interacciones siguientes con péptidos. En una proporción umbral péptido-lípido los péptidos se orientan de manera perpendicular a la membrana. En este punto las hélices pueden empezar a autoasociarse de tal forma que sus residuos polares no se expongan mucho a las cadenas de hidrocarburo de la membrana. Este compuesto momentáneo y multimérico forma los complejos supramoleculares dinámicos péptido-lípido y poro toroidal. Sobre la desintegración del poro, algunos péptidos se translocalizan a la hoja citoplásmica de la membrana, sugiriendo que el desensamble del poro toroidal puede ser un mecanismo clave mediante el cual los péptidos entran al citoplasma microbiano para acceder a los blancos intracelulares potenciales.

Los rasgos característicos de poros toroidales incluyen tiempos de vida limitados, tamaños discretos, selectividad de ion y una relación inversa entre estabilidad y carga del péptido. Además, estas propiedades afectan la función del poro mismo. Por ejemplo, el poro inducido por magainina 2 se ha estimado de 2 a 3 nm y restringe el tránsito de partículas fluorescentes dependiendo del peso molecular. La carga del péptido también puede afectar la estabilidad del poro vía repulsión intramolecular entre las cadenas cargadas positivamente. Así, péptidos cargados más positivamente mostraron la inducción de poros con tiempos de vida más cortos [35].

## **1.8 Péptidos antimicrobianos de animales**

Los péptidos antibióticos son un componente clave en los sistemas de inmunidad innata de la mayoría de los organismos multicelulares y comparten un mecanismo de acción, como el de permeabilización de membrana del patógeno. Los péptidos antibióticos tienen mecanismos de acción sobre bacterias como son la interrupción de síntesis de ADN, de proteínas, de la pared celular y de la integridad de la membrana [34,38].

### **1.8.1 Permeabilización de membrana**

Los estudios de permeabilización de membrana por parte de los PAM se han llevado a cabo en organismos vivos y en modelos de membrana. Algunos ejemplos de correlación directa entre el efecto antibiótico y la capacidad de permeabilización están presentes en defensinas, magaininas, cecropinas, bactenecinas o dermaseptinas. La permeabilización de membrana se da primero por interacción electrostática entre el péptido catiónico y los componentes de membrana patógena cargados negativamente; un incremento en la carga positiva del péptido incrementará la actividad microbicida. Una correlación directa entre el carácter catiónico y la actividad se ha establecido para cecropinas y análogos de magainina, donde la cecropina D menos catiónica muestra actividad microbicida escasa. En otros casos la correlación de carga y actividad es menos evidente tal como en las defensinas de rata, carentes de un residuo de arginina que tienen la misma actividad antibacteriana. Por otro lado, muchas cargas positivas pueden ocasionar una pérdida de la actividad. Por ejemplo, la disminución de actividad de un análogo de magainina altamente catiónico se ha atribuido a la desestabilización del poro debida al incremento de la repulsión entre monómeros de péptidos o bien por la fuerte asociación de péptidos con lípidos aniónicos lo cual favorece la rápida translocación dentro de la hoja interna de la membrana.



Las cargas positivas también tienen influencia en la especificidad del péptido hacia la membrana blanco, de hecho la variación de una sola carga puede ocasionar diferencias dramáticas en las propiedades hemolíticas y antibacterianas. Por su parte, los péptidos aniónicos antibióticos se han reportado raramente. Sin embargo, se sabe que actúan a concentraciones mínimas inhibitorias mucho más altas en cepas bacterianas comunes respecto a las de los péptidos catiónicos típicos. Otra diferencia es que las bacterias expuestas a péptidos aniónicos no muestran las alteraciones típicas observadas con los péptidos catiónicos, sugiriendo un modo de acción diferente. Tres nuevas clases de antibióticos naturales se han aislado de diferentes especies de vertebrados e invertebrados, estas clases son los péptidos aniónicos, péptidos aromáticos y proteínas enlazantes de oxígeno. El amplio espectro de actividades antimicrobianas reportado para estas moléculas sugiere que pueden ser usadas en el tratamiento de cáncer e infecciones virales y parasíticas [34,39,50].

### **1.8.2 Otros mecanismos alternativos a la permeabilización de membrana**

- inhibición de síntesis de proteínas específicas de membrana por atacinas o gloverinas
- inhibición de síntesis de proteínas de estrés
- detención de síntesis de ADN por PR-39
- rotura del puente simple de ADN por defensinas
- interacción con el ADN (sin detención de síntesis de ADN) por buforinas [41]
- producción de peróxido de hidrógeno
- los PAM provocan mecanismos autodestructivos tal como apoptosis en células eucarióticas o autólisis en blancos bacterianos. La lactoferrina induce apoptosis.
- los PAM inhiben también enzimas producidas por organismos patógenos, sirviendo como pseudosustratos o cerrando el enlace al sitio activo que interrumpe el acceso del sustrato
- la inhibición de trombina por defensinas también ayuda a la contención de patógenos y consecuentemente del proceso inflamatorio.

La actividad antimicrobiana también es afectada por las características de la membrana tales como composición de fosfolípidos, contenido de esteroles, potencial de membrana o presencia de polianiones (por ejemplo lipopolisacáridos y residuos de ácido sálico) [34].

### **1.9 Mecanismos de resistencia hacia los PAM**

#### **a) Inactivación por el medio de incubación**

El suero y sus componentes se han descrito como inhibidores para diferentes PAM como las defensinas, las cuales son inhibidas por albúmina de suero bovino y  $\alpha_2$ -macroglobulinas.

#### **b) Inactivación por barreras de oligosacáridos**

Los PAM antes de llegar a sus blancos finales deben atravesar barreras tal como péptidoglucanos bacterianos, matriz extracelular en células eucarióticas u oligosacáridos aniónicos unidos a diferentes componentes de la membrana. La heparina, un componente principal de la matriz extracelular inhibe la

actividad tumoricida de defensinas y la actividad de permeabilización del péptido híbrido de melitina de la cecropina A. En eritrocitos, los residuos de ácido sálico de las glucoproteínas de membrana inducen menor resistencia a magainina o melitina

c) Inactivación de la membrana externa bacteriana

Cuando un péptido es reconocido por lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de las bacterias gram negativas para cruzar las membranas, se da una interacción electrostática entre los residuos catiónicos y los grupos fosfato, respectivamente, así la inactivación a nivel de membrana externa puede ser originada por ausencia de LPS como en el caso de *Borrelia burgdorferi* resistente a la batenecina o por disminución de las cargas negativas tal como resulta de la esterificación de grupos fosfato por ejemplo en la resistencia natural de la bacteria *Proteus* o *Burkholderia*.

d) Proteólisis del péptido

El alto contenido de residuos básicos favorece la degradación por proteinasas parecidas a la tripsina. Así, se han descrito enzimas específicas degradantes de cecropinas producidas por patógenos tal como *Bacillus larvae*.

e) Resistencia de los componentes de la membrana plasmática

- Composición de lípidos

Los niveles muy bajos de fosfolípidos aniónicos están asociados a la resistencia bacteriana, tal como en especies de la bacteria *Serratia* o en esferoplastos de algunas bacterias gram negativas.

- Potencial de membrana

El potencial de membrana ha sido asociado con una permeabilización muy alta de los PAM en bacterias y en modelos de membrana. La hiperpolarización de los eritrocitos incrementa su susceptibilidad a magainina pero no a melitina.

- Reducción de enlaces disulfuro

El enlace de las defensinas a los grupos tioles activados de las  $\alpha_2$ -macroglobulinas es una forma de inactivación de esos péptidos.

- Sistemas de entrada/salida de péptidos

Algunos complejos de transporte de transmembrana en patógenos de plantas y animales, han mostrado estar involucrados en la resistencia al péptido, operando como sistemas de entrada que facilitan la degradación intracelular del péptido. En contraste, la resistencia a protegrinas en *Neisseria gonorrhoeae* parece estar basada en un sistema de salida de péptidos realizado por mecanismos similares a bombas involucradas en la multiresistencia a medicamentos [34].

## 1.10 Modificaciones postranslacionales

Los PAM muestran modificaciones postranslacionales que pueden modificar su actividad de una manera significativa. Las más frecuentes son las siguientes:

### a) Glucosilación

Esta se ha descrito en los PAM de insectos que pertenecen al subgrupo estructural rico en prolina. Así, el tratamiento de diptericina con O-glicosidasa suprime su actividad contra algunas bacterias. Es notable que los péptidos glicosilados no parecen causar permeabilización de membrana tal y como es su principal mecanismo de acción.

### b) Enlaces disulfuro

Los enlaces disulfuro intramoleculares son relativamente comunes en los PAM. En algunos casos, la reducción de enlaces disulfuro en péptidos nativos muestra poco o ningún efecto en la actividad. Así, la reducción de enlaces disulfuro suprime tanto la actividad formadora de canales de las defensinas de insecto sobre *Micrococcus luteus* [42] como la actividad antibacteriana de la sapecina (defensina de insecto), pero no la permeabilización de liposomas por defensinas de mamíferos. La reducción de enlaces disulfuro de defensinas de humano y conejo modifican pero no impiden el mecanismo de permeabilización.

### c) Amidación

La amidación se da en una amplia variedad de péptidos. Involucra la descarboxilación oxidativa de un C-terminal en el residuo de glicina adicional en un proceso enzimático. La correlación entre la amidación y la actividad biológica no es clara pero en algunos casos la actividad es impedida y en otros, el péptido sin amidación no difiere mucho en su actividad respecto al amidado. Otros péptidos análogos sintéticos con amidación en el C-terminal, quienes en su forma nativa no son aminoácidos, muestran actividad antimicrobiana incrementada.

### d)

## Halogenación

El papel de los haluros no es claro. En la misgurina, un nuevo péptido antimicrobiano, la actividad antibacteriana del análogo sintético desprovisto del halógeno es indistinguible del péptido natural. La misgurina es un péptido fuertemente básico que tiene 5 residuos de arginina y 4 de lisina, aislado de lobo marino *Misgurnus anguillicaudatus*, que mostró fuerte actividad antimicrobiana *in vitro* contra un amplio espectro de microorganismos sin actividad hemolítica significativa y fue cerca de seis veces más potente que la magainina 2 [34,43].

### 1.11 Cuantificación de proteínas con ácido bicinconínico

La cuantificación de proteínas con ácido bicinconínico (BCA) se basa en la detección colorimétrica y cuantificación de proteínas totales. Este método combina la reducción bien conocida de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  llevada a cabo por la proteína en un medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) usando un reactivo único que contiene ácido bicinconínico. La reacción de color púrpura, producto de esta cuantificación, se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso. Este complejo soluble en agua exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm que es aproximadamente lineal con el incremento de la concentración de proteínas sobre un amplio rango de trabajo (20-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El método de BCA no tiene un punto final preciso puesto que el color final continúa desarrollándose. Sin embargo con la posterior incubación, la velocidad del color que continua desarrollándose es suficientemente baja para permitir valorar un gran número de muestras a la vez.

La estructura macromolecular de la proteína, el número de enlaces peptídicos y la presencia de cuatro aminoácidos en particular (cisteína, cistina, triptofano y tirosina) se reportan como los responsables para la formación de color con BCA. Estudios con di, tri y tetrapéptidos sugieren que la amplia formación de color se debe a los grupos funcionales. La concentración de proteínas generalmente se determina y se reporta en referencia a estándares de una proteína común tal como albúmina de suero bovino (BSA). Así, se realizan diluciones de la proteína conocida para obtener una curva estándar y conocer a la vez la concentración de la proteína desconocida [44,45].

### 1.12 Método de Kirby-Bauer

El método de Kirby-Bauer (difusión de disco) es el más utilizado para determinar la susceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos. Se coloca un inóculo estándar de bacterias en una caja de Petri de gran tamaño que contenga agar Mueller-Hinton. A continuación se comprimen discos de papel filtro, sobre la superficie del agar, impregnados con cantidades estándar de antibióticos y se incuba la placa de manera adecuada. En donde el cultivo sea sensible a un antibiótico se presentará una zona de inhibición de crecimiento rodeando al disco que contenga al antibiótico. En donde el cultivo sea resistente al antibiótico el crecimiento ocurrirá hasta llegar al disco y aun por debajo de éste. Después se mide el diámetro de la zona de inhibición y se compara contra un control positivo. El tamaño de la zona depende principalmente de la potencia del antibiótico y de la sensibilidad del cultivo que se estudia. Los tamaños de las zonas también dependen de cierto número de distintos factores como tipo de medio usado, factores ambientales o del medio, profundidad del medio, tamaño de inóculo, aplicación del inóculo, aplicación de los discos, elección de discos y periodo de incubación [46,47]. Cuando el disco se impregna de antibiótico y se coloca en el agar húmedo, el agua es absorbida por el papel filtro y el antibiótico difunde al medio que lo rodea. El promedio de extracción del antibiótico del disco es mayor que su difusión hacia el medio, de modo que la concentración inmediatamente adyacente al disco puede exceder a la del disco mismo. Sin embargo, a medida que aumenta la distancia del disco, se produce una reducción logarítmica de la concentración de antibiótico. La concentración de antibiótico difundido en esta interfase de crecimiento y las bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria obtenida en las pruebas de dilución. Las limitaciones de este método incluyen que la prueba solo debe aplicarse a especies bacterianas que han sido totalmente evaluadas y, que no deben probarse bacterias que crecen lentamente, que necesiten nutrientes especiales, que requieran CO<sub>2</sub> o condiciones anaerobias para crecer a menos que la validez del procedimiento haya sido documentada [48]. Anteriormente se utilizaba el fenol como estándar de referencia por su acción bactericida para evaluar nuevos agentes antimicrobianos. El Índice Fenólico es un procedimiento aprobado por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) y tiene condiciones estándares para cepas de *Salmonella typhi*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Este coeficiente es el resultado de la relación entre la mínima concentración esterilizante de fenol y la mínima concentración esterilizante del compuesto estudiado. La determinación oficial indica diluir 1:10 un cultivo de bacterias en caldo con diversas concentraciones del compuesto, después se incuba a 20°C por 10 minutos. Ahora los derivados del fenol incrementan su actividad biológica con sustituyentes en el núcleo fenólico [49-51].

### **1.13 Cromatografía de intercambio iónico**

Esta técnica cromatográfica es la más usada para purificar proteínas. Su popularidad proviene de la posibilidad de separación de proteínas con alta resolución, la relativa facilidad de su uso, reproducibilidad, disponibilidad y bajo costo de materiales. El principio de intercambio iónico permite a la proteína enlazarse a la columna aun cuando un gran volumen de amortiguador es aplicado, haciendo este método básico especialmente en el paso de una purificación inicial de un extracto crudo.

La cromatografía de intercambio iónico requiere que una proteína contenga una carga iónica neta bajo condiciones experimentales. Como resultado, la proteína desplazara a un ión de bajo peso molecular de una matriz de intercambio iónico (un “intercambio de iones”, de aquí el término intercambio iónico) y se enlazará a la columna. Un cambio en las condiciones experimentales (tal como una disminución en la carga iónica neta de la proteína) causará otro intercambio de iones, en este momento se liberará la proteína de la matriz de intercambio iónico. Este proceso de intercambios sucesivos de iones permite la separación de proteínas con diferentes propiedades de carga. Cuando se conoce el punto isoeléctrico de una proteína, una estrategia inicial se puede desarrollar fácilmente para la separación. Si se conoce poco acerca de la proteína, experimentos de intercambio iónico pueden revelar mucho acerca de las propiedades biofísicas de una proteína y pueden guiar a la purificación subsecuente [52-53].

## 1.14 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas se analizan frecuentemente mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida. Este procedimiento es tan común que muchas veces se utilizan las siglas PAGE (del inglés polyacrylamide gel electrophoresis; electroforesis en gel de poliacrilamida) sin hacer una definición previa. La PAGE proporciona una resolución completa de mezclas complejas. Es un método analítico pero se emplea para purificar pequeñas muestras por ejemplo para el análisis de aminoácidos y la determinación parcial de las secuencias de aminoácidos de una proteína.

La electroforesis es la migración de moléculas cargadas en solución a causa de la influencia de un campo eléctrico aplicado externamente. En la PAGE, las moléculas que se están analizando migran en un campo eléctrico que se aplica sobre la solución acuosa que queda atrapada en la matriz del gel. La acrilamida y la metilen-*bis*-acrilamida son los compuestos a partir de los cuales se polimeriza un gel de acrilamida.

La acrilamida y concentraciones bajas de metilen-*bis*-acrilamida se disuelven en la solución amortiguadora la cual tendrá lugar la electroforesis. Los compuestos que se descomponen en radicales libres inician la reacción de polimerización, la cual produce cadenas largas de poliacrilamida que se unen transversalmente a través de la introducción ocasional en la cadena de residuos metilen-*bis*-acrilamida en lugar de residuos de acrilamida.

Las cadenas lineales de poliacrilamida, no unidas por enlaces transversales, producen una solución viscosa. La unión de estas cadenas mediante enlaces transversales a causa de la incorporación de residuos de metilen-*bis*-acrilamida hace que todas las cadenas existentes en la solución formen parte de un número muy pequeño de moléculas o de una sola molécula. Estas moléculas ramificadas muy grandes y la solución acuosa que atrapan constituyen el gel de poliacrilamida claro y elástico.

En un experimento de electroforesis en gel, el gel de poliacrilamida tiene dos importantes funciones: estabilizar el sistema ante el efecto de las perturbaciones convectivas y formar poros es decir, guiar el acceso a través del gel. El flujo de corriente eléctrica durante la electroforesis genera calor, el cual se disipa más rápidamente en los márgenes que en el interior de la solución.

Los gradientes de temperatura generados por la disipación irregular del calor causaran convección en una solución que no sea gel virtualmente elimina la mezcla por convección. En la segunda función del gel, los poros retardan más el movimiento de las moléculas grandes que el de las moléculas pequeñas.

Existen varios geles que son adecuados para realizar experimentos de electroforesis estabilizada, pero en general sólo los de acrilamida y agarosa se utilizan ampliamente. Los poros de los geles de agarosa son por lo general más grandes que los de los geles de poliacrilamida, de aquí que los geles de agarosa se utilicen para la electroforesis de ácidos nucleicos y de las proteínas de mayor tamaño. Las ventajas del gel de poliacrilamida incluyen la matriz hidrofílica (debida a los grupos carboximido) y, para una determinada concentración de gel, la distribución al parecer uniforme de tamaños de poro en todo el gel.

El espesor del gel mide desde una fracción de milímetro a varios milímetros y es polimerizado entre dos placas de vidrio. De esta forma el gel está limitado al frente y por detrás por placas de vidrio, que se mantienen separadas a una distancia uniforme por separadores que definen también los límites del gel. Las placas de vidrio y los separadores se encuentran conectados a los reservorios superior e inferior de tal forma que el gel está en contacto con la solución amortiguadora de los recipientes.

Cada electrodo, generalmente un alambre de platino, facilita una reacción de electrólisis en el recipiente correspondiente. Cuando el sistema se conecta a una fuente de corriente directa, se libera oxígeno en el ánodo (electrodo positivo) e hidrógeno en el cátodo. El voltaje aplicado es en general de 50 a algunos cientos de voltios, dependiendo del gel y de las sustancias amortiguadoras utilizadas. Los electrodos y las reacciones electroquímicas sirven para convertir el flujo de electrones provenientes de la fuente de energía en un flujo de iones en los recipientes y el gel. El calor generado en el gel por el flujo de la corriente irradia rápidamente a través del vidrio debido a su gran área superficial y porque el gel tiene poco espesor.

La gran eficiencia de la PAGE no solo se debe a las propiedades del gel de poliacrilamida, sino también a la disposición especial de los geles y las soluciones amortiguadoras. El gel en sí está compuesto por un gel de separación (está en la parte inferior) que está en contacto con un gel concentrador (parte superior). El gel concentrador tiene pozos o cavidades, que son depresiones rectangulares de unos pocos milímetros de ancho y que se mantienen en su sitio cuando el gel es vertido.



Dicho gel se vierte sólo poco antes de la electroforesis a fin de evitar la difusión excesiva de las sustancias amortiguadoras entre los geles concentrador y de separación. Las muestras se aplican con una micro pipeta en las depresiones del gel concentrador. La solución de la muestra desplaza de la depresión al amortiguador del electrodo superior y permanece en el fondo de la cavidad ya que posee una densidad mayor a causa del glicerol o de la sacarosa. Después se conecta la fuente de potencia y se aplica el voltaje o la fuente de poder, la combinación de los dos geles y las soluciones amortiguadoras causa un efecto sorprendente.

Conforme las proteínas aniónicas descienden en el gel concentrador, alcanzan una concentración mayor que cuando estuvieron en la solución de la muestra. Puede esperarse que una proteína aplicada como una solución de 0.1 mg/mL con una altura de líquido de varios milímetros se concentre hasta algunas décimas de miligramos por mililitro lo cual corresponde a una zona de aproximadamente 0.02 mL de espesor en dirección vertical sobre el gel.

Las proteínas se concentran en mayor grado debido al valor del pH del gel concentrador y la composición de las soluciones amortiguadoras del electrodo superior y de dicho gel. Así, un sistema diseñado para analizar proteínas aniónicas generalmente solo tendrá un catión en las soluciones, catión que forma parte del sistema amortiguador. Por ejemplo, el amortiguador Tris-HCl, el catión es la forma protonada de la alquil amina "Tris". La forma protonada del Tris ascenderá hacia el cátodo.

Los iones cloruro presentan una mayor movilidad (velocidad de migración hacia el ánodo por unidad de campo eléctrico) que otros iones como los de glicinato. La solución amortiguadora del electrodo superior de Tris-HCl (que tiene aniones de cloruro y cationes de Tris protonados) funcionan como un generador de iones cloruro, los cuales descienden en el gel concentrador y por último en el gel de separación, es decir en dirección hacia el ánodo. Dado que la corriente iónica debe ser uniforme en todo el gel, el resultado es que los iones cloruro son seguidos por las proteínas. Después las proteínas se desplazan en el gel de separación, siendo determinadas sus movilidades por la combinación de la carga negativa de la proteína y las dimensiones de ésta. Cuanto mas grande es la proteína mayor es el grado en el que el gel de poliacrilamida retarda su movilidad.

Así se pueden alterar las separaciones logradas en la PAGE ajustando la concentración del gel de poliacrilamida y el pH del gel de separación. Cuando los iones cloruro han llegado al fondo del gel, la fuente de potencia se desconecta y el gel se extrae del aparato. La inmersión del gel en una solución de colorante específico de proteínas que no se une al gel de poliacrilamida revela la localización de las zonas de proteína. La ubicación de la zona se determina mediante fotografía o midiendo las distancias desde la zona interfacial que separa los dos tipos de gel.

La metodología para determinar el peso molecular de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida se basa en solo estimaciones de dichos pesos, los cuales se obtienen de la comparación de la movilidad de las proteínas bajo estudio y otras proteínas de peso molecular conocido.

Dos variantes del procedimiento de PAGE se utilizan para obtener información sobre el tamaño de una molécula de proteína o una cadena polipeptídica independientemente de su carga eléctrica. Ambos procedimientos requieren estimaciones reproducibles de las distancias que una determinada zona de proteína ha recorrido a través del gel. Es por esta razón que suele añadirse un colorante de rastreo a la muestra de proteína. Por ejemplo el colorante azul de bromofenilo tiene una movilidad menor a la de los iones cloruro, pero mayor que la del componente de glicina y glicinato en algunos valores de pH. Por tanto dicho colorante marcará los límites entre los iones cloruro y el par glicina-glicinato, para un amortiguador Tris-glicina en el electrodo superior y Tris-HCl en el gel concentrador y separador. La movilidad relativa o  $R_m$  de cualquier zona de proteína se define como la relación de dos distancias. Para calcularla, se divide la distancia que la zona de proteína ha migrado desde la zona interfacial, entre los geles concentrador y de separación, entre la distancia que el colorante de rastreo ha recorrido desde dicha zona. Los valores de  $R_m$  son de 0 a 1.

En otra variante de la técnica de PAGE, con frecuencia abreviada SDS-PAGE, las proteínas de la muestra se calientan en una solución del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), y este se incorpora al gel para electroforesis y a los amortiguadores de los electrodos. El dodecil sulfato desnatura las proteínas y forma un complejo alargado unido no covalentemente con cada molécula de proteína. Al parecer, el tamaño del complejo está determinado principalmente por la longitud de la cadena polipeptídica que forma el núcleo del complejo. En estos complejos la relación entre la masa del dodecil sulfato y la de la proteína es mayor que 1 y en general varía poco con la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica. El resultado es que la carga negativa del complejo es determinada principalmente por el

tamaño de la cadena de la proteína.

Dado que la contribución que hacen las cadenas laterales de aminoácidos a la carga de la molécula es por lo general insignificante en los complejos de dodecil sulfato y proteína, la relación entre carga y masa de dichos complejos es casi independiente del tamaño de la cadena polipeptídica. Si están libres en solución, dichos complejos mostrarían movilidades electroforéticas similares. Sin embargo, en un gel, los complejos grandes presentan un retraso significativamente mayor en sus movilidades que los complejos pequeños; así mismo, las separaciones observadas en un experimento de SDS-PAGE dependen estrictamente del tamaño de la cadena polipeptídica de las proteínas. Se ha determinado el peso molecular de un mayor número de cadenas polipeptídicas mediante el procedimiento de SDS-PAGE que con cualquier otro método. Asimismo, mediante la técnica de SDS-PAGE no es posible estimar el peso molecular de una proteína que tenga más de una cadena polipeptídica, a menos de que se conozca el número de cadenas de la proteína [53,54].

## 2. Planteamiento del Problema

Debido a que una parte de los péptidos antimicrobianos provienen de fuentes animales como de la piel de anfibios [17,18] lo que representa hasta sacrificar al animal, se aislarán péptidos antimicrobianos partiendo de hojas de la planta *Amaranthus hypochondriacus* la cual es una nueva fuente de obtención. Se ha reportado en la literatura que existen péptidos antimicrobianos en otra especie de amaranto (*Amaranthus caudatus*) y se espera que en el *Amaranthus hypochondriacus* se encuentren estos péptidos activos.

### **3. Objetivo General**

- Aislar péptidos de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* y demostrar su actividad biológica en algunos hongos y bacterias.

#### **3.1 Objetivos particulares**

- Purificar el extracto de hojas de amaranto mediante diálisis, concentración y fraccionamiento por columna de intercambio iónico.
- Verificar la actividad biológica de las fracciones proteicas *in vitro* en bacterias y hongos.
- Determinar el peso molecular de los péptidos de las fracciones de interés mediante la técnica de SDS-PAGE.

#### **4. Hipótesis**

Si las características estructurales y la composición de aminoácidos de los péptidos de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* son similares a los reportados en otros péptidos obtenidos de plantas tendrán actividad biológica contra algunos hongos y bacterias.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Medios de cultivo:

Agar papa dextrosa SIGMA

Agar de malta SIGMA

Agar base sangre

Agar McConkey SIGMA

Agar Mueller-Hinton SIGMA

### 5.2 Material biológico:

#### 5.2.1 Bacterias:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Escherichia coli* ATCC 25922 y ATCC 35218
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Streptococcus sp.* (aislamiento clínico)
- *Staphylococcus sp.* (aislamiento clínico)

#### 5.2.2 Hongos:

- *Aspergillus sp.*
- *Alternaria alternata*
- *Candida albicans*
- *Geotrichum sp.*
- *Monilia sp.*
- *Penicillium sp.*
- *Rhizopus sp.*
- *Trichophyton mentagrophytes*

### 5.3 Equipos, reactivos y materiales

Equipos	Reactivos	Materiales
<p>Molino Broun KSM2</p> <p>Centrífuga Beckman modelo J2-21</p> <p>Espectrofotómetro Milton Roy</p> <p>Spectronic Genesys 2</p> <p>Balanza analítica</p> <p>Balanza granataria OHAUS Harvard</p> <p>Trip Balance</p> <p>Estufa</p> <p>Autoclave</p> <p>Colorímetro</p> <p>Concentrador Amicon</p> <p>Ultrasonido (sonicador) Cole-Palmer 8893</p> <p>Parrillas de agitación y calentamiento</p> <p>Termoline Cimarec 2</p> <p>Refrigerador Nieto Mod. CVC 30</p> <p>Vortex Lab line Instruments Inc.</p> <p>Suppermixer</p> <p>Potenciómetro Conductronic pH 120</p> <p>OAKTON Epoxy body pH electrode</p> <p>Sistema Millipore Nucleopore Corporation</p> <p>Liofilizador Labconco Freezone 4,5</p> <p>Fraccionador GradiFrac system.</p> <p>Pharmacia Biotech, optical unit (UV-1), Mixer (24 V 50-60 Hz 5 MPa), Pump (P-1), Valve (PSV-50, 0.2 MPa/24 VDC), valve (IV-7 2Mpa), control unit (UV-1), Rec 102.</p> <p>Microcentrífuga Eppendorf Mini Spin</p>	<p>Tris-HCl /EDTA 0.01 M</p> <p>Cloruro de sodio</p> <p>Buffer pH 4 y 7</p> <p>NaOH 0.1N</p> <p>Solución Salina 0.85%</p> <p>Azida 0.05%</p> <p>Tanque de gas de nitrógeno</p> <p>Agua Destilada</p> <p>Glicina/HCl 50 mM pH 4</p> <p>Acetatos 50 mM pH 5</p> <p>Acetatos 50 mM pH 6</p> <p>Fosfatos 50 mM pH 7</p> <p>Tris-HCl 50 mM pH 8</p> <p>Glicina pH 9</p> <p>Glicina/NaOH 50 mM pH 10</p> <p>Alcohol 70%</p> <p>Solución de ácido bicinónico 1%</p> <p>Sulfato de Cobre pentahidratado 4%</p>	<p>Vasos de precipitados 0.010 a 2 L</p> <p>Matraces: balón, kitazato</p> <p>Pipetas y micropipetas</p> <p>Aplicadores</p> <p>Cajas de petri 50 mL</p> <p>Pinzas</p> <p>Mecheros</p> <p>Tubos de ensaye 15 x 100</p> <p>Gradillas</p> <p>Papel Whatman No.3</p> <p>Embudos</p> <p>Membrana YM3 Amicon bioseparation millipore</p> <p>Filtros estériles de 0.45 µm, Sartorius minisart CE 0297</p> <p>Jeringas 5 ml</p> <p>Puntas de 1000 y 200 µL</p> <p>Probetas 0.001 a 2 L</p> <p>Magnetos</p> <p>Sistema de vacío</p> <p>Viales 1.5 mL</p> <p>Membranas para diálisis Spectra / por</p> <p>Molecularporous membrane tubing MWCO 3000</p> <p>Asa bacteriológica</p> <p>Tubos con tapón de rosca de de 25 mL</p> <p>Gasas</p> <p>Torundas de algodón</p> <p>Hilo cáñamo para membranas</p> <p>Celdas de cuarzo Perkin</p> <p>Elmer UV/Vis Spectroscopy cells Membranas Millipore 0.45µm</p> <p>Frascos con tapa de rosca</p>



## 5.4 Procedimiento

### 5.4.1 Aislamiento de las proteínas [1,55-57,43]

- Moler con hielo seco 160 g de hojas congeladas de amaranto hasta obtener polvo, en un molino Broun KSM2.
- Homogeneizar el polvo con 240 mL (4 mL/g) de agua desionizada en un matraz Erlenmeyer.
- Agitar constantemente durante 1 hora en una placa de agitación.
- Centrifugar a 12 000 rpm durante 40 minutos.
- Ajustar al sobrenadante con Tris-HCl 50 mM pH 7 a una concentración final de 10 mM del mismo buffer.
- Agregar al sobrenadante 30% de sulfato de amonio hasta saturación relativa.
- Agitar hasta disolver el agente precipitante.
- Permitir reposar por una hora a temperatura ambiente.
- Centrifugar 10 minutos a 7 000 rpm.
- Agregar al sobrenadante 75% de sulfato de amonio hasta saturación relativa
- Agitar hasta disolver y dejar reposar durante toda la noche a temperatura ambiente.
- Recolectar el precipitado formado centrifugando 30 minutos a 7 000 rpm.
- Resuspender el precipitado en 100 mL de agua desionizada en un vortex
- Eliminar el material insoluble por centrifugación 20 minutos a 7000 rpm.
- Dializar toda la noche el sobrenadante contra 2 L de agua desionizada (reservorio) utilizando tubería con exclusión de peso molecular (MWCO) de 3000.
- Cambiar el agua y dializar 4 horas más.
- Ajustar el extracto dializado con Tris-HCl 500 mM pH 9 a una concentración final de 50 mM del mismo buffer.
- Filtrar ese extracto en un filtro de 0.22  $\mu$  mediante sistema millipore.
- Fraccionar el extracto anterior en una columna Econo-Pac High Q Cartridge (Biorad, 5 L) de intercambio aniónico fuerte ( $-N^+(CH_3)_3$ ) equilibrada previamente con Tris-HCl 50 mM pH 9, ver sección de Anexos.
- Leer absorbancia a 280 nm a cada fracción utilizando blanco de agua.

Graficar esas lecturas contra número de fracción para poder separar los picos de las fracciones

- Dializar las fracciones de proteínas contra 2 L de agua desionizada.
- Liofilizar las fracciones de proteínas dializadas sin llegar a sequedad.
- Determinar la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico.

#### 5.4.2 Determinación de proteínas totales en microplacas por el método del ácido bicinconínico [59,60].

##### 1). Preparación de los estándares de albúmina (BSA) diluida

Usar la tabla 1 para preparar los estándares de proteína. Diluir el contenido de la ampolleta de estándar de albúmina preferentemente usando el mismo diluyente de la muestra.

TABLA 1. Preparación de los estándares de albúmina de suero bovino (BSA).

Vial	Volumen de diluyente en $\mu\text{L}$	Volumen y fuente de BSA	Concentración final de BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )
A	0	30 $\mu\text{L}$ de Stock	2000
B	12.5	37.5 $\mu\text{L}$ de Stock	1500
C	32.5	32.5 $\mu\text{L}$ de Stock	1000
D	17.5	17.5 $\mu\text{L}$ de la dilución del vial B	750
E	32.5	32.5 $\mu\text{L}$ de la dilución del vial C	500
F	32.5	32.5 $\mu\text{L}$ de la dilución del vial E	250
G	32.5	32.5 $\mu\text{L}$ de la dilución del vial F	125
H	40	10 $\mu\text{L}$ de la dilución del vial G	25
I	25	0	0=Blanco

##### 2). Preparación del reactivo de trabajo (RT) de ácido bicinconínico

- Volumen total de RT requerido = (# estándares + # muestras) x (# réplicas) x 200  $\mu\text{L}$  RT
- Preparar el RT mezclando 50 partes del reactivo A (ácido bicinconínico) y 1 parte del reactivo B (sulfato cúprico 4%). El RT es estable por varios días si se guarda en un frasco bien cerrado a temperatura ambiente.

### 3). Cuantificación de proteínas totales en microplacas

- Agregar 25  $\mu\text{L}$  de cada réplica de estándar o muestra desconocida a un pozo de microplacas (rango de trabajo = 25-2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
- Agregar 200  $\mu\text{L}$  del RT a cada pozo y mezclar bien la placa en un agitador de microplacas por 30 segundos.
- Tapar la placa e incubar a 37°C por 2 horas.
- Enfriar la placa a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas
- Sustraer la absorbancia promedio del blanco a las absorbancias de las réplicas de los estándares y de las muestras.
- Realizar una curva de calibración con las absorbancias corregidas de los estándares (Tabla 7 en Anexos) contra la concentración respectiva en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Utilizar la curva estándar para determinar la concentración de proteínas de cada muestra.

#### 5.4.3 Pruebas antibacterianas

##### 1). Cultivo de bacterias

- Sembrar todas las cepas bacterianas (apartado 5.2.1) con un asa bacteriológica en agar sangre por estría cruzada, excepto *E. coli* y *P. aeruginosa* que se siembran en agar McConkey.
- Incubar a 37 °C durante 24 horas.
- Resembrar estos cultivos en agar Mueller Hinton en estría cerrada seleccionando cinco colonias uniformes de cada siembra
- Incubar a 37 °C durante 24 horas.

##### 2). Ajuste de bacterias con el colorímetro

Para tener  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL:

- Recoger, del agar M. Hinton, un inóculo ligero de bacterias y suspender en un tubo que contenga 2 mL de solución salina 0.85%.
- Medir el porcentaje de transmitancia.

- Ajustar la concentración de bacterias con inóculo o solución salina según se requiera hasta que la aguja esté en la parte roja (8.5) en la escala de McFarland.
- Hacer una dilución 1/100 con solución salina.
- Introducir un hisopo estéril en la dilución y sembrar en estría cerrada en agar M. Hinton.

### 3). Método de Kirby-Bauer

- Filtrar los extractos con filtros estériles de 0.45  $\mu$ .
- Impregnar cada sensidisco (Whatman No. 3, 6 mm de diámetro) con 20  $\mu$ L de cada extracto.
- Dejar secar bien los sensidiscos sobre rejillas.
- Colocar los sensidiscos, espaciados sobre el agar M. Hinton que ya tiene las bacterias.
- Incubar a 37 °C durante 24 horas.
- Medir el halo de inhibición de crecimiento en cada cepa.
- Realizar el procedimiento anterior para cada cepa y su respectivo control.

### 4). Control Positivo

Utilizar como control positivo una solución de eritromicina de 0.75  $\mu$ g/ $\mu$ L, de tal manera que haya 15  $\mu$ g de esta solución por disco [48].

- Hidratar 1.5 mg de eritromicina con 200  $\mu$ L de agua estéril
- Agregar 100  $\mu$ l de etanol al 95% a la solución anterior y agitar suavemente
- Continuar agregando volúmenes 100  $\mu$ l de etanol al 95% hasta disolver sin rebasar 1 mL de volumen total
- Llevar a 1 mL con agua estéril la solución anterior si es necesario.
- Llevar 500  $\mu$ L de la solución anterior a 1000  $\mu$ L con agua estéril. La concentración de eritromicina en esta solución contiene 0.75  $\mu$ g/ $\mu$ L.

#### 5.4.4 Pruebas antifúngicas

- Resembrar las cepas de hongos (apartado 5.2.2), excepto *T. mentagrophytes*, en agar papa dextrosa colocando con una espátula un trocito del cultivo en el centro del agar.
- Incubar a temperatura ambiente.
- Invertir las cajas cuando el trozo de cultivo se haya pegado al agar (1 a 2 días).
- Dejar crecer el hongo en todo el contorno del agar.
- Resembrar *T. mentagrophytes* en agar de malta siguiendo el procedimiento mencionado.

##### 1). Agar envenenado

- Adicionar 15 mL de agar papa dextrosa en un tubo de ensayo de 20 mL.
- Esterilizar medio en autoclave durante 15 minutos a 121°C a 15 lb de presión.
- Dejar enfriar el medio a una temperatura a la cual aún no se gelifique el agar.
- Agregar 1 mL de la fracción de proteínas (con una concentración proteica de 2.5 mg/mL) a cada tubo de agar estéril. Este es el “agar envenenado”.
- Agitar en vortex hasta homogeneizar.
- Vaciar 5 mL del agar envenenado a una caja petri estéril de 60 x 15 mm.
- Dejar solidificar.
- Cortar un trozo de la periferia de cada hongo con un sacabocados y colocarlo con el micelio hacia arriba en el centro del agar envenenado.
- Incubar de 24 a 26°C.
- Realizar controles de la misma forma, sustituyendo el extracto por el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9.
- Realizar la prueba por cuadruplicado
- Medir el crecimiento radial en las coordenadas “x” y “y” cada 24 horas hasta que el hongo de los controles haya crecido en todo el agar.
- Promediar los crecimientos respectivamente.
- Comparar los promedios de las fracciones con los controles.

2). Ensayo cuantitativo automatizado para medir inhibición de crecimiento de hongos [63].

- Sembrar los hongos en agar papa dextrosa (sembrar *T. mentagrophytes* en agar de malta) permitiendo la esporulación.
- Dejar crecer los hongos el tiempo necesario hasta llenar la caja.
- Agregar 3-5 mL de agua estéril a la caja del hongo, dependiendo de la consistencia del hongo.
- Frotar el cultivo con una espátula estéril hasta formar una suspensión
- Recoger la suspensión de esporas con una jeringa estéril y filtrar con tres capas de popelina estéril.
- Lavar la suspensión dos veces con agua estéril por centrifugación (15 minutos a 4000 rpm) y resuspensión.
- Guardar esta suspensión a  $-80^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 20% con una densidad de esporas de aproximadamente  $2 \times 10^7$  esporas/mL
- Determinar la densidad de esporas en el microscopio óptico a 10x con ayuda de un hemocitómetro.

3). Valoración con el lector de microplacas

Cultivar los hongos en microplacas estériles de fondo plano a  $25^{\circ}\text{C}$  en la obscuridad

- Agregar a cada pozo 80  $\mu\text{L}$  de caldo papa dextrosa (12 mg/mL) estéril
- Agregar a cada pozo 10  $\mu\text{L}$  de la fracción de interés del extracto
- Agregar a cada pozo 2000 esporas contenidas en 10  $\mu\text{L}$  de suspensión para dar un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ /pozo
- Agitar las placas durante 10 segundos en un agitador de microplacas
- Permitir sedimentar durante 30 minutos
- Medir la absorbancia de los pozos a 570 nm con un lector de microplacas
- Incubar a  $25^{\circ}\text{C}$  en una estufa cubriendo las microplacas de la luz
- Medir una segunda absorbancia a las 24 y 48 horas
- Calcular valores de absorbancia restando los primeros valores a los segundos, es decir  $A_2 - A_1$  y ajustar la absorbancia con el control negativo
- Calcular el porcentaje de inhibición respecto al control negativo.

#### 5.4.5 Electroforesis. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

- Frotar los vidrios, previamente lavados, con SDS 0.2%
- Montar los vidrios en el soporte
- Preparar el gel separador\* , agregarlo con una micropipeta entre los vidrios y dejar gelificar
- Preparar el gel concentrador\* y agregarlo con una micropipeta entre los vidrios
- Introducir los peines
- Dejar gelificar
- Agregar el buffer de corrimiento\* en la cámara
- Sacar los peines
- Preparar la muestra
  - 1 volumen de muestra + 1 volumen de buffer 2x de muestra
  - volumen final 20  $\mu$ L
  - hervir a 100°C por un minuto la muestra y el marcador de peso molecular
- Agregar 8  $\mu$ L de muestra y del marcador de peso molecular cada uno en un pozo
- Cerrar la cámara de electroforesis conectando adecuadamente el ánodo y el cátodo.
- Conectar a la fuente de poder durante 1 hora a 100 volts
- Desconectar cuando la banda azul esté 5 mm por arriba del borde inferior del vidrio.
- Sacar el soporte, retirar los vidrios y luego el gel
- Lavar el gel con agua desionizada
- Fijar las proteínas del gel durante 1 hora con la solución fijadora\* de proteínas
- Teñir el gel durante una noche con la solución de tinción\*
- Desteñir\* los geles, en baño maría, cambiándola varias veces
- Comparar las bandas de los geles con las bandas del marcador de peso molecular
- Obtener el peso molecular de los péptidos
- *Nota: las palabras marcadas con \* se refieren a la consulta de preparación de soluciones en la sección de anexos.*

### *Tinción con plata*

Para teñir con plata, geles teñidos con azul brillante de coomasie realizar los pasos siguientes, a 21-25°C y con agitación constante. Usar siempre guantes; las huellas se detectan en los geles.

- Agregar al gel 100 mL de agua desionizada y reposar por 10 minutos. Repetir esta operación dos veces más cambiando el agua en cada tiempo. Retirar el agua al final.
- Colocar el gel en 30 mL de la solución equilibrante de plata\* y permitir equilibrar con agitación durante 30 minutos. Retirar la solución.
- Agregar al gel 100 mL de agua desionizada y reposar por 20 segundos. Retirar el agua.
- Agregar al gel 50 mL de solución reveladora\* y reposar por 8 minutos. Repetir una vez esta operación.
- Esperar hasta ver las bandas oscuras del gel.
- Retirar la solución reveladora y rápidamente colocar la solución para detener el revelado (solución stop)\* durante 5 minutos. Retirar esta solución.
- Agregar al gel 100 mL de agua desionizada y reposar por 10 minutos. Repetir este paso dos veces más, cambiando el agua cada vez.
- Colocar el gel en 30 mL de la solución reductora\* por 30 segundos. Retirar esta solución e inmediatamente llevar al chorro de agua del grifo por 1 minuto.
- Agregar al gel 100 mL de agua desionizada y reposar por 10 minutos. Repetir este paso dos veces más, cambiando el agua cada vez.
- Si se desea incrementar la sensibilidad, reciclar el gel desde el paso de equilibrio con solución de plata hasta el paso inmediato de lavado.
- *Nota: las palabras marcadas con \* se refieren a la consulta de preparación de soluciones en la sección de anexos.*



## 6. Resultados

- *Procedimiento de aislamiento*

El procedimiento de aislamiento de péptidos antimicrobianos de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* se llevó a cabo en dos pasos. El primero se realizó con precipitación de proteínas con sulfato de amonio 30 y 75 % de saturación relativa. En el segundo paso, las proteínas anteriores en solución se aislaron mediante el pasaje de estas en una columna Econo Pac High Q (Biorad) de intercambio aniónico equilibrada a pH 9. La elución de la columna con un gradiente (Tabla 6, en Anexos) en forma de escalera de NaCl 1M produjo cinco picos diferentes: F1-F5, los cuales fueron adsorbidos en la columna (Figura 9).

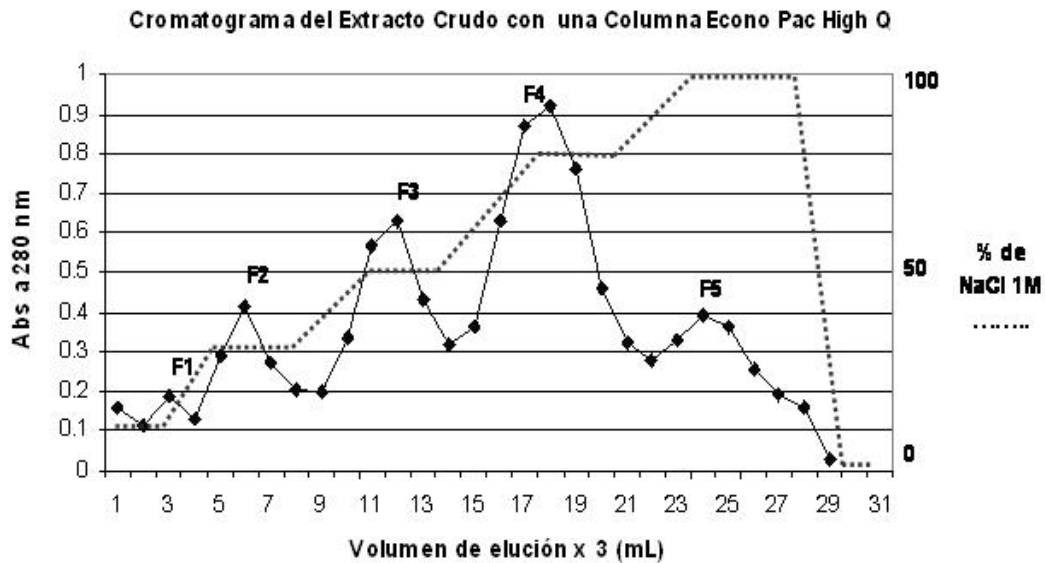


FIGURA 9: Cromatografía de intercambio aniónico fuerte. Se inyectó un volumen de 3 mL del extracto a una concentración aproximada de proteínas de 6 mg/mL a una columna empacada Econo Pac High Q (Biorad) de 5 mL previamente equilibrada con buffer de Tris-HCl 50 mM pH 9. La columna fue eluída a una velocidad de 3 mL/min con un gradiente en forma de escalera (línea punteada): 0, 30, 50, 80, 100 y 0% de NaCl 1M en buffer de Tris-HCl 50 mM pH 9. Al volumen eluído se le monitoreó la proteína mediante la medición de absorbancia a 280 nm y se colectó en fracciones de 3 mL.

1. Actividad antibacteriana por el método de Kirby-Bauer

La actividad antibacteriana se realizó mediante el método de Kirby-Bauer, con el extracto proteico total antes de fraccionar en la columna de intercambio aniónico, probando cuatro diferentes concentraciones de proteínas: 40, 80, 288 y 575 µg/mL en buffer de Tris-HCl 0.1M-EDTA 0.01 M pH 7.5 para cada bacteria.

Tanto las cepas de bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y los aislamientos clínicos *Streptococcus sp.* y *Staphylococcus sp.*) como las gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y ATCC 35218 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) fueron resistentes a las concentraciones mencionadas del extracto proteico total ya que no se observó zona alguna de inhibición de crecimiento.

2. Actividad antifúngica

- a) Método espectrofotométrico (Tablas 2-3 y Figuras 9-13. La actividad antifúngica se realizó con este método después de fraccionar el extracto en la columna probando las cinco fracciones obtenidas una vez dializadas, concentradas y estandarizadas a una sola concentración.

TABLA 2. Absorbancias ( $\lambda=570$  nm) promedio\* del crecimiento fúngico alterado por las fracciones de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* a las 48 horas

<b>Fracción Hongo</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>	<b>Control</b>
<i>T. mentagrophytes</i>	0.0127	0.1912	0.0873	0.031	0.0535	0.0392
<i>Penicillium sp.</i>	-4.448	-8.506	-57.34	-26.88	-7.975	0.111
<i>Geotrichum sp.</i>	0.2495	0.1233	0.2673	0.2285	0.1388	0.3223
<i>A. alternata</i>	0.1155	0.1917	0.1273	0.188	0.1097	0.148
<i>Aspergillus sp.</i>	0.2182	0.2415	0.5235	0.3475	0.2385	0.192
<i>C. albicans</i>	0.5203	0.4098	0.5172	0.4688	0.375	0.3657
<i>Monilia sp.</i>	-88.78	-4.293	-98.19	-28.35	-7.307	0.0576
<i>Rhizopus sp.</i>	10.547	0.7552	9.6975	15.813	3.1227	0.1128

\* Ver sección de Anexos

TABLA 3. Porcentaje de inhibición fúngica por las fracciones de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* a las 48 horas

<b>Fracción Hongo</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>
<i>T. mentagrophytes</i>	<b>68</b>	-388	-123	<b>21</b>	-37
<i>Penicillium sp.</i>	<b>30</b>	-1	<b>9</b>	<b>38</b>	<b>6</b>
<i>Geotrichum sp.</i>	<b>23</b>	<b>62</b>	<b>17</b>	<b>29</b>	<b>57</b>
<i>A. alternata</i>	<b>22</b>	-30	<b>14</b>	-27	<b>26</b>
<i>Aspergillus sp.</i>	-14	-26	-173	-81	-24
<i>C. albicans</i>	-42	-12	-41	-28	-3
<i>Monilia sp.</i>	-74	-35	-54	-80	-3
<i>Rhizopus sp.</i>	-290	-21	-352	-128	-32

- La concentración de proteínas totales probada para cada fracción se estandarizó a 50  $\mu\text{g/ml}$ .
- Los porcentajes en negativo indican que los hongos crecieron más que la muestra control.
- % de Inhibición = (Abs prom control – Abs prom fracción)/Abs prom control (100).

Los porcentajes de inhibición de la Tabla 3 se pueden apreciar también mediante las siguientes gráficas de barras.

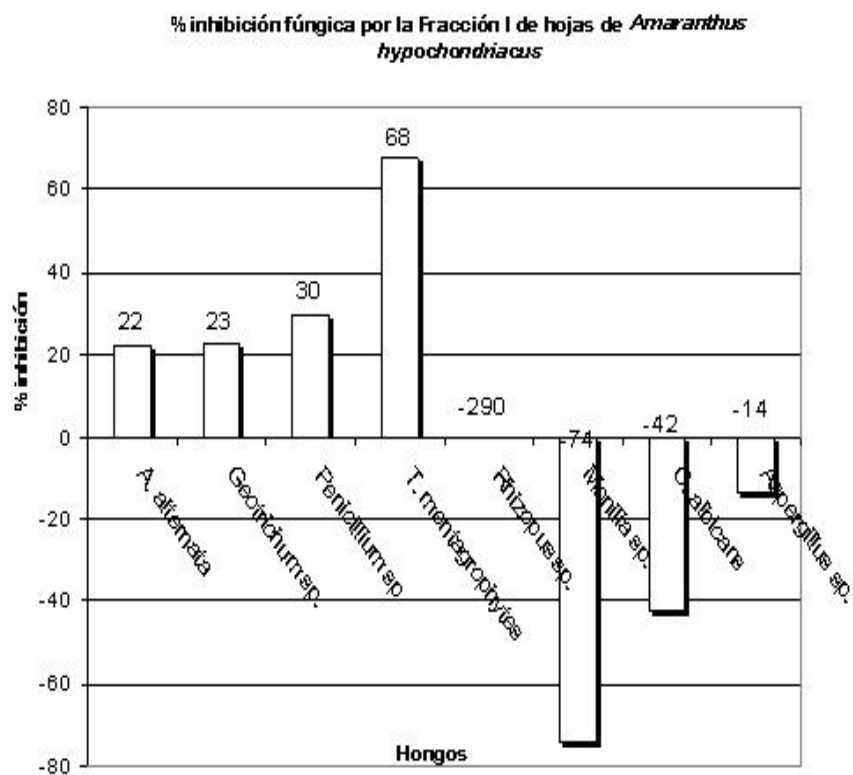


FIGURA 9: porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico por la Fracción 1 sobre los hongos referidos.

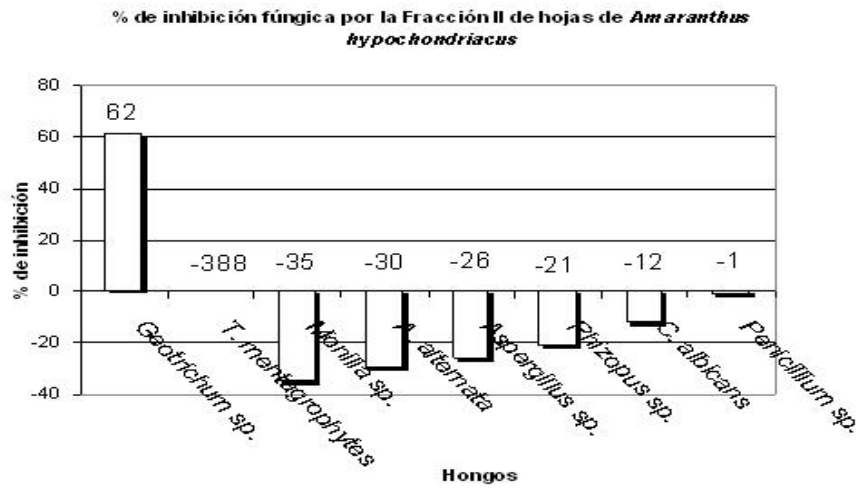


FIGURA 10: porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico por la Fracción 2 sobre los hongos referidos.

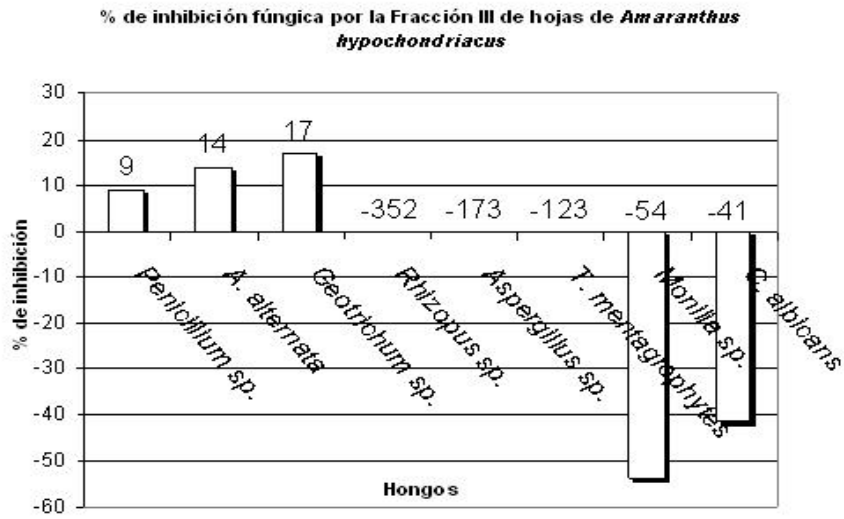


FIGURA 11: porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico por la Fracción 3 sobre los hongos referidos.

**% de inhibición fúngica por la Fracción IV de hojas de *Amaranthus hypochondriacus***

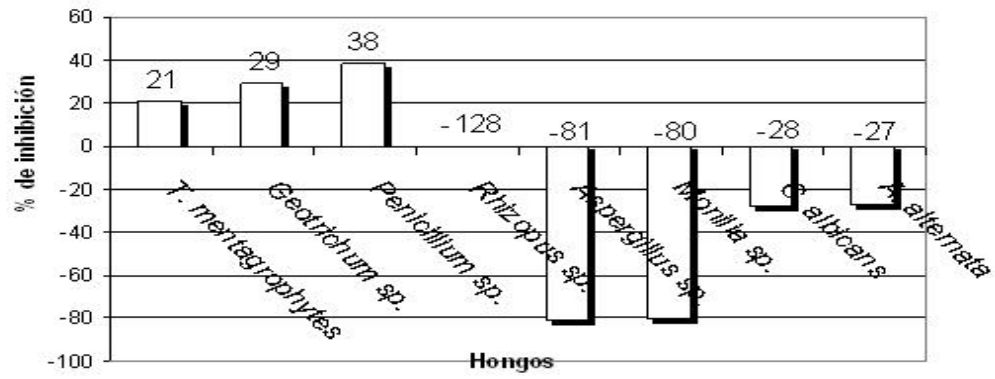


FIGURA 12: porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico por la Fracción 4 sobre los hongos referidos.

% de inhibición fúngica por la Fracción V de hojas de *Amaranthus hypochondriacus*

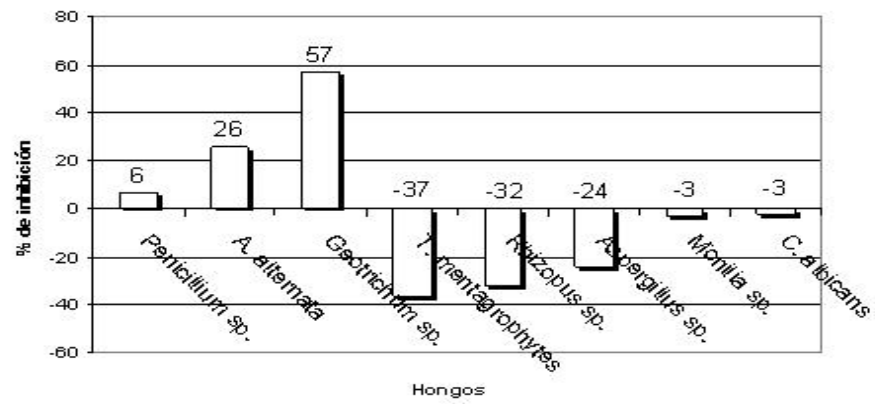


FIGURA 13: porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico por la Fracción 5 sobre los hongos referidos.

## b) Método del “agar envenenado”

Después de probar el método anterior con las cinco fracciones contra los ocho hongos, se procedió a realizar la actividad antifúngica mediante otro método, el del “agar envenenado”, seleccionando sólo los hongos que habían sido afectados por las fracciones correspondientes. Así, los hongos probados con este método fueron *A. alternata* (Figura 14), *Geotrichum sp.* (Figura 15), *Penicillium sp.* (Figura 16) y *T. mentagrophytes* (Figura 17). En las fotos siguientes se puede visualizar la variación en la inhibición de crecimiento por parte de las fracciones antifúngicas. Después se presenta una tabla que muestra los porcentajes de inhibición.

En todos los casos el control, para el método del agar envenenado, estuvo compuesto de 5 mL de agar papa dextrosa, 333  $\mu$ L de buffer Tris-HCl 50 mM pH 9 y un trozo del hongo (6 mm diámetro aproximadamente) correspondiente. En las fotos marcadas con una fracción específica, se substituyó el buffer por la fracción correspondiente a una concentración estandarizada de 96  $\mu$ g/mL.

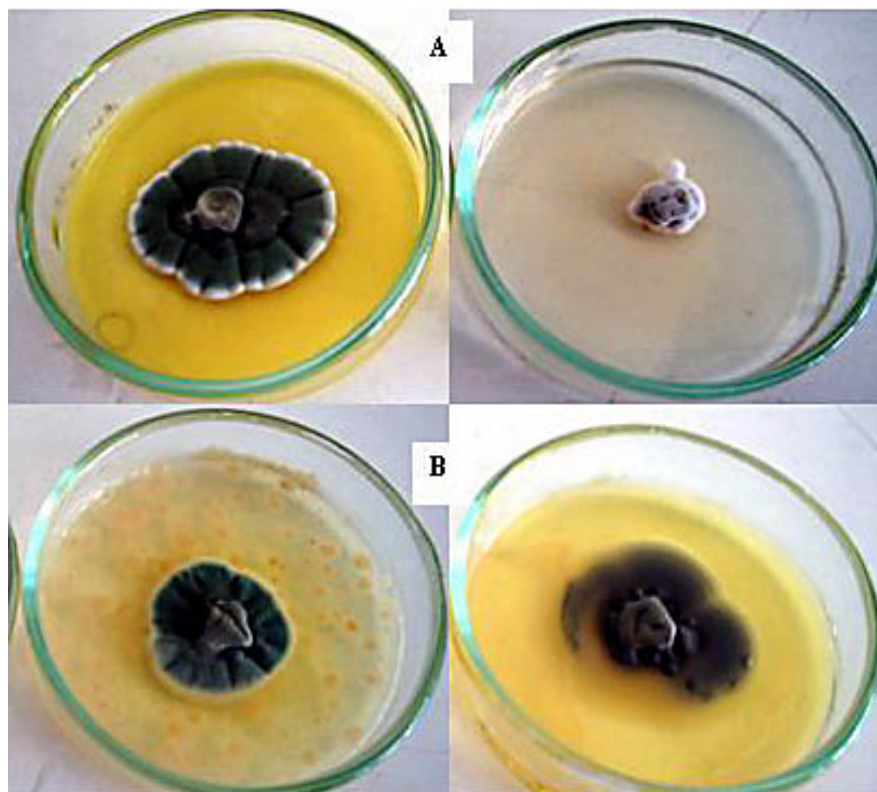


FIGURA 14. Fotos de *Alternaria alternata* afectada por las fracciones proteicas.

Páneos de izquierda a derecha: A (Control y F1) y B (F3 y F5).



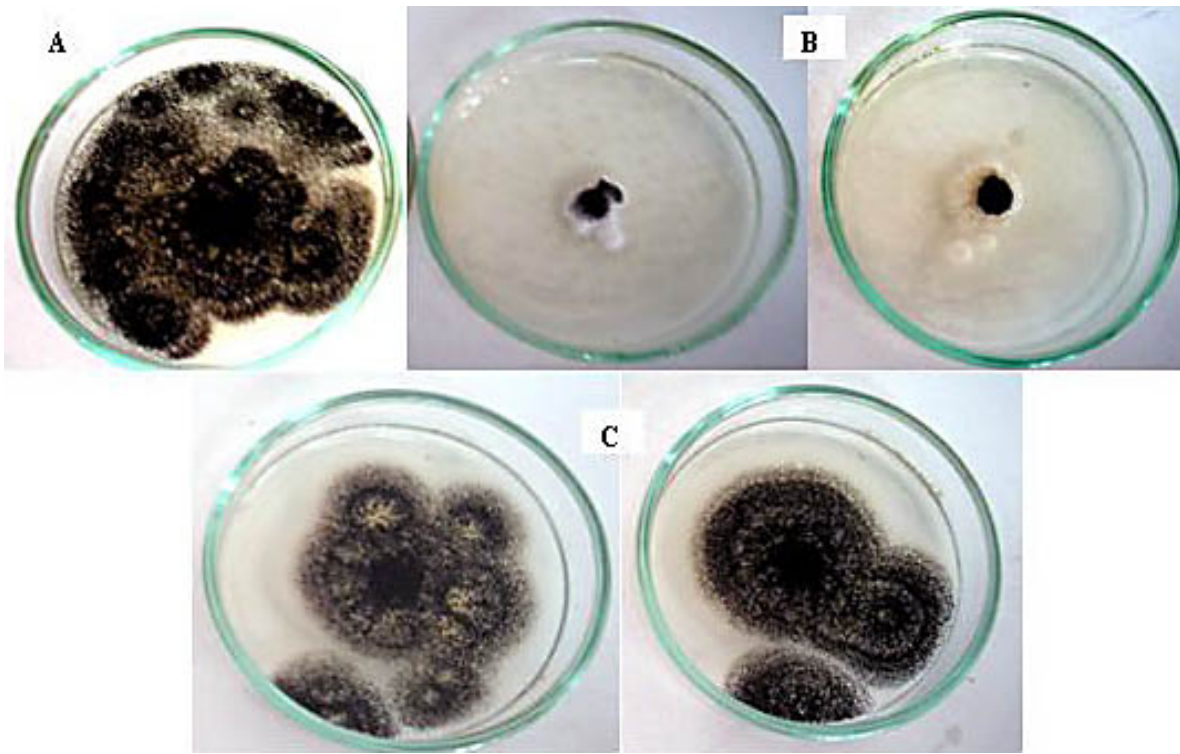


FIGURA 15. Fotos de *Geotrichum sp.* afectado por las fracciones proteicas.  
Páneos de izquierda a derecha: A (Control), B (F2 y F3) y C (F4 y F5).

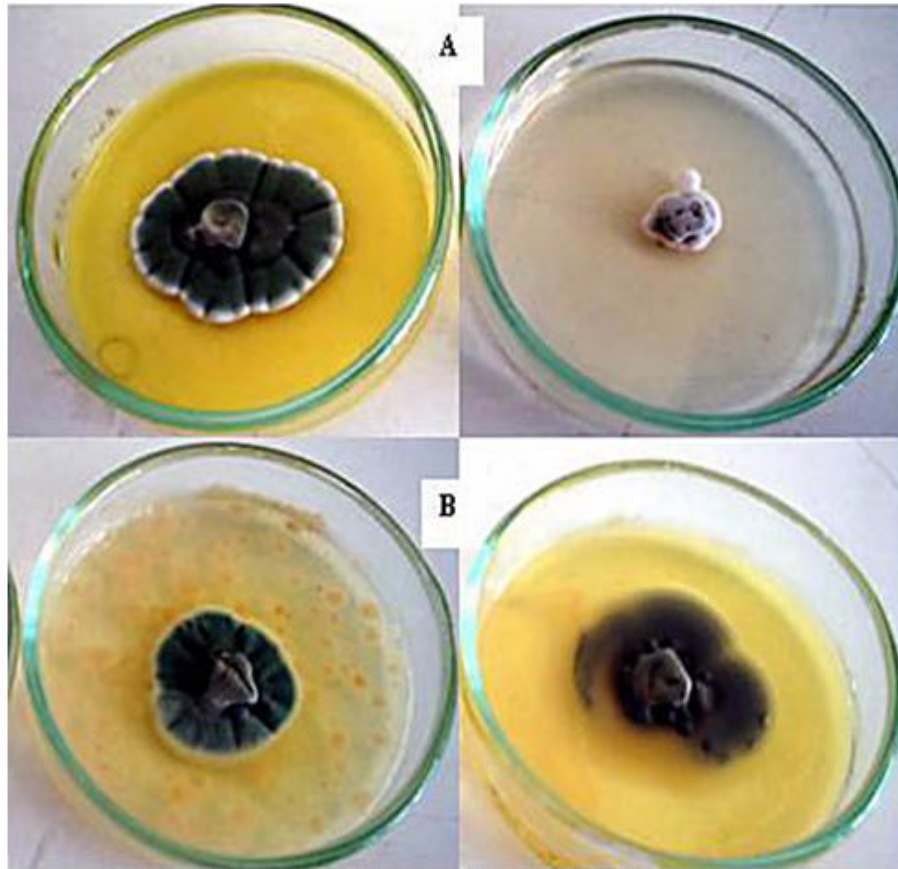


FIGURA 16. Fotos de *Penicillium sp.* afectado por las fracciones proteicas.  
Páneos de izquierda a derecha: A (Control y F1) y B (F3 y F5).

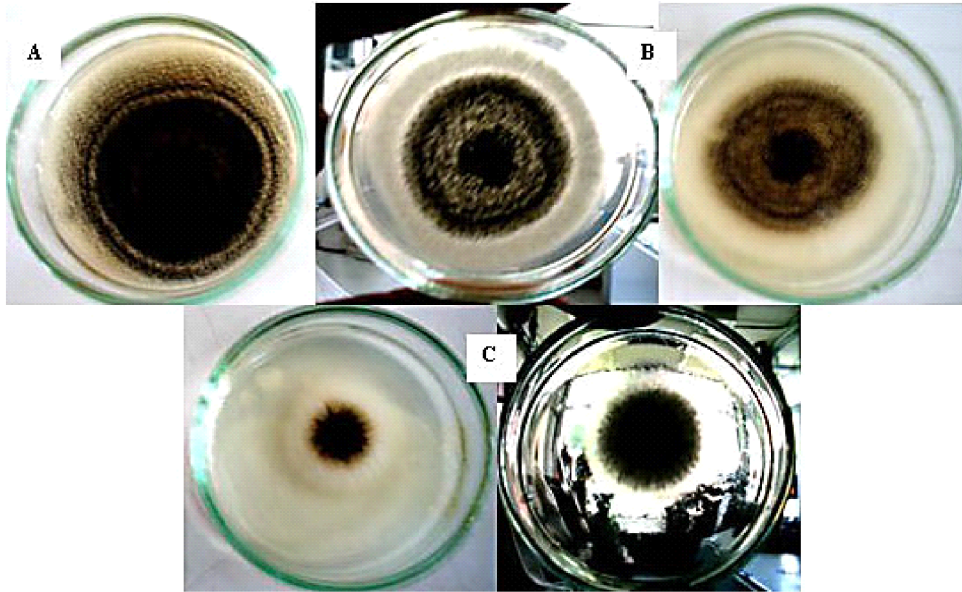


FIGURA 17. Fotos de *T. mentagrophytes* afectado por las fracciones proteicas. Páneos de izquierda a derecha: A (Control), B (F1 y a contra luz) y C (F4 y a contra luz).

TABLA 4. Crecimiento fúngico promedio en mm alterado por las fracciones de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* con el método del agar envenenado

Fracción Hongo	1	2	3	4	5	Control	Tiempo de incubación n
<i>A. alternata</i>	50	-----	50	-----	50	50	48 h
<i>Geotrichum sp.</i>	-----	15	16.7	44.5	43.66	50	48 h
<i>T. mentagrophytes.</i>	48	-----	-----	37.5	-----	50	120 h
<i>Penicillium sp.</i>	15	-----	21.5	-----	27.75	26.35	336 h

- La línea ----- indica que las fracciones correspondientes no se probaron con el hongo respectivo.
- La concentración de proteínas totales utilizada en cada fracción se estandarizó a 96 µg/ml.

TABLA 5. Porcentaje de inhibición fúngica por las fracciones de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* con el método del agar envenenado

Fracción Hongo	1	2	3	4	5	Tiempo de incubación
<i>A. alternata</i>	0	-----	0	-----	0	48 h
<i>Geotrichum sp.</i>	-----	<b>70*</b>	<b>67</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	48 h
<i>T. mentagrophytes</i>	<b>4</b>	-----	-----	<b>25</b>	-----	120 h
<i>Penicillium sp.</i>	<b>43</b>	-----	<b>18.4</b>	-----	<b>-5.3</b>	336 h

- \*Este porcentaje no es representativo porque solo es de una sola muestra y las dos restantes no se pudieron evaluar porque tenían colonias dispersas en el agar.
- Los porcentajes de inhibición reportados en esta tabla son variables ya que como se observa en las fotos no podrían ser confiables cuando hay crecimiento irregular. El objetivo es solo mostrar una imagen visual.

## SDS-PAGE

Las cinco fracciones proteicas antimicrobianas de amaranto, (F1-F5), se analizaron mediante el sistema de SDS-PAGE (Figura 18). La tinción del gel se hizo primero con azul brillante de coomassie R-250 (no se visualizaron las bandas) y luego con plata (sin visualizar las bandas).

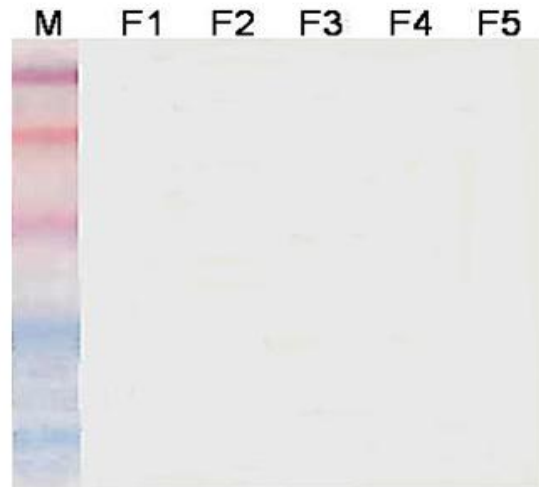


FIGURA 18: Análisis de SDS-PAGE de las fracciones proteicas antimicrobianas, aisladas de hojas de *A. hypochondriacus*. El gel tuvo una densidad de 12% de acrilamida. La concentración de proteínas de las fracciones fue de 96  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los marcadores de peso molecular (M) son los siguientes de arriba hacia abajo: anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina de semilla de soya, lisozima, aprotinina e insulina cadena B.

## 7. Discusión de resultados

El aislamiento de estas proteínas se basó en un protocolo reportado en la literatura basado en el aislamiento de dos potentes péptidos antimicrobianos de *Amaranthus caudatus*[1].

Las fracciones de proteínas de *A. hypochondriacus*: F1, F2, F3, F4 y F5 designadas así de acuerdo al orden de elución en la columna de intercambio aniónico fueron fuertemente adsorbidas a ella, primero con un gradiente de NaCl 1M lineal sin obtener resolución de picos (dato no mostrado) y luego con un gradiente en forma de escalera (NaCl 1M: 0, 30, 50, 80 y 100 %) obteniendo una mejor resolución de los picos (Figura 9).

Por otro lado, las bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, aislamientos clínicos *Streptococcus sp.* y *Staphylococcus sp.*) y las bacterias gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y ATCC 35218 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) fueron “resistentes” a las concentraciones mencionadas del extracto proteico total. El término “resistente” se utiliza para cepas evaluadas con antibióticos ya caracterizados con criterios para interpretar los diámetros de las zonas de inhibición que indican los niveles de susceptibilidad (Resistente, Intermedio, Moderadamente susceptible y Susceptible) de los microorganismos al agente antimicrobiano, de acuerdo a las tablas de susceptibilidad antibiótica específicas NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) [ 48,61].

En cuanto a la actividad antifúngica, ésta quedó demostrada por las cinco fracciones proteicas mediante el método espectrofotométrico (Tablas 2 y 3) contra cuatro de los ocho hongos probados: *T. mentagrophytes*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.* y *A. alternata*; a las 48 horas de incubación con porcentajes de inhibición de crecimiento diferentes para cada fracción. Así, la F1 inhibió el crecimiento de los cuatro hongos, recalcando el 68 % de inhibición sobre *T. mentagrophytes*. La F2 con 62% de inhibición únicamente sobre *Geotrichum sp.* La F5 con 57% de inhibición también sobre *Geotrichum sp.* La F4 con 38 % de inhibición sobre *Penicillium sp.* La F3 con 17% de inhibición también sobre *Geotrichum sp.* Por lo tanto, se puede deducir que la F1 fue la más activa contra los hongos probados y la menos activa fue la F2 en cuanto al espectro de inhibición se refiere. Aunque

la F3 tuvo los porcentajes más bajos de inhibición. Así también, el hongo más susceptible (de los ocho probados) a las cinco fracciones fue *Geotrichum sp.* De tal forma que los hongos nada susceptibles fueron *Aspergillus sp.*, *C. albicans* (levadura), *Monilia sp.* y *Rhizopus sp.* Por ello se muestran con porcentajes negativos, lo cual indica que por el contrario crecieron mucho más rápido (con las proteínas en cada fracción) que la muestra control. Cabe reiterar que la concentración de proteína se estandarizó a 50 µg/ml en las cinco fracciones.

La actividad antifúngica evaluada por el método del “agar envenenado” (Tablas 4 y 5), aunque dependiente del método espectrofotométrico al considerar sólo ciertos hongos afectados (Figuras 14-17) por las fracciones respectivas, mostró porcentajes de inhibición en general más bajos. Aún así, muestra que *Geotrichum sp.* sigue siendo el hongo más susceptible de los probados. Las desventajas de este método como son: los diferentes periodos de incubación de las placas con agar, la fracción proteica (o control) y el hongo; la variabilidad del volumen de cada fracción proteica para “envenenar” cada caja con agar; la variación de lecturas provocada por la visión humana; el gran volumen de fracción proteica y de agar; la gran variación de esporas cuando se utiliza un trozo de hongo (de aproximadamente 6 mm), incluso el espesor del agar en el cual va pegado el hongo, utilización de más horas para el método en general, resultados por tanto menos exactos, entre otras desventajas []. Aún así este método es utilizado para la verificación previa de actividad antifúngica además de que ofrece la visualización de la inhibición de crecimiento y de descartar alguna muestra contaminada. Con este método la F3 mostró los dos porcentajes más altos de inhibición, 67% sobre *Geotrichum sp.* y 18.4 % sobre *Penicillium sp.*, a reserva de la F2 con un 70% de inhibición sobre *Geotrichum sp.* con la desventaja de que el porcentaje es representativo de una sola muestra por contaminación de las otras tres. Finalmente, el hongo *A. alternata* mostró ser nada susceptible a las fracciones F1, F3 y F5 sometido.

El análisis de SDS-PAGE (Figura 18) muestra que las únicas bandas visualizadas, después de la tinción del gel con *azul brillante de coomassie*, fueron las de los marcadores de peso molecular. Por ello se procedió a teñir con *plata*, la cual es 100 veces más sensible que la tinción anterior. Sin embargo, las bandas de las fracciones no se lograron visualizar. Estos

resultados indican que la cantidad de proteína obtenida es muy baja ya que la tinción con plata detecta hasta el orden de nanogramos. Considerando que la concentración de proteínas de la muestra utilizada en el gel fue de 96  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en un volumen de 12  $\mu\text{L}$  para cada fracción, entonces se inyectaron alrededor de 96  $\text{ng}$  en cada pozo del gel, solo que ésta cantidad se distribuye a lo largo de la ruta de corrimiento de las proteínas dejando realmente una bajísima cantidad de proteínas que son indetectables por la tinción con plata. Desde luego que la concentración utilizada fue la más alta que se pudo lograr. Aún con todo esto, ensayos posteriores de concentración de proteínas (dato no mostrado) tampoco permitieron visualizar las bandas de proteína en el gel de poliacrilamida.

El resultado conlleva a lo siguiente: la baja concentración de proteínas antifúngicas y cada vez menor de acuerdo a este orden; en el extracto total de hojas de *A. hypochondriacus*, en las fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico y en el gel de poliacrilamida, puede atribuirse a que las hojas de la planta utilizada se recolectaron en un estado no infectado por patógenos, lo que podría resultar en una baja producción de proteínas o péptidos antimicrobianos [8] respecto a la que se pudiera producir en un estado infectado de la planta. Mientras que cuando una planta se expone a patógenos tal como hongos y virus esta produce compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular llamados fitoalexinas, péptidos antimicrobianos y proteínas pequeñas (tioninas, defensinas, proteínas del tipo heveína y péptidos del tipo knotina y otras proteínas antimicrobianas) [25].

La baja concentración de proteínas también puede deberse a que cuando se rompe un tejido o una célula (en el paso de la extracción de proteínas) suceden dos cosas: la primera, las proteínas se pueden poner en contacto con nuevas enzimas proteolíticas de un compartimiento intracelular, espacio extracelular o célula diferentes. La segunda, la maquinaria degradativa intracelular es desensamblada y diluida, tal que los eventos proteolíticos se limitan a ocurrir sin hidrólisis completa de los productos. En ambos casos, el resultado puede ser el ataque de endo- o exopeptidasas sobre la proteína de interés [62]. En el extracto inicial no se conocen las proteasas que pudieran estar. Sin embargo, hay inhibidores específicos de proteasas y otros que tienen un espectro amplio de inhibición, de hecho el EDTA-disódico tiene propiedades de inhibir algunas proteasas [52].



## 8. Conclusiones

La separación de las fracciones proteicas mediante la cromatografía de intercambio aniónico se obtuvo con una fuerte adsorción de éstas a la columna lo que llevó a eluir las con una alta concentración de cloruro de sodio, dando como resultado un cromatograma de cinco picos con buena resolución.

Las bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 incluyendo los aislamientos *Streptococcus sp.* y *Staphylococcus sp.*) y gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 / ATCC 35218 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) fueron resistentes a diferentes concentraciones del extracto proteico total.

Las pruebas antifúngicas realizadas con las cinco fracciones (F1-F5) proteicas mostraron inhibición de crecimiento hacia cuatro (*T. mentagrophytes*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.* y *A. alternata*) de los ocho hongos probados (*Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Monilia sp.* y la levadura *C. albicans*, además de los anteriores) mediante el método espectrofotométrico y el del agar “envenenado”, arrojando porcentajes de inhibición diferentes para cada hongo y por cada fracción. Es decir, las cinco fracciones mostraron ser inhibitorias sobre estos cuatro hongos bajo las condiciones aquí utilizadas. Cabe recalcar que la fracción uno (F1) tuvo el espectro más amplio así como también los porcentajes más altos de inhibición. Cabe mencionar también, que esta misma fracción se obtuvo con el volumen más bajo de recolección en la columna de entre las cinco fracciones, como se puede corroborar en el cromatograma (Figura 9).

La determinación del peso molecular mediante SDS-PAGE, después de haber teñido con azul brillante de coomassie R-250 y luego con plata, no se obtuvo porque no se visualizaron bandas de proteínas en el gel de poliacrilamida.

Se aislaron cinco fracciones proteicas antifúngicas: F1, F2, F3, F4 y F5 de hojas de *Amaranthus hypochondriacus*.

## 9. Perspectivas

- Las cinco fracciones proteicas antifúngicas pueden tener porcentajes de inhibición mayores a los obtenidos a concentraciones mayores de proteína, lo que significaría exponer a la planta a microorganismos patógenos para la producción de compuestos antimicrobianos.
- De la forma anterior, purificar la F1 y probarla contra hongos fitopatógenos para encontrarle utilidad en cultivos por ejemplo de hortalizas, para así cristalizarla y obtener la estructura tridimensional de la proteína.
- La información estructural obtenida permitiría conocer en detalle a nivel molecular el mecanismo de acción antifúngico de las proteínas. Así mismo, poder inferir a cerca de posibles modificaciones a estas proteínas empleando técnicas de biología molecular que permitan obtener proteínas antifúngicas con mayor actividad, eficiencia y en cantidades relativamente suficientes para su desarrollo tecnológico en un futuro cercano.

## 10. Anexos

### Glosario

- *Afta*: f. *Med.* Úlcera pequeña, blanquecina, que se forma durante el curso de ciertas enfermedades en la mucosa de la boca o de otras partes del tubo digestivo o en lamucosa genital.
  
- *Apoptosis celular*: muerte celular programada
  
- *Astringente*: adj. Que en contacto con la lengua produce en esta una sensación mixta entre la sequedad intensa y el amargor, como ciertas sales metálicas.
  
- *Bicapas*: Las membranas biológicas se forman mediante la aposición de dos monocapas lipídicas, de manera que las colas hidrofóbicas quedan hacia el interior de la estructura y las cabezas polares hacia el exterior.
  
- *Bicapa lipídica*: son agregados supramoleculares producidos por las interacciones entre zonas polares y zonas hidrofóbicas de unas moléculas con otras. Estas interacciones también producen micelas y monocapas.
  
- *Concomitante*: adj. Que aparece o actúa conjuntamente con otra cosa.
  
- *Cosmopolita*: adj. Dicho de un ser o de una especie animal o vegetal: aclimatado a todos los países o que puede vivir en todos los climas.
  
- *Convección*: *Fís.* Transporte en un fluido de una magnitud física, como masa, electricidad o calor, por desplazamiento de sus moléculas debido a diferencias de densidad.
  
- *Elongación*: f. alargamiento.
  
- *Lanceolado*: adj. *Botánica*. Dicho de una hoja o de sus lóbulos: De forma semejante al hierro de la lanza.
  
- *Lípido anfipático*: Con este nombre conocemos una extensa familia de lípidos que se caracterizan por tener en la misma molécula una zona polar que interacciona fácilmente con

el agua y una zona hidrofóbica de la cual el agua y otros compuestos polares quedan excluidos.

- *Micelas*: son agregados esféricos en los que la parte hidrofóbica del lípido se dirige hacia dentro, mientras que la parte polar está hacia fuera en contacto con el agua.

- *Monocapas*: Al extender un conjunto de moléculas (de lecitina por ejemplo, lípido anfipático) en una interfase (agua-aire o polar-hidrofóbica), las colas hidrofóbicas del lípido se orientan hacia el aire mientras que las polares interaccionan con el agua.

- *Oblongo*: adj. Más largo que ancho.

- *Oligosacárido*: m. *Bioquím.* Hidrato de carbono formado por escaso número de monosacáridos.

## Condiciones en la separación por columna Econo-Pac High Q Cartridge

- Columna: Econo-Pac High Q Cartridge 5 mL
- Cantidad de proteína en muestra:  $\approx 6$  mg/mL (determinada a 280 nm), podría estar alterada por la presencia de color debido a la naturaleza del extracto
- Condiciones: Buffer A = Tris-HCl 50 mM pH 9  
Buffer B = Tris-HCl 50 mM pH 9 con NaCl 1 M
- Gradiente

Tabla 6. Gradiente utilizado en la cromatografía de intercambio aniónico

<i>Volumen (mL)</i>	0	6	12	21	30	39	51	60	69	81	84	90
<i>% de buffer B</i>	0	0	30	30	50	50	80	80	100	100	0	0

- Constantes:** Volumen de inyección = 3 mL  
Volumen por fracción = 3 mL  
Velocidad de flujo = 3 mL/min
- Soporte de la columna: Macro-prep high Q support
  - Rango de velocidad de flujo: 1-3 mL/min
  - Detección: 280 nm (0.5 AUFS)
  - Capacidad de albúmina de suero bovino (BSA):  $\geq 170$  mg BSA
  - Tipo de columna: intercambio aniónico fuerte ( $-N^+(CH_3)_3$ )

## Soluciones para SDS-PAGE

### 1. Solución stock de acrilamida, 250 mL

- Acrilamida            30%    73 g
  - Bis-acrilamida        2.7%   2 g
  - Agua                    llevar a 250 mL
- Filtrar y almacenar a 4°C.

**2. Solución stock buffer 4x para gel separador pH 8.8, 500 mL**

- Tris base 91 g
- SDS 2 g
- Agua llevar a 500 mL

Ajustar pH con HCl concentrado y almacenar a 4°C.

**3. Soluciones stock buffer pH 6.8, 250 mL**

	<i>1x</i>	<i>2x</i>
	<i>Para gel</i>	<i>Para buffer</i>
	<i>concentrador</i>	<i>de muestra</i>
- Tris base	15.1 g	30.2 g
- SDS	1 g	2 g
- Agua	llevar a 250 mL	llevar a 250 mL

Almacenar a 4°C.

**4. Solución stock buffer 1x para reservorio, 2L**

- Glicina 28.8 g
- Tris-base 6 g
- SDS 2 g
- Agua llevar a 2 L

Guardar a 4°C.

**5. Solución de persulfato de amonio 10%**

- Persulfato de amonio 1 g
- Agua desionizada 10 mL

**6. Solución buffer 2x para muestra, 100 mL**

- Glicerol 20 mL
- SDS 4 g
- 2-mercaptoetanol 2 mL
- Azul de bromofenol 1 mg
- Solución 3, 2x 6.25 mL
- Agua desionizada llevar a 100 mL

### 7. Preparación del gel separador

- Solución 1	2 mL
- Agua desionizada	1.7 mL
- Solución 2,	1.3 mL
- Solución 5	0.050 mL
- TEMED	0.005 mL

### 8. Preparación del gel concentrador

- Solución 1	510 $\mu$ L
- Agua desionizada	2 000 $\mu$ L
- Solución 3, 1x	420 $\mu$ L
- Solución 5	8 $\mu$ L
- TEMED	5 $\mu$ L

### 9. Solución para fijar proteínas en el gel, 100 mL

- Metanol	40%	40 mL
- Ac. tricloroacético	10%	10 mL
- Agua desionizada		50 mL

### 10. Solución para tinción, 100 mL

- Metanol	40%	40 mL
- Ac. acético	10%	10 mL
- Azul brillante de coomassie R-250	0.1 g	
- Agua desionizada		50 mL

### 11. Solución para desteñir, 100 mL

- Metanol	40%	40 mL
- Ac. acético	10%	10 mL
- Agua		50 mL

*Soluciones para la tinción con plata*

**12. Solución equilibrante de plata**

Diluir 0.5 mL de la Solución Concentrada de Plata (del kit de tinción con plata) en 100 mL de agua desionizada.

**13. Solución reveladora**

Diluir 10 mL del Revelador 1 Concentrado en 100 mL de agua desionizada. Agregar a esta solución 56 µl del Revelador 2 Concentrado. (Esta solución es estable más de 2 horas).

**14. Solución Stop**

Agregar 3 mL de una solución de ácido acético al 1% a 297 mL de agua desionizada.

**15. Solución reductora**

Mezclar 1 mL del Reductor A Concentrado, 2 mL del Reductor B Concentrado y 350 µl del Reductor C Concentrado, diluir a 150 mL con agua desionizada. Esta solución es estable por 1 día o hasta que la solución se torne verde o azul.

TABLA 7. Datos experimentales para la curva estándar de calibración de albúmina de suero bovino (20-2000 µg/mL)

<i>Concentración (µg/ml)</i>	<i>Absorbancia a 570 nm</i>
2000	2.9145
1500	2.181
1000	1.615
750	1.204
500	0.8785
250	0.5125
125	0.4545
25	0.2475

$$y = 0.0013x + 0.225$$

$$r^2 = 0.998$$



## Valores de absorbancia de hongos con el método espectrofotométrico a 570 nm

TABLA 8. Absorbancias de *A. alternata*

<b><i>Alternaria alternata</i> 0 horas</b>						<b><i>Alternaria alternata</i> 48 horas</b>					
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5
0.04	0.043	0.041	0.047	0.057	0.042	0.177	0.163	0.224	0.161	0.236	0.205
0.04	0.044	0.041	0.047	0.057	0.041	0.089	0.141	0.227	0.17	0.244	0.12
0.042	0.046	0.041	0.048	0.058	0.041	0.207	0.13	0.257	0.174	0.257	0.145
0.042	0.052	0.041	0.047	0.058	0.042	0.222	0.226	0.205	0.195	0.236	0.125
0.042	0.043	0.042	0.047	0.061	0.042	0.184	0.146	0.264	0.163	0.284	0.169
0.048	0.048	0.046	0.052	0.062	0.045	0.263	0.163	0.225	0.189	0.224	0.147

<b>Sustracción de Abs</b>						<b>Promedios</b>					
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5
0.137	0.12	0.183	0.114	0.179	0.163	0.148	0.116	0.192	0.127	0.188	0.11
0.049	0.097	0.186	0.123	0.187	0.079	<b>DS</b> 0.056	0.031	0.023	0.013	0.021	0.031
0.165	0.084	0.216	0.126	0.199	0.104	DS = desviación estándar					
0.18	0.174	0.164	0.148	0.178	0.083	F= fracción respectiva del extracto					
0.142	0.103	0.222	0.116	0.223	0.127						
0.215	0.115	0.179	0.137	0.162	0.102						

<b>% de inhibición fúngica</b>				
F1	F2	F3	F4	F5
21.96	-29.5	13.96	-27	25.9

TABLA 9. Absorbancias de *T. mentagrophytes*

<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i> 0 horas</b>						<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i> 48 horas</b>					
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5
0.04	0.042	0.04	0.045	0.048	0.041	0.076	0.053	0.255	0.199	0.081	0.088
0.04	0.042	0.04	0.046	0.049	0.04	0.079	0.057	0.238	0.175	0.08	0.098
0.04	0.042	0.041	0.046	0.049	0.041	0.086	0.054	0.22	0.137	0.077	0.091
0.04	0.041	0.041	0.047	0.049	0.04	0.078	0.054	0.2	0.132	0.076	0.089
0.04	0.041	0.04	0.046	0.049	0.042	0.07	0.051	0.234	0.073	0.083	0.103
0.046	0.046	0.045	0.053	0.053	0.046	0.092	0.061	0.247	0.091	0.086	0.102

<b>Sustracción de Abs</b>						<b>Promedios</b>					
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5
0.036	0.011	0.215	0.154	0.033	0.047	0.039	0.013	0.191	0.087	0.031	0.054
0.039	0.015	0.198	0.129	0.031	0.058	<b>DS</b> 0.006	0.002	0.02	0.05	0.003	0.006
0.046	0.012	0.179	0.091	0.028	0.05	<b>% de inhibición fúngica</b>					
0.038	0.013	0.159	0.085	0.027	0.049	F1	F2	F3	F4	F5	
0.03	0.01	0.194	0.027	0.034	0.061	67.65	-388	-123	20.84	-36.6	
0.046	0.015	0.202	0.038	0.033	0.056						

**Valores de absorbancia de hongos con método espectrofotométrico a 570 nm  
(continuación)**

TABLA 10. Absorbancias de *Geotrichum sp.*

<i>Geotrichum sp.</i>											
0 horas						48 horas					
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5
0.048	0.042	0.04	0.047	0.05	0.04	0.375	0.312	0.168	0.333	0.281	0.163
0.047	0.043	0.041	0.047	0.05	0.042	0.375	0.332	0.166	0.277	0.283	0.173
0.047	0.041	0.041	0.047	0.05	0.041	0.37	0.139	0.161	0.345	0.282	0.187
0.047	0.042	0.04	0.047	0.049	0.042	0.365	0.338	0.168	0.35	0.277	0.186
0.047	0.042	0.041	0.047	0.05	0.042	0.372	0.317	0.166	0.265	0.272	0.194
0.051	0.046	0.047	0.052	0.054	0.046	0.364	0.315	0.161	0.321	0.279	0.183
Sustracción de Abs						Promedios					
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5
0.327	0.27	0.128	0.286	0.231	0.123	0.322	0.25	0.123	0.267	0.229	0.139
0.328	0.289	0.125	0.23	0.233	0.131	<b>DS</b> 0.006	0.075	0.005	0.036	0.004	0.011
0.323	0.098	0.12	0.298	0.232	0.146						
0.318	0.296	0.128	0.303	0.228	0.144						
0.325	0.275	0.125	0.218	0.222	0.152						
0.313	0.269	0.114	0.269	0.225	0.137						
						% de inhibición fúngica					
						F1	F2	F3	F4	F5	
						22.59	61.73	17.05	29.1	56.92	

TABLA 11. Absorbancias de *C. albicans*

<i>Candida albicans</i>											
0 horas						48 horas					
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5
0.04	0.041	0.04	0.046	0.048	0.04	0.377	0.567	0.462	0.602	0.538	0.463
0.04	0.041	0.04	0.046	0.049	0.041	0.372	0.557	0.367	0.563	0.497	0.466
0.04	0.041	0.041	0.046	0.049	0.041	0.38	0.538	0.488	0.542	0.536	0.452
0.04	0.041	0.04	0.046	0.048	0.041	0.379	0.55	0.38	0.543	0.502	0.406
0.04	0.041	0.04	0.046	0.049	0.041	0.45	0.59	0.429	0.55	0.511	0.411
0.045	0.045	0.046	0.05	0.054	0.045	0.481	0.57	0.58	0.583	0.526	0.301
Sustracción de Abs						Promedios					
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5
0.337	0.526	0.422	0.556	0.49	0.423	0.366	0.52	0.41	0.517	0.469	0.375
0.332	0.516	0.327	0.517	0.448	0.425	<b>DS</b> 0.045	0.018	0.076	0.024	0.017	0.064
0.34	0.497	0.447	0.496	0.487	0.411						
0.339	0.509	0.34	0.497	0.454	0.365						
0.41	0.549	0.389	0.504	0.462	0.37						
0.436	0.525	0.534	0.533	0.472	0.256						
						% de inhibición fúngica					
						F1	F2	F3	F4	F5	
						-42.3	-12.1	-41.5	-28.2	-2.57	

**Valores de absorbancia de hongos con método espectrofotométrico a 570 nm  
(continuación)**

TABLA 12. Absorbancias de *Aspergillus sp.*

<i>Aspergillus sp.</i>												
0 horas						48 horas						
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	
0.039	0.041	0.04	0.046	0.049	0.041	0.265	0.221	0.278	0.62	0.371	0.265	
0.04	0.042	0.041	0.047	0.049	0.041	0.21	0.231	0.265	0.491	0.41	0.246	
0.04	0.042	0.041	0.047	0.049	0.041	0.189	0.228	0.248	0.743	0.408	0.344	
0.04	0.042	0.041	0.048	0.049	0.04	0.246	0.393	0.296	0.486	0.392	0.205	
0.04	0.042	0.041	0.047	0.05	0.04	0.222	0.257	0.299	0.519	0.392	0.34	
0.045	0.046	0.046	0.051	0.054	0.046	0.264	0.234	0.313	0.568	0.412	0.28	
Sustracción de Abs						Promedios						
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	
0.226	0.18	0.238	0.574	0.322	0.224	0.192	0.218	0.242	0.524	0.348	0.239	
0.17	0.189	0.224	0.444	0.361	0.205	DS	0.03	0.066	0.023	0.099	0.015	0.054
0.149	0.186	0.207	0.696	0.359	0.303							
0.206	0.351	0.255	0.438	0.343	0.165							
0.182	0.215	0.258	0.472	0.342	0.3							
0.219	0.188	0.267	0.517	0.358	0.234							
						% de inhibición fúngica						
						F1	F2	F3	F4	F5		
						-13.6	-25.8	-173	-81	-24.2		

TABLA 13. Absorbancias de *Penicillium sp.*

<i>Penicillium sp.</i>												
0 horas						48 horas						
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	
0.039	0.041	0.04	0.046	0.049	0.041	0.353	0.237	0.329	0.312	0.234	0.308	
0.039	0.042	0.041	0.046	0.05	0.041	0.28	0.223	0.356	0.309	0.222	0.31	
0.04	0.041	0.041	0.046	0.05	0.042	0.298	0.256	0.318	0.265	0.231	0.316	
0.039	0.041	0.04	0.046	0.049	0.041	0.403	0.219	0.349	0.311	0.226	0.32	
0.04	0.042	0.041	0.046	0.049	0.041	0.308	0.296	0.338	0.346	0.227	0.296	
0.044	0.046	0.045	0.051	0.054	0.045	0.349	0.248	0.322	0.328	0.245	0.338	
Sustracción de Abs						Promedios						
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	
0.314	0.196	0.289	0.266	0.185	0.267	0.292	0.204	0.294	0.265	0.181	0.273	
0.241	0.181	0.315	0.263	0.172	0.269	DS	0.045	0.028	0.016	0.026	0.007	0.013
0.258	0.215	0.277	0.219	0.181	0.274							
0.364	0.178	0.309	0.265	0.177	0.279							
0.268	0.254	0.297	0.3	0.178	0.255							
0.305	0.202	0.277	0.277	0.191	0.293							
						% de inhibición fúngica						
						F1	F2	F3	F4	F5		
						29.96	-0.79	9.153	38.05	6.479		

**Valores de absorbancia de hongos con método espectrofotométrico a 570 nm  
(continuación)**

TABLA 14. Absorbancias de *Rhizopus sp.*

<i>Rhizopus sp.</i>						<i>Rhizopus sp.</i>						
0 horas						48 horas						
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	
0.039	0.041	0.041	0.046	0.049	0.04	0.193	0.649	0.257	0.788	0.404	0.264	
0.041	0.042	0.041	0.047	0.05	0.042	0.209	0.635	0.223	0.762	0.375	0.265	
0.04	0.042	0.042	0.047	0.05	0.042	0.225	0.687	0.24	0.768	0.422	0.278	
0.04	0.041	0.041	0.047	0.05	0.042	0.199	0.67	0.211	0.776	0.47	0.252	
0.039	0.041	0.04	0.046	0.05	0.041	0.183	0.7	0.233	0.796	0.425	0.24	
0.045	0.045	0.045	0.051	0.054	0.045	0.207	0.708	0.26	0.789	0.427	0.238	
Sustracción de Abs						Promedios						
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	
0.154	0.608	0.216	0.742	0.355	0.224	0.162	0.633	0.196	0.733	0.37	0.214	
0.168	0.593	0.182	0.715	0.325	0.223	DS	0.014	0.028	0.018	0.013	0.031	0.016
0.185	0.645	0.198	0.721	0.372	0.236							
0.159	0.629	0.17	0.729	0.42	0.21							
0.144	0.659	0.193	0.75	0.375	0.199							
0.162	0.663	0.215	0.738	0.373	0.193							
						% de inhibición fúngica						
						F1	F2	F3	F4	F5		
						-291	-20.8	-352	-128	-32.2		

TABLA 15. Absorbancias de *Monilia sp.*

<i>Monilia sp.</i>						<i>Monilia sp.</i>						
0 horas						48 horas						
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	
0.047	0.05	0.047	0.054	0.069	0.048	0.186	0.285	0.231	0.257	0.328	0.176	
0.047	0.053	0.049	0.054	0.058	0.047	0.184	0.346	0.269	0.303	0.324	0.174	
0.047	0.05	0.05	0.053	0.057	0.041	0.197	0.31	0.254	0.265	0.31	0.203	
0.047	0.049	0.046	0.054	0.056	0.048	0.187	0.302	0.237	0.277	0.316	0.194	
0.047	0.05	0.047	0.053	0.057	0.046	0.174	0.305	0.262	0.269	0.307	0.18	
0.052	0.054	0.051	0.06	0.062	0.051	0.213	0.246	0.187	0.268	0.315	0.233	
Sustracción de Abs						Promedios						
Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	Ctrl	F1	F2	F3	F4	F5	
0.139	0.235	0.184	0.203	0.259	0.128	0.142	0.248	0.192	0.219	0.257	0.147	
0.137	0.293	0.22	0.249	0.266	0.127	DS	0.012	0.033	0.031	0.016	0.006	0.022
0.15	0.26	0.204	0.212	0.253	0.162							
0.14	0.253	0.191	0.223	0.26	0.146							
0.127	0.255	0.215	0.216	0.25	0.134							
0.161	0.192	0.136	0.208	0.253	0.182							
						% de inhibición fúngica						
						F1	F2	F3	F4	F5		
						-74.3	-34.7	-53.5	-80.5	-2.95		

## 11. Referencias

1. **Broekaert WF, Mariën W, Terras FRG, De Bolle MFC, Proost P, Van Damme J et al.** Antimicrobial Peptides from *Amaranthus caudatus* Seeds with Sequence Homology to the Cysteine/Glycine-Rich Domain of Chitin-Binding Proteins. *Biochemistry* 1992; **31**: 4308-4314.
2. **García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodríguez-Palenzuela P.** Plant Defense Peptides. *Biopolymers Peptide Science* 1998; **47**: 479-491.
3. **Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetru Ch, Hoffmann JA, Bulet P.** Innate Immunity: Isolation of Several Cysteine-Antimicrobial Peptides from the Blood of a Mollusc, *Mytilus edulis*. *J Biol Chem* 1996; **271**(36): 21808-21813.
4. [http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio\\_espanol/doctos/amaranto.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/amaranto.html)
5. <http://www.qro.itesm.mx/agronomia2/extensivos/CAmarantoGeneralidades.html>
6. <http://www.prodigyweb.net.mx/centeotlac/amaranto.htm>
7. <http://www.ecoaldea.com/plmd/amaranto.htm>
8. **Selitrennikoff CP.** Antifungal Proteins. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**: 2883-2894. Disponible en: <http://aem.asm.org/cgi/content/full/67/7/2883/F1>
9. [http://www.danival.org/bacteria/morfo/img/pared\\_gp.gif](http://www.danival.org/bacteria/morfo/img/pared_gp.gif)
10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.chapter.274>
11. [http://www.danival.org/bacteria/morfo/img/pared\\_gn.gif](http://www.danival.org/bacteria/morfo/img/pared_gn.gif)
12. **Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Osborn RW.** Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. *Plant Physiol* 1995; **108**: 1353-1358.
13. **Matsuzaki K.** Why and How are Peptide-lipid Interactions Utilized for Self-defense? Magainins and Tachyplesinas as Archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1462**(1-2):1-10.
14. **Groisman EA.** How Bacteria Resist Killing by Host-Defense Peptides. *Trends Microbiol* 1994; **2**(11): 444-449.
15. **Kjuul AK, Styrvold O.** Effect and Mechanism of Cecropins of Fish Pathogenic Bacteria. *Developm Comp Immunol* 1997; **21**(2): 175.
16. **Simmaco M, Mignogna G, Barra D.** Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin: What Do They Us?. *Biopolymers. Peptide Science* 1998; **47**: 435-450.

17. **Andreu D.** Editorial: Antimicrobial Peptides. *Biopolymers Peptide Science* 1999; **47**: 413.
18. **Schröder JM.** Epithelial Peptide Antibiotics. *Biochem Pharmacol* 1999; **57**(2): 121-134.
19. **Thevissen K, Osborn RW, Aclant DP, Broekaert WF.** Specific, High Affinity Binding Sites for an Antifungal Plant Defensin on *Neurospora crassa* Hyphae and Microsomal. *J Biol Chem* 1997; **272**(51): 32176-32181.
20. **McDowell JM, Dangl JL.** Signal Transduction in the Plant Immune Response. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 79-82.
21. **Nishimura M, Somerville S.** Resisting Attack. *Science* 2002; **295**: 2032-2033.
22. **Zhang Y, Lewis K.** Fabatins: New Antimicrobial Plant Peptides. *FEMS Microbiol Lett* 1997 ; **149**(1) : 59-64.
23. **Thevissen K, Terras FRG, Broekaert WF.** Permeabilization of Fungal Membranes by Plant Defensins Inhibits Fungal Growth. *Appl Environ Microbiol* 1999; **65**(12): 5451-5458.
24. **Nakajima Y, Ishibashi J, Yukuhiro F, Asaoka A, Taylor D, Yamakawa M.** Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Tick Defensin Against Gram-Positive Bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1624**(1-3): 125-130.
25. **Segura A, Moreno M, Molina A, García-Olmedo F.** Novel Defensin Subfamily from Spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett* 1998; **435**: 159-162.
26. **Thevissen K, Ferket KKA, Francois IEJA, Cammue PA.** Interactions of Antifungal Plant Defensins with Fungal Membrane Components. *Peptides* 2003; **24**(11): 1705-1712.
27. **Molina A, Segura A, García-Olmedo F.** Lipid Transfer Proteins (nsLTPs) from Barley and Maite Leaves are Potent Inhibitors of Bacterial and Fungal Plant Pathogens. *FEBS Lett* 1993; **316**: 119-122.
28. **Ramírez-Medeles MC, Aguilar MB, Miguel RN, Bolaños-García VM, García-Hernández E, Soriano-García M.** Amino Acid Sequence, Biochemical Characterization, and Comparative Modeling of a Nonspecific Lipid Transfer Protein from *Amaranthus hypochondriacus*. *Arch Biochem Biophys* 2003; **415**: 24-33.

29. **Blein JP, Coutos-Thévenot P, Marion D, Ponchet M.** From Elicitins to Lipid-Transfer Proteins : a New Insight in Cell Signalling Involved in Plant Defence Mechanisms. *Trends in Plant Sci* 2002; **7**(7): 293-296.
30. **Veronese P, Ruiz MT, Coca MA, Hernández-López A, Lee H, Ibeas J, Damsz B.** In Defense Against Pathogens. Both Plant Sentinels and Foot Soldiers Need to Know the Enemy. *Plant Physiology* 2003; **131**: 1580-1590.
31. **Dathe M, Wieprecht T.** Structural Features of Helical Antimicrobial Peptides: their Potential to Modulate Activity on Model Membranes and Biological Cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1462**(1-2): 71-87.
32. **Epand RM, Vogel HJ.** Diversity of Antimicrobial peptides and their Mechanisms of Action. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1462**(1-2): 11-28.
33. **Oren Z, Shai Y.** Mode of Action of Linear Amphipathic  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides. *Biopolymers Peptide Science* 1998; **47**: 451-463.
34. **Andreu D, Rivas L.** Animal Antimicrobial Peptides: An Overview. *Biopolymers (Peptide Science)* 1998; **47**: 415-433.
35. **Yeaman MR, Yount NY.** Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev* 2003; **55**: 27-55.
36. **Shai Y.** Mechanism of the Binding, Insertion and Destabilization of Phospholipid Bilayer Membranes by  $\alpha$ -Helical Antimicrobial and Cell non-Selective Membrane-Lytic Peptides. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1462**(1-2): 55-70.
37. **Shai Y, Oren Z.** From “Carpet” Mechanism to de-Novo Designed Diastereomeric Cell-Selective Antimicrobial Peptides. *Peptides* 2001; **22**(10): 1629-1641.
38. **McCafferty DG, Cudic P, Yu KM, Behenna DC, Kruger R.** Synergy and Duality in Peptide Antibiotic Mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 1999; **3**(6) : 672-680.
39. **Vizioli J, Salzet M.** Antimicrobial Peptides from Animals: Focus on Invertebrates. *Trends Pharmacol Sci* 2002; **23**(11): 494-496.
40. **Dimarcq JL, Bulet P, Hetru Ch, Hoffmann J.** Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides in Invertebrates. *Biopolymers. Peptide Science* 1998; **47**: 465-477.
41. **Park CB, Kim HS, Kim SC.** Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and

- Inhibiting Cellular Functions. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **244**(1): 253-257.
42. **Cociancich S, Ghazi A, Hetru Ch, Hoffmann JA, Letellier L.** Insect Defensin, an inducible Antibacterial Peptide, Forms Voltage-dependent Channels in *Micrococcus luteus*. *J Bio Chem* 1993; **268**: 19239-19245.
43. **Park CB, Lee JH, Park IY, Kim MS, Kim SC.** A Novel Antimicrobial Peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *FEBS Lett* 1997; **411**: 173-178.
44. **Scopes R.** Protein Purification: Principles and Practice. USA: Springer-Verlag; 1984. pp: 239-243.
45. **Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ.** Protein Methods. 2a ed. USA: Wiley-Liss 1996. pp: 232-251, 72-74.
46. **Delaat ANC.** Microbiología. 2ª ed. México: Interamericana SA de CV; 1984. pp: 331-335.
47. **Stuart WT.** Microbiología. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2000. pp: 4-8, 83.
48. **Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Summers HM, Win WC.** Diagnóstico microbiológico. 3ª ed.. México: Médica Panamericana; 1997. pp: 570-578, 587
49. **Joklik WGK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM.** Zinsser Microbiología. 20ª ed.. Argentina: Médica Panamericana; 1994. pp: 35, 270.
50. **Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg H.** Tratado de Microbiología. 4ª ed.. España: Masson; 1996. pp: 56-57.
51. **Collins CH, Lyne PM.** Métodos microbiológicos. España: Acribia; 1989.
52. **Harris ELV, Angal S.** Protein Purification Applications: A practical approach. England: Irl Press; 1990. pp: 5-14.
53. **Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW.** Bioquímica de Harper. 14ª ed México: El manual moderno; 1997. pp: 39-49.
54. **Conn EE, Stumpf PK, Bruenning G, Doi RH.** Bioquímica fundamental. 4ª ed. México: Limusa; 1996. pp: 101-106.
55. **Wang H, Ng TB.** Isolation of lilin, a novel arginine- and glutamate-rich protein with potent antifungal and mitogenic activities from lily bulbs. *Life Sciences* 2002; **70**: 1075-1084.
56. **Wang H, Ng TB.** Ginkbilobin, a Novel Antifungal Protein from Ginkgo biloba Seeds



with Sequence Similarity to Embryo-Abundant Protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **279**: 407-411.

57. **Lam YW, Wang HX, Ng TB.** A Robust Cysteine-Deficient Chitinase-like Antifungal Protein from Inner Shoots of the Edible Chive *Allium Tuberosum*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **279**: 74-80.

58. **Ye XY, Ng TB.** Mungin, A Novel Cyclophilin-like Antifungal Protein from the Mung Bean. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **273**: 1111-1115.

59. **Lowry OH, Rosenbrogh NJ, Farr AI, Randall RI.** Protein Determination with Folin-Ciocalteu Reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265-275.

60. **Smith PJ.** Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 1985; **150**: 76-85.

61. [http://www.ispch.cl/lab\\_sal/doc/man\\_suscep.pdf](http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/man_suscep.pdf)

62. **Harris ELV, Angal S.** Protein Purification Methods: A practical approach. England: Irl Press; 1990. pp: 40-41, 125-143.

63. **Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Vanderleyden J.** An Automated Quantitative Assaay For Fungal Growth Inhibition. *FEMS Microbiol Lett* 1990; **69**: 55-60.