



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMÉDICA**

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS
ANTIMICROBIANOS DE LAS SEMILLAS DE *Amaranthus
hypochondriacus*.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
QUÍMICA LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO

DIRECTOR DE TESIS
DR. MANUEL SORIANO GRACÍA



MÉXICO, DF 2008

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP-UNAM) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

A DGAPA-UNAM por el financiamiento con el proyecto IN211605.

Al Dr. Manuel Soriano García por todo el apoyo, confianza y conocimientos compartidos.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Carlos Céspedes Acuña, Dr. Jaime Mas Oliva y Dr. Manuel Jiménez, por sus sugerencias y comentarios durante el desarrollo del proyecto.

A los Doctores Alberto Huberman, Edgardo Escamilla, Federico García y Roberto Arreguín, por sus comentarios y sugerencias.

Agradezco enormemente a la Maestra Carmen Márquez por su asesoría en las técnicas de purificación y por su confianza; a la Maestra Cristina Pérez por la donación y ayuda en la identificación de las cepas de hongos y al Maestro Antonio Nieto por su apoyo en diferentes labores técnicas.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento de Bioquímica, especialmente a Otoniel, Gabriela, Norma, Eduardo, Vanesa, Azucena, Martha, Verónica, Ernesto y Francisco.

A Marianita y Toño por su amistad y ayuda.

Infinitas gracias al Dr. Juan Camilo Marín (Juanquita) por su amor, su compañía, su asesoría, su apoyo físico y moral en todos los momentos difíciles y por contagiarme su espíritu de aventura. Te amo.

A mi mamá y mi hermana por su amor y apoyo durante toda mi vida.

INTRODUCCIÓN.....	i
1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	3
1.1 FUENTES DE OBTENCIÓN.....	4
1.1.1 AMPs de Mamíferos.....	5
1.1.2 AMPs de Anfibios.....	11
1.1.3 AMPs de Invertebrados.....	14
1.1.4 AMPs de Aves.....	15
1.1.5 AMPs de Bacterias.....	16
1.1.6 AMPs de Hongos.....	17
1.1.7 AMPs de Plantas.....	18
1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN.....	25
1.2.1 Actividad Antibacterial.....	26
1.2.2 Actividad Antifúngica.....	34
2. AMARANTO.....	38
2.1 FAMILIA AMARANTHACEA.....	39
2.2 GÉNERO <i>Amaranthus</i>	40
2.2.1 Composición del Vegetal.....	44
2.2.2 Proteínas de la Semilla.....	45
2.2.3 <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	48

3.	HIPOTESIS.....	54
4.	OBJETIVOS.....	54
5.	METODOLOGÍA.....	55
5.1	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEÍNIC.....	55
5.2	FRACCIONAMIENTO POR HPLC.....	55
5.3	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	56
5.4	ELECTROFORESIS.....	56
5.5	PRUEBAS ANTIFÚNGICAS.....	57
5.5.1	Obtención de Esporas.....	57
5.5.2	Prueba Antifúngica.....	57
5.6	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	58
5.7	ACTIVIDAD INHIBITORIA CINCUENTA (IC ₅₀).....	59
5.8	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC).....	59
5.9	ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO PURO AL EFECTO DE PROTEASAS Y SU ANTAGONISMO CON IONES.....	60
5.10	CL-EM/EM Y SECUENCIACIÓN.....	61
5.11	ALINEACIÓN.....	62
5.13	ENSAYO DE UNIÓN A QUITINA.....	62
5.14	ENSAYO DE ACTIVIDAD QUITINASA.....	63
5.15	EFFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD QUITINASA.....	63
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64

6.1	PURIFICACIÓN.....	64
6.2	SECUENCIACIÓN.....	67
6.3	ALINEACIÓN.....	69
6.4	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	70
6.5	ACTIVIDAD ANTIBACTARIANA.....	74
6.6	ENSAYO DE UNIÓN A QUITINA.....	75
6.7	ENSAYO DE ACTIVIDAD QUITINASA.....	76
7.	CONCLUSIONES.....	80
8.	REFERENCIAS.....	81
9.	ARTÍCULO.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Péptidos antimicrobianos.....	6
Tabla 2.1	Clasificación del Amaranto.....	40
Tabla 2.2	Diferentes especies de <i>Amaranthus</i>	41
Tabla 2.4	Comparación de la composición porcentual aproximada de peso seco de Diferentes hojas de comestibles.....	44
Tabla 2.5	Composición porcentual de proteínas de diferentes variedades de semilla de <i>A. hypochondriacus</i>	51
Tabla 5.1	Condiciones de hidrólisis.....	60
Tabla 6.1	IC ₅₀ y MIC de Ay-AMP1 contra diferentes cepas de hongos.....	71
Tabla 6.2	Efecto antagonista de Ay-AMP1 con iones mono y divalentes.....	72
Tabla 6.3	Resistencia de Ay-AMP1 al tratamiento con proteasas y calor.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Estructura de diferentes clases de AMPs.....	10
Figura 1.2	Mecanismos de acción de AMPs.....	31
Figura 1.3	Esquema de la pared y la membrana celular de hongos y levaduras.....	36
Figura 2.1	Especies domesticadas de amaranto.....	42
Figura 2.2	Distribución del <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>A. cruentus</i> en México.....	49
Figura 6.1	Perfil cromatográfico del extracto ácido eluido en RP-C ₁₈	64
Figura 6.2	Actividad antifúngica de las fracciones obtenidas por HPLC.....	65
Figura 6.3	Gel de poliacrilamida de las fracciones activas de RP-C ₁₈	65

Figura 6.4	Análisis de masas de Ay-AMP1.....	66
Figura 6.5	Análisis de masas de las fracción que contiene a Ay-AMP2.....	67
Figura 6.6	Estructura tridimensional del péptido antimicrobiano Ac-AMP2.....	69
Figura 6.7	Alineamiento de Ay-AMPs con péptidos caracterizados de plantas.....	70
Figura 6.8	Curvas dosis-respuestas de Ay-AMP1 en presencia de sales.....	72
Figura 6.9	Curvas dosis-respuesta de Ay-AMP1 tratado con proteasas y calentamiento.....	74
Figura 6.10	Actividad antibacteriana de Ay-AMP1.....	75
Figura 6.11	Gel de poliacrilamida para observar la unión a quitina de Ay-AMP1....	76
Figura 6.12	Reacción de la digestión del sustrato $pNP-(GlcNAc)_2$ con quitinasa.....	77
Figura 6.13	Efecto del pH en la actividad quitinasa.....	77

RESUMEN

Mediante una extracción ácida y posterior purificación por RP-HPLC, se aislaron dos péptidos con actividad antimicrobiana de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, Ay-AMP1 y Ay-AMP2. La masa molecular de los péptidos, determinada por espectrometría de masas, fue de 3184 y 3128 Da, respectivamente. De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, los péptidos pertenecen a la superfamilia de proteínas de unión a quitina; adicionalmente, se encontró que Ay-AMP1 degrada quitina. Sólo Ay-AMP1 pudo ser completamente purificado y se encontró que inhibe, a dosis muy bajas, el crecimiento de hongos patógenos como *Candida albicans*, *Trichoderma* sp., *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus ochraceus* y *Alternaria alternata*. Además de su potencia antifúngica, Ay-AMP1 es muy resistente al efecto de proteasas y calentamiento; sin embargo, mostró efecto antagónico con CaCl₂ y KCl.

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AMPs	“Antimicrobial Peptides”
BCA	“Bicinconinic Acid”
CL-EM/EM	Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas
DTT	Ditiotreitol
IC ₅₀	“50% Inhibitory Concentration”
LPS	Lipopolisacáridos
LTPs	“Lipid Transfer Protein”
MIC	“Minimal Inhibitory Concentration”
NK	“Natural Killer”
<i>p</i> NP-(GlcNAc) ₂	p-Nitrofenil-N,N`-diacetil-β-quitobiósido
<i>p</i> NP	p-nitrofenol
PR	“Pathogenesis Related”
RIP	“Ribosome-Inactivating Protein”
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han aislado numerosos péptidos antimicrobianos, AMPs (sigla en inglés de “*Antimicrobial Peptides*”), de insectos, anfibios, plantas y mamíferos, los cuales representan un componente antiguo y conservado del mecanismo de defensa de plantas y animales, que se ha desarrollado para controlar la flora natural y combatir patógenos. Los AMPs no tienen un solo mecanismo de acción, pero su interacción con las membranas microbianas es un requisito importante para muchos de ellos.

Estos péptidos están presentes en la mayoría, si no en todas, las especies de plantas, y son principalmente antifúngicos. Los AMPs de plantas se clasifican de acuerdo con semejanzas en secuencia y a nivel estructural en tioninas (Bohlmann *et al.*, 1991), defensinas (Ganz, 2003), proteínas transportadoras de lípidos (Cammue *et al.*, 1995), péptidos tipo heveína, entre otras. Sus mecanismos de acción son tan variados como sus fuentes de obtención e incluyen degradación de la pared celular del hongo, formación de poros y canales en la membrana, daño al ribosoma, inhibición de la síntesis de ADN e inhibición del ciclo celular (Broekaert *et al.*, 1997).

De las semillas de diferentes especies de amaranto se han aislado AMPs, Ac-AMP1 y Ac-AMP2 de *Amaranthus caudatus* (Broekaert *et al.*, 1992) y Ar-AMP de *Amaranthus retroflexus* (Lipkin *et al.*, 2005). El *Amaranthus hypochondriacus* es la especie cultivada en México y es de gran importancia desde el periodo prehispánico, especialmente las semillas, las cuales tienen una alta concentración de proteína y aminoácidos esenciales.

En este trabajo, se reporta la purificación y caracterización de un péptido antifúngico de las semillas de *A. hypochondriacus*, Ay-AMP1 y Ay-AMP2 de 3184 y 3124 Da respectivamente, los cuales, de acuerdo con alineaciones de su secuencia de amino ácidos, pertenecen a la superfamilia de proteínas de unión a quitina. Ay-AMP1 demostró potente acción antifúngica contra diferentes hongos patógenos, además, se une a quitina y la degrada *in vivo*.

1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.

Al contrario de muchas sustancias antimicrobianas naturales sintetizadas por vías metabólicas específicas, los AMPs, con tamaños de 1,5 a 10kDa, son expresados en genes individuales y producidos por procesos proteolíticos de moléculas precursoras. Su objetivo principal es la defensa contra ataques microbianos y son capaces de matar bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, parásitos y virus encapsulados (Zasloff, 2002).

El gran número de péptidos descritos hasta ahora se puede agrupar en varias familias estructurales, sin ninguna relación desde el punto de vista evolutivo. Cada familia tiene características estructurales específicas como la masa molecular, la presencia o no de puentes disulfuro, la predominancia de un aminoácido en particular, etc. A pesar de la similitud en características y propiedades físicas, individualmente, los péptidos tienen muy poca similitud en secuencia y estructura secundaria, sin embargo, todos comparten propiedades comunes, tales como el carácter catiónico y la propensión a adoptar conformaciones α helicoidales que frecuentemente resultan en un comportamiento anfipático (Ponti *et al.*, 1999).

Numerosos estudios de la relación estructura-actividad de estos péptidos indican que por lo menos siete parámetros pueden influir en la potencia y el espectro de actividad de los AMPs con hélices α : el tamaño, la secuencia, el grado de estructura (contenido de α hélices), la carga, la hidrofobicidad total y la separación respectiva de las caras hidrofóbicas e hidrofílicas de la hélice (Tossi *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que el blanco antibacteriano de los AMPs es la membrana citoplasmática. Los péptidos catiónicos son generalmente capaces de interactuar electrostáticamente con los grupos cargados negativamente de la membrana fosfolipídica de las bacterias y luego se insertan en la membrana citoplasmática formando conductos, que se cree, dejan escapar el contenido celular causando la muerte (Wu *et al.*, 1999). Los péptidos que destruyen membranas se pueden clasificar en: citolíticos, los cuales son activos contra células procarióticas y eucarióticas; antimicrobianos, con especificidad por las membranas de células procarióticas. Por ahora está bien establecido que estos péptidos actúan incrementando la permeabilidad de las membranas, perturbando la función de barrera de las mismas. En un primer paso, los péptidos se unen a la membrana adoptando una estructura secundaria anfipática, principalmente de hélices α con la cara polar de la hélice expuesta a las cabezas polares de los lípidos y la cara hidrofóbica embebida en la región hidrofílica de la bicapa (Weiprecht *et al.*, 1997). Luego, se destruye la membrana y ocurre muerte celular; o los péptidos se internan en el citoplasma e inhiben alguna función vital como la síntesis de proteínas y de su ADN.

A lo largo de este capítulo se describen algunos de los AMPs más estudiados, sus características y mecanismos de acción.

1.1 FUENTES DE OBTENCIÓN

La expresión de los AMPs puede ser constitutiva o inducible por infecciones y/o estímulos inflamatorios, tales como citoquinas proinflamatorias, moléculas bacterianas que

inducen inmunidad innata, como lipopolisacáridos (LPS) (Cunliffe, y Mahida, 2004; Hancock, 2001). Estos AMPs son importantes moléculas efectoras del sistema inmune innato (Bowdish *et al.*,2005). Son capaces de inducir fagocitosis, estimular la liberación de prostaglandinas, neutralizar los efectos sépticos de LPS y promover acumulación de varias células inmunes en sitios de inflamación (Elsbach, 2003, Yang *et al.*, 2002).

Aunque estos péptidos pueden tener un efecto directo sobre los microorganismos, como provocar daño o desestabilización en la membrana u otros blancos de bacterias y hongos, también parecen estar ampliamente involucrados en las respuestas inmunes (Hancock y Diamond, 2000). A la fecha, se han identificado cientos de AMPs (Hancock y Chapple, 1999.), lo que indica su importancia en el sistema inmune innato (Hancock y Diamond, 2000). Se han aislado de todas las especies vivas, vertebrados, invertebrados, bacterias, hongos y plantas, algunos de los más estudiados se enlistan en la **Tabla 1.1**. A continuación se enumeran las principales fuentes de obtención de AMPs.

1.1.1 AMPs de Mamíferos

Los péptidos de mamíferos han demostrado tener un papel activo en la transición de inmunidad innata a adaptativa al ser quimiotácticos para monocitos humanos y células T y por exhibir efectos en el desarrollo de células dendríticas. Aunque estos péptidos tienen efectos directos en microorganismos, dañando o desestabilizando la membrana de bacterias, y hongos, parecen estar muy involucrados en la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria, por lo que cada vez más son referidos como péptidos de defensa (Jensen *et al.*, 2006). Algunos ejemplos de péptidos de mamíferos y sus características particulares se enuncian a continuación.

Tabla 1.1 Péptidos antimicrobianos.

AMP	Fuentes de obtención	Referencia
Alameticina	Hongos (<i>Trichoderma viride</i>)	Vodyanoy <i>et al.</i> , 1983
Apidaecina	Hemolinfa de insectos	Casteel <i>et al.</i> , 1989
Bacitracina	Bacteria (<i>Bacillus subtilis</i> var Tracy)	Johnson <i>et al.</i> , 1945
Bactenecina	Neutrófilos de bovino	Gennaro <i>et al.</i> , 1989
Bacteriocina	Ribosoma de bacterias	Papagianni, 2003
Bombinina	Rana <i>Bombina variegata</i>	Mignogna <i>et al.</i> , 1993
Brevinina	Piel de <i>Rana brevipoda porsa</i>	Morikawa <i>et al.</i> , 1992
Buforina	Sapos	Park <i>et al.</i> , 1998 (a)
Caerina	Piel de rana <i>Litoria splendida</i>	Stone <i>et al.</i> , 1992
Catelicidina	Epitelio y fagocitos de mamíferos	Zanetti <i>et al.</i> 1995
Cecropina	Insectos	Steiner <i>et al.</i> , 1981
Clavanina	Hemocitos de tunicados	Lee <i>et al.</i> , 1997
Defensina	Vertebrados, invertebrados, plantas	Ganz <i>et al.</i> 2003
Dermaseptina	Ranas, género <i>Phyllomedusidae</i>	Krugliak <i>et al.</i> , 2000
Esculentina	Piel de ranas de la familia Ranidae	Ponti <i>et al.</i> , 1999
Gallinacina	Aves	Brockus <i>et al.</i> , 1998
Gramicidina	Bacteria (<i>Bacillus brevis</i>)	Ketchem <i>et al.</i> , 1996
Histatina	Saliva de humanos	Oppenheim <i>et al.</i> , 1988
Indolicidina	Neutrófilos de bovinos	Selsted <i>et al.</i> , 1992
Inhibidores proteasa	Plantas	Joshi <i>et al.</i> , 1998
Lactoferricina	Derivado de lactoferrina	Wakabayashi <i>et al.</i> , 2003
Lantibiotico	Bacterias	Jung, 1991
LTP*	Mamíferos, bacterias, hongos, plantas	Selitrennikoff, 2001
Magainina	Piel de rana	Zasloff, 1987
Mastropano	Veneno de avispa	Hirai <i>et al.</i> , 1979
Melitina	Veneno de abejas	Habermann., 1972
Moricin	Gusano de seda (<i>Bombyx mori</i>)	Hara y Yamakawa, 1995
Parasin	Mucosa de la piel del pez gato	Park <i>et al.</i> , 1998 (b)
Pardaxina	Pez lenguado de Moisés	Lazarovici <i>et al.</i> , 1986
Peptaibol	Hongos (<i>Trichoderma virens</i>)	Wiest <i>et al.</i> , 2002
Polifemusina	Cangrejo	Powers <i>et al.</i> , 2004
Polimixina	Bacterias (<i>Bacillus polymyxa</i>)	Gales <i>et al.</i> , 2001
PR*	Plantas	Selitrennikoff, 2001
Profenina	Leucocitos de mamíferos	Harwig <i>et al.</i> , 1995
Protegrina	Leucocitos de mamíferos	Kokryakov <i>et al.</i> , 1993
Ranalexina	Piel de <i>Rana catesbeina</i>	Clark <i>et al.</i> , 1994
Glicina/histidina	Insectos	Lee <i>et al.</i> , 1995
RIP*	Plantas	Iglesias <i>et al.</i> , 1993
Taquiplesina	Cangrejo de herradura	Shigenaga <i>et al.</i> , 1990
Tenecina	Insectos	Kim <i>et al.</i> , 1998
Temporinas	Ranas	Simmaco <i>et al.</i> , 1996
Tionina	Plantas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1991
Tipo ciclofilina	Mamíferos, bacterias, hongos, plantas	Ostoa-Saloma <i>et al.</i> , 2000
Tipo heveína	Plantas	Lee <i>et al.</i> , 1991
Tipo knottin	Plantas	Broekaert <i>et al.</i> , 1997
Toxinas “Killer”	Hongos	Magliani <i>et al.</i> , 1997

*Siglas en inglés: LTP, Lipid Transfer Protein; PR, Patogenesis Related; RIP, Ribosome-Inactivating Protein.

Histatinas. Es una familia de al menos 12 péptidos obtenidos de saliva, catiónicos y ricos en histidina. Los más abundantes son las Histatinas 1, 3 y 5, que contienen 38, 32 y 24 residuos de aminoácidos respectivamente. El interés original por estos péptidos se debió al hecho de que eran adsorbidos en la hidroxiapatita (Hay, 1973), por lo que se les consideraba el principal precursor de la estructura proteínica de la superficie de los dientes o de la película de esmalte. Adicionalmente, las histatinas inhiben la precipitación de sales de fosfato de calcio de soluciones supersaturadas, proveyendo un ambiente termodinámico favorable para el mantenimiento del esmalte de los dientes. Años después se estableció su actividad contra un amplio espectro de hongos patógenos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus* (Oppenheim *et al.*, 1988). Dada su actividad *in vitro* y su relativa abundancia en secreciones sublinguales y de la parótida, estos péptidos pueden representar componentes principales de un sistema de defensa no inmune involucrado en el mantenimiento de la salud oral.

Varios estudios han mostrado que las histatinas son capaces de traslocarse a través de la membrana citoplasmática. Los primeros pasos de la interacción no se conocen todavía, pero la internación ya se determinó para las histatinas 3 y 5 (Xu *et al.*, 1999; Gyurko *et al.*, 2001). Una vez dentro del citosol del hongo, la histatina 5 llega a la mitocondria y comienza la disipación del potencial transmembranal de la célula, indicando un detrimento en la función mitocondrial por un mecanismo directo o indirecto del ataque. Estas observaciones son muy interesantes pues se sabe que las mitocondrias juegan un papel clave en la apoptosis y la necrosis celular. Aunque se han descrito varios fenómenos durante la exposición de levaduras a la histatina 5, no está claro cuales de estos eventos son

tangenciales y cuales son centrales en el mecanismo fungicida. Como consecuencia, el mecanismo de acción de las histatinas no se ha establecido (Helmerhorst *et al.*, 2001).

Defensinas. Éstas forman una de las familias más grandes de AMPs, son péptidos pequeños ricos en cisteínas y divididos en tres subfamilias: α - y β -defensinas, de acuerdo con la unión de sus seis residuos de cisteínas y θ -defensinas, de naturaleza macrocíclica (**Figura 1.1A**). Las α - y β -defensinas están ampliamente distribuidas en especies de vertebrados, mientras que las θ -defensinas sólo se han identificado en neutrófilos y monocitos de macacos (Tang *et al.*, 1999). Dependiendo de la especie, las α - y β -defensinas se encuentran en diferentes tejidos como gránulos de neutrófilos, macrófagos, células NK, tejido epitelial, piel, mucosas, tracto urinario y fluidos corporales. Su expresión puede ser constitutiva, como la β -defensina humana (hBD-1) en la mayoría de los tejidos (Duits *et al.*, 2002); o inducible, como la hBD-2 cuya expresión es regulada de acuerdo con la exposición a bacterias o lipopolisacáridos (Fang *et al.*, 2003). Estudios *in vitro* demuestran que las defensinas poseen una baja actividad microbicida contra bacterias, hongos y algunos virus y que su actividad bactericida es antagonizada por crecientes concentraciones de sal (aproximadamente 100mM de sales monovalentes y 2mM de sales divalentes), sin embargo, la alta concentración de α -defensinas en algunos tejidos, particularmente en los gránulos de fagocitos y en el intestino, hacen pensar que son suficientes para eliminar las bacterias a pesar del antagonismo de las sales (Ayabe *et al.*, 2000).

Lactoferricina. Se identificó como un producto de la digestión con pepsina de la lactoferrina, una proteína multifuncional de defensa innata de la leche (**Figura 1.1B**). La

lactoferricina inhibe el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos como bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras, hongos y protozoarios. Actúa perturbando la membrana celular (Wakabayashi *et al.*, 2003).

Indolicidina. El triptófano, la prolina y aminoácidos básicos son residuos que se consideran de vital importancia en el ensamble y la estructura de proteínas de membrana (**Figura 1.1C**). La indolicidina es un péptido antimicrobiano de 13 residuos, aislado de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos de bovino, altamente enriquecido en este tipo de aminoácidos, cinco triptófanos, tres prolinas, tres residuos básicos y ninguno ácido. Consistente con la probable importancia de esos aminoácidos en el ensamble de proteínas de membrana, la indolicidina es conocida por ser altamente activa y se cree que actúa por ruptura de las membranas celulares (Ladokhin *et al.*, 1997).

Catelicidinas. Aisladas de fagocitos de mamíferos. Están definidas por un motivo común, catelina, en el extremo amino, aparentemente el motivo responsable de la actividad microbicida, y un dominio C-terminal muy variable. Muchas, pero no todas, las catelicidinas tienen un sitio de división de elastasa entre el dominio aniónico de catelina y la región catiónica carboxiterminal. El producto proteolítico en este sitio es el péptido activo en neutrófilos bovinos (Zanetti *et al.*, 1995) y porcinos (Panyutich *et al.*, 1997). En contraste, las catelicidinas de conejo, p15a y p15b, no tienen este sitio, su dominio catelina es menos aniónico y son activas sin proceso proteolítico (Weinrauch *et al.*, 1995). Las catelicidinas están localizadas en los gránulos de neutrófilos que son fácilmente liberados dentro del fluido extracelular, sugiriendo que los péptidos pueden funcionar inicialmente en espacios extracelulares (Shi y Ganz, 1998).

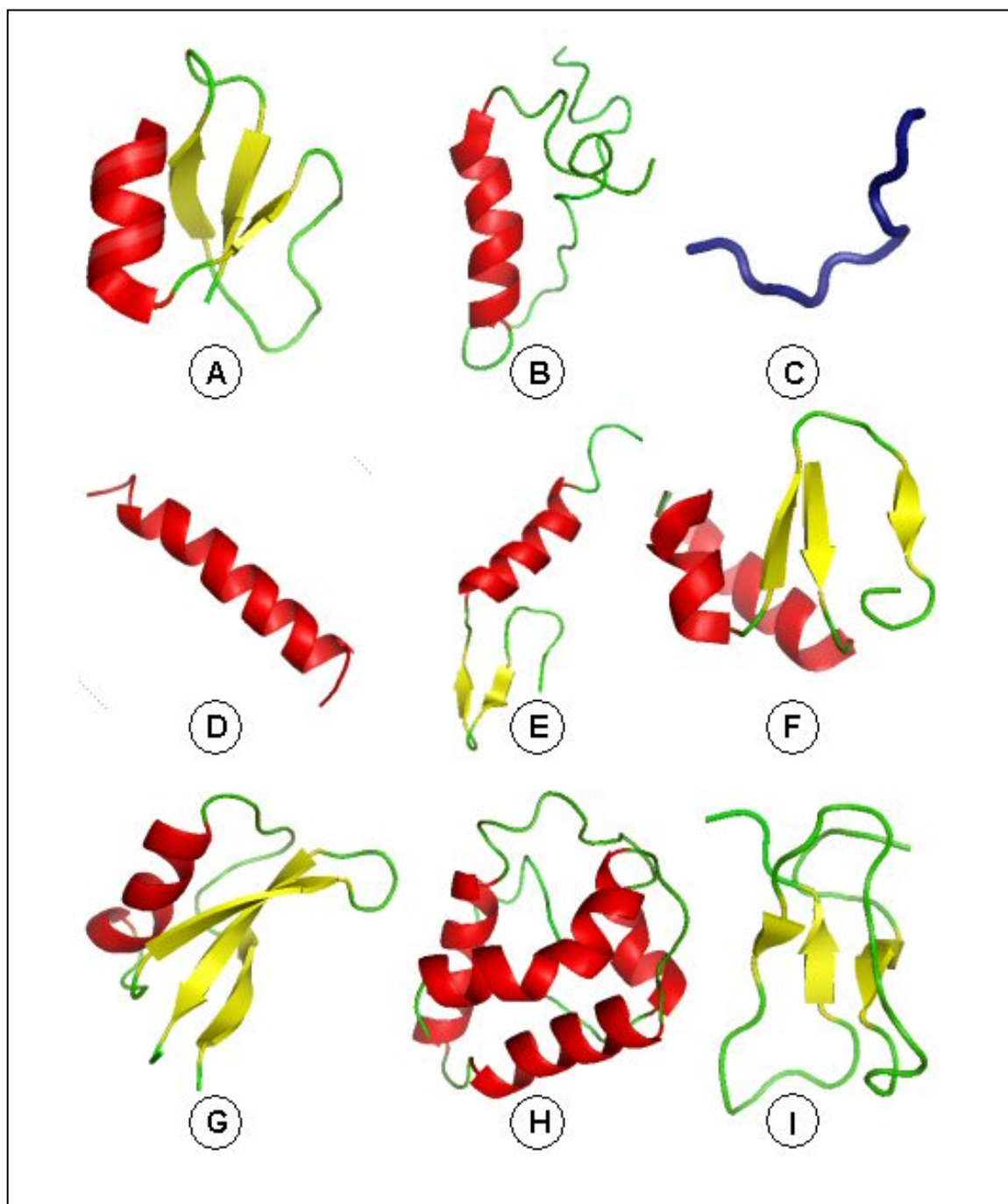


Figura 1.1 Estructura de diferentes clases de AMPs.

(A) β -defensina humana (Pazgier *et al.*, 2007); (B) Lactoferricina de humano (Hunter *et al.*, 2005); (C) Indolicidina de bovino (Rozek *et al.*, 2000); (D) Magainina (Gesell *et al.*, 1997); (E) Bacteriocín de *Leuconostoc gelidum* (Wang *et al.*, 1999); (F) Tionina de *Crambe abyssinica* (Teeter *et al.*, 1993); (G) Defensina de planta (*Aesculus hippocastanum*) (Fant *et al.*, 1999); (H) LTP de semillas de arroz (Poznansky *et al.*, 1999); (I) Péptido tipo “Knottin” de *Phytolacca americana* (Gao *et al.*, 2001).

1.1.2 AMPs de Anfibios

La piel de muchos anfibios contiene altas concentraciones de péptidos antimicrobianos, con aproximadamente 500 descritos a la fecha, ésto representa una gran proporción del número total de péptidos antimicrobianos reportados. Estas moléculas se producen y almacenan en estructuras dérmicas llamadas glándulas granulares, las cuales liberan su contenido a la superficie externa de la rana cuando hay un estímulo adrenérgico o un daño físico (Bevins *et al.*, 1990). Al igual que otros AMPs de origen animal, los AMPs de anfibios son sintetizados como precursores inactivos más grandes y luego de una división proteolítica producen el péptido activo. Los últimos reportes han demostrado que los péptidos de las glándulas granulares de *Rana esculenta* y *Bombina* sp. son expresados en respuesta a ataque microbiano (Mangoni *et al.*, 2001). Estas moléculas tienen carga positiva, la mayoría tiende a formar hélices anfipáticas. Sin embargo, cada género de anfibios parece contener una familia de péptidos con secuencia de aminoácidos y espectro de actividad biológica distintivos. Las principales familias de estos péptidos son las bombininas y bombininas H de *Bombina variegata* y *Bombina orientalis* (Mignogna *et al.*, 1993); las magaininas de la rana africana *Xenopus leavis* (Zaslhoff, 1987); las dermaseptinas de la rana arbórea de Suramérica *Phyllomedusa sauvaggi* (Krugliak *et al.*, 2000); y los extraídos del género *Rana*, brevininas, ranalexinas, ranateurinas, esculentinas y temporinas (Mangoni *et al.*, 2007). A continuación se da un breve descripción de los AMPs más estudiados obtenidos de anfibios.

Magaininas. Son el prototipo de péptido antimicrobiano de anfibios, pues fueron los primeros péptidos aislados de estos animales (**Figura 1.1D**). Son altamente eficientes en la permeación de membranas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, y

levaduras, sin exhibir una toxicidad significativa contra células de mamíferos. La relación estructura-función de la magainina ha sido muy estudiada, razón por la cual, estos péptidos se han empleado como molde para desarrollar, sin éxito hasta el momento, un péptido útil para tratamiento clínico. Su toxicidad selectiva se puede explicar parcialmente por las interacciones preferenciales de las magaininas con los fosfolípidos aniónicos, abundantes en las membranas bacterianas (Matsuzaki, 1998).

Dermaseptinas. Son una gran familia de péptidos que contienen entre 28 y 34 residuos de aminoácidos. Son producidos por la piel de ranas arbóreas pertenecientes al género *Phyllomedusidae* (Krugliak *et al.*, 2000). Las dermaseptinas son péptidos lineales policatiónicos, con una estructura α helicoidal en disolventes polares (Mor y Nicolas, 1994). Tienen actividad citolítica *in vitro* contra un amplio espectro de microorganismos patógenos (bacterias, protozoarios y hongos filamentosos) (Coot *et al.*, 1998). Además son muy potentes contra bacterias de crecimiento lento, sugiriendo un uso potencial para la erradicación de bacterias en estado latente, ya que la mayoría de los bactericidas convencionales no son efectivos contra éstas.

Se cree que la unión de estos péptidos a la membrana representa un primer paso en una serie de eventos que conducen finalmente a una fusión de la bicapa con el péptido, lo cual desestabiliza la estructura de la membrana microbiana, resultando en permeación y muerte celular (Krugliak *et al.*, 2000). La selectividad antimicrobiana de estos péptidos es mediada por una interacción selectiva de los motivos de hélices anfipáticas con la membrana fosfolipídica (De Lucca *et al.*, 1998). A concentraciones antimicrobianas, las

dermaseptinas no son tóxicas para los eritrocitos, con excepción de la dermaseptina S4 (Ghosh *et al.*, 1997).

Bombininas H. Se refiere a una familia de péptidos hidrofóbicos de 17 a 20 residuos de aminoácidos, aislados de la piel de *Bombina variegata* y *Bombina orientalis*. Todas están amidadas en el extremo carboxilo y adoptan una estructura predominantemente α helicoidal anfipática en ambientes transmembranales. Son activos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras y promastigotos y amastigotos de parásitos de *Leishmania*, pero también son hemolíticos contra eritrocitos de mamíferos. Algunos de ellos contienen un residuo D-aloisoleucina en su secuencia (Mangoni *et al.*, 2007).

Temporinas. La primera fue identificada en 1996 en la secreción de la piel de la rana roja europea *Rana temporaria* (Simmaco *et al.*, 1996), luego se purificaron de otras especies norteamericanas y asiáticas. Las temporinas están entre los AMPs más pequeños encontrados en la naturaleza. Al contrario de la mayoría de los AMPs de Ranidae, como las brevininas, ralexinas, ranateurinas y esculentinas, las temporinas carecen del anillo en el extremo carboxilo estabilizado por dos puentes disulfuro, su extremo está amidado como resultado de una reacción enzimática postraducciona (Bradbury *et al.*, 1991).

Hasta la fecha, las temporinas son la familia más grande de AMPs, con más de 50 miembros (Conlon, 2006) y más de 10 isomorfos se han aislado de un solo espécimen. El blanco de las temporinas no está claro todavía, su actividad está gobernada por sus características fisicoquímicas (secuencia, distribución de cargas, estado oligomérico,

anfipaticidad y helicidad) pero además por el tipo de superficie de la célula blanco y su metabolismo. Son activas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y contra hongos, sin afectar la viabilidad de células sanas de mamíferos (Mangoni *et al.*, 2007).

Caerinas. Aisladas de la rana australiana *Litoria splendida* (Stone *et al.*, 1992) y de ranas de la familia Ranidae (Horikawa *et al.*, 1985). Difieren de los demás péptidos en que contienen dos residuos de cisteínas, unidas por un puente disulfuro, en el extremo carboxilo.

Esculentinas. Familia que contiene péptidos de 46 residuos de aminoácidos y han sido aislados sólo de la piel de *Rana esculenta*. Las esculentinas son los péptidos más grandes aislados hasta ahora de la piel de anfibios y, a pesar de obtenerse en pequeñas cantidades, son altamente activas contra un amplio espectro de microorganismos y con un mínimo efecto en membranas de células eucarióticas (Ponti *et al.*, 1999).

1.1.3 AMPs de Invertebrados

Dado que los invertebrados carecen de inmunidad adaptativa, dependen exclusivamente de su sistema de inmunidad innata para contraatacar los patógenos invasores. Teniendo en cuenta el considerable éxito evolutivo de estos organismos, es evidente que su inmunidad innata es extremadamente efectiva. Por esta razón se han hecho muchos estudios en especies invertebradas tal como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, la cual se ha convertido en un sistema modelo para el estudio de la inmunidad innata y ha conducido al descubrimiento de estrategias del sistema inmune, como los receptores de reconocimiento

de patógenos (receptores “*Toll*”), que están conservados en organismos superiores, incluyendo mamíferos (receptores “*Toll-like*”).

Ya se han identificado numerosos péptidos antimicrobianos de invertebrados. Se han encontrado en la hemolinfa (plasma y hemocitos), en las células fagocíticas y en ciertas células epiteliales. Se pueden expresar constitutivamente, por ejemplo, en hemocitos de artrópodos marinos como camarón, ostras y cangrejos (Bachere *et al.*, 2004) o inducidos en respuesta al reconocimiento de patógenos, como ocurre con los péptidos en *Drosophila* (Lemaitre *et al.*, 1996). Su actividad biológica está dirigida principalmente contra bacterias y hongos.

Dentro de los AMPs de invertebrados más representativos están las cecropinas, la melitina, las taquiplesinas y las polifemusinas. Estas últimas son los antibacterianos más potentes y además muestran actividad contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Masuda *et al.*, 1992). Por otro lado, las defensinas, con tres o cuatro puentes disulfuro son las más abundantes.

1.1.4 AMPs de Aves

En la actualidad la información acerca del perfil, la potencia y el papel defensivo de los AMPs en el tracto gastrointestinal de las aves es escasa. Su estudio es especialmente importante, pues las aves son universalmente reconocidas como el principal reservorio de enteropatógenos de humanos, siendo, la mayoría de ellos, asintomáticos. A la fecha, se han caracterizado cuatro péptidos de aves, llamados gallinacinas (Evans *et al.*, 1995). Todos

son homólogos de las β -defensinas y son activos contra *Salmonella enteritidis* y *Campylobacter jejuni* (Townes *et al.*, 2004).

1.1.5 AMPs de Bacterias

Los AMPs producidos por bacterias están entre los primeros que fueron aislados y caracterizados (Mattick *et al.*, 1947). Ellos no protegen contra infecciones en el sentido clásico, pero contribuyen a la supervivencia de las células bacterianas al matar otras bacterias que compiten por nutrientes en el mismo medio (**Figura 1.1E**). También llamados bacteriocinas, son producidos por la mayoría de las bacterias y son extremadamente potentes comparadas con la mayoría de los AMPs de eucariotas (Riley, 1998). Sus actividades pueden ser de amplio espectro o no, pueden ser activas contra bacterias de la misma especie o de un género diferente. Las bacteriocinas son de síntesis ribosomal, constituyen un grupo de péptidos con gran diversidad estructural y se clasifican en dos categorías: los que contienen lantionina, llamados lantibióticos, y los que no contienen lantionina (Cotter *et al.*, 2005).

Los lantibióticos están caracterizados por la inclusión de un aminoácido inusual, la lantionina, un aminoácido no proteínogénico con fórmula química (HOOC-CH(NH₂)-CH₂-S-CH₂-CH(NH₂)-COOH), y la necesidad de modificaciones postraduccionales para adquirir su forma activa. El más estudiado es la nisina, producido por *Lactococcus lactis*, que ha sido usado por casi 50 años como preservador de alimentos sin desarrollo de resistencia. Este péptido es extremadamente potente contra una variedad de bacterias Gram-positivas. Además de formar poros, interfiere con la transglicosilación del lípido II, un paso necesario

en la síntesis de peptidoglicanos (Brumfitt *et al.*, 2002). Otro antibiótico importante es la mersacidina, un péptido tetracíclico producido por *Bacillus* spp. (Chatterjee *et al.*, 1992), el cual es importante debido a su posible aplicación en el tratamiento de especies de bacterias que han desarrollado resistencia a antibióticos, pues presenta actividad contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (van Kraaij *et al.*, 1999).

Algunas de las bacteriocinas que no poseen lantionina son las polimixinas, péptidos cíclicos con una gran cola hidrofóbica, producidos por *Bacillus polymyxa*. Son activas contra bacterias Gram-negativas, especialmente *Pseudomonas*, y hongos; además, son altamente neurotóxicas y pobremente absorbidas por el tracto gastrointestinal. Las polimixinas cruzan la membrana externa de las bacterias Gram. negativas (vía de autpromoción) provocando, por competencia, el desplazamiento de los cationes divalentes del conjunto de policationes de la membrana, así, los péptidos cruzan la membrana unidos no covalentemente a los polisacáridos. En consecuencia, la membrana externa se distorsiona y se hace más permeable. De las cinco polimixinas conocidas, A a E, sólo la B y la E, colistina, han avanzado a uso terapéutico (Gales *et al.*, 2001).

1.1.6 AMPs de Hongos

Los más conocidos son los peptaiboles, una familia de péptidos de cadenas cortas, aproximadamente 20 residuos de aminoácidos, aislados de hongos del suelo, caracterizados por una alta porción de aminoácidos α,α -dialquilados con abundancia de ácido α -aminoisoburítico, también contiene el imino ácido hidroxiprolina, además, tiene el extremo amino acetilado y el extremo carboxilo hidroxilado. Exhiben actividad antibiótica

formando canales iónicos en las membranas de lípidos y son activos contra hongos y bacterias. Algunos péptidos de esta familia son: alameticina, anti amoebina, cefaibol, crisopermina, tricotoxina, zervamicina, entre otros (Wiest *et al.*, 2002).

Otro tipo de AMPs de hongos son las proteínas “*killer*”, secretadas por hongos y levaduras y letales contra células fúngicas sensibles, sin embargo, los hongos son resistentes a sus propias toxinas. Varían en masa de 10.7 a 156.5 kDa y son potentes antifúngicos. Tienen varios mecanismos de acción, pero el primer paso es la unión de la toxina al receptor específico de la superficie celular. Una vez unida, la toxina se internaliza y puede afectar la síntesis de pared celular, la síntesis de ADN, la actividad del canal de potasio, inhibir la síntesis de (1,3)- β -glucano, o detener el ciclo celular (Selitrennikoff, 2001).

1.1.7 AMPs de Plantas

Las plantas están expuestas a un gran número de bacterias y hongos patógenos y, aunque no poseen inmunidad adaptativa, han desarrollado varios mecanismos de defensa como la síntesis de compuestos de bajo peso molecular, proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana. Los AMPs de plantas son principalmente antifúngicos y hay cientos conocidos, todos con un número par de cisteínas, 4, 6 u 8, conectadas por puentes disulfuro y, de acuerdo con su papel defensivo, se encuentran en hojas, flores, semillas o tubérculos. Sus mecanismos de acción son muy diversos e incluyen degradación de la pared celular del hongo, formación de poros en la membrana, daño al ribosoma, inhibición de la síntesis de ADN, inhibición del ciclo celular, entre otros (Selitrennikoff, 2001).

Los AMPs de plantas se han clasificado y nombrado de acuerdo con su mecanismo de acción (glucanasas), estructura (ricos en cisteína) o similitud con una proteína conocida (tipo-heveína), algunos son enunciados a continuación.

Proteínas PR-1. Se acumulan a altos niveles luego de una infección patogénica. Se han encontrado en arroz, maíz, trigo, tabaco y muchas otras plantas. Tienen actividad a niveles micromolares contra varios hongos patógenos de plantas incluyendo *Uromyces fabae*, *Phytophthora infestans* y *Erysiphe graminis* (Niderman, *et al.*, 1995). Tienen masas de 15 a 17 KDa y tienen similitud con la superfamilia de proteínas ricas en cisteína. El mecanismo preciso de acción no se conoce, pero se sospecha que inhibe la liberación de Ca^{2+} (Morrisette *et al.*, 1995).

Proteínas PR-2 (β -glucanasas). Se encuentran en granos y frutos del tabaco, son activas a concentraciones micromolares contra un amplio número de hongos, incluyendo patógenos humanos como *Rhizoctonia solani*, *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*. Su actividad se ha comprobado por ensayos y por sobreexpresión usando plantas transgénicas. La actividad se cree es debida a que la PR-2 hidroliza el (1,3) β -glucano presente en la pared celular del hongo, resultando en una pared celular débil, lo que conlleva a lisis y muerte celular (Stintzi *et al.*, 1993).

Proteínas PR-3 (quitinasas). Muchos ensayos bioquímicos han demostrado la actividad quitinasa de estas proteínas. La mayoría tiene masas moleculares entre 26 y 43 KDa. Se han aislado de hongos, plantas, bacterias y tienen una potente actividad antifúngica contra

patógenos humanos y de plantas, incluyendo *Trichoderma reesei*, *Alternaria solani*, *Alternaria radicina*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Guignardia bidwellii*, *Botrytis cinerea* y *Coprinus comatus*. Las PR-3 son endoquitinasas que dividen los polímeros de quitina de la pared celular *in situ*, resultando en un debilitamiento de ésta, lo que provoca células de hongos osmóticamente sensibles. Se puede observar sinergismo entre PR-2 y PR-3 (Jach *et al.*, 1995).

Proteínas PR-4. Son proteínas que se unen a quitina, tienen masas moleculares entre 13 y 14.5 KDa. Se han aislado de tabaco, cebada y tomate, entre otras. Son activas contra diferentes patógenos como: *Trichoderma harzianum*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* y *B. cinerea*. La actividad es probablemente el resultado de la unión de la proteína a la β -quitina de la pared celular del hongo, por mecanismos que no se entienden, esto resulta en la perturbación de la polaridad celular, con concomitante inhibición del crecimiento (Bormann *et al.*, 1999).

Proteínas PR-5. Se han aislado de maíz, soya, arroz, trigo, tabaco, tomate, calabaza, frijol y cebada, entre otras. La mayoría de estas proteínas tienen masas moleculares de, aproximadamente, 22 kDa y su estructura terciaria está estabilizada por ocho puentes disulfuro, lo que las hace muy resistentes a la degradación por proteasas. Su mecanismo de acción no se ha establecido, pero se ha observado actividad antifúngica frente a diferentes patógenos (Coca *et al.*, 2000).

Tioninas. Representan una familia de péptidos de 45 a 47 residuos de aminoácidos. Se han dividido en al menos dos subgrupos, las que poseen 8 cisteínas formando 4 puentes disulfuro y las que poseen 6 cisteínas y forman 3 puentes disulfuro. Poseen mucha variedad en los residuos de su cadena, sólo se conservan las posiciones de las cisteínas, un residuo aromático en la posición 13 y una arginina en la posición 10. Los estudios de la estructura tridimensional de las tioninas han mostrado un plegamiento global conservado. La estructura está caracterizada por una forma de “L”, el brazo más largo está formado por dos α hélices antiparalelas y la corta por una doble cadena de filamentos β antiparalelos. Tienen estructura anfipática, los residuos hidrofóbicos están agrupados en la superficie externa del brazo largo de la L, mientras los residuos hidrofílicos están en la superficie externa de la esquina de la L (**Figura 1.1F**).

Las tioninas se han aislado de una amplia variedad de especies de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Son reconocidas como potentes antibacterianos y antifúngicos. El mecanismo de acción antifúngica se investigó por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* (Okada *et al.*, 1973) y se encontró que las tioninas causan permeación de las células de la levadura y ocasionan pérdida de K^+ y PO_4^{-3} , esenciales en la formación de ATP, sin el cual se bloquean los procesos energéticos (Guihard *et al.*, 1993). Además, para el hongo filamentoso *Neurospora crassa* se encontró que las tioninas pueden causar una liberación substancial de ácido ^{14}C -isoaminobutírico sin metabolizar, y la curva de liberación de éste correlaciona con la de inhibición de crecimiento del hongo, lo que indica que la liberación del ácido puede resultar del proceso de permeación (Theviessen *et al.*, 1996). El cambio en la permeabilidad de la membrana celular de los hongos puede ser

el resultado de una interacción directa entre la membrana de fosfolípidos y las tioninas, ensayos usando bicapas lipídicas planas han mostrado que las tioninas pueden alterar las propiedades fisicoquímicas y eléctricas de las membranas a concentraciones relativamente bajas (1 $\mu\text{g/mL}$).

Defensinas. Guardan similitud con las tioninas en que tienen el mismo tamaño y poseen 8 cisteínas enlazadas con puentes disulfuro, pero se diferencian en su estructura tridimensional, ya que las defensinas poseen una triple cadena de filamentos β antiparalelos y una hélice α (**Figura 1.1G**). Otra característica es que su secuencia de aminoácidos está muy poco conservada entre defensinas de diferentes plantas, los residuos conservados son las cisteínas, dos glicinas en las posiciones 13 y 34, un residuo aromático en la posición 11 y un ácido glutámico en la posición 29. Se han aislado de más de una docena de plantas y lo más probable es que estén presentes en todas las especies. Los tejidos en los cuales se encuentran son hojas (Kragh *et al.*, 1995), tubérculos (Moreno *et al.*, 1994), órganos de flores (Gu *et al.*, 1992), frutos secos como almendras y nueces (Chiang *et al.*, 1991) y semillas (Méndez *et al.*, 1990).

Se les ha reportado actividad antifúngica fuerte y por esto se clasifican en morfogénicas que causan elongación hifal con un incremento en la ramificación y las no morfogénicas que sólo disminuyen la elongación pero no inducen distorsiones morfológicas. No se sabe exactamente cómo inhiben el crecimiento fúngico, pero se tienen pruebas de que no afectan la permeabilidad (Thevissen *et al.*, 1996; Broekaert *et al.*, 1997).

RIPs. Son ARN N-glicosidasas que eliminan purinas del rARN, lo que resulta en inhibición de la síntesis de proteínas debido a daño ribosomal (Barbieri *et al.*, 1993). Se ha demostrado que inhiben la síntesis de proteínas, *in vitro* e *in vivo*, de mamíferos, bacterias, hongos y plantas (Iglesias *et al.*, 1993). Se han clasificado en tres grupos: las RIP tipo 1, de cadena única, N-glicosiladas con masas moleculares de 11 a 190 kDa. Las tipo 2, que contienen dos cadenas, una N-glicosilada (cadena A) y la otra una lectina de unión a células (cadena B), tiene masas moleculares de, aproximadamente, 60kDa (Zhang *et al.*, 1999), una de las más tóxicas de este grupo es la ricina. Las tipo 3, tienen cuatro cadenas organizadas como dos dímeros de RIPs tipo 2. Las RIPs tiene actividad antifúngica intrínseca debida a su habilidad para inactivar ribosomas *in vitro*. Estudios recientes con una RIP tipo 2 mostraron que la cadena B se une a las células fúngicas formando un canal que permite a la cadena A internarse y causar daño al ARN (Zhang *et al.*, 1999). El modo exacto como se interna se desconoce. Las RIPs tipos 1 y 2 tienen una excelente actividad contra hongos patógenos de plantas y humanos.

LTPs. Estas proteínas tienen la capacidad de transferir fosfolípidos entre membranas, son pequeñas, de 90 a 93 aminoácidos. Se han aislado de varias especies y diferentes órganos como hojas, semillas, tallos y flores (Cammue *et al.*, 1995). Estudios estructurales han revelado un plegamiento muy conservado, estabilizado por cuatro puentes disulfuro y que consiste de un nudo de cuatro α hélices, enlazadas por asas flexibles y un centro, tipo túnel, hidrofóbico en el que se acomodan los ácidos grasos (**Figura 1.1H**). El mecanismo de acción es desconocido, pero puede ser que se inserten dentro de la membrana celular del

hongo y su cavidad hidrofóbica forme un poro, permitiendo el flujo hacia fuera de iones intracelulares conduciendo a la muerte celular (Selitrennikoff, 2001).

Tipo heveína. La heveína es un péptido de unión a quitina de 4.7kDa y rica en cisteína. Se aisló por primera vez del látex del árbol del caucho (Archer *et al.*, 1969). Muchos péptidos de unión a quitina comparten un dominio rico en cisteínas, de cerca de 40 residuos, que ha mostrado ser el sitio responsable de la unión a quitina (Lee *et al.*, 1991). Los péptidos tipo heveína, al contrario de la heveína, son potentes antifúngicos y contienen ocho cisteínas unidas por puentes disulfuro, excepto las de semillas de amaranto que sólo contienen seis. Su mecanismo de acción es la inhibición del crecimiento hifal del hongo al unirse a la quitina, además, pueden causar filtración del material citoplasmático al unirse a las hifas (Koo *et al.*, 1998).

Tipo “Knottin”. Fueron aisladas por primera vez de *Mirabilis jalapa*. Contienen seis cisteínas unidas por puentes disulfuro, las cisteínas pueden ser relativamente bien alineadas con aquellas de un grupo de péptidos llamados “Knottins”, de allí su nombre (Chagola-López *et al.*, 1994), Los péptidos tipo “knottin” incluyen el inhibidor de α -amilasa de las semillas de amaranto, toxinas de moluscos *Conus* que se unen a los canales de calcio y el péptido de *Gymnea sylvestre*. Las “knottins” tienen un plegamiento tipo nudo (knot), con 3 filamentos β que forman una hoja β compacta y una asa larga conectando el primer y segundo filamento (**Figura 1.1I**). Desde el punto de vista estructural, los péptidos tipo “knottin” están relacionados, distantemente, con los péptidos tipo heveína en su motivo cisteína (C-C-CC-C-C) y los puentes disulfuro (Broekaert *et al.*, 1997). Inhiben un amplio

rango de hongos y bacterias Gram-positivas, pero en presencia de cationes divalentes pierden su actividad.

Inhibidores de proteasas. Los inhibidores de proteasas serínicas (tripsina y quimotripsina) y las proteasas cisteínicas, han emergido como una clase de proteínas antifúngicas contra patógenos de plantas y animales. Los inhibidores de proteasas cisteínicas se han aislado de varias plantas y forman un cuarto grupo de cistatinas, las fitocistatinas (Blanco-Labra *et al.*, 1980) con masas moleculares entre 10 y 12 kDa, y son activas contra patógenos de plantas como el *Fusarium solani* y *Trichoderma reesei* (Joshi *et al.*, 1998). Su mecanismo de acción se desconoce.

Los inhibidores de proteasas serínicas que tienen actividad antifúngica también tienen la capacidad de inhibir la actividad de la α -amilasa de los insectos (Schimoler-O'Rourke *et al.*, 2001) pero su mecanismo de acción aún no se entiende.

1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN

Entender el o los mecanismos de permeación de la membrana es crucial para el desarrollo de nuevos antibióticos a partir de AMPs. El primer grupo de AMPs estudiados fueron las α -hélices anfipáticas lineales y en los estudios primarios se sugirió que éstos formaban poros transmembranales (Ludtke *et al.*, 1996).

Los AMPs varían considerablemente en la longitud de la cadena, la hidrofobicidad y la distribución total de las cargas, pero comparten una estructura común de α hélices cuando se asocian con las membranas fosfolipídicas. Muchos estudios realizados con diferentes AMPs, tienden a enfatizar la importancia de una estructura α hélice y una carga neta positiva para que haya actividad citolítica. La estructura α hélice anfipática demostró ser esencial para la actividad lítica de los péptidos antibacterianos. Así mismo, la carga positiva facilita la interacción con las membranas cargadas negativamente, encontradas en concentraciones más altas en células de organismos patógenos que en células eucarióticas normales (Oren *et al.*, 1999).

A pesar de estas características comunes, los AMPs presentan diferencias en su mecanismo de acción dependiendo de la fuente de obtención y del microorganismo contra el que presentan actividad. Por esta razón los mecanismos de acción se han diferenciado en mecanismo de acción antibacteriana y antifúngica.

1.2.1 Actividad Antibacteriana

Hoy en día es claro que las interacciones péptido-bacteria no están mediadas por el reconocimiento de un receptor. Ésto se demostró con los péptidos magainina y cecropina que muestran un amplio espectro antimicrobiano. Los análogos sintéticos de estos compuestos, empleando únicamente los enantiómeros D de los residuos de aminoácidos, conservaron la estructura anfipática y α -helical. Y lo más importante, la actividad antimicrobiana, lo cual sería imposible si hubiera un receptor que reconociera al péptido y desencadenara la destrucción celular, pues los receptores no reconocen la forma

enantiómerica de su ligando (Epanand *et al.*, 1999). Las interacciones entre los péptidos bioactivos y las membranas celulares juegan un papel clave en diferentes procesos celulares, incluyendo la inserción y el plegamiento de proteínas de membrana, la formación y la estructura de canales iónicos, la interacción de hormonas con los receptores de membrana y la acción de los péptidos citotóxicos y antimicrobianos. La característica estructural común de todas estas moléculas es la adopción de una estructura secundaria estable luego de unirse a la superficie membranal. En el caso de los AMPs que actúan perturbando la función de barrera de las membranas celulares, la adopción de estructuras catiónicas y hélices α anfipáticas es esencial para su actividad biológica.

Todos los AMPs naturales tienen la capacidad de asumir una conformación helicoidal en un ambiente anisotrópico, así que esto es probablemente un elemento clave en su mecanismo de actividad antimicrobiana. Varios factores pueden afectar la estructura de un péptido. Éstos incluyen (1) la presencia de estabilizadores de α -hélices, Leu, Ala, Lys, o residuos desestabilizantes como Pro, (2) efectos de encapsulamiento, (3) interacciones útiles de residuos cargados con el dipolo de la hélice, (4) puentes salinos entre residuos con cargas opuestas, (5) interacción de residuos en el sector hidrofóbico con las cadenas acilo de los fosfolípidos en las bicapas. Análisis de las secuencias indican patrones frecuentes como que los residuos que estabilizan las hélices α son abundantes, mientras que la prolina es escasa, también se observa frecuentemente la presencia de glicina, que es una buena N-encapsuladora, y la región C-terminal amidada, lo que provee un puente de hidrógeno extra para estabilizar la hélice (Tossi *et al.*, 2000).

Varios estudios en sistemas de membranas modelo dirigidos a caracterizar el mecanismo de permeación membranal de los AMPs (Matsuzaki *et al.*, 1995; Blondelle *et al.*, 1999) han señalado diferentes propiedades fisicoquímicas, la carga, la hidrofobicidad, la anfipaticidad y el grado de estructura secundaria, como vitales para la función de estos péptidos (Mozsolits *et al.*, 2001).

El primer paso de la unión o el ataque de la mayoría de los AMPs a las bacterias es por una interacción electrostática entre las cargas positivas de los péptidos y las negativas de las membranas bacterianas. La superficie externa de las bacterias Gram-negativas contiene LPS y en su membrana interna fosfolípidos con carga negativa, y la de las Gram-positivas contiene polisacáridos ácidos como el ácido teicóico, lo que les brinda, a ambas, una superficie con carga neta negativa. Los LPS están formados por tres regiones, el antígeno O, el núcleo y el lípido A. El núcleo y el antígeno O consisten de cadenas de polisacáridos y están en la superficie de la membrana externa. El componente mayoritario, el lípido A, es una molécula de carga negativa compuesta de ácidos grasos y de grupos fosfato unidos al esqueleto de carbohidratos, unida directamente a la membrana externa. La estructura de la membrana externa se mantiene estable, en parte, por enlaces de cationes divalentes entre las diferentes cadenas de LPS (Erand *et al.*, 1999).

Existen diferentes modelos propuestos del modo de acción de los AMPs contra bacterias, los más relevantes son los siguientes.

Modelo de Agregados. Este modelo ha sido propuesto recientemente por Jenssen y colaboradores (Jenssen *et al.*, 2006), tiene una naturaleza menos formal que los modelos

más estudiados y puede explicar la permeación membranal por medio de canales con diferentes tamaños y tiempos de vida (Wu *et al.*, 1999) y el transporte a través de la membrana, lo que se sabe ocurre con varios péptidos (Powers *et al.*, 2005). El modelo propone que los AMPs α -helicoidales se unen a la membrana externa y se abren paso hacia el interior, llevando lípidos con ellos y creando una breve ruptura en la permeabilidad (Chang *et al.*, 2005). Matsuzaki y colaboradores sugieren que los péptidos se reorientan, sin adoptar una orientación particular, para abarcar la membrana y se forma un complejo supramolecular péptido-lípido que media el transporte de los péptidos a través de la bicapa (Matsuzaki, 1998) (**Figura 1.2A**). Los complejos contendrían agregados irregulares de moléculas de péptido y membrana, sin estequiometría fija, que se formarían de manera dependiente de la concentración y el voltaje. Estos agregados ofrecen sus superficies hidrofóbicas para unirse a las cadenas lipídicas de la membrana y las hidrofílicas para interactuar con el medio externo y las cabezas de fosfolípidos. De este modo existirán canales acuosos informales que permitirán el paso de iones y, posiblemente, moléculas más grandes. Este modelo se puede extender a varias clases estructurales de AMPs, incluyendo los más pequeños y además provee un mecanismo de entrada para los péptidos que actúan sobre blancos citoplasmáticos.

Modelo Toroidal. Propone que los péptidos se insertan perpendicularmente al plano de la bicapa, con las regiones hidrofílicas asociadas con las cabezas de los fosfolípidos mientras que las regiones hidrofóbicas están asociadas con el núcleo del lípido. En este proceso la membrana se curva hacia adentro de modo que también hace parte del poro. El modelo toroidal difiere del modelo de duela de barril en que los péptidos están siempre

asociados con las cabezas de los lípidos aún cuando se inserten perpendicularmente en la bicapa (**Figura 1.2B**) (Yang *et al.*, 2001). La magainina 1 actúa por este mecanismo.

Modelo de la Duela de Barril. Describe la formación de poros transmembranales por agrupamiento de α -hélices anfipáticas de manera que sus superficies hidrofóbicas interactúan con el núcleo lipídico de la membrana y sus superficies hidrofílicas apuntan hacia el interior, produciendo un poro acuoso (Ehrenstein *et al.*, 1977) (**Figura 1.2C**). Los pasos de este modelo son: (1) los monómeros se unen a la membrana en una estructura de α -hélice, (2) los monómeros se autoreconocen en el estado enlazado a la membrana, (3) las hélices se insertan dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana y por último (4) nuevos monómeros recubren progresivamente a los anteriores para incrementar el tamaño del poro. De acuerdo con observaciones experimentales, los péptidos que actúan por esta vía pueden matar bacterias a concentraciones micromolares, que es lo mínimo requerido para cubrir toda la superficie externa de la membrana bacteriana (Steiner *et al.*, 1988).

Debido a que es energéticamente desfavorable para una α -hélice anfipática atravesar la membrana como monómero, el paso crucial en este mecanismo es el ensamble de los monómeros en la superficie de la membrana antes de que los péptidos se inserten. Basados en este criterio, es improbable que las hélices sean o estén homogéneamente cargadas ya que sus superficies hidrofílicas están en contacto unas con otras durante la formación del poro transmembranal. Además, se puede asumir que, dado que estos péptidos se pueden insertar dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana, su interacción con la membrana está

dirigido principalmente por interacciones hidrofóbicas, y en consecuencia se deben unir a las membranas fosfolipídicas independientemente de su carga (Shai, 1999).

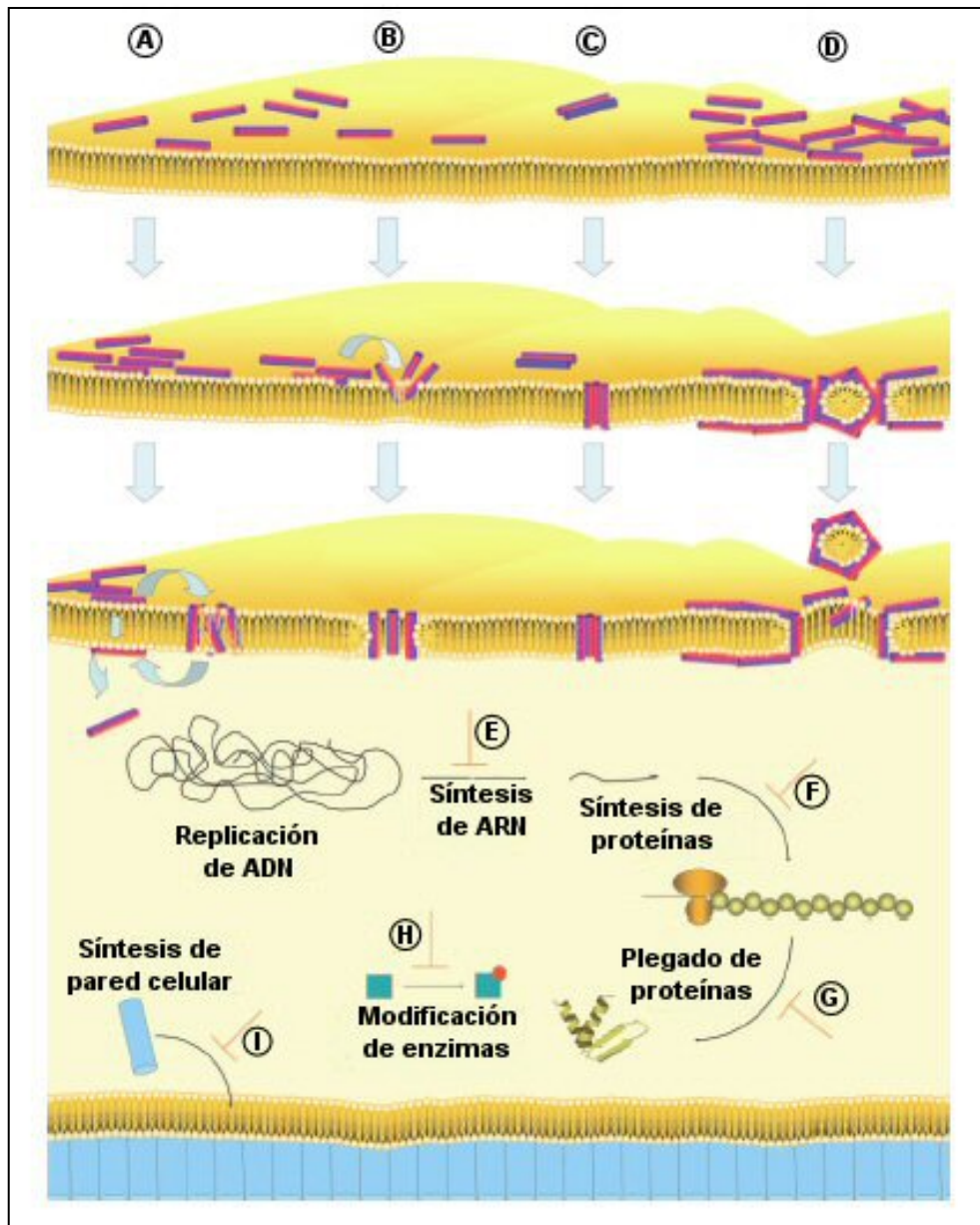


Figura 1.2 Mecanismos de acción de AMPs

La membrana está representada como una bicapa lipídica amarilla. Los péptidos están representados por cilindros, con las regiones hidrofílicas en rojo y las hidrofóbicas en azul. Las moléculas de peptidoglicanos de la pared celular son cilindros azules. Los modelos de permeación de membrana están indicados de A a D. (A) Modelo de agregados, (B) Modelo toroidal, (C) Modelo de duela de barril, (D) Modelo del Tapete. De E a I se describen los mecanismos de no permeación membranar. (E) Inhibición de la síntesis ADN y ARN, (F) Inhibición de la síntesis de proteínas, (G) Inhibición del plegamiento de proteínas, (H) Inhibición de enzimas., (I) Inhibición de la síntesis de pared celular. Figura tomada de Jensen *et al.*, 2006.

Teóricamente, los péptidos que actúan por este mecanismo deben tener varias características como: ser muy hidrofóbicos para poder penetrar en el núcleo apolar de la bicapa lipídica y, además, su interacción con la membrana blanco está gobernada predominantemente por interacciones hidrofóbicas; reconocerse entre ellos en el estado en que están enlazados a la membrana para formar grupos que conformen los poros transmembranales; tener una longitud mínima para poder atravesar la bicapa, 22 aminoácidos en hélices α y 8 aminoácidos en hojas β y ser mínimo 3 moléculas para formar el poro transmembranal (Shai, 2002).

Varios estudios han mostrado que el modelo de *duela de barril* funciona para péptidos líticos no selectivos, pero no para los que tienen alta actividad sólo sobre microorganismos. Por ejemplo, la cecropina B2 derivada del gusano de seda (*Bombyx mori*) y su análogo [3→35], los cuales tienen carga positiva (nueve aminoácidos positivos y tres negativos) y forman una α hélice anfipática, revelan una no cooperatividad en el enlace de la cecropina a membranas fosfolipídicas y una inhabilidad para asociarse a la superficie de membranas cargadas independientemente de la polarización de la membrana. Esto sugiere que las cecropinas se unen a membranas fosfolipídicas preferencialmente como ligandos monoméricos en superficie, más que como los grupos que forman los poros transmembranales. Las ventajas de esta unión no cooperativa es que previene la agregación de las cecropinas en la superficie de la membrana externa de la bacteria y las ayuda a difundirse dentro de la membrana interna (Gazit *et al.*, 1994).

Modelo del Tapete (“*Carpet*”). El modelo describe una situación en la cual los péptidos líticos están en contacto con las cabezas de los fosfolípidos durante el proceso de permeación de la membrana. De acuerdo con este modelo, los péptidos líticos inicialmente se unen a la superficie de la membrana del blanco y la cubren a manera de tapete. La permeación de la membrana ocurre sólo si hay una alta concentración local de péptidos enlazados a la membrana, lo cual puede ocurrir después de que toda la superficie esté cubierta con monómeros, o después de una asociación entre la membrana y los péptidos unidos a ella, formando un tapete localizado. En el modelo del tapete, contrario al de duela de barril, los péptidos no se insertan en el núcleo hidrofóbico de la membrana, ni ensamblan sus caras hidrofílicas con las de la membrana. Además, los péptidos no necesariamente tienen que adoptar una estructura particular para enlazarse a la membrana, pero si deben tener un balance entre hidrofobicidad y carga neta positiva. La interacción inicial con las membranas cargadas negativamente es dirigida electrostáticamente, dado que los péptidos tienen carga positiva. Los cuatro pasos propuestos para este modelo son: (1) unión preferencial del monómero a las cabezas de fosfolípidos; (2) alineación del monómero en la superficie con los residuos hidrofílicos mirando hacia las cabezas de fosfolípidos o hacia las moléculas de agua; (3) rotación de la molécula permitiendo reorientación de los residuos no polares hacia el núcleo hidrofóbico de la membrana y (4) desintegración de la membrana por perturbación de la curvatura de la bicapa (Shai, 1999). Los péptidos se unen a la membrana fosfolipídica hasta alcanzar una concentración umbral, con la superficie hidrofóbica hacia la membrana y la hidrofílica hacia la solución o solvente; en la concentración umbral la membrana es permeada a manera de detergente (**Figura 1.2D**). Antes de llegar a la membrana, los péptidos deben pasar a través de LPS o polisacáridos ácidos. Este proceso se llama absorción autopromovida y se basa en la

absorción de antibióticos policatiónicos a través de la membrana externa. Los péptidos interaccionan con la superficie de LPS desplazando completamente los cationes divalentes que neutralizan parcialmente las cargas negativas de los LPS, entonces hay rompimiento de la membrana externa y se llega a la bicapa fosfolipídica (Shai, 2002).

Mecanismos de no permeación de membrana. Todos los péptidos deben interactuar con la membrana citoplasmática, aunque sea sólo para alcanzar su sitio de acción. Ya se ha determinado que varios AMPs no causan permeación de la membrana a concentraciones mínimas efectivas y aún así provocan la muerte bacteriana. Los AMPs se acumulan intracelularmente e interfieren con una variedad de procesos celulares esenciales conllevando a la muerte celular (**Figura 1.2E a I**). Algunos de estos modos de acción incluyen: inhibición de la síntesis de proteínas de membrana (Engström *et al.*, 1984), síntesis de proteínas de estrés (Groisman *et al.*, 1996), inhibición de la síntesis de ADN (Boman *et al.*, 1993), rompimiento de una cadena del ADN (Bateman *et al.*, 1991), interacción con el ADN (Park *et al.*, 1998(a)), producción de peróxido de hidrógeno (Thevissen *et al.*, 1996) o disparar mecanismos autodestructivos como apoptosis en células eucariotas o autólisis en bacterias (Andreu *et al.*, 1998).

1.2.2 Actividad Antifúngica

No existe en el mundo ningún organismo que no esté o haya estado bajo la influencia de los hongos. Éstos pueden estar asociados como saprófitos, parásitos o como vectores de enfermedades (Castillo, 1987). Los hongos se consideraron originalmente como plantas inferiores en la categoría de criptógamas y en la división (*Phylum*) Thallophitas. El reino Fungae es un reino aparte constituido por un complejo y fascinante grupo de organismos,

tan grande que se calculan más de 300 mil especies. Todos son heterótrofos, eucariotos, tienen pared celular rígida formada por quitina, por lo que no pueden fagocitar alimentos sino que absorben nutrientes simples y solubles. Su estructura consta de un complejo llamado talo o micelio constituido por múltiples filamentos o hifas, o, menos a menudo, por estructuras unicelulares o levaduras (Arenas, 1993).

La pared celular de los hongos protege al organismo contra un medio ambiente hostil y libera señales para la invasión e infección de un probable huésped animal, vegetal o humano. Además provee una clara diferenciación entre el hongo y su huésped ofreciendo un blanco experimental para los antibióticos antifúngicos. Esta pared está compuesta de diferentes capas, la más interna es una bicapa lipídica llamada membrana plasmática, seguida de quitinas y proteínas ancladas del tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI, proteínas de anclaje a la membrana), en su capa más externa tiene manoproteínas y β -glucanos (**Figura 1.3**). Los hongos tienen una presión interna y cualquier perturbación de la pared celular puede resultar en lisis celular. (Money, 1990; Money *et al.*, 1992).

Los mecanismos de acción de las proteínas antifúngicas son tan variados como sus fuentes de obtención e incluyen degradación del polímero que compone la pared celular, formación de poros y canales en la membrana, daño a los ribosomas, inhibición de la síntesis de ADN e inhibición del ciclo celular (Selitrennikoff, 2001). Pero el mecanismo de acción antifúngica de algunos péptidos aún está en debate.

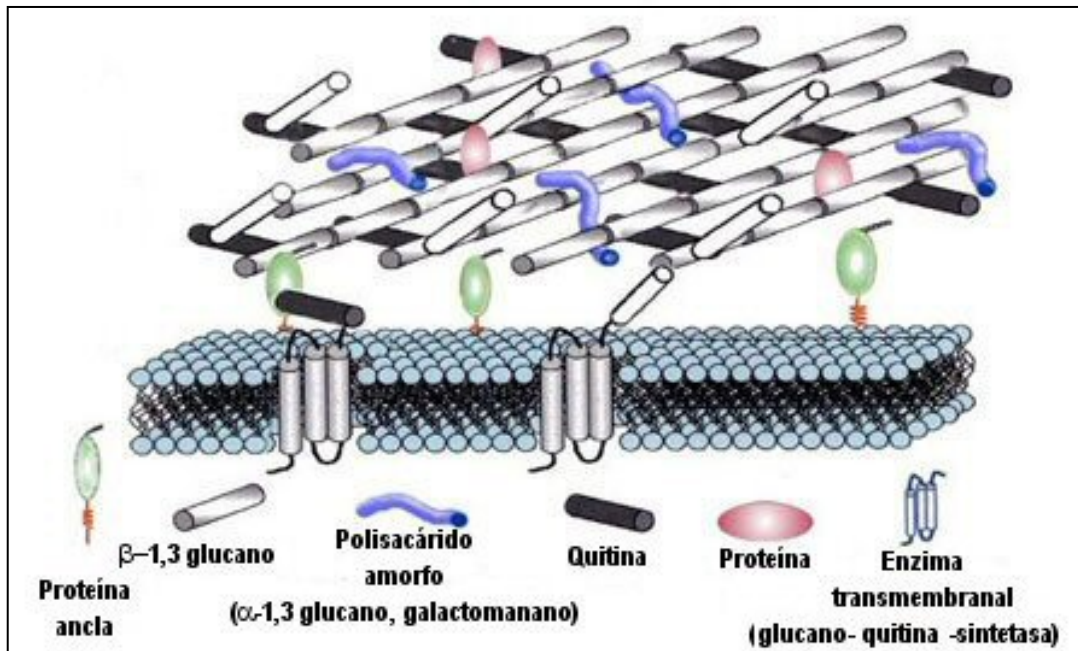


Figura 1.3 Esquema de la pared y la membrana celular de hongos y levaduras. Normalmente están compuestas de quitina, (1-3)- β -D-glucano, (1-6)- β -glucanos, celulosa, lípidos y péptidos embebidos en una matriz de proteína.

Lehrer y colaboradores demostraron que la defensina de conejo, NP-2, causa permeabilización de *Candida albicans* (Lehrer *et al.*, 1985). Se demostró que la actividad antifúngica de la indolicidina es debida a la disrupción de la estructura de la membrana fúngica por interacciones directas con la bicapa lipídica (Lee *et al.*, 2003). La histatina de saliva de humanos y de algunos primates superiores se une a un receptor de la membrana fúngica y entra al citoplasma para alcanzar la mitocondria (Kavanagh *et al.*, 2004).

Las tioniinas por ejemplo, inhiben el crecimiento de hongos y levaduras causando permeación de las células fúngicas, evidencias dadas por la liberación de K^+ , PO_4^{3-} y componentes celulares en el medio de cultivo. Usando bicapas planas artificiales, se ha mostrado que las tioniinas pueden alterar las propiedades eléctricas y fisicoquímicas de la

membrana a concentraciones relativamente bajas (1µg/ml), sin embargo las evidencias apuntan a que no forman canales iónicos (Thevissen *et al*, 1996).

Las defensinas inhiben el crecimiento de hongos ocasionando cambios morfológicos, causando elongación de las hifas con un incremento en la ramificación hifal, y no morfológicos, que sólo provocan elongación hifal lenta. Además causan daño severo en la membrana fúngica, aunque no se entiende bien como es la interacción. Un modo posible propone que las defensinas se unen a los glicolípidos en la superficie de la membrana, en este caso los glicolípidos trabajarían como receptores de membrana, creando poros y conduciendo al flujo de iones (Thevissen *et al*, 1996).

2. AMARANTO

El amaranto fue ampliamente distribuido a través del mundo en regiones templadas y tropicales aún antes de que el hombre convirtiera algunas cizañas en domésticas y cosmopolitas. Cerca de 60 especies fueron nativas de América y aproximadamente otras 15 de Europa, Asia, África y Australia. Según evidencias arqueológicas, el amaranto es originario de Puebla, México. En América se ha cultivado desde Arizona y Nuevo México en Estados Unidos, hasta Perú, Bolivia y Argentina (Sauer, 1967).

Su nombre significa vida eterna y se le dio debido a que crece en tierra poco fértil y con una mínima cantidad de agua, también porque una sola planta puede producir varios cientos de miles de semillas que pueden conservar sus propiedades por más de 40 años sin ser gramíneas. A pesar de que las semillas sólo tienen cerca de 1 mm de diámetro, se obtienen en cantidades prodigiosas, aún por técnicas de recolección primitivas. En México se cultiva en los estados de Puebla, Veracruz, Morelos, Tlaxcala, Distrito Federal y el Estado de México.

Muchas especies silvestres tienen notables y variados colores rojos en las flores, hojas y tallos, debido a una antocianina como la encontrada en remolacha. Las más rojas fueron consideradas, en todo el mundo, como plantas ceremoniales, mágicas o simplemente ornamentales (Sauer, 1967).

Las hojas tiernas de amaranto se han utilizado como verduras o condimento en muchas partes del mundo. Antiguamente eran recogidas sin discriminar la especie, sólo en Asia se hizo una domesticación cuidadosa de las especies usadas como condimento. En el este y sur de Asia, las especies *Amaranthus lividus* L. y *A. tricolor* L. son condimentos comunes y se han introducido en occidente con nombres como espinaca china, espinaca Malabar y *tampala*, el nombre genérico del amaranto en Ceylon (Sauer, 1967).

Hasta donde se conoce, cualquier semilla de amaranto es comestible simplemente con tostarlo o molerlo, su sabor es muy parecido al de un cereal. Además de su importancia como fuente de alimento, el grano era muy apreciado por los incas, mayas y aztecas, quienes lo consideraban más valioso que el oro.

2.1 FAMILIA AMARANTHACEAE

La familia Amaranthaceae está constituida por especies que conforman una de las líneas de evolución que sucedieron dentro del orden *Caryophyllales*, al que pertenece esta familia. Se considera que su posible antecesor directo sea algún miembro de la familia Phytolaccaceae, pasando luego por características similares a las de la actual Chenopodiaceae, hasta alcanzar el grado evolutivo que actualmente presenta (**Tabla 2.1**). La familia Amaranthaceae se compone de 60 géneros y alrededor de 800 especies. Aproximadamente 50 especies de un mismo género son nativas de América y otras se localizan en Europa, Asia, África y Australia, algunas son *Amaranthus albus*, *A. deflexus*, *A. muricatus*, *A. viridis*, *A. blitoides*, *A. graecizans*, *A. quitensis*, *A. retroflexus*, *A. lividus*, *A. standleyanus*, entre otras.

Tabla 2.1 Clasificación del Amaranto.

Reino	: Plantae
Subreino	: Embriofitas
División	: Magnoleophyta
Clase	: Magnoleopsida
Subclase	: Caryophyllidae
Orden	: Caryophyllales
Familia	: Amarantacea
Género	: Amaranthus, Froelichia, Iresine, Gomphrena, Guilleminea, Alternanthera

Tomada de (Standley, 1917)

2.2 GÉNERO *Amaranthus*

Hierbas anuales o perennes, monoicas, dioicas o polígamo-dioicas, erguidas o postradas, glabras o pubescentes; hojas alternas, pecioladas, enteras o con el borde ondulado, con frecuencia mucronadas; flores pequeñas, bracteadas y bibracteoladas, hermafroditas o unisexuales, verdosas o rojizas, dispuestas en glomérulos (o espicastos más bien cortos) axilares y además con frecuencia en espicastos terminales alargados y a menudo ramificados; tépalos 5 (1 a 4); estambres generalmente 5 ó 3, anteras tetraloculares; ovario ovoide, comprimido, estilo corto o ausente, estigma 2 a 3 (4)-fido; utrículo entero ó 2 a 3-dentado en el ápice, indehiscente, circuncísil o irregularmente dehiscente, membranáceo o coriáceo, pericarpio liso a fuertemente rugoso; semilla erguida, lenticular, comprimida, lisa o ligeramente ornamentada, embrión anular. Unas 50 especies ampliamente distribuidas en regiones templadas y tropicales de ambos hemisferios. Algunas son altamente variables y muy afines entre sí, por lo que su de identificación es problemática (Standley, 1917).

En el amaranto existen discontinuidades entre especies por lo que es muy difícil poner barreras absolutas. Además, sus especies tienden a formar arreglos de híbridos, pero muchos son estériles o eliminados rápidamente por selección natural. Sin embargo, algunas

poblaciones de cizañas y cultivos tienen patrones de variación, sugiriendo una hibridación efectiva.

El amaranto tiene la ruta fotosintética C4, igual que las plantas de maíz y sorgo, lo que le permite utilizar eficientemente la luz solar y los nutrientes a altas temperaturas. El rendimiento del grano es comparable al del arroz y el maíz, pero el amaranto resiste la sequía mejor que el maíz.

Las especies domesticadas difieren un poco de las silvestres. Las brácteas son más cortas y débiles, tal vez debido a una selección para favorecer que las inflorescencias sean menos espinosas cuando se frota entre las manos, un método común de extraer las semillas. Las plantas y las inflorescencias son extremadamente largas, dando mayor rendimiento de grano con menor o no incremento del tamaño de semilla. Las semillas marfil claro, son preferidas por su calidad de reventado y sabor. Algunas plantas domesticadas producen semillas café oscuras, características de las especies silvestres o cizañas. En la **Tabla 2.2**, se listan algunas de las especies mejor estudiadas.

Tabla 2.2 Diferentes especies de *Amaranthus*.

Especies domesticadas	Especies silvestres	
<i>A. hypochondriacus</i> <i>A. cruentus</i> <i>A. caudatus</i>	<i>A. dubius</i>	<i>A. retroflexus</i>
	<i>A. celosioides</i>	<i>A. powelli</i>
	<i>A. pallidiflorus</i>	<i>A. viscidulus</i>
	<i>A. spinosus</i>	<i>A. quitensis</i>
	<i>A. hybridus</i>	<i>A. scariosus</i>
	<i>A. tricolor</i>	<i>A. cruentus</i>
	<i>A. graecizans</i>	<i>A. brandegei</i>

Tabla tomada de Sauer, 1967.

La planta del amaranto puede medir de metro y medio a dos metros y medio de altura. La flor, según sean las variedades de amaranto, puede presentar diferentes tonalidades que van desde rojos pálidos hasta intensos, verdes o dorados (**Figura 2.1**).



Figura 2.1 Especies domesticadas de amaranto
(A) *Amaranthus caudatus*, (B) *A. hypochondriacus*, (C) *A. cruentus*.

Amaranthus caudatus presenta un amplio espectro en cuanto a color y forma de la planta, sin embargo, se distingue por su inflorescencia en forma cauda y las semillas color marfil con los bordes rojos. Es una herbácea anual que llega a medir 2 m de altura. Las panículas o espigas son extremadamente largas y colgantes, lo que le da su apariencia glomerular característica.

A. cruentus es una planta ornamental perteneciente al grupo de especies con fruto en pixidio e inflorescencias terminales muy desarrolladas, en este caso son grandes y de color rojo, más o menos erectas.

De la planta se aprovecha todo: el grano y la planta en sí, como verdura o forraje para los animales. Las hojas tienen hierro, calcio, magnesio, mucha fibra y vitaminas A y C. Las semillas tienen un alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales. Su nivel de proteínas, va del 15 al 18% pero además lo interesante es su buen equilibrio a nivel de aminoácidos y el hecho de que contenga lisina. Contiene entre un 5 y 8% de grasas saludables. Destaca la presencia del escualeno, un tipo de grasa que, hasta ahora, se obtenía especialmente del hígado de tiburones y ballenas. Su cantidad de almidón varía entre el 50 y 60% de su peso.

Las semillas del amaranto tienen un alto valor nutritivo debido a la cantidad y calidad de sus proteínas; cuenta con el doble de proteína que el maíz y el arroz, y de un 60 a 80% más que el trigo. De igual manera posee el doble de lisina que el trigo y el triple que el maíz. Es rico en fibra dietética, calcio, hierro, almidón amilopectinado, metionina, vitamina C, complejo B, grasas poliinsaturadas y es bajo en gluten (**Tabla 2.3**).

Por su elevado nivel nutricional, desde 1979 la Academia de Ciencias de los Estados Unidos de Norte América (NAS, por sus siglas en inglés) y la Organización para la Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) denotaron al amaranto como uno de los cultivos con elevado potencial para su explotación económica y nutricional a gran escala en el mundo. Así mismo, lo calificaron como el mejor alimento de origen vegetal para consumo humano.

Tabla 2.3 Composición aproximada del amaranto (porciones de 100g).

Componente	Vegetal	Grano
Humedad	86.9	9.0
Proteína	3.5	15.0 g
Grasa	0.5	7.0 g
Carbohidratos totales	6.5	63.0 g
Fibra	1.3	2.9 g
Calorías	36.0	39.1 g
Fósforo	67.0 mg	477 mg
Hierro	3.9 mg	--
Potasio	411 mg	--
Vitamina A	6100 u.i.	0.0
Riboflavina	0.16 mg	0.32 mg
Niacina	1.4 mg	1.0 mg
Ácido ascórbico	80.0 mg	3.0 mg
Tiamina (Vitamina B1)	0.08 mg	0.14 mg
Ceniza	2.6 g	6.0 mg
Calcio	267.0 mg	490.0 mg

Tomada de Sauer, 1967

2.2.1 Composición del Vegetal

Las hojas de todas las especies de amaranto son comestibles. Por siglos las especies más abundantes en el mundo han sido: *A. tricolor* y *A. dubius*, en regiones tropicales de la India, China y el sureste de Asia, *A. cruentus*, *A. retroflexus* y *A. graecizans* en regiones húmedas tropicales (Smidt, 1977).

Tabla 2.4 Comparación de la composición porcentual aproximada de peso seco de diferentes hojas comestibles.

Componente	Amaranto	Espinaca	Acelga	Col verde
Proteína	46.5	34.4	26.9	32.6
Grasa	6.8	3.2	3.4	5.4
Fibra	11.1	46.2	51.7	51.0
Cenizas	35.4	16.1	18.0	10.9

Tomada de Segura-Nieto, 1994

Las porciones suaves y las hojas de los retoños son hervidos en varios cambios de agua y separados para cocinar con el líquido (Carlsson, 1977). La apariencia, textura, sabor y

calidad total para comer del amaranto es comparable con la de la espinaca. La **Tabla 2.4** compara la composición de diferentes hojas comestibles con las del amaranto.

2.2.2 Proteínas de la Semilla

Hay varias maneras de clasificar las proteínas de las semillas de amaranto:

- De acuerdo con su morfología se pueden clasificar en endospermas, embrios y perispermas.
- Por su función biológica, en proteínas metabólicamente activas y en proteínas de almacenamiento que se acumulan en las semillas en desarrollo y se hidrolizan rápidamente para proveer una fuente de nitrógeno reducido al estado temprano de germinación.
- Considerando su composición química se definen como proteínas simples o complejas (lipoproteínas, glicoproteínas, metaloproteínas, etc.).
- la solubilidad se dividen en: albúminas, solubles en agua; globulinas, solubles en altas concentraciones de sal; prolaminas, solubles en alcohol acuoso y glutelinas, solubles en soluciones ácidas o básicas.

El contenido de proteínas en las semillas de este género es de 48.9-65.0% de albúminas; la glutelina es la segunda en abundancia, 22.4-42.3%. Las globulinas representan del 13.7 al 18.1% de proteína de la semilla; las prolaminas son las de menor abundancia con valores entre 7.2 y 11.0%. Estas cantidades varían en diferentes reportes dependiendo del método de extracción y del tipo de semillas usadas (Segura-Nieto *et al.*, 1994.)

Albúminas. Como ya se mencionó, las albúminas son proteínas solubles en soluciones acuosas con baja fuerza iónica y existen de diferentes tamaños y actividades. Algunas de ellas son:

Proteínas ricas en metionina (MRPs). Son proteínas presentes en varias semillas, en el amaranto hay un grupo de polipéptidos 2S con un contenido de 16 a 18% de metionina.

Péptidos antimicrobianos. Son péptidos que, se sugiere, están involucrados en una función de defensa debido a la actividad antibiótica que muestran *in vivo*. Algunos ejemplos de estos péptidos o proteínas de plantas son quitinasas de frijol (Boller *et al.*, 1983), trigo (Molano *et al.*, 1979)) y tabaco (Shinshi *et al.*, 1987), heveína del árbol de látex (Van Parijs *et al.*, 1991) entre otros. De las semillas de amaranto se han aislado de las especies *A. retroflexus* (Lipkin *et al.*, 2005), *A. caudatus* (Broekaert *et al.*, 1992) y *A. hypochondriacus* (Rivillas-Acevedo y Soriano-García, 2007).

Lectinas. Son proteínas que se unen a carbohidratos, glicoproteínas sin actividad enzimática. Debido a sus propiedades de unión específica se han usado en estudios de arquitectura de la superficie celular, grupo sanguíneo y aislamiento y caracterización de estructuras de oligosacáridos (Sharon y Lis, 1982). Las lectinas son ampliamente usadas en inmunología, biología celular e investigación del cáncer debido a sus efectos biológicos como inmunosupresión, mitogenicidad y citotoxicidad (Lis *et al.*, 1977). Se han aislado de *A. caudatus* (Rinderle *et al.*, 1989), *A. cruentus* (Koeppel *et al.*, 1988) y *A. hypochondriacus* (Zenteno y Ochoa, 1988).

Globulinas. Las globulinas representan el principal grupo de proteínas de almacenamiento de las legumbres y juegan un papel muy importante como agentes funcionales en productos alimenticios. Hay dos clases principales de estas proteínas, llamadas 7S y 11S de acuerdo con sus coeficientes de sedimentación (Wright, 1987). Las globulinas 7S están compuestas de tres subunidades llamadas α (57 a 68 kDa), α' (57 a 72 kDa) y β (42 a 52 kDa). Están unidas por un enlace no covalente formando un trímero con pesos moleculares que van de 170 a 200 kDa. Cada subunidad tiene uno o dos grupos glicosil unidos al extremo amino. Las moléculas de las globulinas 11S de legumbres son hexámeros con pesos moleculares de 300 a 400 kDa. Los hexámeros están compuestos de polipéptidos ácidos con masas moleculares de 30 a 40 kDa y polipéptidos básicos de 18 a 22 kDa, ambos polipéptidos están unidos por puentes disulfuro (Segura-Nieto, *et al.*, 1994).

Se ha reconocido la amplia distribución de globulinas 11S y 7S en semillas de angiospermas, entre las que se encuentra el amaranto (Marccone *et al.*, 1992). Las globulinas del amaranto, además de su valor nutricional, están compuestas de proteínas tipo 11S y 7S y presentan buenas propiedades funcionales como capacidad emulsificante (Barba de la Rosa *et al.*, 1992)

Prolaminas y Glutelinas. En cereales hay dos fracciones mayoritarias de proteínas, una de ellas, encontrada en trigo, cebada y maíz como la fracción más grande. Esta fracción es soluble en etanol acuoso y se conoce como prolamina (Shewry *et al.*, 1978). La otra fracción, las glutelinas, requiere soluciones de pH extremo para su extracción y se encuentra como la principal fracción de proteína del arroz (Lásztity, 1984). En amaranto,

la cantidad de proteínas solubles en alcohol es baja. Las glutelinas son la fracción no soluble más importante en las semillas de amaranto (Segura-Nieto *et al.*, 1994).

2.3 *Amaranthus hypochondriacus*

Es una herbácea anual que llega a alcanzar hasta los 3 m de alturas. La inflorescencia es de gran tamaño, muy densa, erecta y espinosa. El tamaño de las brácteas le da una apariencia y tacto espinoso. Las semillas son de color blanco, dorado, café y negro; las de coloración clara son las que más comúnmente se utilizan para grano; esta especie también es usada como ornamental.

La especie *hypochondriacus* es conocida también como *leucocarpus*, *frumentaceus*, *anardana* y *leocospermus* y se puede encontrar en Arizona (Estados Unidos), en México, Guatemala, Ceylon, China, India, Kashmir, Nepal, Rusia, Uganda. En México se encuentra ampliamente distribuido en los estados de Chihuahua, Distrito Federal, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Morelos, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Sinaloa y Tlaxcala (Sauer, 1967) como se aprecia en la **Figura 2.2**.

Existen dos hipótesis para el origen de las especies domesticadas, *Amaranthus caudatus*, *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*. La hipótesis polifilética supone que los tres cultivos de amaranto se originaron independientemente de ancestros separados en diferentes partes del mundo. La hipótesis alternativa presupone que un solo ancestro progenitor originó a las demás especies (Sauer, 1967). En ambas hipótesis, los progenitores implicados en la evolución de los cultivos son *A. hybridus*, *A. powelli* y *A. quitensis*. Según la hipótesis

monofilética, *A. hybridus* originó a *A. cruentus* en Centroamérica, esta especie migra al norte y se cruza repetidamente con *A. powelli* dando origen a *A. hypochondriacus*. La migración de *A. cruentus* hacia el sur y cruzamientos reiterados con *A. quitensis* daría origen a *A. caudatus*. La hipótesis de un antecesor común remoto explicaría la presencia de características comunes en las tres especies cultivadas. Los estudios recientes de variación isoenzimática entre especies silvestres y domesticadas (Chan y Sun, 1997), muestran que, en general, las especies cultivadas están más relacionadas entre sí (identidad genética del 86%) y con *A. hybridus* (identidad del 78%) que con sus presuntos progenitores silvestres, *A. powelli* y *A. quitensis*, con los que tienen identidad genética de 56 y 71% respectivamente. Esto implicaría un solo evento de domesticación con *A. hybridus* como antecesor común (Sauer, 1967; Chan y Sun, 1997).

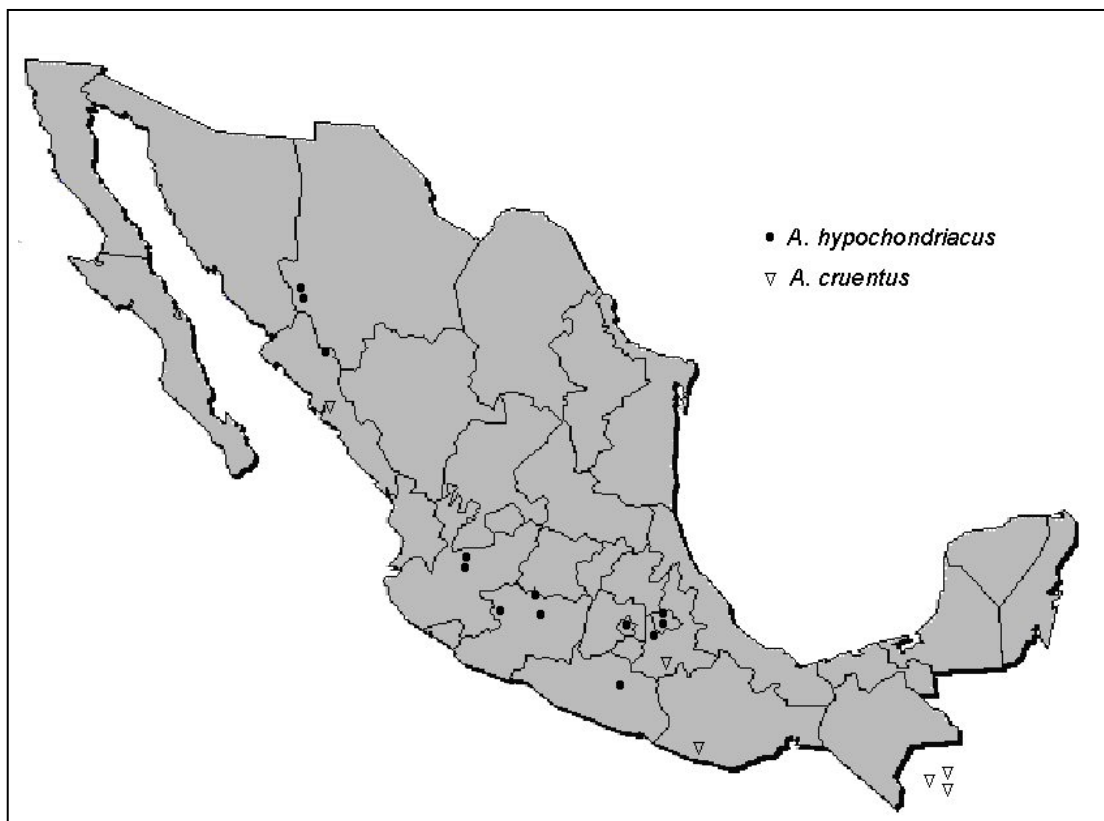


Figura 2.2 Distribución del *Amaranthus hypochondriacus* y *A. cruentus* en México.

La hibridación es sorprendentemente limitada considerado el gran traslapamiento geográfico de las diferentes especies. En México, *A. powelli* y *A. hybridus* son cizañas comunes en los cultivos de *A. hypochondriacus*, y es fácil identificar trazas del domesticado en las cizañas. El efecto de cruzado del cultivo es limitado por el hecho de que los híbridos producen principalmente semillas oscuras que son rechazadas por los sembradores.

Mucho de la historia del amaranto depende de sus nombres comunes. Antes de la conquista los aztecas llamaban *huauhtli* a las semillas y el *A. hypochondriacus* era probablemente la principal, sino la única, especie cultivada. Las semillas se consumían en atoles, tortillas, tamales, entre otros. Además lo mezclaban con miel y sangre humana, como las famosas alegrías (ahora sólo con miel) dándole formas de animales y dioses, los consumían durante ceremonias religiosas y rituales de sacrificios humanos y en el principal ritual del año dedicado al Dios de la guerra, *Huitzilopochtli*. La pasta del *huauhtli* molido se llamaba *zoale*. En varias lenguas del nordeste de México la misma semilla se llamó *guegui* y a principios del siglo XVII, se le aplicó el nombre en español “alegría” a los dulces de amaranto reventado. Otro nombre común en español del amaranto es “bledo”.

Las hojas de la planta se utilizaban para elaborar tamales, denominados *huauhquiltamalli*, para ofrecerlos al dios del fuego. Por estas costumbres, los españoles prohibieron su cultivo durante la conquista, como una forma de dominación y exterminio de la cultura. Sin embargo, la magnífica adaptación del amaranto, su gran resistencia a heladas y plagas y el sentido tradicionalista del pueblo, impidieron su extinción.

La **Tabla 2.5** presenta el contenido de proteínas y aminoácidos en las semilla de *A. hypochondriacus*, el cual varía un poco entre las diferentes variedades, pero el mayor porcentaje de proteínas lo representan las globulinas y albúminas.

Tabla 2.5 Composición porcentual de proteínas de diferentes variedades de semilla de *A. hypochondriacus*.

<i>A. hypochondriacus</i>	Albúminas y Globulinas	Prolaminas	Glutelinas
Azteca	66.9	2.0	31.1
Graso	56.9	1.6	22.4
No graso	59.4	1.0	29.4
HN5	82.0	11.0	7.0
78S-125 Nepal ND	47.5	1.4	29.3
A-718	40.0	2.0	44.0
Amarillo	59.0	1.7	26.3

Tomada de Segura-Nieto, 1992.

La **Tabla 2.6** muestra la composición de aminoácidos de las semillas del *A. hypochondriacus* tipo Azteca y su distribución en los diferentes tipos de proteínas que presenta la semilla.

Tabla 2.6 Composición de aminoácidos de las semillas de *A.*

Aminoácido	Harina	Albúminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas
Ácido cistéico	1.3	1.9	1.5	1.0	0.6
Asx	7.9	9.4	9.4	8.0	7.2
Glx	14.9	20.0	17.5	10.0	11.1
Ser	7.3	6.4	7.7	8.0	9.0
Gly	10.7	10.5	13.9	10.7	10.3
His	3.0	2.3	2.3	1.8	2.4
Arg	7.3	8.9	9.3	6.8	8.5
Thr	5.1	3.4	4.0	7.2	5.4
Ala	6.6	6.2	5.4	8.6	6.3
Pro	5.7	5.0	4.0	4.5	5.9
Metionina sulfona	3.3	2.5	1.6	1.7	2.6
Tyr	1.9	2.9	2.8	3.0	3.0
Val	5.9	4.0	5.0	4.5	5.0
Ile	3.9	3.5	4.0	4.5	5.0
Leu	6.2	5.5	6.0	10.0	8.0
Phe	3.4	3.0	2.0	3.9	4.3
Lys	5.7	6.6	7.0	6.7	4.2

Tomada de Segura-Nieto, 1992.

De las semillas de *A. hypochondriacus* se han aislado y estudiado varias proteínas como son:

- AmTI, el principal inhibidor de tripsina, una proteína de 69 aminoácidos con alta similitud con la familia de inhibidores obtenidos de papa (Valdés-Rodríguez *et al.*, 1999).
- AAI es un péptido de 32 residuos, el polipéptido más pequeño conocido por inhibir la actividad α -amilasa de larvas de insectos sin afectar la de mamíferos (Chagola-López *et al.*, 1994).
- Amarantina, un hexámero de 398 kDa, es una globulina con características estructurales similares a las de proteínas 11S de otras plantas (Chen y Paredes-López, 1997)
- La lectina ALL, una glicoproteína dimérica que se une específicamente a N-acetil-D-galactosamina (Hernández *et al.*, 2004).
- Lectina de 45 kDa, una glicoproteína con 10% de carbohidratos, seis unidades de N-acetil-D-glucosaminas, cuatro unidades de D-galactosa, una unidad de D-glucosa y trazas de xilosa por cada tres residuos de D-manosa (Zenteno y Ochoa, 1988).
- Proteína del tipo nsLTP1 (Non-specific lipid-transfer protein) de 9.7 KDa, esta proteína parece tener un papel importante en la defensa de las plantas por estrés físico y biológico (Ramírez *et al.*, 2003).
- Globulina de 34.957 Da que es una proteína de almacenamiento y es importante en la conservación de los nutrientes de las semillas (Vasco *et al.*, 1999).

- De las semillas de otras especies de amaranto se han purificado tres péptidos antifúngicos, dos de la especie *A. caudatus* (Broekaert *et al.*, 1992) y uno de *A. retroflexus* (Lipkin *et al.*, 2005).

3. HIPÓTESIS

En diferentes especies del género *Amaranthus* se ha reportado la existencia de AMPs. Por lo tanto, se espera que la especie mexicana *Amaranthus hypochondriacus*, la cual presenta alta resistencia al ataque de bacterias y hongos patógenos, produzca este tipo de péptidos para su defensa.

4. OBJETIVOS

GENERAL

Purificar y caracterizar péptidos antimicrobianos de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* mediante ensayos biodirigidos para conocer su espectro de acción antifúngica y antibacteriana.

ESPECÍFICOS

- Obtener un extracto proteínico de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.
- Purificar las proteínas pequeñas mediante técnicas de cromatografía de alta resolución.
- Caracterizar bioquímicamente los péptidos aislados (pureza y pI).
- Realizar estudios de espectrometría de masas y de dicroísmo circular que nos permitan determinar la secuencia de aminoácidos y la estructura secundaria de los péptidos.
- Realizar estudios de actividad antimicrobiana de las proteínas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y contra hongos patógenos.

3. HIPÓTESIS

En diferentes especies del género *Amaranthus* se ha reportado la existencia de AMPs. Por lo tanto, se espera que la especie mexicana *Amaranthus hypochondriacus*, la cual presenta alta resistencia al ataque de bacterias y hongos patógenos, produzca este tipo de péptidos para su defensa.

4. OBJETIVOS

GENERAL

Purificar y caracterizar péptidos antimicrobianos de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* mediante ensayos biodirigidos para conocer su espectro de acción antifúngica y antibacteriana.

ESPECÍFICOS

- Obtener un extracto proteínico de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.
- Purificar las proteínas pequeñas mediante técnicas de cromatografía de alta resolución.
- Caracterizar bioquímicamente los péptidos aislados (pureza y pI).
- Realizar estudios de espectrometría de masas y de dicroísmo circular que nos permitan determinar la secuencia de aminoácidos y la estructura secundaria de los péptidos.
- Realizar estudios de actividad antimicrobiana de las proteínas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y contra hongos patógenos.

5. METODOLOGÍA

5.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEÍNICO

Las semillas secas de *A. hypochondriacus* se compraron a los productores locales de Tlaxcala, México, una muestra se depositó en la colección del Herbario Nacional MEXU, UNAM. Las semillas se guardaron bajo condiciones ambientales de temperatura y humedad.

Las semillas se molieron en un molino de café. A 100 mg de harina se le adicionó 1 mL de ácido acético al 10% y se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 9000 x g por 5 minutos y las proteínas del sobrenadante se precipitaron durante toda la noche con seis volúmenes de acetona a -20°C . El botón se recuperó por centrifugación a 1000 x g por 10 minutos y luego se resuspendió en agua con 0.1% de TFA.

5.2 FRACCIONAMIENTO POR HPLC

Se inyectó el extracto proteínico en la columna RP-C18 Phenomenex (250 x 10 mm; 5 μm ; 300 Å) (Torrance, CA) en un HPLC Waters acoplado a un detector de diodos. La columna se equilibró con agua MQ con 0.1% de TFA. Se utilizó un gradiente lineal de 0 a 60% de ACN en 90 minutos. Se colectaron las fracciones detectadas a 215 nm, cada fracción corresponde a un pico de absorbencia, luego se concentraron por liofilización y se

cuantificaron por el método de BCA. A cada fracción se le probó actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Penicillium chrysogenum*.

5.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteína se determinó utilizando el kit de BCA (Pierce, Rockford, IL). Como estándar se empleó suero de albúmina bovina. Se realizaron los ensayos por duplicado y la concentración de proteína se expresó como microgramos por mililitro ($\mu\text{g/mL}$).

5.4 ELECTROFORESIS

Para hacer el seguimiento a las fracciones colectadas por HPLC y obtener un estimado del peso molecular del péptido a purificar, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 16%. El buffer de muestra contenía Tris-HCl 1 M, pH 6.8, SDS 1% (w/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v), azul de bromofenol 0.01% y glicerol 20% (v/v). Los péptidos se fijaron, después de la electroforesis con ácido tricloroacético 10% (v/v) y etanol 40% (v/v), luego se tiñeron con Azul de Coomassie (Sigma, St. Louis, CO).

Los geles de isoelectroenfoque se hicieron en geles preformados (Amersham, Piscataway, NJ) en el intervalo de pI de 3 a 9, y se utilizó un marcador en el mismo intervalo de pI.

5.5 PRUEBAS ANTIFÚNGICAS

5.5.1 Obtención de Esporas

Los hongos *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *A. candidus*, *A. ochraceus*, *Trichoderma* sp., *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus arrhizus*, *Alternaria alternata*, *Trichophyllum mentagrophytes* y *Geotrichum candidum*, fueron proporcionados por el laboratorio de micología UBIPRO Fez-Cuautitlán, UNAM. Los hongos se crecieron en agar papa-dextrosa por una semana a temperatura ambiente. Luego, las esporas se obtuvieron inundando la caja petri con agua destilada estéril. La suspensión de esporas se filtró por 3 capas de muselina estéril y se lavó tres veces con agua destilada estéril, finalmente se resuspendieron en glicerol estéril al 20%. La densidad o concentración de esporas se determinó en una cámara de Neubauer con microscopio óptico. Esta suspensión se guardó a -70 °C (Broekaert *et al.*, 1990).

5.5.2 Prueba Antifúngica

Las pruebas antifúngicas se realizaron en microplacas estériles de fondo plano a 25 °C. Cada pozo contenía 20 µL de sustancia de prueba estéril, 70 µL de caldo papa dextrosa, 10 µL de suspensión de esporas (2000 esporas por mL). Las placas se agitaron por 30 segundos en un agitador de microplacas, se dejaron sedimentar por 30 minutos y se midió la absorbencia (A_0) a 570 nm en lector de microplacas Elx-808 Ultra (Bio-Tek Instrumens Inc., Winooski, VT). Las microplacas se incubaron por 48 horas a 25 °C. Luego de ese tiempo se midió absorbencia (A_{48}) a 570 nm y se calculó la absorbencia corregida (A_C) con la fórmula: $A_C = A_{48} - A_0$.

Para determinar el porcentaje de inhibición se realizó un cálculo utilizando la fórmula que sigue: $\%I = [(A_C - A_{BLANCO}) / A_{BLANCO}] * 100$, en donde A_C es la absorbencia corregida para cada pozo y A_{BLANCO} es la absorbencia corregida del blanco, o control negativo, que en lugar de sustancia de prueba contiene el mismo volumen de agua destilada estéril. Se consideró que la fracción tenía actividad cuando su porcentaje de inhibición era mayor al 20%. Como control positivo se utilizó Nistatina (Alpharma, México, D.F.). Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

5.6 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Estas pruebas se realizaron luego de purificar el péptido antimicrobiano. Se probaron las bacterias *Moraxella catharralis*, *Escherichia coli* ATCC 35218 y 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, proporcionadas por el laboratorio de Inmunología Molecular y Celular de la UNAM; *Enterobacter aerogenes*; *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155; *Vibrio cholerae* (no patógena); *V. cholerae* INDRE 206; *V. cholerae* CDC V12; *V. cholerae* (caso clínico); *Staphylococcus aureus* ATCC 12398; *Yersinia enterocolitica*, *Sarcina lutea* y *Shigella disenteridae*, donadas por el laboratorio UBIPRO-FES IZTACALA, UNAM. Se utilizaron microplacas de fondo plano estériles. Cada pozo contenía 50 μ L de Ay-AMP1 estéril con concentraciones desde 335 a 0.33 μ g/mL y 50 μ L de caldo Muller-Hinton con bacterias al 1.5×10^8 UFC. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. Se leyó la absorbencia a 595 nm en un lector de microplacas a tiempo cero y a las 24 horas, para

determinar el porcentaje de inhibición como se describió para las pruebas antifúngicas. Como control positivo se utilizó Ciprofloxacina a una concentración de 1µg/mL.

5.7 CONCENTRACIÓN INHIBITORIA CINCUENTA (IC₅₀)

La relación dosis-respuesta, normalmente produce una curva sigmoideal cuando se grafica la respuesta contra el logaritmo de la dosis. No hay una teoría aceptada que explique tal forma de la curva, pero, se determinó que estas curvas son aproximadamente lineales entre el 20 y el 80% de la respuesta. Entonces, los datos en la región de 20-80% se pueden someter a una regresión lineal, en la cual la ordenada es el porcentaje de inhibición y la abscisa es el logaritmo de la dosis (Tallarida y Murria, 1987).

Para obtener este tipo de comportamiento, se hicieron diluciones logarítmicas del péptido activo puro y se probó su actividad antifúngica contra todos los hongos mencionados como se describió previamente. Las dosis probadas fueron: 31.62µg/mL, 10.0µg/mL, 3.16µg/mL, 1.0µg/mL, 0.32µg/mL, and 0.1µg/mL. Cada concentración se probó por triplicado.

5.8 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)

La determinación de MIC del péptido activo puro se realizó contra todos los hongos de que se disponía. Se partió de una disolución patrón de 200 µg/mL de Ay-AMP1, de la cual se tomaron 30 µL y se pusieron en la primera columna de los microplatos. Luego se hicieron diluciones dobles seriadas con agua destilada estéril hasta la columna once

(Fernandez-Andreu *et al.*, 1999). Así se probaron once concentraciones, desde 40 $\mu\text{g/mL}$ hasta 0,04 $\mu\text{g/mL}$. El resto de la prueba se realizó como se describió anteriormente. Se realizaron 3 réplicas y se determinó MIC como la mínima concentración a la que hay inhibición del 80% en el crecimiento del hongo.

5.9 ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO PURO A LA ACCIÓN DE PROTEASAS Y SU ANTAGONISMO CON IONES

Se ha reportado la resistencia de los péptidos antimicrobianos a la acción de proteasas, por esta razón se quiso determinar la resistencia del péptido puro a proteasas como tripsina, quimotripsina, pepsina y papaína. Cada una se probó a diferentes pHs para mantener las mejores condiciones enzimáticas de las proteasas (**Tabla 3.1**). Todas las hidrólisis se realizaron a una razón enzima:sustrato de 1:60 (peso:peso) y se incubaron a 37°C por 6 horas con agitación constante.

Tabla 5.1 Condiciones de hidrólisis.

Proteasa	Disolvente enzima	Disolvente péptido	Inactivación
Tripsina	HCl 1 mM	Tris-HC 100 mM l, pH 8.5	pH > 11.0
Quimotripsina	HCl 1 mM	Tris-HCl y CaCl ₂ 100 mM, pH 7.8	pH = 2.0
Pepsina	HCl 10 mM	Glicina-HCl 100 mM, pH 2.0	pH > 8.0
Papaína	MES 100 mM, pH 6.0	MES 100 mM, pH 6.0	pH < 3

La reacción se detuvo de acuerdo con las condiciones indicadas en la **Tabla 3.1**. El péptido antimicrobiano se recuperó utilizando centricones de diferente corte, primero YM10, luego YM3, lo que no pasó por la membrana de YM3 se liofilizó, cuantificó y probó contra *Penicillium chrysogenum* por triplicado.

Debido a que normalmente los péptidos antimicrobianos son antagonizados por iones mono- y divalentes, se probó el efecto de diferentes concentraciones de sales mono- y divalentes, KCl 10 mM y 50 mM; CaCl₂ 1 mM y 5 mM, en el caldo papa-dextrosa. Las pruebas antifúngicas se realizaron contra *Penicillium chrysogenum* como se describió previamente y por triplicado.

5.10 CL-EM/EM Y SECUENCIACIÓN

Antes de realizar el análisis de espectroscopía de masas la muestra se digirió en gel.

Digestión en gel. Se realizó utilizando el método descrito por Wilm y colaboradores en 1996 (Wilm *et al.*, 1996). Las bandas del gel se trataron con bicarbonato de amonio 50 mM en 50% de ACN para remover el Azul de Coomassie. Los puentes disulfuro se redujeron con DTT 10mM por 45 minutos a 56 °C y los grupos SH se alquilaron con yodoacetamida 55 mM. Después de lavar el gel, las manchas fueron deshidratadas con ACN, luego digeridas en hielo con buffer de digestión que contenía 12.5 ng/μL de tripsina, bicarbonato de amonio 50 mM y se incubaron a 37 °C toda la noche. Los péptidos fueron extraídos con 50% de ACN y posteriormente fueron desalinizados.

Los péptidos trípticos se reconstituyeron en 5 μL de ácido acético al 1% hasta una concentración de 500 picomoles y se aplicó directamente en un espectrómetro de masas Finnigan LCQ de trampa de iones (San Jose, CA). Los péptidos digeridos se separaron en una columna capilar RP18 (Woburn, MA) con un gradiente lineal de 5-75% de 0.1% de

ácido acético en 90% de ACN, en treinta minutos. Los espectros EM/EM se obtuvieron en el modo ión positivo. Con esta metodología se obtuvo el peso molecular del péptido y su secuencia parcial.

5.11 ALINEACIÓN

La comparación de la secuencia se analizó por medio de una alineación en BLAST. Posteriormente se utilizó el programa ANTHEPROT 2000 (6.0) para alinear la secuencia con proteínas con las que compartía identidad. Las proteínas utilizadas para el alineamiento fueron: Heveína, de *Hevea brasiliensis* (Brokaert *et al.*, 1990); Pn-AMP1, de *Pharbitis nil* L (Koo *et al.*, 1998); EAFP2, de *Eucommia ulmoides* (Huang *et al.*, 2002); Ar-AMP, de *Amaranthus retroflexus* (Lipkin *et al.*, 2005); IWF4, de *Beta vulgaris* (Nielsen *et al.*, 1997); y GAFP, de *Ginkgo biloba* (Huang *et al.*, 2000).

5.12 ENSAYO DE UNIÓN A QUITINA

Se utilizó una minicolumna empacada con quitina (BioLabs, New England) a la que se le adicionó el péptido puro disuelto en PBS, pH 7.4. Posteriormente, se lavó la columna con 10 volúmenes de PBS, pH 7.4 y luego se eluyó el péptido con 10 volúmenes de ácido acético 100 mM, pH 2.8. Las dos fracciones, PBS y ácido acético, se concentraron y analizaron por electroforesis.

5.13 ENSAYO DE ACTIVIDAD QUITINASA

Se realizó en microplacas de 96 pozos a un volumen final de 100 μL que contenían 10 μL del péptido antimicrobiano, 25 μL de *p*-nitrofenil-*N,N'*-diacetil- β -D-quitobiósido, *p*NP-(GlcNAc)₂ 1 mM y 65 μL de buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0. La reacción se incubó a 37°C por 10 minutos con agitación constante, la reacción enzimática se terminó adicionando 50 μL de carbonato de sodio 1.0 M. La cantidad de *p*-nitrofenol (*p*NP) liberada, se determinó espectrofotométricamente a 405 nm en un lector de microplacas Elx-808 Ultra (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). La concentración molar de *p*NP se calculó de una curva de calibración de *p*NP construida con diferentes concentraciones del mismo, que iban de 0 a 30 nmol (Suginta, 2007).

5.14 EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD QUITINASA

Se determinó la actividad quitinasa del péptido antimicrobiano en un amplio espectro de pHs, de 3.0 a 10.0. Para mantener la capacidad del buffer a un pH particular, se emplearon diferentes sistemas de buffer, los cuales fueron: buffer de glicina-HCl 100 mM, pH 3.0; buffer de acetatos 100 mM, pHs 4.0, 4.5 y 5.0; buffer MES 100 mM, pHs 6.0 y 6.5; buffer de fosfatos 100 mM, pHs 7.0 y 7.5; buffer tris-HCl 100 mM, pHs 8.0 y 9.0; y buffer carbonato-bicarbonato 100 mM, pH 10.0. Cada reacción se llevó a cabo con la metodología descrita anteriormente. Se realizaron tres réplicas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 PURIFICACIÓN

Luego de la extracción ácida, previamente descrita en la metodología, se comenzó la purificación por HPLC y se obtuvo el perfil cromatográfico que se muestra en la **Figura 6.1**.

6.1.

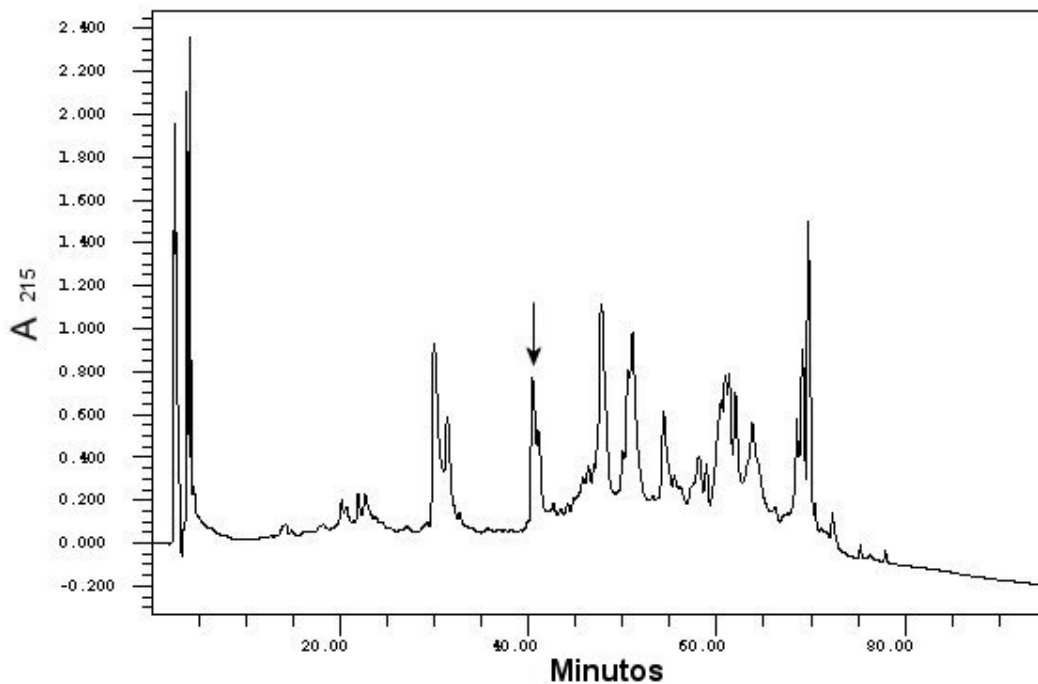


Figura 6.1 Perfil cromatográfico del extracto ácido eluido en RP-C₁₈.

La columna fue equilibrada con agua MQ con 0.1% de TFA y se eluyó con un gradiente de 0 a 60% de ACN en 90 minutos a 1 mL/min. La flecha indica la fracción que presentó actividad contra *Candida albicans* y *Penicillium chrysogenum*.

A cada fracción se le midió actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Penicillium chrysogenum*. Se observó la actividad en las fracciones de tiempo de retención de 40.3 y 40.9 minutos (**Figura 6.2**). Estas fracciones se escogieron para análisis posteriores debido a su alta actividad inhibitoria, cercana al 100%, en el crecimiento de los hongos.

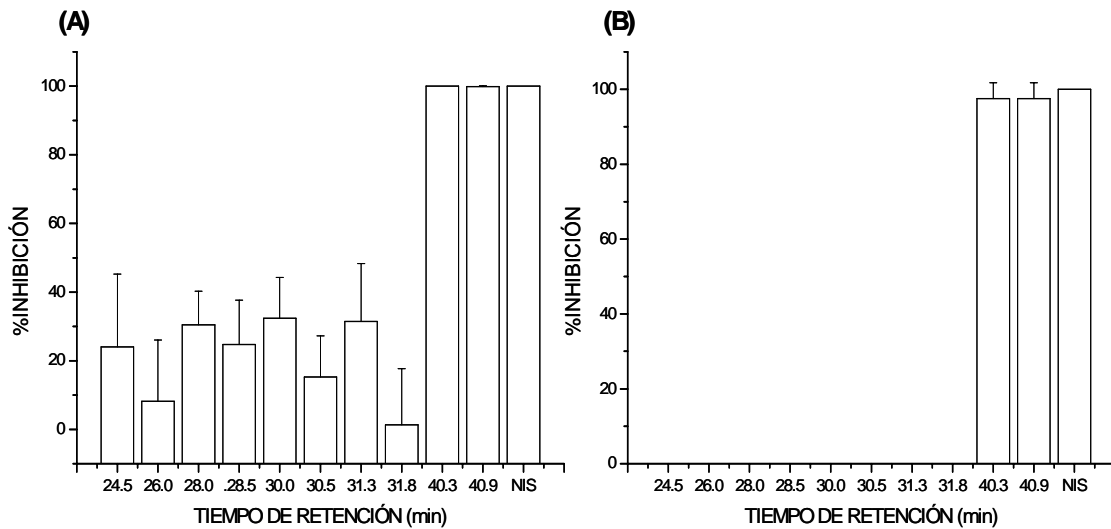


Figura 6.2 Actividad antifúngica de las fracciones obtenidas por HPLC. (A) Actividad contra *Candida albicans* y (B) actividad contra *Penicillium chrysogenum*. Todas las fracciones se probaron a una concentración de proteína de 40 µg/mL en el pozo. NIS (Nistatina) corresponde al control positivo.

La **Figura 6.3** muestra los gels de poliácridamida de las fracciones activas y se observan bandas únicas y limpias, indicando buen grado de pureza.

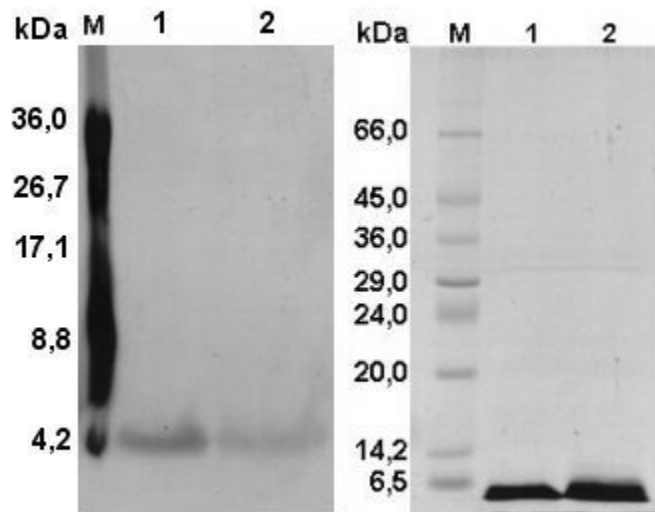


Figura 6.3 Gel de poliácridamida de las fracciones activas de RP-C₁₈. Gels de izquierda a derecha de 16 y 12% de poliácridamida. M es el marcador, 1 y 2 son las fracciones activas de tiempo de retención 40.3 y 40.9 minutos respectivamente.

Para asegurar la pureza de las fracciones activas y determinar su masa molecular, se realizaron análisis de espectrometría de masas en los que se estableció que la fracción de 40.3 minutos estaba pura y su masa molecular fue de 3184 Da (**Figura 6.4**), esta fracción se denominó Ay-AMP1.

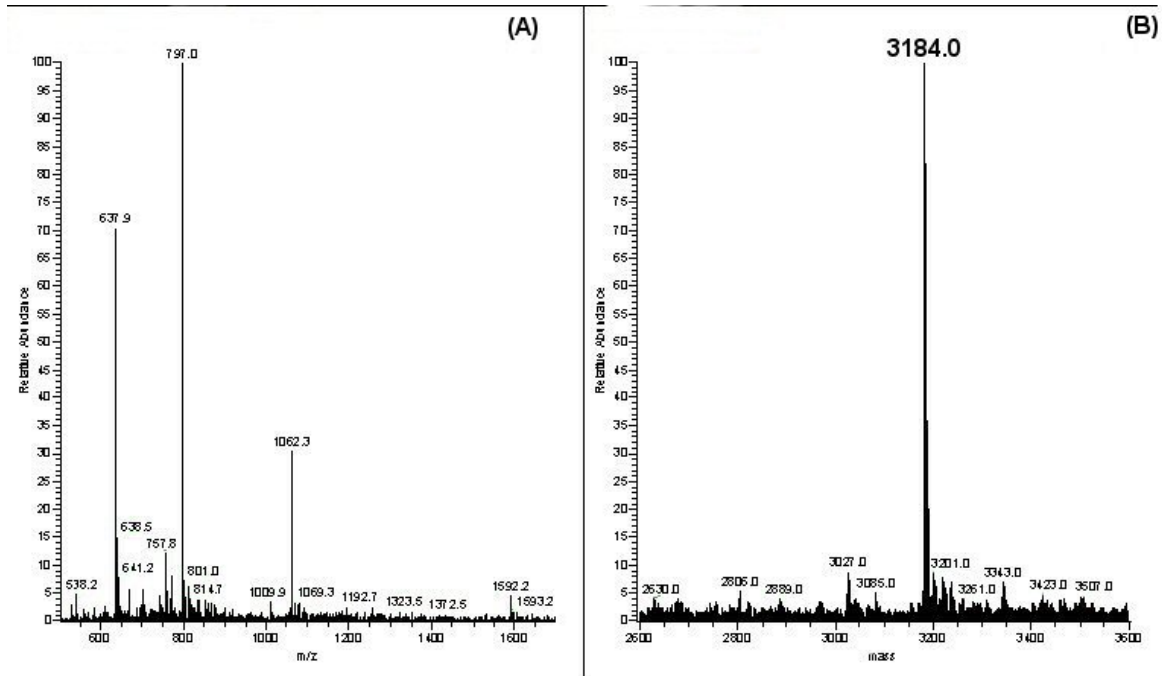


Figura 6.4 Análisis de masas de Ay-AMP1.

(A) Espectro de masas de Ay-AMP1; (B) Deconvolución del espectro de masas de Ay-AMP1 para determinar su peso molecular.

La fracción de 40.9 minutos presentó dos componentes, uno de masa molecular 3027 y otro de masa 3184 Da que corresponde a la masa de Ay-AMP1 (**Figura 6.5**). En consecuencia es una mezcla de Ay-AMP1 con un segundo péptido, al cual se le llamó Ay-AMP2.

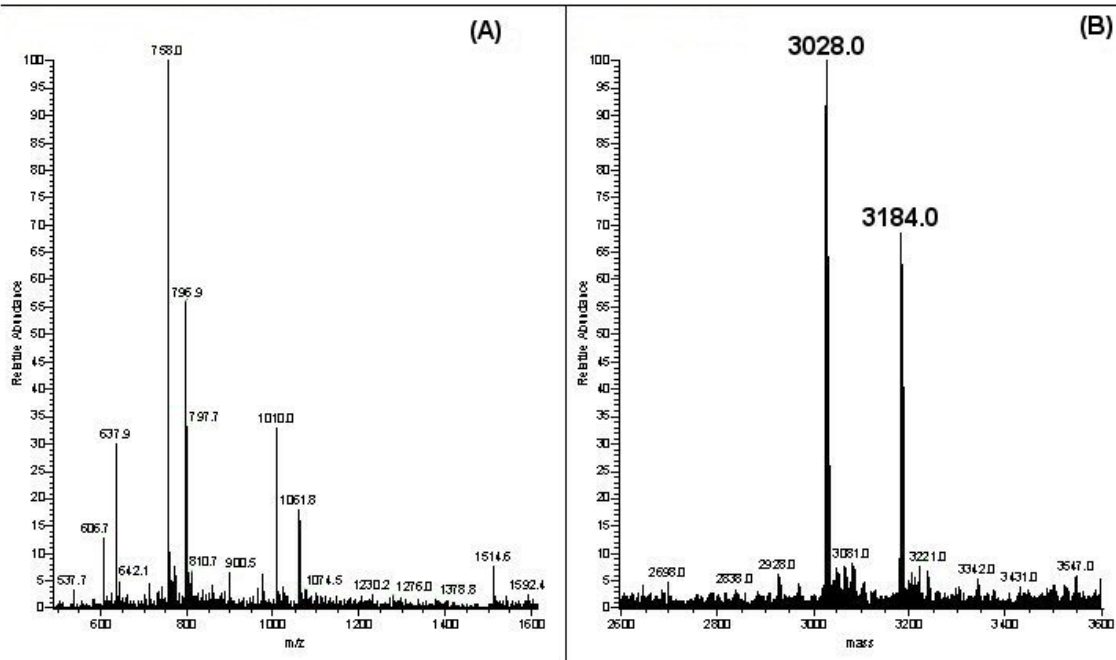


Figura 6.5 Análisis de masas de la fracción que contiene a Ay-AMP2.

(A) Espectro de masas de Ay-AMP2; (B) Deconvolución del espectro de masas de Ay-AMP2 para obtener su peso molecular.

6.2 SECUENCIACIÓN

Ay-AMP1 y Ay-AMP2 se secuenciaron parcialmente por CL-EM/EM y se obtuvieron los siguientes 15 residuos de aminoácidos para Ay-AMP1, **CPSGMCCSQFGYCGK**. Esta secuencia tiene una identidad del 100% con un fragmento de la secuencia de Ac-AMP2, un péptido antimicrobiano aislado de las semillas de *Amaranthus caudatus* (Broekaert *et al.*, 1992) y cubre más del 50% de la secuencia total. Ambos péptidos, Ay-AMP1 y Ac-AMP2, tienen la misma masa molecular. La secuencia no determinada de Ay-AMP1 sólo tiene un aminoácido isobárico en la posición 26, la lisina, con masa molecular de 128 Da, la cual podría ser reemplazada por una glutamina, que tiene la misma masa molecular. Sin embargo, los residuos básicos, como la lisina, son muy conservados en los péptidos antimicrobianos porque son extremadamente importantes para la actividad del

péptido. Considerando todo lo anterior se puede decir que la secuencia de Ay-AMP1 es la misma que la de Ac-AMP2 (**Figura 6.7A**). Igualmente, la secuencia de Ay-AMP2 es exactamente la misma que la de Ac-AMP1, por los mismo motivos expuestos anteriormente. La única diferencia en secuencia entre Ay-AMP1 y Ay-AMP2 es que Ay-AMP1 tiene un arginina extra en el extremo aminoterminal.

Basándonos en la hipótesis de un origen monofilético de los granos de amaranto (Chan *et al.*, 1997), es concebible que las secuencia de los AMPs aislados de semillas de *A. hypochondriacus* (Ay-AMP1 y Ay-AMP2) y los de las semillas de *A. caudatus* (Ac-AMP1 y Ac-AMP2) hayan sido conservadas a través de la domesticación de *Amaranthus hybridus*, el ancestro putativo común (Chan *et al.*, 1997). Existe un antecedente de este hecho, la proteína tipo nsLTP aislada de semillas de *A. hypochondriacus* tiene exactamente la misma secuencia que la aislada de las semillas de *A. caudatus* (Ramírez *et al.*, 2003).

El hecho de que las secuencias de Ay-AMP1 y Ac-AMP2 sean las misma, implica que también su estructura tridimensional es la misma. La estructura de Ac-AMP2 fue resuelta por Resonancia Magnética Nuclear (Martins *et al.*, 1996) y se muestra en la **Figura 6.6**.

De los datos de secuencia de Ay-AMP1 y Ay-AMP2 se calculó el punto isoelectrico y se obtuvieron valores de 8.92 y 8.66 respectivamente. Los valores experimentales de pI de estos péptidos no se pudieron determinar ya que las bandas migran hasta el límite en los geles preformados de isoelectroenfoque en el intervalo de 3-9, por lo que sólo se puede afirmar que fueron mayores a 9.

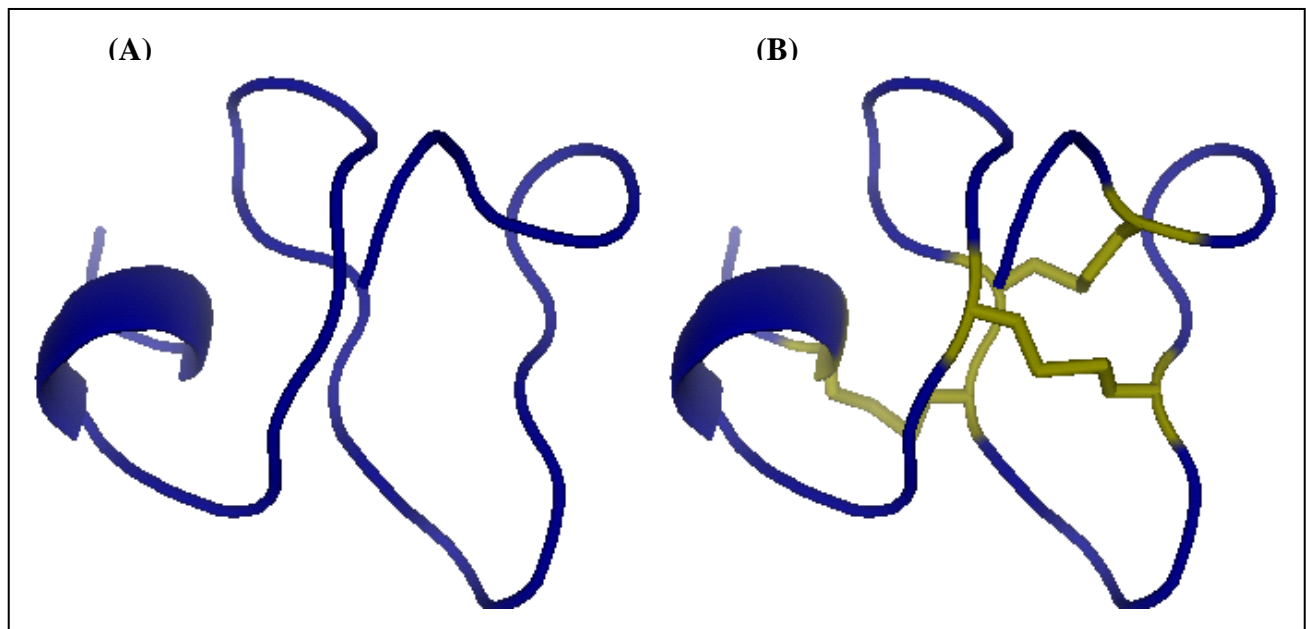


Figura 6.6 Estructura tridimensional del péptido antimicrobiano Ac-AMP2. Estructura del péptido antimicrobiano de las semillas de *Amaranthus caudatus*, resuelta por resonancia magnética nuclear. (A) Muestra la estructura tridimensional y (B) muestra los puentes disulfuro que estabilizan la estructura. Tomado de Martins *et al.*, 1996.

El péptido Ay-AMP2 se pudo identificar y determinar su masa molecular por espectrometría de masas, pero no fue posible purificarlo completamente, por lo que no se hicieron más análisis experimentales ya que no se sabe en qué relación estequiométrica se encuentran Ay-AMP1 y Ay-AMP2 en la mezcla.

6.3 ALINEACIÓN

La alineación de las secuencias de los Ay-AMPs, con algunas proteínas de unión a quitina, demostró la similitud de estos péptidos con esta superfamilia, con un dominio rico en cisteína/glicina como la heveína (**Figura 6.7B**). El dominio de la heveína es muy conservado, contiene ocho cisteínas, seis en Ay-AMPs, las cuales están involucradas en enlaces disulfuro intramoleculares. Adicionalmente, el dominio heveína tiene una serina y tres residuos aromáticos en posiciones conservadas. Cabe anotar, que la presencia de

dominios de heveína adicionales no aumenta la potencia antifúngica en la proteína (Theis *et al.*, 2004).

A.	
Ay-AMP1	VGECVR---GR-CPSGMCCSQFGYCGKGPKYCGR
Ay-AMP2	VGECVR---GR-CPSGMCCSQFGYCGKGPKYCG
B.	
HEVEIN	-EQCGRQAGGKLC PNNLCCSQWGWCGSTDEYCS PDHNCQS-NCKD
Pn-AMP1	-QQCGRQASGRLCGNRLCCSQWGYCGSTASYCGA--GCQS-QCRS
EAFP2	-QTCAS-RCPRPCNAGLCCSIYGYCGSGAAYCGAGN-CRC-QCRG
Ar-AMP	AGECVQ---GR-CPSGMCCSQFGYCGRGPKYCGR
IWF4	SGECNMY--GR-CPPGYCCSKFGYCGVGRAYCG
GAFP	DPTCSVLGDFK-CNPGRCCSKINYCGAC-YQWRFGLT PAR

Figura 6.7 Alineamiento de Ay-AMPs con péptidos caracterizados de plantas. (A) Secuencia de Ay-AMP1 y Ay-AMP2. (B) Alineamiento de secuencias de proteínas identificadas: Heveína de *Hevea brasiliensis*; Pn-AMP1, de *Pharbitis nil* L; EAFP2, de *Eucommia ulmoides*; Ar-AMP, de *Amaranthus retroflexus*; IWF4, de papa y GAFP de *Ginkgo biloba*. Los dominios de unión a quitina están sombreados.

Es obvia la alta identidad en las secuencias de Ay-AMPs y Ar-AMP (**Figura 6.6**), Ar-AMP es un péptido antimicrobiano aislado de *Amaranthus retroflexus* una cizaña que afecta los cultivos en el sur de Rusia (Lipkin *et al.*, 2005). Las diferencias se presentan sólo en tres posiciones, V1, R6 y K23 que en Ay-AMP son reemplazados por A1, Q6 y R23 en Ar-AMP.

6.4 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

La potencia antifúngica de Ay-AMP1 se probó contra 12 hongos patógenos, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus ochraceus*, *Trichoderma* sp., *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus arrhizus*, *Alternaria alternata*, *Trichophytum mentagrophytes* y *Geotrichum candidum*. Ay-AMP1

no mostró actividad antifúngica contra *A. flavus*, *R. arrhizus*, *T. mentagrophytes* y *F. oxysporum* a ninguna de las concentraciones probadas.

El IC₅₀ de Ay-AMP1, varió desde 0.33 a 11.88 µg/mL, dependiendo del hongo. El MIC estuvo en la escala de valores de 2.74 a 39.90 µg/mL (**Tabla 6.1**). La actividad inhibitoria más alta se observó contra *Trichoderma* sp. con valores de IC₅₀ de 0.24 µg/mL, por lo tanto es el más susceptible a este péptido. Por el contrario *F. solani* es el hongo menos susceptible al efecto de Ay-AMP1, pues presentó el valor más alto de IC₅₀, 11.88 µg/mL.

Para todos los análisis de susceptibilidad a la presencia de sales, proteasas y calentamiento, se midió el IC₅₀ sólo contra *Penicillium chrysogenum* ya que este hongo presentó la mejor curva dosis respuesta.

Tabla 6.1 IC₅₀ y MIC de Ay-AMP1 y Ay-AMP2 contra diferentes cepas de hongos.

HONGOS	IC ₅₀ (µg/mL)	MIC (µg/mL)
<i>Trichoderma</i> sp.	0.24	6.41
<i>Candida albicans</i>	0.33	2.74
<i>Geotrichum candidum</i>	0.61	1.84
<i>Aspergillus candidus</i>	1.27	3.90
<i>Alternaria alternata</i>	2.26	11.67
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2.66	6.22
<i>Aspergillus ochraceus</i>	7.87	27.43
<i>Fusarium solani</i>	11.88	39.90

Se evaluó la dependencia de la actividad de Ay-AMP1 con la fuerza iónica del medio de cultivo. A concentraciones de KCl 10 mM y CaCl₂ 1mM, no se observó disminución de la actividad de Ay-AMP1 contra *P. chrysogenum* (**Tabla 6.2**), como se muestra en la curva de dosis respuesta (**Figura 6.7A**). Sin embargo, a concentraciones más altas de las mismas

sales, KCl 50 mM y CaCl₂ 5mM, el IC₅₀ aumentó 12 veces su valor (Tabla 6.2 y Figura 6.8B).

Tabla 6.2 Efecto antagonista de Ay-AMP1 con iones mono y divalentes.

Adición al medio PDB	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
	IC ₅₀ (µg/mL)	MIC (µg/mL)
KCl 10Mm	2.35	7.02
KCl 50Mm	28.07	84.23
CaCl ₂ 1Mm	2.46	11.43
CaCl ₂ 5Mm	29.5	137.14

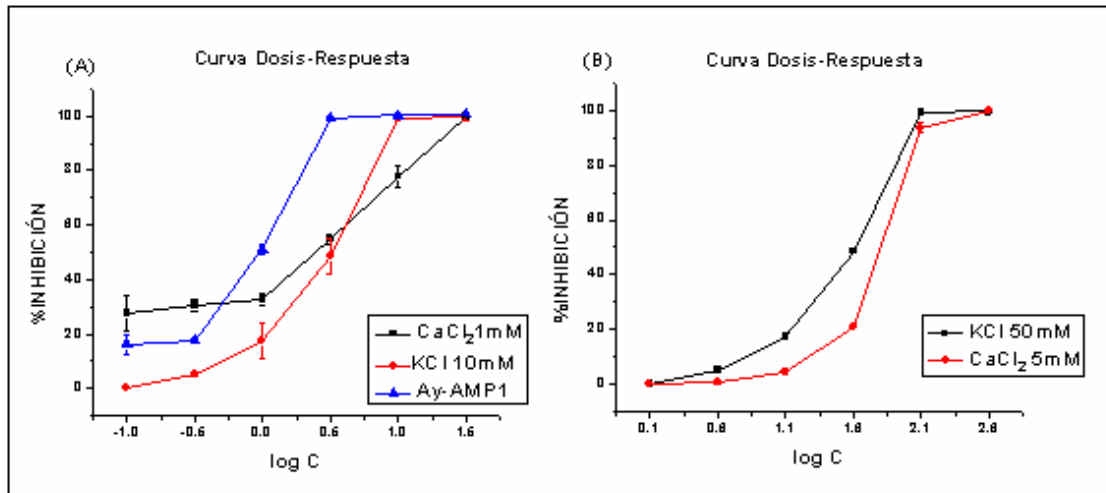


Figura 6.8 Curvas dosis-respuesta de Ay-AMP1 en presencia de sales.

La prueba se hizo contra *Penicillium chrysogenum*, en presencia de KCl y CaCl₂. (A) KCl 10mM y CaCl₂ 1mM. (B) KCl 50mM y CaCl₂ 5mM.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos para otros péptidos antimicrobianos que son antagonizados por iones mono y divalentes, por ejemplo defensinas de plantas, en las cuales la actividad antifúngica disminuye al incrementar la fuerza iónica, especialmente por cationes divalentes (Broekaert *et al.*, 1997); las tioninas, la actividad antifúngica de esta familia de péptidos se inhibe por concentraciones de Ca²⁺ mayores que 5 mM, pero no por Mg²⁺ o Ba²⁺ a concentraciones tan altas como 10mM, o por cationes monovalentes a concentraciones arriba de 50 mM (Terras *et al.*, 1992); EAFP1 y EAFP2 de *Eucommia*

ulmoides, los cuales exhiben propiedades de unión a quitina similares a las de otros péptidos tipo heveína, cuando se adicionan iones de calcio 5 mM al medio de cultivo, el IC_{50} se incrementan más de 100 veces (Huang *et al.*, 2002). Existen muy pocos péptidos antifúngicos que no sean afectados por cationes monovalentes, como K^+ , a concentraciones mayores que 50 mM; este es el caso de Rs-AFP1 y Rs-AFP2, polipéptidos ricos en cisteína aislados de semillas de rábano. Sin embargo, su actividad sí se ve afectada por cationes divalentes, pues una concentración de $CaCl_2$ 5mM causa reducción de la actividad (Leer *et al.*, 1991)

El tratamiento de Ay-AMP1 con diferentes proteasas, pepsina, papaína, quimotripsina y tripsina, no afectó mucho su actividad antifúngica, excepto en el caso de pepsina y tripsina. Con pepsina el IC_{50} se triplicó pero la actividad se conservó, mientras que con tripsina el IC_{50} aumenta más de 10 veces y el MIC no pudo determinarse a ninguna de las concentraciones probadas (**Tabla 6.3** y **Figura 6.9A**).

Tabla 6.3 Resistencia de Ay-AMP1 al tratamiento con proteasas y calor.

Adición al medio PDB	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
Papaína	1.01	4.93
Pepsina	6.37	35.52
Quimotripsina	2.84	21.47
Tripsina	56.57	--
Ebullición	0.76	3.96

La actividad antifúngica tampoco se vio afectada por la ebullición del péptido durante 10 minutos (**Figura 6.9B**). La alta estabilidad de este péptido se puede deber a que es pequeño y presenta puentes disulfuro intramoleculares.

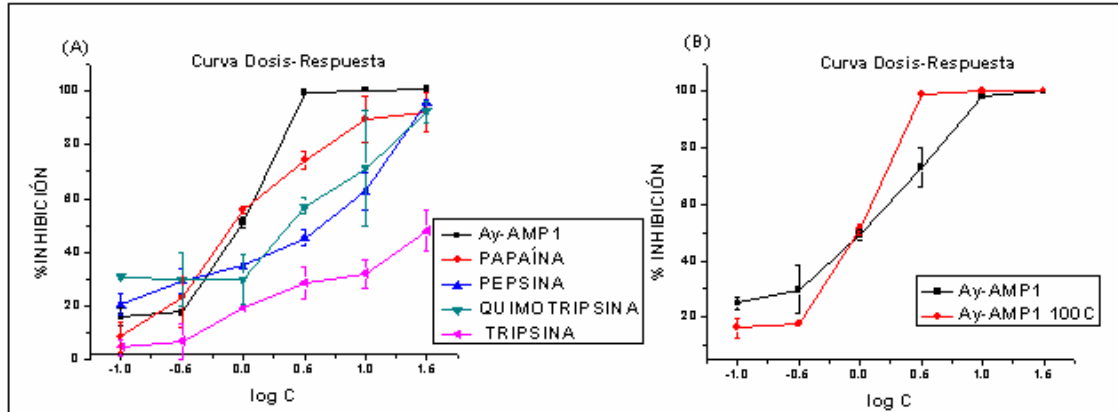


Figura 6.9 Curvas dosis-respuesta de Ay-AMP1 tratado con proteasas y calentamiento. Las pruebas se realizaron contra *Penicillium chrysogenum*, (A) luego de 6 horas de digestión con proteasas, (B) luego de calentar Ay-AMP1 a ebullición por 10 minutos.

6.5 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

En las pruebas de actividad contra las bacterias *Moraxella catharralis*, *Pseudomona aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, sólo se obtuvo una inhibición por debajo del 60% y a concentraciones muy altas de Ay-AMP1 (**Figura 6.10**).

Las cepas más susceptibles fueron *Vibrio cholerae* CDC V12 con una inhibición de 67.2% y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con una inhibición del 60%. Debido a que no se obtuvieron inhibiciones superiores al 60% no se pudo obtener una curva dosis-respuesta adecuada para determinar el IC_{50} .

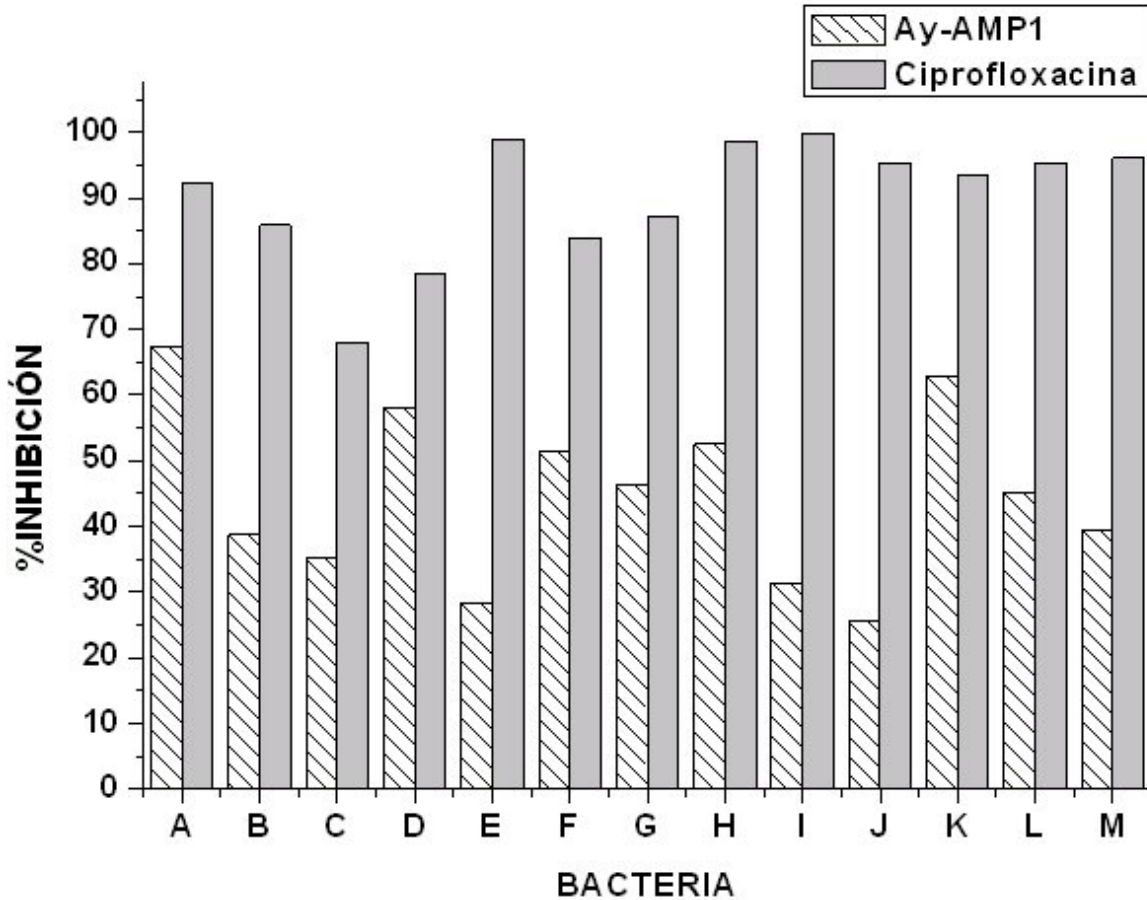


Figura 6.10 Actividad antibacteriana de Ay-AMP1.

Contra las cepas de bacterias **A:** *Vibrio cholerae* CDC V12; **B:** *Vibrio cholerae* No patógena; **C:** *Vibrio cholerae* caso clínico; **D:** *Sarcina lutea*; **E:** *Enterobacter aerogenes*; **F:** *Yersinia enterocolitina*; **G:** *Staphylococcus aureus* ATCC12398; **H:** *Moraxella catharralis*; **I:** *Escherichia coli* ATCC 35218; **J:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; **K:** *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; **L:** *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, y **M:** *Escherichia coli* ATCC 25922. La concentración de Ay-AMP1 en todos los casos fue de 335 $\mu\text{g/mL}$. La ciprofloxacin, control positivo se muestra a una concentración de 1.0 $\mu\text{g/mL}$.

6.6 ENSAYO DE UNIÓN A QUITINA

La secuencia de amino ácidos de Ay-AMP1 indica que pertenece a una superfamilia de proteínas de unión a quitina y para confirmar si poseía esa función, se eluyó por una minicolumna de quitina. La **figura 6.11** muestra el patrón electroforético de las fracciones que se pasaron por la minicolumna, se observa que la fracción eluída con PBS está casi

ausente, lo que indica que el péptido se unió a la columna y fue liberada con el ácido acético. Estos resultados indican que Ay-AMP1 tiene afinidad por la quitina. La tenue banda que se observa en la fracción de PBS se puede deber a saturación de la columna.

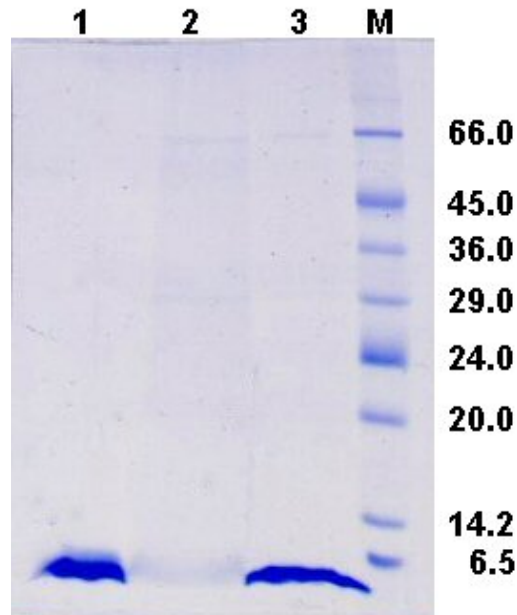


Figura 6.11 Gel de poliacrilamida para observar la unión a quitina de Ay-AMP1. Gel al 12%, la línea 1 corresponde al péptido que se corrió en la columna; la línea 2 es la fracción eluida con PBS 100mM, pH 7.4; la línea 3 es la fracción eluida con ácido acético 100 mM, pH 2.8. la línea marcada con M corresponde a los marcadores de peso molecular.

6.7 ENSAYO DE ACTIVIDAD QUITINASA

La división exoquitinolítica del extremo no reducido del sustrato $pNP-(GlcNAc)_2$, provoca la liberación de pNP (**Figura 6.12**). Ay-AMP1 liberó pNP a concentraciones de péptido tan bajas como 2-8 $\mu g/mL$, ésto es un reflejo del mecanismo de acción exoquitinasa de Ay-AMP1. Se debe recordar que $pNP-(GlcNAc)_2$ no es un sustrato específico para quitinasas; sin embargo, Roberts y Selitrennikoff en 1989, encontraron que las quitinasas bacterianas tenían 200 veces más afinidad para hidrolizar el sustrato que la β -N-

acetilglucosaminidasa, sugiriendo que la hidrólisis del sustrato cromogénico por otros compuestos no es un problema (Roberts y Selitrennikoff, 1989).

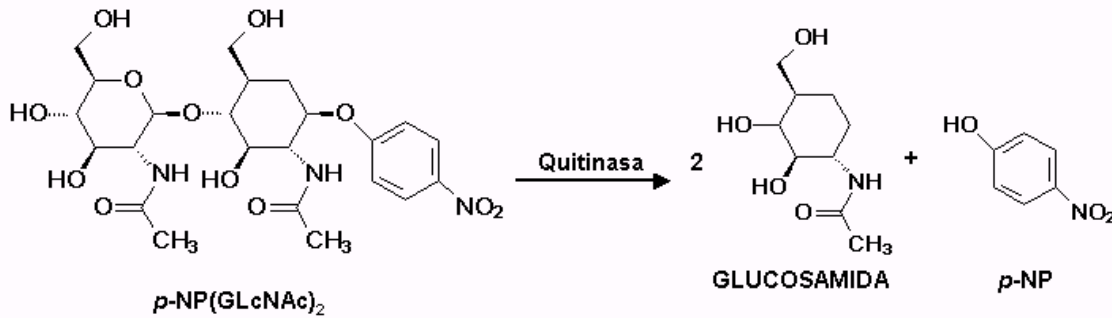


Figura 6.12 Reacción de la digestión del sustrato $p\text{NP}-(\text{GlcNAc})_2$ con quitinasa.

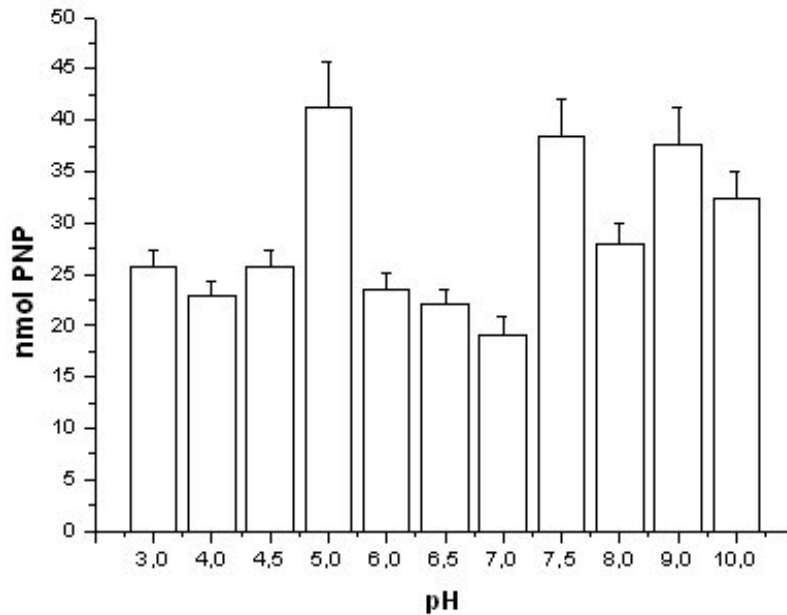


Figura 6.13 Efecto del pH en la actividad quitinasa.

El efecto del pH en la actividad quitinasa de Ay-AMP1 se examinó en una amplia gama de pHs, de 3.0 a 10.0 (**Figura 6.13**). Se observó que a pH 5.0 se alcanza el máximo de actividad enzimática, al igual que a pH básicos de 7.5 y 9.0.

En resumen, se identificaron dos péptidos antimicrobianos de las semillas de *A. hypochondriacus*, Ay-AMP1 y Ay-AMP2. Este último sólo pudo ser parcialmente purificado, por lo que no se pudo analizar su potencia antimicrobiana; sin embargo, se determinó que tiene 29 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 3028 Da. Además, se estableció que la secuencia de aminoácidos de Ay-AMP2 es idéntica a la de Ac-AMP1, un péptido antimicrobiano previamente aislado de las semillas de *A. caudatus* (Broekaert *et al.*, 1992).

El otro péptido, Ay-AMP1, se purificó completamente por RP-HPLC. La masa molecular de este péptido es de 3184 Da y tiene 30 residuos de aminoácidos. Su secuencia tiene un 100% de homología con la de Ac-AMP2, un péptido antimicrobiano aislado de las semillas de *A. caudatus* (Broekaert *et al.*, 1992). Esta identidad puede explicarse por el hecho de que las especies domesticadas, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, poseen un ancestro putativo común, *A. hybridus*, lo que es indicativo de que los péptidos antimicrobianos presentes en ambas especies, son de vital importancia para la defensa de la planta, puesto que el gen que los codifica se conservó a pesar de las domesticaciones separadas y de las claras diferencias fenotípicas entre *A. caudatus* y *A. hypochondriacus*; pues la primera presenta inflorescencias en forma cauda y sus semillas son de color marfil con bordes rojos; mientras que en *A. hypochondriacus* las inflorescencias crecen en forma de espiga y sus semillas son de color pardo claro. De la misma manera, Ay-AMP1 posee un 90% de identidad con Ar-AMP, un péptido antimicrobiano aislado de las semillas de *A. retroflexus*; difiriendo uno del otro únicamente en tres posiciones, V1, R6 y K23 en Ay-AMP1 que son reemplazadas por A1, Q6 y R23 en Ar-AMP.

De acuerdo con los resultados obtenidos por el alineamiento de secuencias de aminoácidos en BLAST, Ay-AMP1 y Ay-AMP2 pertenecen a la superfamilia de proteínas de unión a quitina. Esta afinidad por quitina se comprobó con la unión reversible de Ay-AMP1 a una minicolumna de quitina. Adicionalmente, se encontró que Ay-AMP1 posee capacidad para degradar quitina *in vitro*. Todo lo anterior sugiere que un posible mecanismo de acción de este péptido está basado en su afinidad hacia quitina. Dado que la quitina naciente del ápice hifal, donde el crecimiento hifal y el ensamble de la pared celular tienen lugar, es la más accesible, el péptido se localizaría a lo largo de la pared celular y se acumularía allí, ocasionando paredes celulares débiles que conducirían a la muerte del hongo.

En cuanto a la actividad y la potencia antimicrobiana, se encontró que Ay-AMP1 inhibe el crecimiento de hongos patógenos como *Candida albicans*, *Trichoderma* sp., *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus ochraceus* y *Alternaria alternata* a dosis muy bajas. Por otra parte, Ay-AMP1 mostró alta resistencia al efecto del calentamiento y de proteasas como pepsina, quimiotripsina y papaína. La alta resistencia de este péptido al efecto de proteasas y calentamiento puede deberse a que es pequeño y a la presencia de 4 puentes disulfuro que estabilizan la estructura. Sin embargo, Ay-AMP1 presentó efecto antagónico en presencia de 50mM de KCl y 5mM de CaCl₂. Finalmente, a pesar de la alta potencia antifúngica, se encontró muy baja actividad microbicida contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

7. CONCLUSIONES

- Los AMPs aislados de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* tienen exactamente la misma secuencia que los AMPs aislados de semillas de *Amaranthus caudatus*.
- De acuerdo con las alineaciones de las secuencias de Ay-AMP1 y Ay-AMP2, estos péptidos pertenecen a la superfamilia de proteínas de unión a quitina, lo cual se corroboró por cromatografía de afinidad en una minicolumna de quitina.
- Ay-AMP1 es un péptido fuertemente antifúngico y resistente a la acción de proteasas y las altas temperaturas.
- Ay-AMP1 presenta actividad quitinasa de acuerdo con los resultados obtenidos usando el sustrato *p*NP-(GlcNAc)₂.
- De acuerdo con su capacidad de unión a quitina y la actividad quitinasa presentada, se puede decir que el mecanismo de acción de este péptido es principalmente debido a su unión a quitina y probablemente a la degradación de ésta, debilitando la pared celular del hongo.
- Ay-AMP1 presenta muy baja actividad antibacteriana contra las bacterias probadas.

8. REFERENCIAS

Andreu, D., Rivas, L. 1998. Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers (Peptide Science)*, 47:415-433.

Archer, B.L., Audley, B.G., Swweney, G., Hong, T.C.J. 1969. Studies on composition of latex serum and bottom fraction particles. *Rubber Res. Inst.*, 21:560-569.

Arenas, R. 1993. *Micología Médica Ilustrada*. Primera Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V., México D.F, pág 11-36.

Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., Ouellette, A.J. 2000. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.*, 1:113-118.

Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., De Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.*, 198:149-168.

Barba de la Rosa, A.P., Paredes-López, O., Gueguen, J. 1992. Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *J. Agric. Food Chem.*, 40:937-940.

Barbieri, L., Batelli, M.G., Stirpe, F. 1993. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1154:237-282.

Bateman, A., Singh, A., Congote, L.F., Solomon, S. 1991. The effect of HP-1 and related neutrophil granule peptides on DNA synthesis in HL60 cells. *Regul. Pept.*, 35:135-143.

Bevins, C.L., Zasloff, M. 1990. Peptides from frog skin. *Annu. Rev. Biochem.*, 59:395-414.

Blanco-Labra, A., Iturbe-Chinas, F.A. 1980. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). *J. Food Biochem.*, 5:1-17.

Blondelle, S.E., Lohner, K., Aguilar, M.I. 1999. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1462:89-108.

Bohlmann, H., Apel, K. 1991. Thionins. *Annual Rev. Plant Physiol.*, 42:227-240.

Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., Vogeli, U. 1983. Chitinases in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta*, 157:22-31.

Boman, H.G., Agerberth, B., Boman, A. 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect. Immun.*, 61:2978-2984.

- Bormann, C., Baier, D., Horr, I., Rasp, C., Berger, J., Jung, G., Schwartz, H. 1999.** Molecular analysis of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* MNN9, required for glycosylation of cell wall mannoproteins. *J. Bacteriol.*, 181:7421-7429.
- Bowdish, D.M., Davidson, D.J., Lau, Y.E., Lee, K., Scott, M.G., Hancock, R.E. 2005.** Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.*, 77:451-459.
- Bradbury, A.F., Smyth, D.G. 1991.** Peptide amidation. *Trends Biochem. Sci.*, 16:112-115.
- Brockus, C. W., M. W. Jackwood, B. G. Harmon. 1998.** Characterisation of beta-defensin prepropeptide mRNA from chicken and turkey bone marrow. *Anim. Genet.*, 29:283-289.
- Broekaert, W., Terras, F., Cammue, B., Vanderleyden, J. 1990.** An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.*, 69:55-60.
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., Desamblanx, G.W., Usborn, R.W. 1997.** Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 16:297-323.
- Broekaert, W.F., Marien, W., Terras, F.R.G., De Bolle, M.F.C., Probst, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A. 1992.** Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry.*, 31:4308-4314.
- Brumfitt, W., Salton, M.R., Hamilton-Miller, J.M. 2002.** Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50:731-734.
- Cammue B.P.A, Thevissen K., Hendriks M., Eggermont K., Goderis I.J., Proost P., Van Damme J., Osborn R.W., Guerbette F., Kader J.C., Broekaert W.F. 1995.** A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.*, 109:445-455.
- Carlsson, R. 1977.** Amaranth species and related species for leaf protein concentrate production. *Proceedings of the Second Amaranth Conference.* Rodale Press, Emmaus, PA.
- Casteel, P., Ampe C., Jacobs, E., Vaeck, M., Temust. P. 1989.** Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.*, 8:2387-2391.
- Castillo, J. 1987.** *Micología General.* Primera Edición. Editorial Limusa S.A. de C.V. México D.F., pág. 17-18.
- Clark, D.P., Durell, S., Maloy, W.L., Zasloff, M. 1994.** Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *J. Biol. Chem.*, 269:10849-10855.

- Coca, M.A., Damsz, B., Yun, D.J., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Narasimhan, M.L. 2000.** Heterotrimeric G-proteins of a filamentous fungus regulate cell wall composition and susceptibility to a plant PR-5 protein. *Plant J.*, 22:61-69.
- Conlon, M.J. 2006.** *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier: San Diego, 305-309.
- Coot, P.J., Holyoak, C.D., Bracey, D., Ferdinando, D.P., Pearce, J.A. 1998.** Inhibitory action of the amphibian skin peptide dermaseptin S3 on *S. cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42:2160-2170.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005.** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3:777-788.
- Cunliffe, R.N., Mahida, Y.R. 2004.** Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J. Leukoc. Biol.*, 75:49–58.
- Chagolla-López, A., Blanco-Labra, A., Patthy, A., Sánchez, R., Pongor, S. 1994.** A novel α -amylase inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) seeds. *J. Biol. Chem.*, 269: 23675-23680.
- Chan, K.F., Sun, M. 1997.** Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of amaranthus. *Theor. Appl. Genet.*, 95:865-873.
- Chang, T. L., Vargas, J., Del Portillo, Jr,A., Klotman, M. E. 2005.** Dual role of α -defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J. Clin. Investig.*, 115:765-773.
- Chatterjee, S., Chatterjee, S., Lad, S.J., Phansalkar, M.S., Rupp, R.H., Ganguli, B.N., Fehlhaber, H.W., Kogler, H. 1992.** Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization. *J. Antibiot.*, 45:832-838.
- Chen, S., Paredes-López, O. 1997.** Isolation and characterisation of the 11S globulin from amaranth seeds. *J. Food Biochem.*, 21:53-65.
- Chiang, C.C., Hadwiger, L.A. 1991.** The *Fusarium solani*-induced expression of a pea gene family encoding high cysteine content proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4:324-331.
- De Lucca, A.J., Bland, J.M., Jacks, T.J., Grimm, C., Walsh, T.J. 1998.** Fungicidal and binding properties of the natural peptides cecropin B and dermaseptin S1. *Med. Mycol.*, 36:291-298.
- Duits, L.A., Ravensbergen, B., Rademaker, M., Hiemstra, P.S., Nibbering, P.H. 2002.** Expression of β -defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology*, 106:517-525.
- Ehrenstein, G., Lecar, H.Q. 1977.** Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Rev. Biophys.*, 10:1-34.

Elsbach, P. 2003. What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *J. Clin. Investig.*, 111:1643–1645.

Epple, P., K. ApelEngström, P., Carlsson, A., Engström, Å., Tao, Z.J., Bennich, H. 1984. The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 3:3347-3351.

Epand, R.M., Vogel, H.J. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biophys. Acta, Biomembr.*, 1462:11-28.

Evans, E.W., Beach, F.G., Moore, M., Jackwood, W., Glisson, J.R., Harmon, B.G. 1995. Antimicrobial activity of chicken and turkey heterophils CHP1, CHP2, THP1 and THP3. *Vet. Microbiol.*, 47:295-303.

Fang, X.M., Shu, Q., Chen, Q.X., Book, M., Sahl, H.G., Hoefft, A., Stuber, F. 2003. Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood. *Eur. J. Clin. Investig.*, 33:82-87.

Fant, F., Vranken, W.V., Borremans, F.A.M. 1999. The three-dimensional structure of *Aesculus hippocastanum* antimicrobial protein 1 determined by 1H NMR. *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, 37:388-403.

Fernández-Andreu, C.M., Pimentel-Turino, T., Martínez-Machín, G., González-Miranda, M. 1999. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fluconazol frente a *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Cubana Med. Trop.*, 51, 55-57.

Gales, A.C., Reis, A.O., Jones, R.N. 2001. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin b and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J. Clin. Microbiol.*, 39:183-190.

Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 3:710-720.

Gao, G.H., Liu, W., Dai, J.X., Wang, J.F., Hu, Z., Zhang, Y., Wang, D.C. 2001. Solution structure of PAFP-S: a new knottin-type antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*. *Biochemistry*, 40:10973-10978.

Gazit, E., Lee, W.L., Brey, P.T., Shai, Y. 1994. Mode of action of the antibacterial cecropin B2: A spectrofluorometric study. *Biochemistry*, 33:10681-10692.

Gennaro, R., Skerlavaj, B., Romeo, D. 1989. Purification, composition, and activity of two bactenecins antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect. Immun.*, 57:3142-3146.

Gesell, J., Zasloff, M., Opella, S.J. 1997. Two-dimensional 1H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *J. Biomol. NMR*, 9:127-135.

Ghosh, J.K., Shaool, D., Guillaud, P., Ciceron, L., Mazier, D. Kustanovich, I., Shay, Y., Mor, A. 1997. Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. *J. Biol. Chem.*, 267:6502-6509.

Groisman, E.A. 1996. Bacterial responses to host defense peptides. *Trends Microbiol.*, 4:127-128.

Gu, Q., Kawata, E.E., Morse, M. J., Wu, H.M., Cheung, A.Y. 1992. A flower-specific cDNA encoding a novel thionin in tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, 234:89-96.

Guihard, G., Bénédicti, H., Besnard, M., Letellier, L. 1993. Phosphate efflux through the channels formed by colicins and phage T5 in *Escherichia coli* cells is responsible for the fall in cytoplasmic ATP. *J. Biol. Chem.*, 268:17775-17780.

Gyurko C., Lendenmann U., Helmerhorst E.J., Troxler R.F., Oppenheim F.G. 2001. Killing of *Candida albicans* by histatin 5: Cellular uptake and energy requirement. *Antonie Leeuwenhoek.*, 79:297-309.

Habermann, E. 1972. Bee and wasp venoms. *Science*, 177:314-322.

Hancock, R.E., Chapple, D.S. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43:1317-1323.

Hancock, R. E., and G. Diamond. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.*, 8:402-410.

Hancock, R.E. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.*, 1:156-164.

Hara, S., Yamakawa, M. 1995. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 270:29923-29927.

Harwig S.S, Kokryakov, V.N., Swiderek, K.M., Aleshina, G.M., Zhao, C., Lehrer, R.I. 1995. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Lett.*, 362:65-69.

Hay, D. I. 1973. The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch. Oral. Biol.*, 18:1517-1529.

Helmerhorst, E.J., Troxler, R.F., Oppenheim, f.G. 2001. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:14637-14642.

Hernández, P., Tetaert, D., Vergoten, G., Debray, H., Jiménez, M.C., Álvarez, G., Agundis, C., Degand, P., Zenteno, E. 2004. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn *hypochondriacus* lectin for O-glycopeptides. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 1674:282-290.

- Hirai, Y., Yasuhara, T., Yoshida, H. Nakajima, T. Fujino, M., Kitada, C. 1979.** A new mast cell degranulating peptide 'mastoparan' in the venom of *Vespula lewisii*. *Chem. Pharm. Bull.*, 27:1942-1944.
- Horikawa, R., Parker, D.S., Herring, P.L., Pisano, J. 1985.** Pipinins: new mast cell degranulating peptides from *Rana pipiens*. *Fed. Proc.*, 44:695.
- Huang, R.H., Xiang, Y., Liu, X.Z., Zhang, Y., Hu, Z., Wang, D.C. 2002.** Two novel antifungal peptides distinct with a 5-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. *FEBS Lett.*, 521:87-90.
- Huang, X., Xie, W., Gong, Z. 2000.** Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Lett.*, 478:123-126.
- Hunter, H.N., Demcoe, A.R., Jansen, H., Gutteberg, T.J., Vogel, H.J. 2005.** Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in a membrane mimetic solvent. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49:3387-3395.
- Iglesias, R., Arias, F.J., Rojo, M.A., Escarmis, C., Ferreras, J.M., Girbes, T. 1993.** Molecular action of the type 1 ribosome-inactivating protein saporin 5 on *Vicia sativa* ribosomes. *FEBS Lett.*, 325:291-294.
- Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., Maas, C. 1995.** Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.*, 8:97-109.
- Jensen, H., Hamill, P., Hancock, R.E.W. 2006.** Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Reviews*, 19:491-511.
- Johnson, B., Ander, H., Meleney, F. 1945.** Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science*, 102:376-377.
- Joshi, B.N., Sainani, M.N., Bastawade, K.B., Gupta, V.S., Ranjekar, P.K. 1998.** Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 246:382-387.
- Jung G. 1991.** Lantibiotics-ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and a β -didehydroamino acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 30:1051-1068.
- Kavanagh, K., Dowd, S. 2004.** Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J. Pharm. Pharmacol.*, 56:285-289.
- Ketchum, R.R., Lee, K.C., Huo, S., Cross, T.A. 1996.** Macromolecular structural elucidation with solid-state NMR-derived orientational constraints. *J. Biomol. NMR*, 8:1-14.

Kim, D.H., Lee, Y.T., Chung, J.H., Lee, B.I., Choi, B.S., Lee, Y. 1998. Bacterial expression of tenecin 3, an insect antifungal protein isolated from *Tenebrio molitor*, and its efficient purification. *Mol. Cells.*, 31:786-789.

Koepe, S.J., Rupnow J.H. 1988. Purification and characterization of a lectin from the seeds of amaranth (*Amaranthus cruentus*). *J. Food Sci.*, 53:1412-1417.

Kokryakov, V.N., Harwig, S.S., Panyutich, E.A., Shevchenko, A.A., Aleshina, G.M., Shamova, O.V., Korneva, H.A., Lehrer, R.I. 1993. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.*, 327:231-236.

Koo, J.C., Lee, S.Y., Chun, H.J., Cheong, Y.H., Choi, J.S., Kawabata, S.I., Miyagim M., Tsunasawa, S., Ha, K.S., Bae, D.W., Han, C., Lee, B.L., Cho, M.J. 1998. Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1382:80-90.

Kragh, K.M., Nielsen, J.E., Nielsen, K.K., Dreboldt, S., Milkelsen, J.D. 1995. Characterisation and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 8:424-434.

Krugliak, M., Feder, R., Zolotarev, V.Y., Gaidukov, L., Dagan, A., Ginsburg, H., Mor, A. 2000. Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.*, 44: 2442-2451.

Ladokhin, A.S., Selsted, M.E., White, S.H. 1997. Bilayer interactions of indolicidin, a small antimicrobial peptide rich in tryptophan, proline, and basic amino acids. *Biophys. J.*, 72:794-805.

Lásztity, R. 1984. *The Chemistry of Cereal Proteins*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Lazarovici, P., Primor, N., Loew, L.M. 1986. Purification and poreforming activity of two hydrophobic polypeptides from the secretion of the Red Sea moose sole (*Pardachirus marmoratus*). *J. Biol. Chem.*, 261:16704-16713.

Lee, D.G., Kim, H.K., Kim, S.A., Park, Y., Park, S.C., Jang, S.H., Hahm, K.S. 2003. Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305:305-310.

Lee, H.I., Broekaert, W.F., Raikhel, N.V. 1991. Co- and post-translational processing of the hevein in preprotein of latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *J. Biol. Chem.*, 266:15944-15955.

Lee, I. H., Zhao, C., Cho, Y., Harwig, S. S. L., Cooper, E. L., Lehrer, R. I. 1997. Clavanins, α -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Lett.*, 400:158-162.

- Lee, S.Y., Moon, J.H., Kurata, S., Natori, S., Lee, B.L. 1995.** Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae. *Biol. Pharm. Bull.*, 18:1049-1052.
- Lee, T.H., Rivett, D., Werkmeister, J., Hewish, D., Aguilar, M.I. 1999.** Interaction of amphipathic peptides with an immobilised model membrane. *Lett. Pept. Sci.*, 6:371-380.
- Lehrer, R.I., Ganz, T., Selsted, M.E. 1991.** Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell*, 64:229-230.
- Lehrer, R.I., Szklarek, D., Ganz, T., Selsted, M.E.. 1985.** Correlation of binding of rabbit granulocyte peptides to *Candida albicans* with candidacidal activity. *Infect. Immun.*, 49:207-211.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. 1996.** The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86:973-983.
- Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E., Egorov, T. 2005.** An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry.*, 66:2426-2431.
- Lis, H., Sharon, N. 1977.** Lectins: their chemistry and application to immunology. *The Antigens*. Volumen 4, Editorial Academic Press, New York.
- Ludtke, S.J., He, K., Heller, W.T., Harroun, T.A., Yang, L., Huang, H.W. 1996.** Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, 35:13723-13728.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. 1997.** Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10:369-400.
- Mangoni, M.L., Marcellini, H.G.L., Simmaco, M. 2007.** Biological characterization and modes of action of temporins and bombinins H, multiple forms of short and mildly cationic anti-microbial peptides from amphibian skin. *J. Pept. Sci.*, 13:603-613.
- Mangoni, M.L., Miele, R., Renda, T.G., Barra, D., Simmaco, M. 2001.** The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms. *FASEB J.*, 15:1431-1432.
- Marcone, M.F., Yada, Y. 1992.** Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *J. Agric. Food Chem.*, 40:385-389.
- Martins, J.C., Maes, D., Loris, R., Pepermans, H.A.M., Wyns, L., Willem, R., Verheyden, P. 1996.** ¹H NMR Study of the solution structure of Ac-AMP2, a sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*. *J. Mol. Biol.*, 258:322-333.

- Masuda, M., Nakashima, H., Ueda, T., Naba, H., Ikoma, R., Otaka, A., Terakawa, Y., Tamamura, H., Ibuka, T., Murakami, T. 1992. A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr^{5,12},Lys⁷]-polyphemusin II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189:845-850.
- Matsuzaki, K. 1998. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1376:391-400.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fuji, N., Miyajima, K. 1995. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, Magainin 2. *Biochemistry*, 34:3423-3429.
- Mattick, A.T.R., Hirsch, A. 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 11:5-7.
- Méndez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G.G., Méndez, R., Soriano, F., Salinas, M., De Haro, C. 1990. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, g-hordothionin, from barley endosperm. *Eur. J. Biochem.*, 194:533-539.
- Mignogna, G., Simmaco, M., Kreil, G., Barra, D. 1993. Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *EMBO J.*, 12:4829-4832.
- Molano, J., Polacheck, I., Duran, A., Cabib, E. 1979. An endochitinase from wheat germ. *J. Biol. Chem.*, 524:4901-4907.
- Money, N. 1990. Measurement of hyphal turgor. *Exp. Mycol.*, 14:416-425.
- Money, N., Harold, F. 1992. Extension growth of the water mold *Achlya*: Interplay of turgor and wall strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:4245-4249.
- Mor, A., Nicolas, P. 1994. The NH₂-terminal helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.*, 269:1934-1939.
- Moreno, M., Segura, A., García-Olmedo, F. 1994. Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. *Eur. J. Biochem.*, 223:135-139.
- Morikawa, N., Hagiwara, K., Nakajima, T. 1992. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog *Rana brevipoda* porsa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189:184-190.
- Morrisette, J., Kratzschmar, J., Haendler, B., El-Hayek, R., Mochca-Morales, J., Martin, B.M., Patel, J.R., Moss, R.L., Shleuning, W.D., Coronado, R. 1995. Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin blocks ryanodine receptors. *Biophys. J.*, 68:2280-2288.
- Mozsolits, H., Wirth, H.J., Werkmeister, J., Aguilar, M.I. 2001. Analysis of antimicrobial peptide interaction with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Act. Biomembr.*, 1512:64-76.

Niderman, T., Genetet, I., Buryere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., Mosinger, E. 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal (isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 108:17-27.

Nielsen, K.K., Nielsen, J.E., Madrid, S.M., Mikkelsen, J.D. 1997. Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from Sugar Beet leaves. *Plant Physiol.*, 113:83-91.

Okada, T., Yoshizumi, H. 1973. The mode of action of toxic protein in wheat and barley on brewing yeast. *Agric. Biol. Chem.*, 37:2289-2294.

Oppenheim, F.G., Xu, T., McMillan, F.F., Levitz, S.M., Diamond, R.D., Offner, G.D., Troxler, R.F. 1988. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, 263:7472-7477.

Oren, Z., Hong, J., Shai, Y. 1999. A comparative study on the structure and function of a cytolytic α -helical peptide and its antimicrobial β -sheet diastereomer. *Eur. J. Biochem.*, 259:360-369.

Ostoa-Saloma, P., Carrero, J.C., Petrossian, P., Herion, P., Landa, A., Laclette, J.P. 2000. Cloning, characterization and functional expression of a cyclophilin of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.*, 107:219-225.

Panyutich, A., Shi, J., Boutz, P.L., Zhao, C., Ganz, T. 1997. Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted propeptidases. *Infect. Immun.*, 65:978-985.

Papagianni M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol Adv.*, 21:465-499.

Park, C.B., Kim, H.S., Kim, S.C. 1998 (a). 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.*, 244:253-257.

Park, I.Y., Park, C.B., Kim, M.S., Kim, S.C. 1998 (b). Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett.*, 437:258-262.

Pazgier, M., Prahl, A., Hoover, D.M., Lubkowski, J. 2007. Studies of the biological properties of human beta-defensin 1. *J. Biol. Chem.*, 282:1819-1829.

Ponti, D., Mignogna, G., Mangoni, M.L., De Biase, D., Simmaco, M., Barra, D. 1999. Expression and activity of cyclic and linear analogues of esculentin-1, an antimicrobial peptide from amphibian skin. *Eur. J. Biochem.*, 263:921-927.

Powers, J.P., Tan, A., Ramamoorthy, A., Hancock, R.E. 2005. Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes. *Biochemistry*, 44:15504-15513.

Poznansky, J., Sodano, P., Suh, S.W., Lee, J.Y., Ptak, M., Vovelle, F. 1999. Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds. Comparison with homologous proteins. *Eur. J. Biochem.*, 259:692-708.

Ramírez, M., Aguilar, M., Miguel, R., Bolaños, V., García, E., Soriano-García, M. 2003. Amino acid sequence, biochemical characterization and comparative modeling of nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 415:24-33.

Riley, M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.*, 32:255-278.

Rinderle, S.J., Goldstein, I.J., Remsen, E.E. 1989. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seed of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T) -antigen. *J. Biol. Chem.*, 264:16123-16131.

Rivillas-Acevedo, L.A., Soriano-García, M. 2007. Isolation and biochemical characterization of an antifungal peptide from *Amaranthus hypochondriacus* seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 55:10156-10161.

Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P. 1989. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.*, 134:169-176.

Rozeq, A., Friedrich, C.L., Hancock, R.E. 2000. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecyl phosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*, 39:15765-15774.

Sauer, J.D. 1967. The grain amaranths and their relatives: A revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 54 (2):103-137.

Schimoler-O'Rourke, R., Richardson, M., Selitrennikoff, C.P. 2001. Zeamatin inhibits trypsin and α -amylase activities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:2365-2366.

Segura-Nieto, M., Barba de la Rosa, A.P., Paredes-López, O. 1994. Biochemistry of amaranth proteins. *Amaranth biology, chemistry and technology*, CRC Press.

Segura-Nieto, M., Vázquez-Sánchez, N., Rubio-Velázquez, H., Olguín-Martínez, L.E., Rodríguez-Nester, C.E., Herrera-Estrella, L. 1992. Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 40:1553-1558.

Selitrennikoff, C.P. 2001. Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:2883-2894.

- Selsted, M. E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.Q., Smith, W., Cullor, J.S. 1992.** Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 267:4292-4295.
- Shai, Y. 1999.** Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1462:55-70.
- Shai, Y. 2002.** From innate immunity to de-Novo designed antimicrobial peptides. *Curr. Pharm. Des.*, 8:715-725.
- Sharon, N., Lis, H. 1982.** Glycoproteins: research booming on long ignored ubiquitous compounds. *Mol. Cell. Biochem.*, 42:167-187.
- Shewry, P.R., Hill, J.M., Pratt, H.M., Leggatt, M.M., Miflin, B.J. 1978.** An evaluation of techniques for the extraction of hordein and glutelin from barley seed and a comparison of the protein composition of Bomi and Riso 1508. *J. Exp. Bot.*, 29:677-692.
- Shi, J., Ganz, T. 1998.** The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect.Immun.*, 66:3611-3617.
- Shigenaga T., Muta T., Toh Y., Tokunaga F., Iwanaga S. 1990.** Anti-microbial tachyplesin peptide precursor. cDNA cloning and cellular localization in the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). *J. Biol. Chem.*, 265: 21350-21354.
- Shinshi, H., Mohnene, D., Meins, F. 1987.** Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: inhibition of chitinases and chitinases mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84:89-93
- Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R., Mangoni, M.L., Barra, D. 1996.** Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur. J. Biochem.*, 242:788-792.
- Smidt, D. 1977.** Grain amaranth: A look at some potentials. *Proc. 1st Amaranth Sem.*, Rodale Press, Emmaus, PA.
- Standley, P.C. 1917.** Amaranthaceae. *North Amer. Flora*, 21:95-169.
- Steiner, H., Andrew, D., Merrifield, R.B. 1988.** Binding and action of cecropin and cecropin analogues: Antibacterial peptides from insects. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 939:260-266.
- Steiner, H., Hulmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Boman, H.G. 1981.** Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292:246-248.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdioglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B. 1993.** Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75:687-706.

- Stone, D.J., Waugh, R.J., Bowie, J.H., Wallace, J.C., Tyler, M.J. 1992.** The structures of the caerins and caeridin 1 from *Litoria splendida*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1:3173-3178.
- Suginta, W. 2007.** Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinases isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme. Microb. Technol.*, 41:212-220.
- Tallarida, R.J., Murria, R.B. 1987.** Graded Dose-Response. *Manual of Pharmacological Calculations with Computer programs*. Second edition. Springer-Verlag, New York, 27-31.
- Tang, Y.Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C.J., Ouellette, A.J., Selsted, M. E. 1999.** A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*, 286:498-502.
- Teeter, M.M., Roe, S.M., Heo, N.H. 1993.** Atomic resolution (0.83 Angstroms) crystal structure of the hydrophobic protein crambin at 130 K. *J. Mol. Biol.*, 230:292-311.
- Terras, F.R.G., Schoofs, H.M.E., De Bolle, M.F.C., Van Leuvenll, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B., Broekaert, W.F. 1992.** Analysis of two novel plant antifungal from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.*, 267:15301-15309.
- Theis, T., Stahl, U. 2004.** Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61:437-455.
- Thevissen K., Ghazi A., De Samblanx G.W., Brownlee C., Osborn R.W., Broekaert W.F. 1996.** Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.*, 271:15018-15025.
- Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A. 2000.** Amphipatic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55:4-30.
- Townes, C.L., Michailidis, G., Nile, C.J., Hall, J. 2004.** Induction of cationic chicken liver-expressed antimicrobial peptide 2 in response to *Salmonella enterica* infection. *Infect. Immun.*, 72:6987-6993.
- Tuncui, J.A., Taylor, S.W. 2004.** Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48:3645-3654.
- Valdés-Rodríguez, S., Blanco-Labra, A., Gutiérrez-Benicio, G., Boradenenko, A., Herrera-Estrella, A., Simpson, J. 1999.** Cloning and characterization of trypsin inhibitor cDNA from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. *Plant Mol. Biol.*, 41:15-23.
- van Kraaij, C., Vos, W.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P. 1999.** Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Nat. Prod. Rep.*, 16: 575-587.
- Van Parijs, J., Broekaert, W.F., Goldstein, I.J., Peumans, W.J. 1991.** Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, 183:258-264.

Vasco, N., Soriano, M., Moreno, A., Castellanos, R., Paredes, O. 1999. Purification, crystallization, and preliminary X-ray characterization of a 36 KDa amaranth globulin. *J. Agric. Food Chem.*, 47:862-866.

Vodyanoy, I., Hall, J.E., Balasubramanian, L. 1983. Allameticin-induced current-voltage curve asymmetry in lipid bilayers. *Biophys. J.*, 42:71-82.

Wakabayashi, H., Takase, M., Tomita, M. 2003. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Curr. Pharm. Des.*, 9:1277-1287.

Wang, Y., Henz, M.E., Gallagher, N.L.F., Chai, S., Gibbs, A.C., Yan, L.Z., Stiles, M.E., Wishart, D.S., Vederas, J.C. 1999. Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIA bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*, 38:15438-15447.

Weinrauch, Y., Foreman, A., Shu, C., Zarembek, K., Levy, O., Elsbach, P., Weiss, J. 1995. Extracellular accumulation of potentially microbicidal bactericidal/permeability-increasing protein and p15s in an evolving sterile rabbit peritoneal inflammatory exudate. *J. Clin. Investig.*, 95:1916-1924.

Wieprecht, T., Dathe, M., Epand, R., Beyermann, E., Maloy, W.L., MacDonald, D.L., Bienert, M. 1997. Influence of the angle subtended of the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry*, 36:12869-12880.

Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B.W., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbole, D.J., Bodo, B., Kenerley, C. 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J. Biol. Chem.*, 277:20862-20868.

Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M. 1996. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, 379, 466-469.

Wright, D.J. 1987. The seed globulins. *Developments in Food Proteins*. Editorial Elsevier Applied Science.

Wu, M., Maier, E., Benz, R., Hancock, R. 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 38:7235-7242.

Xu, Y., Ambudkar, I., Yamagishi, H., Swaim, W., Walsh, T.J., O'Connell, B.C. 1999. Histatin 3-mediated killing of *Candida albicans*: effect of extracellular salt concentration on binding and internalization. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43:2256-2262.

Yang, L., Horroon, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., Huang, H.W. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.*, 81:1475-1485.

Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W., Oppenheim, J.J. 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.*, 23:291–296.

Zanetti, M., Gennaro, R., Romeo, D. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.*, 374:1-5.

Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84:5449-5443.

Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415:389-395.

Zenteno, E., Ochoa, J.L. 1988. Purification of a lectin from *Amaranthus leucocarpus* by affinity chromatography. *Phytochemistry*, 27:313-317.

Zhang, G.P., Shi, Y.L., Wang, W.P., Liu, W.Y. 1999. Cation channel formed at lipid bilayer by Cinnamomin, a new type II ribosome-inactivating protein. *Toxicon*, 37:1313-1322.

9. ARTÍCULO

Isolation and Biochemical Characterization of an Antifungal Peptide from *Amaranthus hypochondriacus* Seeds

LINA A. RIVILLAS-ACEVEDO AND MANUEL SORIANO-GARCÍA*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán C.P. 04510, México D.F., México

An antifungal peptide, Ay-AMP, was isolated from *Amaranthus hypochondriacus* seeds by acidic extraction and then purified by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. The molecular mass of this peptide, as determined by mass spectrometry, is 3184 Da. The peptide belongs to the superfamily of chitin-binding proteins, containing a single cysteine/glycine-rich chitin-binding domain, and it was found that Ay-AMP degrades chitin. Ay-AMP inhibits the growth, at very low doses, of different pathogenic fungi, such as *Candida albicans*, *Trichoderma* sp., *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus schraceus*, and *Alternaria alternata*. Ay-AMP is very resistant to the effect of proteases and heating; however, it showed an antagonistic effect with CaCl₂ and KCl.

KEYWORDS: Antifungal activity; antifungal peptide; peptide purification; *Amaranthus hypochondriacus*; chitin-binding peptide

INTRODUCTION

Plants use a variety of antimicrobial proteins and peptides to protect themselves from pathogen invasion, and they are mostly antifungal. Their mechanisms of action are as varied as their sources and include fungal cell wall polymer degradation, membrane channel, pore formation, damage to cellular ribosome, inhibition of DNA synthesis, and inhibition of the cell cycle (1). On the basis of homologies at the primary structure level, they can be classified into distinct families, including thionins (2), plant defensins (3), lipid-transfer proteins (4), chitinases (5), glucanases (6), hevein- and knottin-type antimicrobial peptides (1), and chitin-binding proteins (7).

The chitin-binding proteins have been isolated from diverse sources, and most of them have shown antifungal activity against phytopathogenic species, because chitin is the key component of the cell wall of these microorganisms. They have shown to affect fungal growth and development, disturbing the synthesis and/or deposition of chitin in the cell wall (5). The chitin-binding proteins from plants have been classified as PR-4 proteins. They are subdivided into two classes within this group. Class I has an N-terminal domain, which is similar to a domain present in hevein, a protein from rubber latex (8), whereas class II PR-4 proteins lack this domain. Examples of such chitin-binding proteins are chitinases from bean (9), wheat (10), and tobacco (11), chitin-binding lectins from wheat (12), barley (13), rice (14), breadfruit (15), *Pakia platycephala* (16), chitin-binding

proteins and peptides from *Amaranthus retroflexus* and *Amaranthus caudatus* (17, 18), sugar beet (19), *Pharbitis nil* L. (20), *Eucommia ulmoides* (21), and *Ginkgo biloba* (22). The size of chitin-binding proteins varies from 3.1 up to 20 kDa; they often have a basic pI and are highly resistant to extreme pH and protease treatment (7).

Since prehispanic time, every part of the *Amaranthus hypochondriacus* plant has been broadly used in Mexico, especially the seeds. Some proteins from *A. hypochondriacus* seeds have already been isolated in our laboratory, such as the nsLTP1 (nonspecific lipid-transfer protein) with 9.7 kDa (23), which plays a role in the plant defense, and a globulin of 34.9 kDa, which is a storage protein very important in nutrient conservation (24).

Currently, there is a great interest in antimicrobial peptides, because these so-called “natural antibiotics” are promising to overcome the growing problem of antimicrobial resistance. There are already studies about antimicrobial peptides isolated from another amaranth seeds; however, there are not reports about these kind of peptides on the Mexican species *A. hypochondriacus*. Therefore, in this paper, we report the isolation, amino acid sequence determination, and biological properties of the antimicrobial peptide Ay-AMP from the seeds of *A. hypochondriacus*. According to its amino acid sequence and cysteine motif, Ay-AMP belongs to a superfamily of chitin-binding proteins, containing a single cysteine/glycine-rich chitin-binding domain.

MATERIALS AND METHODS

Biological Materials. Amaranth seeds were used as plant material for peptide extraction and analysis. Amaranth (*A. hypochondriacus*)

* To whom correspondence should be addressed. Telephone: (5255) 5622-4569. Fax: (5255) 5616-2217. E-mail: soriano@servidor.unam.mx.

dry seeds were bought from local producers from the state of Tlaxcala in México. The seeds were stored at room temperature. The fungi *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus schraceus*, *Trichoderma* sp., *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus arrhizus*, *Alternaria alternata*, *Trichophyllum mentagrophytes*, and *Geotrichum candidum* were supplied by the UNAM mycology laboratory, UNIGRAS. Their spores were collected as described by Broekaert and collaborators (25) and stored at -70°C .

Chemicals. All chemicals used in this study were of the highest grade available from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA) with a resistance greater than $18\text{ M}\Omega$ was used throughout. The samples and solutions were sterilized by filtration through $0.22\ \mu\text{m}$ sterile filters (Millipore, Bedford, MA) prior to use.

Peptide Extraction and Purification. Ground seeds were extracted with 10% (v/v) acetic acid for over 1 h. The extract was centrifuged at 13 000 rpm. The soluble part was precipitated with acetone overnight. The precipitated fraction was collected by centrifugation at 3000 rpm, redissolved in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (v/v) and injected onto a C18 RP-column (17).

The peptides were eluted with a linear acetonitrile gradient (0–40% of solvent B in solvent A for 60 min). Solvent A is 0.1% TFA in water (v/v), and solvent B is acetonitrile (17). The fractions were tested against *C. albicans* and *P. chrysogenum*.

Antifungal Activity. The microbiological tests were performed on microplates using phytopathogenic and dermatopathogenic fungi, *P. chrysogenum*, and *C. albicans*, following the methodology developed by Broekaert and collaborators in 1990 (25), with some variations. Routinely, tests were performed with $20\ \mu\text{L}$ of a filter-sterilized test solution, $10\ \mu\text{L}$ of a fungal spore suspension (2×10^4 spores/mL), and $70\ \mu\text{L}$ of potato dextrose broth (PDB). Control microcultures contained $20\ \mu\text{L}$ of sterile distilled water instead of the test solution. It was incubated at room temperature for 48 h. The growth inhibition percentage is defined as 100 times the ratio of the corrected absorbance of the control microculture minus the corrected absorbance of the test microculture over the corrected absorbance at 570 nm of the control microculture. The corrected absorbance value is the absorbance at 570 nm of the culture measured after 48 h minus the absorbance at 570 nm of the culture measured after 30 min. A 1 mg/mL dose of nistatine (Alpharma, México D.F.) was used as a positive control. The absorbance was measured in an Elx-808 Ultra Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT).

Minimal Inhibitory Concentration (MIC). A total of 11 concentrations of Ay-AMP (40–0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used to test the fungal growth inhibition against *C. albicans*, *A. flavus*, *A. candidus*, *A. schraceus*, *Trichoderma* sp., *F. solani*, *F. oxysporum*, *P. chrysogenum*, *Rhizopus arrhizus*, *A. alternata*, *T. mentagrophytes*, and *G. candidum*. A total of $30\ \mu\text{L}$ from a $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ stock solution of Ay-AMP was taken and put on the first column of flat-bottom microplates. Then, double serial dilutions were made with distilled sterile water for the remaining columns (26). The microbial test was made as explained above, and the MIC was assumed as the minimal concentration that inhibits 80% fungal growth. Triplicate assays were conducted.

IC₅₀. The dose–response relation of many agonists yields sigmoidal curves when the response is plotted against the logarithm of the dose. There is no generally accepted theory that explains the shape of such curves; however, it was found that such curves are often approximately linear between 20 and 80%. Therefore, the data in the 20–80% region may be subjected to linear regression, in which the ordinate is the inhibition percent and abscissa is the log dose (27). To perform the test, logarithmic dilutions were made of the peptide and then the activity was measured as explained above. The doses tested were 31.62, 10.0, 3.16, 1.0, 0.32, and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Triplicate assays were conducted.

Protein Quantification. Protein concentration in the extract and the peptide concentration were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Bovine serum albumin was employed as a standard. The protein concentration was expressed as micrograms per milliliter. Triplicate assays were conducted.

Electrophoresis. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE, 16%) was performed on a Bio-Rad electro-

phoresis apparatus. The sample buffer contained 1 M Tris-HCl at pH 6.8, 1% (w/v) SDS, 2% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue, and 20% (v/v) glycerol. Peptides were fixed after electrophoresis in 10% (v/v) trichloroacetic acid and 40% (v/v) methanol and then Coomassie-stained. Isoelectric focusing was performed on precast IEF gels in the pI range from 3 to 9, and a marker protein was used in the same pI range (Amersham, Piscataway, NJ).

In-Gel Digestion. In-gel digestion of samples was carried out using the method described by Wilm et al. (28). Briefly, excised gel spots were treated with 50 mM ammonium bicarbonate in 50% acetonitrile to remove Coomassie Brilliant Blue. The disulfide bonds were reduced with 10 mM dithiothreitol for 45 min at 56°C , and SH groups were subsequently alkylated with 55 mM iodoacetamide. The gel pieces were washed, then dehydrated with acetonitrile, reswelled on ice in a digestion buffer containing 12.5 ng/ μL trypsin and 50 mM ammonium bicarbonate, and incubated overnight at 37°C . Peptides were extracted with 50% acetonitrile and desalted by ZipTip C18.

Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC–MS/MS) Analysis. The mixture of tryptic gel-digested peptides was condensed to a concentration of approximately 500 pmol/5 μL of 1% acetic acid and directly loaded into a Finnigan LCQ ion-trap mass spectrometer (San Jose, CA) using a Surveyor MS syringe pump delivery system. The eluate at $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ was split to allow only 5% of the sample to enter the nanospray source ($0.5\ \mu\text{L}/\text{min}$). Tryptic peptides were separated online using a capillary/needle PicoFrit (ProteoPep) RP18 from New Objective (Woburn, MA) with a 5–75% linear gradient of solvent B (0.1% acetic acid in 90% acetonitrile) for 30 min. The spray voltage and the capillary temperature were set at 1.7 kV and 130°C , respectively. For MS experiments, the fragmentation source was operated with 25–35 V of collision energy and 35–45% (arbitrary units) of normalized collision energy and then scan with an activated wide band. All spectra were obtained in the positive-ion mode. The data acquisition was performed on an Xcalibur Windows NT PC data system. The MS/MS spectra from enzymatically produced peptides were analyzed manually and using Sequest (Thermo Electron Co.), Mascot (Matrix Science Ltd.), and Protein Prospector (UCSF).

Alignment. The amino acid sequences were aligned using the ANTHEPROT 2000 (version 6.0) program. The alignment was performed with selected sequences extracted from the following identified proteins: Ay-AMP from *A. hypochondriacus* (this work), hevein from *Hevea brasiliensis* (8), Pn-AMP1 from *Pharbitis nil* L. (20), EAFP2 from *Eucommia ulmoides* (21), Ar-AMP from *Amaranthus retroflexus* (17), IWF4 from *Beta vulgaris* (19), and GAFF from *Ginkgo biloba* (22).

Chitin-Binding Assay. Because of the sequence similarity between Ay-AMP and chitin-binding proteins, we tested the Ay-AMP ability to bind on a chitin substrate. Microcolumns packed with chitin (New England BioLabs) were loaded with Ay-AMP and eluted with phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 and 100 mM acetic acid at pH 2.8. The fractions were analyzed by SDS–PAGE.

Chitinase Activity Assay. Chitinase activity was determined in 96-well microplates and a $100\ \mu\text{L}$ assay mixture containing protein sample (10 μL), 1 mM 4-nitrophenyl-*N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside (*p*-NP-(GlcNAc)₂) (25 μL), and 100 mM sodium acetate buffer at pH 5.0 (65 μL). The reaction was incubated at 37°C for 10 min, with constant agitation, and then the enzymatic reaction was terminated by the addition of 1.0 M sodium carbonate (50 μL). The amount of *p*-nitrophenol (*p*-NP) released was determined spectrophotometrically at 405 nm in an Elx-808 Ultra Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). The molar concentration of *p*-NP was calculated by a calibration curve constructed with *p*-NP concentrations varying from 0 to 30 nmol (29).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and Peptide Purification. Acidic extract from 10 mg of *A. hypochondriacus* seeds showed antifungal activity toward *C. albicans* and *P. chrysogenum* using the microculture method (results not shown). The total extract was fractionated by RP-HPLC (Figure 1). Every peak was tested against *C. albicans* and *P. chrysogenum*. One peak was active against both fungi

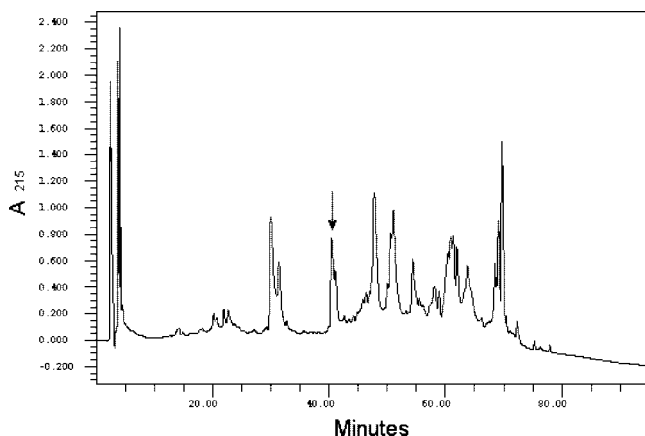


Figure 1. RP-HPLC chromatogram of the acidic extract from *A. hypochondriacus*. The antimicrobial peptide Ay-AMP eluted at approximately 40 min is shown by a vertical arrow.

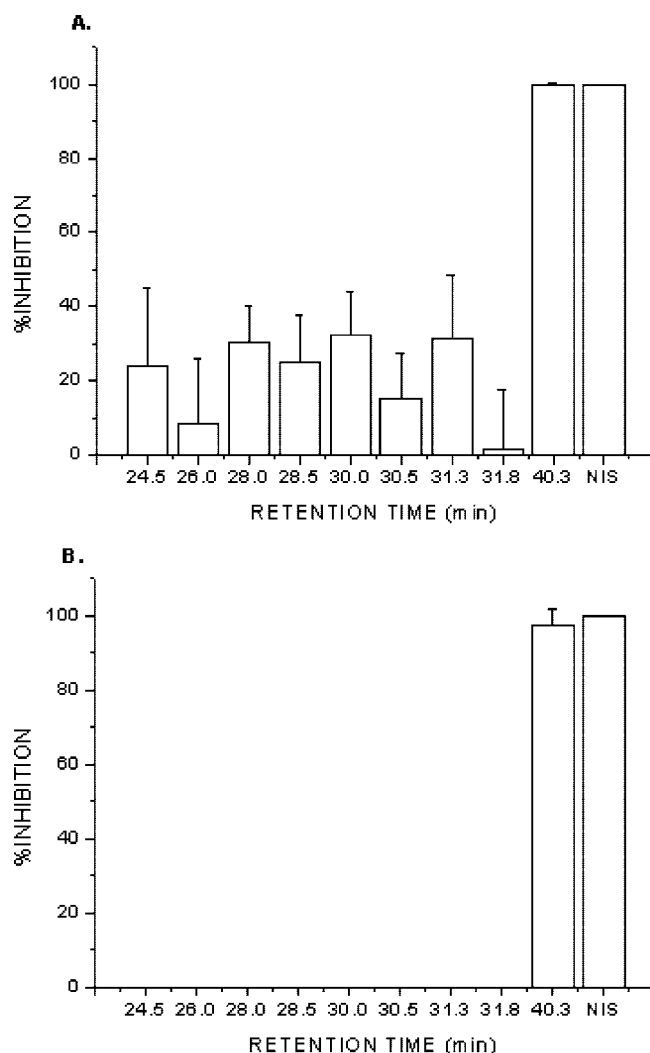


Figure 2. Antifungal activity plot. Chromatogram peaks tested against (A) *C. albicans* and (B) *P. chrysogenum*. In the plot, NIS is the activity of the positive control, 1 mg/mL nistatine.

(Figure 2) and was chosen for further analysis. It was named Ay-AMP. The electrophoresis showed a clear band for the peak with antifungal activity (Figure 3), and apparently, it is pure.

Mass Spectrometry. The spectrum showed that Ay-AMP was homogeneous and pure (Figure 4). The molecular mass was estimated to be 3184.0 Da in the reduced state.

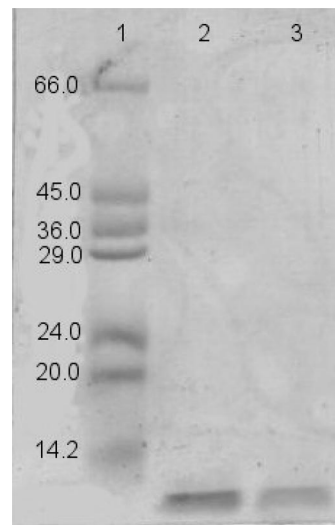


Figure 3. SDS-PAGE analysis of purified Ay-AMP. Both lanes 2 and 3 are reduced Ay-AMP. Line 1 is the molecular-weight markers.

The calculated monoisotopic molecular mass of Ay-AMP of 3187.35 Da was in good agreement with the measured monoisotopic molecular mass, 3184.0 Da, suggesting that there are no other post-translational modifications of the peptide, except for the formation of disulfide bridges.

Amino Acid Sequence. The amino acid sequence of Ay-AMP was partially determined by LC-MS/MS analysis. From this analysis, we obtained 15 residues, CPSGMCCSQFGYCGK. This sequence has 100% homology with a fragment of the Ac-AMP2 sequence, which was isolated from *A. caudatus* seeds (18), and it covered more than 50% of the total sequence. Both peptides Ay-AMP and Ac-AMP2 have the same molecular mass. The undetermined sequence of Ay-AMP has just one isobaric amino acid in position 26, lysine with molecular mass 128 Da, which could be replaced by glutamine, which has the same molecular mass, 128 Da. However, the basic residues, such as lysine, are very conserved in these antimicrobial peptides because they are extremely important to the peptide activity. Considering all of the evidence discussed, we can say that the sequence of Ay-AMP is the same as that of the Ac-AMP2 (Figure 5A), and because of that, it also has the same three-dimensional structure (30) (Figure 6). On the basis of the hypothesis of a monophyletic origin of grain amaranths, it is conceivable that the Ay-AMP and Ac-AMP2 sequences might be conserved through domestication of *Amaranthus hybridus*, the putative common ancestor (31). There is a previous antecedent of this fact; the nsLTP isolated from *A. hypochondriacus* seeds has exactly the same sequence as that of one isolated from *A. caudatus* (23).

Ay-AMP is 30 amino acids in length, and its theoretical isoelectric point, calculated in expasy (32), from the sequence data is 8.92. The experimental pI value of Ay-AMP is higher than 9 (results not shown).

The alignment of the Ay-AMP amino acid sequence with some chitin-binding proteins demonstrated the similarity of Ay-AMP to a superfamily of chitin-binding proteins, containing a single cysteine/glycine-rich domain, such as hevein (Figure 5B). The hevein domain is highly conserved, containing six to eight cysteine residues, six in Ay-AMP, which are all involved in intramolecular disulfide bridges. Additionally, the hevein domain contains one serine and three aromatic residues at a conserved position (7).

It is obvious the high similarity between Ay-AMP and Ar-AMP (Figure 5), an antifungal peptide isolated from *A.*

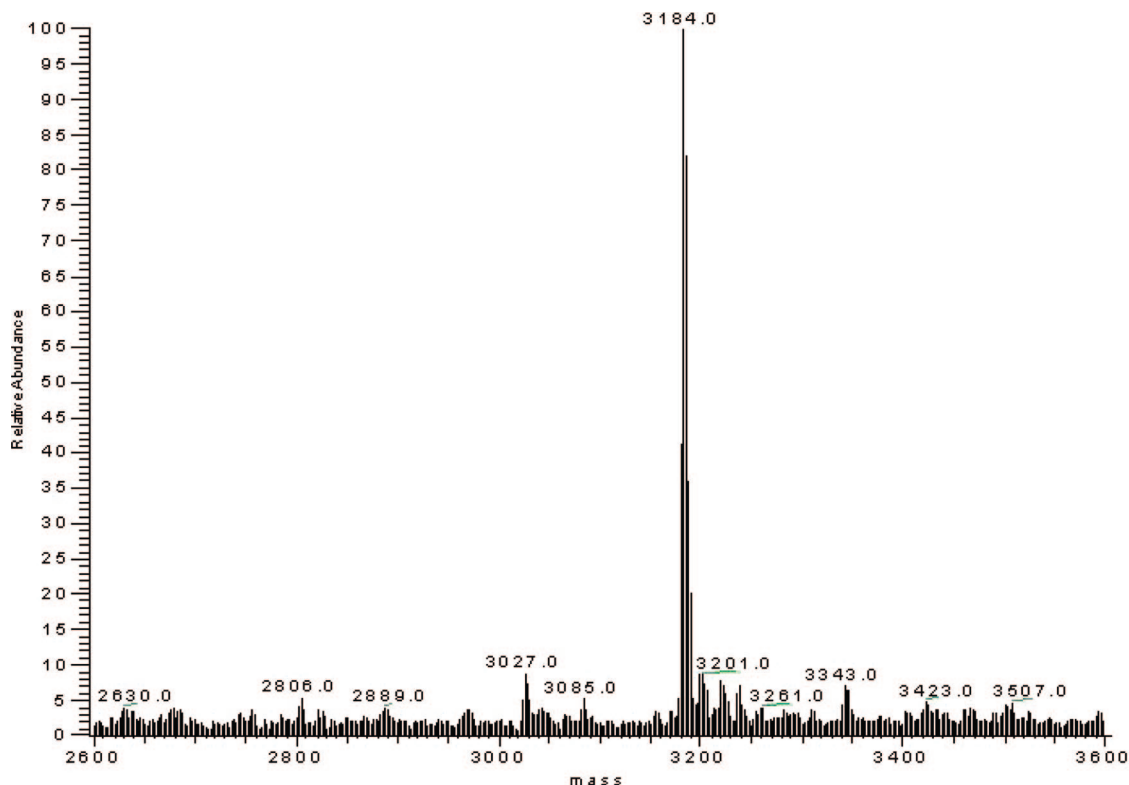


Figure 4. Electrospray mass spectrum of Ay-AMP. The major peak corresponds to the singly protonated molecule at m/z 3184.0.

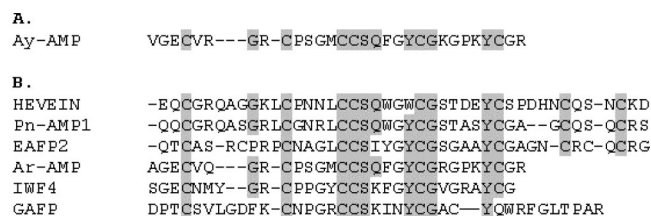


Figure 5. Comparison of the N-terminal amino acid sequence of Ay-AMP with chitin-binding proteins. (A) Amino acid sequence of Ay-AMP. (B) Sequences were aligned using the ANTHEPROT 2000 (version 6.0) program. Chitin-binding domains are shadowed. The alignment was performed with selected sequences extracted from the following identified proteins: Ay-AMP from *A. hypochondriacus*, hevein from *H. brasiliensis*, Pn-AMP1 from *P. nil* L., EAFP2 from *E. ulmoides*, Ar-AMP from *A. retroflexus*, IWF4 from potato, and GAFP from *G. biloba*.



Figure 6. Three-dimensional structure of Ay-AMP. Because Ay-AMP has the same amino acid sequence as Ac-AMP2, the three-dimensional structure of Ay-AMP is exactly the same as the structure solved for Ac-AMP2 by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) (30).

retroflexus, a weed that causes damage to crops in the south of Russia (17). The difference is just in three positions V1, R6, and K23 in Ay-AMP, which are replaced by A1, R6, and R23 in Ar-AMP.

Table 1. Antifungal Activity of Ay-AMP

fungus	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Trichoderma</i> sp.	0.24	6.41
<i>Candida albicans</i>	0.33	2.74
<i>Geotrichum candidum</i>	0.61	1.84
<i>Aspergillus candidus</i>	1.27	3.90
<i>Alternaria alternata</i>	2.26	11.67
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2.66	6.22
<i>Aspergillus schraceus</i>	7.87	27.43
<i>Fusarium solani</i>	11.88	39.90

It is also noteworthy that several proteins that have been shown to possess antimicrobial properties share some key structural features with Ay-AMP, namely, a highly basic nature, a small-sized polypeptide chain, and a high content of cysteines. Examples of that are the thionins occurring in seeds and leaves of different plants, with about 45–47 residues and 4 disulfide bridges (33), and plant defensin, with around 45–54 amino acids and 4 disulfide bridges (34). Thionins and defensin have a broad spectrum of antibiotic properties because they are toxic to fungi, bacteria, and mammalian cells (35, 36).

Antifungal Activity. Ay-AMP was assessed for its antifungal potency on 12 different pathogenic fungi and active against eight of them (Table 1). On the fungi where there was found antifungal activity, the IC₅₀ varied from 0.24 to 11.88 $\mu\text{g/mL}$, depending upon the test organism. The MIC, to inhibit 80% of fungal growth, took values from 2.74 to 39.90 $\mu\text{g/mL}$. Ay-AMP did not have growth inhibitory activity against *A. flavus*, *R. arrhizus*, *T. mentagrophytes*, and *F. oxysporum* at any tested concentration. The highest inhibitory activity of Ay-AMP was observed against *Trichoderma* sp., and the lowest inhibition was noted against *F. solani*.

To assess possible synergistic effects between Ay-AMP and another antifungal agent, thaumatin from *Taumatococcus daniellii* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), was used. The mixture with an Ay-AMP/thaumatin ratio of 1:1 (wt/wt) was tested against

P. chrysogenum, and a high synergistic effect was observed. The IC_{50} fell from 2.66 to 0.66 $\mu\text{g/mL}$.

The specific activity of Ay-AMP was found to be dependent upon the ionic constitution of the growth medium. The addition of 10 mM KCl or 1 mM CaCl_2 to the PDB medium did not affect the dose–response curves against *P. chrysogenum*, whereas 50 mM KCl and 5 mM CaCl_2 increase the IC_{50} values by about 12-fold. This is in concordance with other antifungal peptides that are antagonized by mono- and divalent ions, such as plant defensins, in which antifungal activity is reduced by an increase in ionic strength, especially by divalent cations (1), and thionins, which are inhibited by Ca^{2+} at a concentration above 5 mM but not by Mg^{2+} or Ba^{2+} at levels up to 10 mM or monovalent cations at concentrations up to 50 mM (37), and in the case of EAFP1 and EAFP2 from *Eucommia ulmoides*, which exhibit chitin-binding properties similar to other hevein-like peptides, when 5 mM calcium ions are added to the medium, IC_{50} values rise more than 100-fold (38). There are very few antifungal peptides that are not affected by monovalent cations, such as K^+ up to 50 mM; this is the case of Rs-AFP1 and Rs-AFP2, polypeptides rich in cysteine isolated from radish seeds, in which the CaCl_2 concentration of 5 mM is necessary to cause activity reduction (36).

The treatment of Ay-AMP with different proteases, such as pepsin, papain, chymotrypsin and trypsin, in an enzyme/peptide ratio of 1:60 (wt/wt) incubated for 5 h at 37 °C, did not affect its antifungal activity, except for trypsin, which increased the IC_{50} values by about 10-fold. The antifungal activity was not affected by boiling Ay-AMP for over 10 min. The high resistance of this peptide to the proteolysis and heating may be due to its small size and the presence of intramolecular disulfide bridges.

Even when the antifungal activity of Ay-AMP and Ac-AMP2 were tested against different fungi, their antifungal properties and potency are similar, because both of them show values of IC_{50} under 10 $\mu\text{g/mL}$ and they were antagonized by mono- and divalent ions. Additionally, both peptides Ay-AMP and Ac-AMP2 were very resistant to the heating and protease effect (18).

The Ay-AMP was not cytotoxic against human T lymphocytes at 50 $\mu\text{g/mL}$, which is a higher concentration than the MIC to inhibit the fungal growth against any of the eight sensitive fungi.

The mechanism of action of this peptide, such as the chitin-binding proteins, is mainly due to their affinity to chitin. Because nascent chitin of the hyphal apex, where hyphal growth and, therefore, cell-wall assembly take place, is the most accessible, chitin-binding proteins localize along the fungal cell walls and accumulated at septa and hyphal tips by the union to the fungus cell-wall chitin, as its name indicates.

Chitin-Binding Assay. The amino acid sequence of Ay-AMP indicates that it belongs to a superfamily of chitin-binding proteins, and it was confirmed by the reversible binding of this peptide to a mini-chitin column. **Figure 7** shows that Ay-AMP is almost missing in the fraction of PBS washings but was recovered in the low pH desorption buffer. This result indicates that Ay-AMP exhibits binding affinity toward chitin.

Chitinase Activity. The Ay-AMP released *p*-NP from the substrate at peptide concentrations as low as 2–8 $\mu\text{g/mL}$. This could be a reflection of the exochitinase mechanism of action of these peptides. The exochitinolytic splitting of diacetylchitobiose from the nonreducing end of this substrate liberates *p*-nitrophenol as the product. It should be noticed that *p*-NP-(GlcNAc)₂ is not specific for chitinases, however. Roberts and

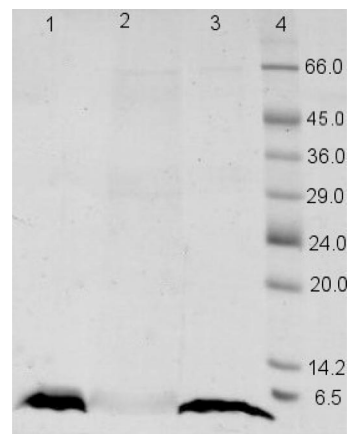


Figure 7. Chitin-binding assay of the Ay-AMP. Line 1 corresponds to Ay-AMP loaded on the column; line 2 is the fraction eluted with 100 mM PBS at pH 7.4; line 3 is the fraction eluted with 100 mM acetic acid at pH 2.8; and line 4 corresponds to the molecular-weight markers.

Selitrennikoff in 1988 found that bacterial chitinases had over 200-fold more specific activity than the β -*N*-acetylglucosaminidase for the hydrolysis of the substrate, suggesting that hydrolysis of the chromogenic substrate by nonchitinases may not be a significant problem (39).

In conclusion, Ay-AMP is a very potent antifungal peptide isolated from the *A. hypochondriacus* seeds, which, besides exhibiting binding affinity toward chitin, shows chitinase activity. Ay-AMP may be a component of active defense, providing a valuable tool for engineering resistance against phytopathogenic fungi in plants.

ABBREVIATIONS USED

PR, pathogenesis related; TFA, trifluoroacetic acid; RP-HPLC, reverse-phase high-pressure liquid chromatography; pI, isoelectric point; MIC, minimal inhibitory concentration; IC_{50} , inhibitory concentration to inhibit 50% fungal growth; LC–MS/MS, liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *p*-NP-(GlcNAc)₂, 4-nitrophenyl-*N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside; *p*-NP, *p*-nitrophenol; PDB, potato dextrose broth; PBS, phosphate-buffered saline.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank DGEP for a doctoral fellowship received for 2 and a half years, Dr. Ruben Batista and the UPRO–UNAM for performing LC–MS/MS experiments, Cristina Pérez M.Sc. (UNIGRAS–UNAM) for supplying and identifying the fungi, and Carmen Márquez M.Sc. and Teresa Ramírez-Apan M.Sc. (Instituto de Química–UNAM) for technical assistance.

LITERATURE CITED

- (1) Broekaert, W. F.; Cammue, P. A.; De Bolle, M.; Thevissen, K.; Samblanx, G.; Osborn, R. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **1997**, *16*, 297–323.
- (2) Clore, G. M.; Sukumaran, D. K.; Nilges, M.; Gronenborn, A. M. Three-dimensional structure of phoratoxin in solution: Combined use of nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics. *Biochemistry* **1987**, *26*, 1732–1745.
- (3) Zhang Hong Kato, Y. Common structural properties specifically found in the CS $\alpha\beta$ -type antimicrobial peptides in nematodes and mollusks: Evidence for the same evolutionary origin. *Dev. Comp. Immunol.* **2003**, *27*, 499–503.

- (4) Cammue, B. P. A.; Thevissen, K.; Hendriks, M.; Eggermont, K.; Goderis, I. J.; Proost, P.; Van Damme, J.; Osborn, R. W.; Guerbette, F.; Kader, J. C.; Broekaert, W. F. A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* **1995**, *109*, 445–455.
- (5) Selitrennikoff, C. P. Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 2883–2894.
- (6) Linthorst, H. J. M.; Melchers, L. S.; Mayer, A.; Van Roekel, J. S. C.; Cornelissen, B. J. C.; Bol, J. F. Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3 glucanases of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 8756–8760.
- (7) Theis, T.; Stahl, U. Antifungal proteins: Targets, mechanisms and prospective applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 437–455.
- (8) Broekaert, W.; Lee, H. I.; Kush, A.; Chua, N. H.; Raikhel, N. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 7633–7637.
- (9) Boller, T.; Gehri, A.; Mauch, F.; Vogeli, U. Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta* **1983**, *157*, 22–31.
- (10) Molano, J.; Polascheck, I.; Duran, A.; Cabib, E. An endochitinase from wheat germ. *J. Biol. Chem.* **1979**, *59*, 85–89.
- (11) Shinshi, H.; Mohnene, D.; Meins, F. Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 89–93.
- (12) Rice, R. H.; Etzler, M. E. Subunit structure of wheat germ agglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *59*, 414–419.
- (13) Peumans, W. J.; Stinissen, H. M.; Carlier, A. R. Isolation and partial characterization of wheat-germ-agglutinin-like lectins from rye (*Secale cereale*) and barley (*Hordeum vulgare*) embryos. *Biochem. J.* **1982**, *203*, 239–243.
- (14) Tsuda, M. Purification and characterization of a lectin from rice bran. *J. Biochem.* **1979**, *86*, 1451–1461.
- (15) Trindade, M. B.; Lopes, J. L. S.; Soares-Costa, A.; Monteiro-Moreira, A. C.; Moreira, R. A.; Oliva, M. L. V.; Beltramini, L. M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1764*, 146–152.
- (16) Cavada, B. S.; Castellón, R. E. R.; Vasconcelos, G. G.; Rocha, B. A. M.; Bezerra, G. A.; Debray, H.; Delatorre, P.; Nagano, C. S.; Toyama, M.; Pinto, V. P. T.; Moreno, F. B. M. B.; Canduri, F.; de Azevedo, W. F. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a new chitin-binding protein from *Parkia platycephala* seeds. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2005**, *61*, 841–843.
- (17) Lipkin, A.; Anisimova, V.; Nikonorova, A.; Babakov, A.; Krause, E.; Bienert, M.; Grishin, E.; Egorov, T. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2426–2431.
- (18) Broekaert, W. F.; Marien, W.; Terras, F. R. G.; De Bolle, M. F. C.; Probst, P.; Van Damme, J.; Dillen, L.; Claeys, M.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P. A. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry* **1992**, *31*, 4308–4314.
- (19) Nielsen, K. K.; Nielsen, J. E.; Madrid, S. M.; Mikkelsen, J. D. Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. *Plant Physiol.* **1997**, *113*, 83–91.
- (20) Koo, J. C.; Lee, S. Y.; Chun, H. J.; Cheong, Y. H.; Choi, J. S.; Kawabata, S. I.; Miyagim, M.; Tsunasawa, S.; Ha, K. S.; Bae, D. W.; Han, C.; Lee, B. L.; Cho, M. J. Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1382*, 80–90.
- (21) Huang, R. H.; Xiang, Y.; Liu, X. Z.; Zhang, Y.; Hu, Z.; Wang, D. C. Two novel antifungal peptides distinct with a 5-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. *FEBS Lett.* **2002**, *521*, 87–90.
- (22) Huang, X.; Xie, W.; Gong, Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin-binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Lett.* **2000**, *478*, 123–126.
- (23) Ramírez, M.; Aguilar, M.; Miguel, R.; Bolaños, V.; García, E.; Soriano-García, M. Amino acid sequence, biochemical characterization and comparative modeling of nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *415*, 24–33.
- (24) Vasco, N.; Soriano, M.; Moreno, A.; Castellanos, R.; Paredes, O. Purification, crystallization, and preliminary X-ray characterization of a 36 kDa amaranth globulin. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 862–866.
- (25) Broekaert, I.; Lee, H. I.; Kush, A.; Chua, N. H.; Raikhel, N. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 7633–7637.
- (26) Fernandez-Andreu, C. M.; Pimentel-Turino, T.; Martínez-Machin, G.; González-Miranda, M. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fluconazol frente a *Cryptococcus noformans*. *Rev. Cubana Med. Trop.* **1999**, *51*, 55–57.
- (27) Tallarida, R. J.; Murria, R. B. Graded dose–response. In *Manual of Pharmacological Calculations with Computer Programs*, 2nd ed.; Springer-Verlag: New York, 1987; pp 27–31.
- (28) Wilm, M.; Shevchenko, A.; Houthaave, T.; Breit, S.; Schweigerer, L.; Fotsis, T.; Mann, M. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* **1996**, *379*, 466–469.
- (29) Suginta, W. Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinases isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 212–220.
- (30) Martins, J. C.; Maes, D.; Loris, R.; Pepermans, H. A. M.; Wyns, L.; Willem, R.; Verheyden, P. ¹H NMR study of the solution structure of Ac-AMP2, a sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*. *J. Mol. Biol.* **1996**, *258*, 322–333.
- (31) Chan, K. F.; Sun, M. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theor. Appl. Genet.* **1997**, *95*, 865–873.
- (32) <http://expasy/tools>.
- (33) Pelegrini, P. B.; Franco, O. L. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 2239–2253.
- (34) Thevissen, K.; Ferket, K. K. A.; François, I. E. J. A.; Cammue, B. P. A. Interaction of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides* **2003**, *24*, 1705–1712.
- (35) Bohlmann, H.; Apel, K. Thionins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1991**, *42*, 227–240.
- (36) Lehrer, R. I.; Ganz, T.; Selsted, M. E. Defensins: Endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* **1991**, *64*, 229–230.
- (37) Terras, F. R. G.; Schoofs, H. M. E.; De Bolle, M. F. C.; Van Leuvenill, F.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B.; Broekaert, W. F. Analysis of two novel plant antifungal from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 15301–15309.
- (38) Huang, R.; Xiang, Y.; Lium, X.; Zhang, Y.; Hu, Z.; Wang, D. Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. *FEBS Lett.* **2002**, *521*, 87–90.
- (39) Roberts, W. K.; Selitrennikoff, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* **1989**, *134*, 169–176.

Received for review July 10, 2007. Revised manuscript received October 2, 2007. Accepted October 23, 2007. This work was supported by DGAPA, UNAM Grant (IN211605).