

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS,
PROTEÍNAS Y GLICOPROTEÍNAS DE *Aloe vera* CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA**

Por

LCA ETHEL DANIELA CABELLO RUIZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

JULIO, 2016

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
PÉPTIDOS, PROTEÍNAS Y GLICOPROTEÍNAS DE
Aloe vera CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA**

Comité de Tesis

Dra. Catalina Rivas Morales
Presidente

Dra. María Adriana Núñez González
Secretario

Dra. Catalina Leos Rivas
Vocal

Dra. María Julia Verde Star
Vocal

Dr. Víctor Manuel Torres de la Cruz
Vocal

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
PÉPTIDOS, PROTEÍNAS Y GLICOPROTEÍNAS DE
Aloe vera CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA**

Dirección de Tesis

Dra. Catalina Rivas Morales
Director Interno

Dra. Gloria María Molina Salinas
Director Externo

AGRADECIMIENTOS

Existen personas y seres, que sin su valiosa aportación no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo. Agradezco...

♥ **A Dios**, por la dicha de la vida y por siempre y a todo momento hacerse presente en ella. Gracias por la vida que has diseñado para mí, por todo lo que me ha tocado vivir... No cambiaría nada de ella, gracias Señor.

♥ A mi comité de tesis que sin ellos no lo hubiese podido lograr... a la **Dra. Adriana Núñez**, por su confianza, por creer en mí desde el principio, por todos sus consejos, por su paciencia y apoyo en todos los sentidos de mi vida. Gracias por compartirme un poco de usted y por ser una de las personas más importantes de mi vida, siendo no únicamente mi “madre académica” instruyéndome a lo largo de mi formación académica, sino por ser una de mis más grandes amigas. A la **Dra. Catalina Rivas**, por todos sus consejos y apoyo en el desarrollo de este trabajo. Gracias por confiar en mí desde el principio para el desarrollo de este trabajo y por toda su paciencia. A la **Dra. Azucena Oranday, Dra. Catalina Leos y la Dra. Julia Verde**, por su apoyo en el desarrollo de esta investigación. A la **Dra. Gloria Molina**, por todo su apoyo y compañía en el desarrollo de este trabajo y en mi formación académica. Gracias no únicamente por haber estado ahí para escuchar mi situación académica, sino también por escucharme y apoyarme en mi vida personal y siempre tener un consejo y buscar lo mejor para el grupo de trabajo pese a las circunstancias que pasaban. Gran parte de mi aprendizaje en esta etapa, se lo debo a usted. Al **Dr. Víctor Torres** por toda su paciencia y apoyo para el logro de este trabajo; definitivamente sin usted no estaría en esta etapa. Le agradezco enormemente todo su apoyo incondicional y por siempre haber estado ahí para el desarrollo del trabajo. Gracias por escuchar todas mis inquietudes y haberme dado los mejores consejos y enseñanzas. **A todos y a cada uno les agradezco todo su apoyo, su disposición para compartirme un poco de su experiencia y por toda su confianza. Los conservo en mi corazón por la gran enseñanza que han dejado en mí** y por formar parte de este gran logro en mi vida.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- ♥ A la Universidad Autónoma de Nuevo León por haberme recibido como parte de sus estudiantes desde el 2004 y ahora siendo parte de la formación académica de nuevas generaciones. En especial, a la Facultad de Ciencias Biológicas por la oportunidad de pertenecer a la misma, brindándome la mejor etapa de mi vida llena de aprendizajes e historias, además de permitirme portar con orgullo, el título de profesionista de la misma institución.
- ♥ Al departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la UANL, por permitirme desarrollar gran parte de este trabajo en sus instalaciones.
- ♥ Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de Becario 393911, por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.
- ♥ Finalmente pero no menos importante, a la Fundación Educación Superior-Empresa (FESE) y a la empresa Aloe Jaumave S.A. de C.V. por la ayuda brindada para el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

TÍTULO	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	77
PERSPECTIVAS	79
BIBLIOGRAFÍA	80
RESUMEN BIOGRÁFICO	103
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	104
ANEXOS	137

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Condiciones modificadas para la extracción proteica de hoja y liofilizado de gel de <i>A. vera</i> por M1 y M2 .	38
2	Concentraciones de ACN utilizadas para la separación cromatográfica de EPLM2 .	44
3	Condiciones de la separación analítica empleadas en el EPLM2 .	44
4	Condiciones de detección utilizadas en la interfase nano electrospray en el espectrómetro de masas, para la identificación del EPLM2 ..	46
5	Concentración media de proteínas totales (mg mL ⁻¹) para los diferentes tratamientos y selección de los parámetros de mayor contenido de éstas por M1 y M2 de hoja y liofilizado del gel de <i>A. vera</i> .	54
6	Concentración media de proteínas totales (mg mL ⁻¹ ± DE) de EPLM1 y EPLM2 , en función de las variables óptimas modificadas (m1 , t1 y v1).	57
7	Secuencias identificadas en el EPLM2 de <i>A. vera</i> asociadas a diferentes proteínas.	70
8	Criterios de toxicidad según Nguta y Mbaria (2013) para extractos de plantas.	75

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Estructura general de las glicoproteínas.	22
2	Cultivo orgánico de <i>Aloe vera</i> de la empresa Aloe Jaumave y liofilizado obtenido a partir del gel de la misma.	32
3	Método 1 (Costa <i>et al.</i> , 1998) aplicado a liofilizado de gel de <i>A. vera</i> .	34
4	Método 2 (Faurobert <i>et al.</i> , 2007) aplicado a liofilizado de <i>A. vera</i> .	36
5	Método 1 (Costa <i>et al.</i> , 1998) para la obtención del extracto proteico a partir de hoja de <i>A. vera</i> ..	37
6	Diagrama de conexiones del sistema nanoAcquity acoplado al sistema de espectrometría de masas q-TOF premier XE, empleada para la separación e identificación del EPLM2 .	45
7	Espectro UV-VIS del EPHM1 y EPLM1 de <i>A. vera</i> ($\lambda = 280$ nm).	50
8	Espectro de masas obtenido para el estándar de ASB.	52
9	Espectro UV-VIS del EPLM2 de <i>A. vera</i> ($\lambda = 280$ nm).	53

10	Gráfico de perfil de las medias marginales estimadas de concentración de proteínas totales en función de la variable peso de material vegetal en EPLM1 y EPLM2 .	56
11	Gráfico que muestra las diferencias estadísticamente significativas en función a la comparación de las medias de concentración de proteína total de los diferentes tratamientos para las tres variables evaluadas en el M2 .	59
12	Comparación de la concentración media de proteína total de liofilizado de gel de <i>A. vera</i> obtenidos por M1 y M2 , con sus respectivos espectros de absorción a 280 nm.	60
13	Actividad antimicrobiana de EPLM2 y halos de inhibición mostrados a 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del mismo. C+= control positivo: gentamicina; C-= control negativo: Medio C. Rivas.	61
14	Gráfico de letalidad sobre <i>A. salina</i> del EPLM2 de <i>A. vera</i> en función de los $\mu\text{g mL}^{-1}$.	75

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo/ Abreviatura	Significado
g	Gramos
μg	Microgramos
mL	Mililitros
cm	Centímetros
μm	Micrómetros
h	Hora
min	Minutos
rpm	Revoluciones por minuto
°C	Grados Celcius
%p/v	Porcentaje peso-volumen
kDa	Kilodaltons
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
TA	Temperatura ambiente

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas son un problema de Salud Pública que se agrava debido a la múltiple resistencia que han presentado los microorganismos. Lo anterior nos lleva a la búsqueda de nuevas moléculas y al desarrollo de nuevos fármacos.

Aloe vera considerada como una especie vegetal medicinal, se le han descrito múltiples usos en la Medicina Tradicional que por mencionar algunas de ellas son: para tratar problemas gastrointestinales, dermatológicos, antiinflamatorios, heridas y quemaduras menores, para la tos, diabetes, erisipela, inflamación e infección de la piel, dolor de estómago o sólo como planta decorativa. Esta planta representa un gran aporte económico en la industria alimenticia, de salud, cosmética y en la farmacéutica. Recientemente se ha estudiado la actividad farmacológica de péptidos y proteínas provenientes de fuentes naturales. A pesar de la poca cantidad de proteínas que posee la sábila, es importante investigar sobre sus actividades biológicas para futuras aplicaciones.

El propósito de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos proteicos puros obtenidos a partir de *A. vera* determinando las condiciones óptimas de extracción, considerando el escaso contenido proteico en la planta, identificar los componentes presentes y determinar la toxicidad de los extractos bioactivos. Se obtuvieron extractos proteicos de hoja y liofilizado de gel de *A. vera* por dos métodos: **EPHM1** y **EPLM1** por el método 1 (**M1**) en donde se realizó una precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y **EPLM2** por el método 2 (**M2**) en donde se hizo una extracción con fenol. Posteriormente se evaluó la actividad bactericida y fungicida del extracto proteico de mayor concentración de proteínas totales y mayor pureza, siendo éste el **EPLM2**, el cual presentó actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Por espectrometría de masas, se identificó en **EPLM1** un péptido y una proteína de 5 y 31 kDa respectivamente, mientras que en **EPLM2** se aislaron e identificaron 15 péptidos que fueron asociados con proteínas de membrana, secuencias a las que se les relaciona con el proceso de la tolerancia al estrés en suelos y otras que fueron asociadas a enzimas relacionadas a la absorción de luz y a la protección contra patógenos, obteniendo la caracterización de nuevas proteínas con posible actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Infectious diseases are a public health problem that is compounded by multiple resistance presented by microorganisms. This leads us to the search for new molecules and new drug development. *Aloe vera* is considered a medicinal plant and is described with multiple uses in Traditional Medicine, some of these are: for treat gastrointestinal problems, skin, anti-inflammatory, wounds and minor burns, the cough, diabetes, erysipelas, inflammation and skin infection, stomach pain or just as a decorative plant. This plant represents a major economic contribution in the food industry, health, cosmetic and pharmaceutical. Recently, it has been studied the pharmacological activity of peptides and proteins from natural sources. Despite the small number of proteins that has *Aloe vera*, it is important to investigate their biological activities for future applications. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity of proteins extracts from *A. vera* determining the optimal conditions of extraction, considering the low protein content in the plant, identify the present components and determine the toxicity of the bioactive extracts. From leaf and lyophilised of *A. vera* gel, were obtained protein extracts by two methods: **EPHM1** and **EPLM1** by Method 1 (**M1**) where precipitation was carried out with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and **EPLM2** by Method 2 (**M2**) that was a phenol extraction. Subsequently bactericidal and fungicidal activity of the protein extract higher total protein concentration and higher purity was assessed, being the **EPLM2**, which showed activity against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. By mass spectrometry, was identified in **EPLM1** a peptide and a protein of 5 and 31 kDa respectively, while from **EPLM2** were isolated and identified 15 peptides that were associated with membrane proteins, sequences to which they are associated with the process of stress tolerance and other soils that were associated with the related light absorption and protection against pathogens enzymes, obtaining the characterization of new proteins with possible antimicrobial activity.

1. INTRODUCCIÓN

El estilo de vida de los seres humanos y los microorganismos que producen una gran variedad de infecciones han provocado diferentes enfermedades en la población y han ocasionado que México se destaque por la prevalencia de dichas enfermedades (Cifuentes *et al.*, 1994).

Aloe vera es una especie vegetal a la que se le atribuyen usos en la Medicina Tradicional hindú para tratar problemas gastrointestinales, dermatológicos y antiinflamatorios. Es considerada para tratar y producir un rápido alivio de heridas y quemaduras menores o como planta decorativa. Sin embargo, recientemente se le ha considerado como un ingrediente “natural” en la industria alimenticia y en medicina. (Klein y Penneys, 1988). En México se utiliza para tratamiento de tos, diabetes, erisipela, inflamación e infección de la piel, dolor de estómago y como vermífugo (Andrade, 2009).

Aloe vera significa Aloe verdadero. Actualmente se considera que el nombre Aloe, es derivado del árabe “alloeh” o del hebreo “halal” que significa sustancia amarga brillante (Joseph y Raj, 2010). Es conocida como parte de las plantas de la Medicina Tradicional en algunos países ya que generalmente se utiliza con fines curativos, sin embargo su aplicación incluye la industria de cosméticos y como plantas ornamentales. Esta planta es originaria de los países mediterráneos y del este y sur de África; Siria, Arabia, Málaga España, Islas Canarias y Barbados (López y Cisneros, 2000).

El *A. vera* produce ingresos millonarios en la industria alimenticia y de suplementos para la Salud, así como de artículos de belleza y cremas farmacéuticas. Además ha capturado el interés de científicos y médicos a través del mundo quienes están trabajando para descubrir e identificar los componentes responsables de las propiedades medicinales y paliativas de esta planta (Stevens, 2006).

El *A. vera* produce en la superficie de las hojas, carbohidratos, lípidos, proteínas y otros compuestos de bajo peso molecular que presentan variadas actividades biológicas (Park y Son, 2006). Ésta contiene aproximadamente el 95% de agua y menos de 0.1% de proteínas. A pesar de que la cantidad de proteínas presentes es relativamente pequeña,

sus actividades biológicas son importantes para su aplicación clínica (Okamura *et al.*, 1996).

Existen numerosos reportes de metabolitos bioactivos de *A. vera*, principalmente del metabolismo secundario tales como flavonoides, terpenoides, colesterol, antraquinonas y sacáridos, como representantes del metabolismo primario (Hammam y Viejoen, 2008; Joseph y Raj, 2010).

En los últimos años ha surgido el interés en el estudio de la química y actividades farmacológicas exhibidas por metabolitos primarios incluyendo las proteínas y péptidos provenientes de fuentes naturales (Korhonen y Pihlanto, 2003; Farrokhi *et al.*, 2008).

El propósito de este proyecto fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos de liofilizado de gel y hoja de *A. vera* e identificar los péptidos, proteínas y glicoproteínas presentes en el mismo, para posteriormente determinar la toxicidad del extracto proteico bioactivo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia del desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

La Epidemiología es la disciplina que estudia la enfermedad en poblaciones humanas. En México destaca la prevalencia de enfermedades que son consecuencia del estilo de vida de los seres humanos y en menor grado, las causadas por microorganismos, conocidas como enfermedades infecciosas (Cifuentes *et al.*, 1994).

Una infección se refiere a la colonización que especies exteriores realizan en un organismo que en términos médicos se denomina huésped, siendo estas absolutamente perjudiciales para su desarrollo y la supervivencia. La gravedad de la infección variará de acuerdo al compromiso que ostente el microorganismo y el estado inmunológico del huésped (Ingraham e Ingraham, 1998). Existen una enorme cantidad de infecciones que afectan particularmente a cada parte del ser humano, siendo las infecciones bacterianas las más comunes (Esquivel *et al.*, 2010).

En el 2015 en México se reportaron 28,175,283 casos de enfermedades infecciosas intestinales y respiratorias, de los cuales 1,637,692 se presentaron en el estado de Nuevo León (DGE, 2015).

Por otro lado, la micosis superficial en piel y uñas representa uno de los padecimientos más frecuentes en México (Abreu *et al.*, 1998), y la mayoría causada por dermatofitos. De éstos las especies más frecuentemente encontradas son: *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Epidermophyton floccosum*, distinguiéndose a *T. rubrum* como el microorganismo que incrementa su incidencia en nuestro país (López *et al.*, 2010).

En caso de que se detecte alguna infección, se prescriben ciertos tratamientos con medicamentos antibacterianos o antifúngicos según el caso. Dentro de los factores que influyen en la efectividad de éstos se destaca el hecho que algunos microorganismos han

desarrollado resistencia a fármacos; por ejemplo, algunas bacterias han desarrollado resistencia a antibióticos lactámicos y en el caso de hongos, algunos han desarrollado resistencia a los imidazoles (Sessmann *et al.*, 2001).

2.2. Las plantas medicinales como fuente de nuevos fármacos.

El uso medicinal de plantas en México se realiza desde tiempos prehispánicos, siendo por tanto este país, una buena área para desarrollar estudios etnofarmacológicos. Además de que más del 80% de la población del mundo sigue dependiendo de medicina tradicional para sus padecimientos (Kumara *et al.*, 2001). De alguna manera el pasado termina por recordarnos que no debemos olvidar la Medicina de antaño sin antes realizar serias investigaciones sobre ella.

Una de las plantas que actualmente ha capturado el interés de científicos y médicos es el *A. vera*, en donde el objetivo primordial es aislar e identificar cada componente responsable de sus efectos biológicos, para elucidar su mecanismo de acción.

2.3. *Aloe vera*.

El *Aloe vera* es un complejo de plantas que contienen cerca de 200 compuestos diferentes beneficiosos para el cuerpo humano. Dichos compuestos incluyen a enzimas, glicoproteínas, factores de crecimiento, vitaminas y minerales (Davis *et al.*, 1991). Estos reportes han promovido la búsqueda las propiedades químicas, bioquímicas y farmacológicas del Aloe, así como de sus usos medicinales.

La mayoría de los botánicos, así como las evidencias históricas, coincide en ubicar el origen del *A. vera* en los cálidos y secos climas de África (Gómez, 2003).

Los primeros reportes terapéuticos del Aloe remontan al año 1750 A.C. aproximadamente. Egipto y Oriente Medio fueron las primeras civilizaciones en utilizar esta planta con fines terapéuticos. Los egipcios reportan su uso en procedimientos de embalsamientos, y se han encontrado pinturas del *A. vera* en las paredes de las cuevas de este país. Existe una leyenda acerca de los uso del *A. vera*, el cual era uno de los secretos de Cleopatra para mantener firme y suave su piel. Los egipcios se referían al Aloe como la “planta de la inmortalidad” (Cheesbrough, 2000).

Dioscórides (41-68 D.C.) describe a detalle esta planta y comprobó sus propiedades cicatrizantes, además que reportó que cuanto más amargo era el Aloe, más eficaz resultaba como agente cicatrizante (Graf, 2000).

Se reporta que en el año 700-800 D.C., los chinos utilizaron el Aloe para el tratamiento de las convulsiones febriles de los niños. Posteriormente en el año 900 D.C., Al-Kindi, utilizó el Aloe para el tratamiento del dolor inflamatorio, las úlceras de los ojos y la melancolía. Entre el 1500-1600 los conquistadores y misioneros españoles llevaron esta planta a las islas del Caribe, Centroamérica y América del Sur (Ernst, 2000), de ahí que se considere una planta introducida a las Américas.

No es hasta finales de la Segunda Guerra Mundial que se redescubrió el poder terapéutico del Aloe, al comprobar que los habitantes de Hiroshima y Nagasaki, los cuales padecieron grandes quemaduras, después del tratamiento con Aloe se curaban más rápido y en algunos casos sin señales de cicatrices (Krapp y Longe, 2001).

Últimamente el *A. vera* está recobrando importancia a raíz de la aprobación de su uso por la Food and Drug Administration en E.E.U.U. para el tratamiento de cierto tipo de tumores y su empleo en los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (U.S. Department of Health and Human Services. FDA, 2009).

2.3.1. Ficha taxonómica (Grindlay y Reynolds, 1986).

Reino: Planta

Orden: Asparagles

Familia: Liliaceae

Género: *Aloe*

Especie: *vera*

2.3.2. Nombre Común.

Es comúnmente llamada Aloe o sábila, planta caliente, lily del desierto y bilis de elefante (Cheesbrough, 2000).

2.3.3. Descripción.

El género *Aloe* incluye 200 o más especies. El Aloe posee dos tipos de exudados que son secretados por las hojas; la primera es un jugo rojo-amarillo contenido en las células pericíclicas localizadas bajo la epidermis de las hojas. Este jugo ha sido empleado generalmente para propósitos laxantes en polvo. Su amargura es debida a la presencia de aloína, Aloe emodina y compuestos relacionados. El otro exudado es un gel transparente y resbaladizo producido por las células tubulares en la zona central del parénquima de la hoja. (Yongchaiyudha *et al.*, 1996). El parénquima del Aloe o la pulpa ha mostrado contener proteínas, lípidos, aminoácidos, vitaminas, enzimas, compuestos inorgánicos y

pequeños compuestos orgánicos, además de diferentes carbohidratos (Vázquez *et al.*, 1996).

Es una planta suculenta y perenne de la Familia *Liliaceae* la cual crece en regiones subtropicales del planeta. Florece una vez al año y se propaga a través de hijuelos que crecen alrededor de ésta durante todo el año y los cuales pueden ser trasplantados con facilidad. Su hoja es gruesa, carnosa y espinosa (Joseph y Raj, 2010).

2.3.4. Floración.

Según la especie del género *Aloe*, la floración ocurre en primavera y en verano principalmente, aunque también en invierno en sus respectivos países de origen. Sin embargo, debido a la capacidad de adaptación de esta planta y al transporte de ésta y de la mano del hombre, ahora se puede encontrar en la mayor parte de las tierras cálidas (Speranza *et al.*, 1994).

Las flores se generan en un estado maduro de desarrollo, y suelen ser de color rojo o amarillo. Tiene dos enemigos naturales: el exceso de humedad y las temperaturas por debajo de los 0°C. Es muy resistente a las plagas y a las sequías (Zonta *et al.*, 1995; Okamura *et al.*, 1996).

Las flores del *A. vera* son tubulosas, debido a que las seis piezas que forman la cubierta de la flor se unen todas entre sí formando un tubo, generalmente recto o en ocasiones también encorvado. Estas flores suelen tener un color rojizo, anaranjado o amarillento. Los estambres de la flor son seis, largos filamentos que crecen en el fondo de la flor, debajo del pistilo (Plaskett, 1996).

2.3.5. Recolección.

Si se les realiza un corte exudan un líquido acuoso con un sabor muy amargo, acumulado en células secretoras que envuelven la región cribosa. Puesto que la pared celular que las separa es muy fina, el jugo fluye fácilmente. El corte en las hojas hay que realizarlo de forma que la secreción pueda recogerse en algún tipo de recipiente. Después se condensa el líquido calentándolo a fuego o a baño María. Se separa la espuma y se desecha, y el líquido se pasa a otro recipiente en el que se volverá más sólido. Es de esta forma como llega al mercado y se distribuye después en forma de preparados galénicos como gotas, píldoras, supositorios, etc. (Grindlay y Reynolds, 1986).

2.3.6. Composición fitoquímica.

La planta de *A. vera* contiene aproximadamente 95% de agua, 20 a 25% de sólidos (polisacáridos, glicoproteínas y sales de ácidos orgánicos) y menos de 0.1% de proteínas. Además posee minerales como sodio, potasio, calcio, manganeso, cobre, zinc, cromo y hierro. Además de que el gel proporciona 20 de los 22 aminoácidos necesarios requeridos por el cuerpo humano, y siete de los ocho aminoácidos esenciales los cuales el cuerpo no los puede sintetizar. Ejemplo de ellos son la arginina, asparagina, ácido glutámico, ácido aspártico y serina, entre otros. Están presentes enzimas como la catalasa, celulasa, amilasas y lipasas; así también como carboxipeptidasa (Grindlay y Reynolds, 1986).

Se ha reportado que el parénquima y la pulpa del Aloe contienen proteínas, lípidos, aminoácidos, vitaminas, enzimas compuestos inorgánicos y pequeños compuestos orgánicos, además de carbohidratos (Femenia *et al.*, 1999).

Por otra parte, derivan del mucílago de la planta del Aloe, bajo la corteza, rodeando su propio parénquima o gel, azúcares, los cuales forman el 25% de la fracción sólida e incluye mono y polisacáridos (Krapp y Longe, 2001).

Además, se ha reportado que contiene antraquinonas libres y sus derivados, las cuales le confieren el sabor amargo característico al Aloe. Ejemplos de ellas son la barbaloina, aloe-emodina-9-antrona, isobarbaloina, antrona-C-glicósidos y cromonas.

Éstas en grandes cantidades poseen un efecto purgativo, pero cuando son en pequeñas, son potentes agentes antimicrobianos, además de poseer fuertes poderes analgésicos (Zhang y Tizard, 1996).

De igual manera, al *A. vera* se le han descrito presentes flavonoides, terpenoides, lectinas, ácidos grasos, colesterol, cromonas, mono- y poli-sacáridos, taninos, ácido aloetínico, ácidos orgánicos, colina, sapogeninas (Waihenya *et al.*, 2002). También se ha reportado la presencia de esteroides en el Aloe, de los cuales se incluyen campesterol, sitosterol y lupeol. Así mismo se reporta ácido salicílico (Waihenya, 2002).

Recientemente se ha reportado que Aloe posee vitaminas como las antioxidantes A y C, además B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B9 (ácido fólico), B12 (cianocobalamina) y otros antioxidantes como caroteno y tocoferol (Hammam, 2008; Joseph y Raj, 2010).

2.3.7. Propiedades farmacológicas.

El Aloe posee efectos terapéuticos para enfermedades del estómago, problemas gastrointestinales como disentería y diarrea, enfermedades de la piel, constipación, heridas por radiación, cicatrización de heridas, quemaduras, entre otras (Gordon *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que los agentes activos farmacológicamente están concentrados en el gel y corteza de la hoja del *A. vera* (Davis *et al.*, 1991).

Estudios preliminares han conducido al uso de diferentes solventes para la extracción, revelando la presencia de sustancias activas biológicamente en los extractos etanólicos del gel de la hoja del *A. vera* (Rajasekaran *et al.*, 2004).

Las principales propiedades farmacológicas que posee el *Aloe vera* son:

2.3.7.1. Antimicrobiana.

Ajabnoor (1990) y Arunkumar y Muthuselvam (2009) reportaron las propiedades antibacterianas y antifúngicas del *A. vera*. El primero reportó que el extracto etanólico del *A. vera* posee actividad contra varios microorganismos gram positivos y gram negativos, así como actividad antifúngica. Los segundos reportaron actividad antifúngica de la solución acetónica del gel contra *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Drechslera hawaiiensis* y *Penicillium digitatum*.

Se ha reportado la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto metanólico del gel de *A. vera* contra *Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter* sp., *Trichophyton* sp. y *Mycobacterium tuberculosis* exhibiendo una actividad bactericida o bacteriostática sobre éstas (Pecere *et al.*, 2000).

Las especies de *Candida parapsilosis*, *C. albicans* y *C. krusei* han mostrado sensibilidad a una gran variedad de proteínas vegetales, incluyendo las proteínas de *A. vera*. Se distingue el efecto fungicida que mostró sobre *C. albicans* (Liu *et al.*, 2006).

Para la pulpa de *A. vera* se ha descrito actividad antifúngica, la cual fue evaluada sobre micelios de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, y *Colletotrichum coccodes*, mostrando un efecto inhibitorio en *F. oxysporum* a 10 $\mu\text{L/L}$ y la fracción líquida redujo el crecimiento de *R. solani*, *F. oxysporum* y *C. coccodes* a una concentración de 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ (De Rodríguez *et al.*, 2005).

Se reporta que “rhein” (4, 5-dihydroxiantraquinona-2-ácido carboxílico), una antraquinona aislada de plantas medicinales como el *A. barbadensis* Miller que presenta actividad hepatoprotectora, antibiótica, antimicrobiana, antiinflamatoria y anticáncer (Zhou *et al.*, 2015).

Además un estudio *in vitro* con gel de *A. vera* sobre *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos (Multi Drug Resistance [MDR], por sus siglas en inglés) aisladas de pacientes con infecciones en heridas por quemaduras se demostró que el gel posee actividad antibacteriana contra estas cepas, con valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ similares, de 200 mg mL⁻¹ (Goudarzi *et al.*, 2015).

Cellini *et al.* (2014) evaluaron la actividad antibacteriana del gel de *A. vera* contra cepas sensibles y resistentes de *Helicobacter pylori*, mostrando actividad inhibitoria a 100 mg mL⁻¹, tanto para cepa sensible como resistente.

También se ha demostrado su eficacia antimicrobiana *in vitro* en el tratamiento contra *Enterococcus fecalis* aislado de conductos radiculares dentales que muestran periodontitis apical persistente que con tratamiento de hidróxido de calcio (Abbaszadegan *et al.*, 2016).

2.3.7.2. Anticancerígena y antitumoral.

Los efectos anticancerígenos del Aloe se han confirmado en dos fracciones que incluyen las glicoproteínas (lectinas) y los polisacáridos (Reynolds *et al.*, 1996). Adicionalmente se ha reportado la actividad antitumoral de los polisacáridos del *A. vera* (Akey *et al.*, 2007).

La Aloe emodina, una antraquinona del Aloe, posee una actividad selectiva contra los tumores neuroectodérmicos, particularmente contra el neuroblastoma, el cual es un tumor que muestra poca sensibilidad a fármacos (Pecere *et al.*, 2000).

Se ha reportado que los principios activos del *A. vera* mostraron inhibición significativa sobre células carcinógenas EACC (por sus siglas en inglés *Ehrlich ascite carcinoma cell* [El *et al.*, 2010]).

Thimmegowda *et al.* (2015) realizaron estudios sobre la síntesis y la actividad antitumoral de derivados de la Aloe emodina. Mediante los ensayos de inhibición del crecimiento celular, revelaron que los derivados de la Aloe emodina disminuyeron de manera eficaz el crecimiento de HepG2 (células de cáncer de hígado humano) y NCI-H460 (células de cáncer de pulmón humano) además de que algunos de los derivados exhiben actividad antitumoral contra células HeLa (células de carcinoma epitelial humano) y PC3 (células de cáncer de próstata).

Por otro lado Tabolacci *et al.* (2015) demostraron que la Aloe emodina causa la reducción de la proliferación celular y la inducción de SK-MEL-28 y células A375 seguido de un aumento en la actividad de la transglutaminasa, atribuyéndole una actividad inmunomoduladora y de reducción de la proliferación de células de melanoma.

Se ha reportado que los Aloe esteroles reducen considerablemente los pólipos intestinales atribuyéndole efectos quimiopreventivos sobre el cáncer colorrectal (Chihara *et al.*, 2015).

2.3.7.3. Reparadora de tejidos.

Davis *et al.* (1989) reportó que el gel del *A. vera* exhibe una actividad reparadora de tejidos estimulando la formación de fibroblastos, jugando un papel fundamental en la cicatrización de quemaduras, heridas, úlceras y membranas gastrointestinales.

Miroddi *et al.* (2015) evaluaron la efectividad del *A. vera* en pacientes afectados con psoriasis concluyendo que la administración de Aloe como un tratamiento cutáneo es generalmente bien tolerado.

Por otro lado Coelho *et al.* (2015) estudiaron el efecto de la aplicación tópica de extracto de *A. vera* evaluando la cicatrización de heridas orales en ratas observando que al día 10 y 14 la reparación de las úlceras había sido total. Oryan *et al.* (2014) también investigaron el efecto de la aplicación tópica de *A. vera* en heridas cutáneas en ratas, demostrando que el Aloe, moduló la inflamación de las heridas y la epitelización, disminuyendo el tamaño de la cicatriz y mejorando las características bioquímicas, morfológicas y biomecánicas del tejido.

Tanaka *et al.* (2015) confirmaron que los esteroides de *A. vera* ingeridos, alcanzan los tejidos periféricos a través del torrente sanguíneo y determinaron la capacidad de los mismos para estimular los fibroblastos dérmicos humanos *in vitro*, mostrando una reducción significativa en las arrugas faciales de mujeres con edades ≥ 40 años, estimulando también la producción de colágeno y ácido hialurónico por los fibroblastos dérmicos humanos.

Se tiene el reporte de que la administración oral diaria de extracto etanólico de gel de *A. vera* a ratas diabéticas, redujo significativamente la glucemia y mejoró significativamente la insulina plasmática, notando también una reducción de glucosa en la sangre y un aumento en los glicosaminoglicanos (GAGs), mejorando así las úlceras y cicatrizando heridas (Daburkar *et al.*, 2014).

Por otro lado, se comparó el efecto curativo del extracto de *A. vera* y sulfadiazina de plata en quemaduras, utilizando ratas como modelo experimental. La cicatrización de heridas fue más visible y veloz en el grupo tratado de *A. vera* (Akhoondinasab *et al.*, 2014). Además, Bahramsoltani *et al.* (2014) evaluaron mezclas preparadas a base de plantas y sus componentes fitoquímicos para el tratamiento de quemaduras. El *A. vera* mostró la mejor actividad de curación de la herida provocada por la quemadura.

Eghdampour *et al.* (2013) determinaron el impacto de *A. vera* y caléndula en la cicatrización de la episiotomía en primíparas, demostrando que el uso de *A. vera* y el ungüento de caléndula aumentan considerablemente la velocidad de cicatrización de la herida de la episiotomía.

Además se ha reportado al *A. vera* como parte de diversas formulaciones. Ejemplo de estos, lo reportado por Rahmani *et al.* (2014) que evaluaron los efectos de una crema tópica con 0.5% de *A. vera* en polvo empleada para el tratamiento de las fisuras anales crónicas, mostrando diferencias estadísticamente significativas en el dolor de la fisura anal, hemorragia en la deserción y la cicatrización de la herida antes y al final de la primera semana de tratamiento. Por otro lado, Pereira *et al.*, (2014) desarrollaron y evaluaron películas poliméricas que contenían *A. vera* y vitamina E para el tratamiento de las heridas causadas por quemaduras. También se tiene el reporte de que Khan *et al.* (2013) formularon un gel a base de extracto de *A. vera* y Carbopol 934 e investigaron los efectos de su aplicación tópica en la curación de heridas de la piel inducidas quirúrgicamente en ratas. Observaron que las ratas tratadas con el gel, sanaron para el día 14, además de que no mostraron ninguna formación de pus e inflamación. Aunado a lo anterior, se tiene el reporte del desarrollo de una tableta de amoxicilina y gel de *A. vera* en polvo para el tratamiento de la úlcera péptica, demostrando una actividad antiulcerosa (Ranade *et al.*, 2012).

La utilización del resveratrol y el Aloe emodina son utilizadas como alternativas para la cicatrización de heridas por quemaduras, ya que estudios recientes en ratones muestran un incremento en la actividad cicatrizante de estos compuestos en comparación con los grupos sin tratamiento (Lin *et al.*, 2016).

Se ha reportado la actividad de *A. vera* en el tratamiento de psoriasis leve a moderada. Se comparó la eficacia de *A. vera* y de acetónido de triamcinolona (TA) contra psoriasis en placa moderada a leve, demostrando que tras 8 semanas de tratamiento, la crema de *A. vera* puede ser más eficaz que la crema de TA en cuanto la reducción de los síntomas clínicos de psoriasis sin embargo, ambos tratamientos mostraron tener una eficacia similar en la mejora de la calidad de vida de los pacientes tratados (Choonhakarn *et al.*, 2010)

En la ortodoncia, se ha demostrado que el *A. vera* tiene mayor viabilidad de estimular la regeneración tisular en células madre de pulpa dental. Lo anterior debido a que el *A. vera* contiene acemanano, un polisacárido que ha demostrado ser un factor

desencadenante de la proliferación celular, diferenciación, mineralización y formación de dentina. En el tratamiento de la fibrosis submucosa oral, la utilización de la sábila, en comparación con antioxidantes, se ha reportado una mejoría en sensación de ardor, mejora la apertura de la boca, facilita la movilidad de la lengua y la flexibilidad de la mejilla, en pacientes de 30 a 35 años (Singh y Singh, 2016)

Por otro lado, el polvo de gel de *A. vera* contiene esteroides que tienen un efecto de protección sobre la elasticidad de la piel y la matriz extracelular. Esto se comprobó administrándose el polvo vía oral a ratones irradiados con rayos ultravioleta, donde los ratones expresaron una disminución significativa en el daño inducido por la radiación. También tienen la capacidad de reducir el daño causado por rayos ultravioleta tanto *in vitro* como *in vivo* (Rodrigues *et al.*, 2016)).

2.3.7.4. Inmunomoduladora.

Investigaciones científicas mostraron que el gel del *A. vera* posee propiedades inmunomoduladoras, las cuales se evaluaron en una línea celular de macrófagos, las células RAW 264.7 y en la cepa ICR de ratones implantados con células de sarcoma 180 (Reynolds, 1999).

Por otro lado, Madal *et al.* (2008) reportaron que la administración de extracto etanólico de *A. vera* a ratones albinos suizos aumentaba el total de glóbulos blancos y la respuesta inmune humoral, demostrado por el aumento de células formadoras de placa en el bazo y de anticuerpos circulantes.

Se conoce que *A. vera* posee un efecto terapéutico en el modelo experimental de esclerosis múltiple en ratones, a los cuales se les provocó experimentalmente encefalomiелitis autoinmune (Mirshafiey *et al.*, 2010).

Se destaca el empleo de *A. vera* para el tratamiento de enfermedades de la piel, diarrea, infecciones de transmisión sexual, malaria y para el tratamiento de las enfermedades oportunistas relacionadas con el SIDA en Rundu, Kavango, Namibia (Chinsebu *et al.*, 2015).

Saka *et al.* (2011) evaluaron la actividad hepatoterapéutica del extracto acuoso de gel de *A. vera* en ratas, revelando que el alcohol induce daño hepático pero el tratamiento de *A. vera* mantiene la arquitectura hepática.

De igual manera, Baradaran *et al.* (2014) evaluaron el extracto acuoso de *A. vera* determinando sus efectos nefroprotectores, determinando que ésta planta podría atenuar la nefrotoxicidad inducida por gentamicina, protegiendo significativamente las células renales y reduciendo la gravedad del daño tubular, aunque no puede regenerar el daño tubular.

2.3.7.5. Antiinflamatoria.

El gel de *A. vera* exhibe actividad antiinflamatoria *in vitro* actuando sobre la producción de metabolitos reactivos de oxígeno, eicosanoides y la interleucina-8, los cuales causan de enfermedades inflamatorias intestinales. La actividad se evaluó en células libres que generan radicales y sobre sistemas de mucosa colorrectal incubadas en medio preoxigenado (Medio de Tyrode [Langmead *et al.*, 2004]).

Para el extracto etanólico de sus hojas se han reportado actividades gastroprotectoras, evaluando el efecto de la variación de las dosis aplicadas en lesiones agudas de la mucosa gástrica inducida por 0.6 M de HCl (Yusuf *et al.*, 2004).

Ahmadi (2012) formuló un enjuague bucal de *A. vera* para prevenir la mucositis inducida por la radiación y la inflamación en pacientes con cáncer que son sometidos a radioterapia, inclusive para reducir la candidiasis oral.

2.3.7.6. *Antioxidante.*

Se han reportado propiedades antioxidantes en el extracto alcohólico del *A. vera* llevando el administrador por vía oral del extracto de gel a ratas diabéticas, lo cual condujo a la disminución significativa de los niveles de glucosa en sangre, hemoglobina glicosilada y al aumento de hemoglobina en las mismas. Además, el aumento de los niveles de peroxidación lipídica e hidroperóxidos en los tejidos de las ratas diabéticas se tornaron a niveles casi normales después del tratamiento con el extracto (Rajasekaran *et al.*, 2005).

Kaithwas *et al.* (2014) evaluaron la actividad antioxidante de polisacáridos de gel de *A. vera* *in vitro* estableciendo su actividad contra el estrés oxidativo del miocardio (OS) inducida por doxorubicina (DOX).

El efecto antioxidante que presentan tanto la vitamina E como del *A. vera*, ha sido aprovechado en la curación de lesiones orales inducidas por radiación en modelos murinos. Lo anterior sustentado en que a los 7 días de tratamiento, los animales en el grupo de control mostraron inflamación intensa, mientras que aquellos en los grupos de vitamina E y *A. vera* exhibieron leve a moderada inflamación (De Freitas *et al.*, 2016).

2.3.7.7. *Facilitadora de transporte.*

Se ha reportado que el gel del *A. vera* y el extracto de la hoja incrementan significativamente el transporte de péptidos macromoleculares, fármacos, insulina a través del intestino humano (Hamman y Viljoen, 2008).

2.3.7.8. Antimutagénica.

En la literatura también se reporta actividad antimutagénica del gel de *A. vera* empleando la prueba de *Drosophila* recesiva ligada al sexo letal (sex-linked recessive lethals [SLRL por sus siglas en inglés]), resultando eficaz en la reducción de la genotoxicidad de los mutágenos de acción directa (Snezana, 2007).

2.3.7.9. En el metabolismo de azúcares y lípidos.

Okyar *et al.* (2001), reportaron que el extracto del gel mostró actividad hiperglicémica en NIDDM (Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus, por sus siglas en inglés) inducida en ratas.

Se reporta la actividad hipoglicemiante y antilipidémica del gel de *A. vera* mediante la determinación de los efectos NIDDM, en ratones C57BL/6J (Kim *et al.*, 2009).

Recientemente, Gabriel *et al.* (2015) realizaron estudios sobre el efecto del *A. vera* en la dieta de tilapias juveniles expuestas a *Streptococcus iniae*. Para ello tomaron en cuenta el perfil de lípidos en plasma, antioxidantes y hepatoprotectores, así como la actividad enzimática, determinando que los peces alimentados con la dieta de Aloe, redujeron significativamente el colesterol total.

Chihara *et al.* (2015) reportan compuestos anti-diabéticos en gel de *A. vera* que se identificaron como Aloe esteroides.

2.3.7.10. *Nutracéutico.*

En la industria de alimentos, el Aloe ha sido una fuente de alimentos funcionales y como ingrediente en otros productos alimenticios (Grindlay y Reynolds, 1986; Gordon *et al.*, 2001).

Los valores nutricionales de mango “*Alphonso*” (AM) se enriquecieron con *A. vera* (AV), obteniendo un producto que incrementó la concentración de ácido ascórbico, el de fenoles y de flavonoides los cual dio lugar a la obtención de un producto con una calidad aceptable conforme a la condición de mercado (Chakraborty y Samanta, 2015).

2.4. Proteínas, péptidos y glicoproteínas.

2.4.1. Proteínas y péptidos.

Las proteínas son uno de los constituyentes primarios de los organismos vivos. Incluso en las plantas, donde los carbohidratos son los componentes estructurales más abundantes, las proteínas se encuentran presentes en aquellas partes que son responsables del crecimiento y reproducción. La estructura fundamental de las proteínas es relativamente sencilla; son largas cadenas de aminoácidos unidos entre sí por enlaces amida, también llamados enlaces peptídicos, entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro. Estas cadenas se denominan polipéptidos. Una proteína puede estar constituida por una única cadena polipeptídica o por varias asociadas entre sí y están constituidas por unos veinte aminoácidos diferentes (Ege, 2004). Son macromoléculas orgánicas, constituidas básicamente por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N); aunque pueden contener también azufre (S) y fósforo (P) y, en menor proporción, hierro (Fe), cobre (Cu), magnesio (Mg), yodo (I), entre otros (Calvo *et al.*, 2012). Estas moléculas corresponden a las estructuras primarias dentro del metabolismo de los seres vivos, junto con los carbohidratos y lípidos. En general, las

proteínas pueden clasificarse de acuerdo a (Duranti, 2006):

1. Sus propiedades físicas y/o químicas: grupos de proteínas basados en su tamaño, estructura, solubilidad o grado de basicidad.
2. El tipo de moléculas al que pueden unirse: lipoproteínas (grupo prostético lipídico), nucleoproteínas (grupo prostético núcleo proteico), cromoproteínas (grupo prostético pigmento), metaloproteínas (grupo prostético metálico) y glicoproteínas (grupo prostético carbohidrato).
3. La función en la célula: pueden ser agrupadas en tres clases generales basadas en su función, las cuales corresponden a proteínas estructurales (proteínas de membranas, paredes celulares o citoesqueletos), proteínas de almacenamiento y enzimas.

Las proteínas de origen vegetal presentan muy diversas actividades biológicas no sólo como parte de la estructura de la planta o como parte fundamental de almacenamiento, además en la defensa contra diferentes plagas. Dichas proteínas son actualmente motivo de estudio por sus posibles aplicaciones dentro de la agricultura. Además, el enfoque de la proteómica dentro de los productos naturales ha tomado importancia por su potencial aplicación dentro la biotecnología.

Por otro lado, los péptidos se han definido como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática (Meisel, 1998). Sin embargo, unos años después, (Kitts y Weiler, 2003) retomaron el concepto para definirlo como fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones del cuerpo o condiciones y que pueden finalmente, influenciar en la salud. Generalmente estas moléculas son de un tamaño pequeño que va de 3 a 20 aminoácidos, aunque en ocasiones puede exceder esa longitud (Shahidi y Zhong, 2008).

Los efectos benéficos a la Salud por parte de las proteínas, podrían ser atribuidos a numerosas secuencias de péptidos que poseen actividades antimicrobianas, antioxidativas, antitrombóticas, antihipertensiva e inmunomoduladoras. La actividad se basa en la composición inherente y la secuencia de sus aminoácidos. El tamaño de las

secuencias activas puede variar de dos a veinte aminoácidos, y algunos péptidos son conocidos por sus propiedades multifuncionales (FitzGerlad y Meisel, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2003; Shimizu, 2004).

Los péptidos de plantas, moléculas menores de 10 kDa, pueden ser divididas esencialmente dentro de dos categorías: péptidos bioactivos y péptidos degradadores que resultan de la actividad de enzimas proteolíticas (Fricker *et al.*, 2006).

Los péptidos bioactivos han sido definidos como fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones del cuerpo o condiciones y que pueden finalmente, influenciar en la salud (Kitts y Weiler, 2003).

Los péptidos y proteínas han sido aislados de las raíces, semillas, flores, tallos y hojas de plantas y han demostrado diversas actividades. Más tarde mencionan que los péptidos bioactivos forman parte de la respuesta innata provocada por la mayoría de los organismos. La mayoría de los péptidos bioactivos producidos en las plantas poseen propiedades microbicidas, también forman parte de la señalización celular. Se reporta que la acción biológica de péptidos bioactivos inicia con la unión a la membrana diana seguido por permeabilización de la membrana y ruptura (Salas *et al.*, 2015).

2.4.2. Glicoproteínas.

En las plantas, muchas de las proteínas ubicadas en el compartimiento extracelular y la endomembrana están glicosiladas, es decir, un grupo azúcar se une de forma covalente a una proteína para formar una glicoproteína, lo cual trae como consecuencia un gran impacto tanto en sus propiedades fisicoquímicas como en sus funciones biológicas. Las glicoproteínas, participan en la formación de la pared celular, diferenciación de tejidos, embriogénesis y adhesión sexual (en algunas especies de plantas [Bretthauer, 1995; Berg *et al.*, 2008]).

Por muchos años las glicoproteínas han sido objetos de interés para bioquímicos y biólogos para un amplio rango de objetivos. Este interés se debe particularmente al

hecho de que las glicoproteínas fueron descubiertas en los seres vivos, además de las muy diversas funciones que se les han atribuido (Bretthauer, 1995).

Las secuencias glicosídicas de las glicoproteínas son muy variadas, según los tipos moleculares y las especies estudiadas. Sin embargo, las secuencias mejor conocidas presentan analogías en las zonas próximas a la unión con la proteína. Si bien las distintas cadenas glicosídicas de una glicoproteína son aparentemente iguales, se han encontrado ligeras modificaciones estructurales entre ellas. La composición de la fracción proteica es variable de unas glicoproteínas a otras. No está claro cuáles son los aminoácidos implicados en la unión con la cadena glicosídica, sin embargo las funciones tan diversas de las glicoproteínas son resultado directo de sus estructuras (Hernández y Sastre, 1999). En la **Figura 1** se muestra la estructura general de una glicoproteína.

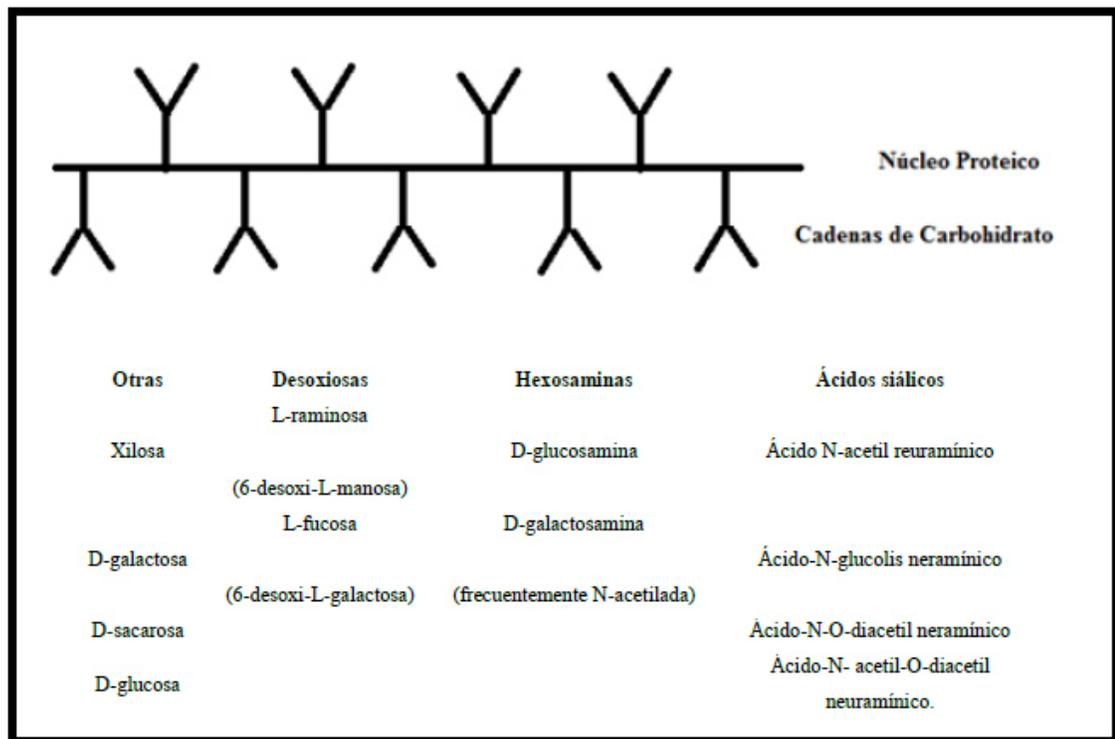


Figura 1. Estructura general de las glicoproteínas.
Fuente: Berg *et al.*, 2008

Los carbohidratos están presentes en un porcentaje en peso mucho menor en las glicoproteínas que en los proteoglicanos, de hecho muchas de las glicoproteínas se forman por la unión de carbohidratos a proteínas solubles. La naturaleza hidrofílica y polar de los azúcares pueden cambiar dramáticamente las características químicas de la proteína a la cual están glicosilando (Berg *et al.*, 2008; Noiva, 2010).

2.4.3. Proteínas, péptidos y glicoproteínas de fuentes naturales con actividad biológica.

Las propiedades antimicrobianas de proteínas y péptidos de diferentes fuentes han sido estudiadas por cerca de 40 años. Durante los pasados años, el interés por antimicrobianos naturales ha ido aumentando debido al incremento en la resistencia de los microorganismos a los fármacos disponibles. Los péptidos y proteínas muestran su actividad antimicrobiana causando lisis por unión y ruptura de la membrana de los microorganismos, mientras que otros penetran la membrana e interactúan con el interior de la célula o causan la formación de poros resultando una fuga de contenidos intracelulares importantes y por ende, causando su muerte (Huang *et al.*, 2000).

Los péptidos y proteínas han sido aislados de las raíces, semillas, flores, tallos y hojas de plantas y han demostrado actividades contra fitopatógenos, así como contra bacterias patógenas para los seres humanos (Terras *et al.*, 1995; Selitrennikoff, 2001; Pelegrini y Franco, 2005).

Varios péptidos y proteínas, con actividad antibacteriana se han caracterizado, representados no sólo por tioninas, ahora conocidas como defensinas, sino también por otros grupos de proteínas conocidos como ciclotidas ricas en glicina, las snakins, albúminas 2S y proteínas tipo heveína (Selitrennikoff, 2001; Pelegrini y Franco, 2005; Witkowska *et al.*, 2008; Daly *et al.*, 2009).

El primer péptido antibacteriano reportado la purotionina, se aisló de una especie vegetal *Triticum aestivum* (de la cual se obtiene la harina de trigo); esta proteína mostró

capacidad de inhibir el crecimiento de algunos fitopatógenos tales como *P. solanacearum*, *Xanthomonas campestris* y *Corynebacterium michiganense* (De Caley et al., 1972).

Se ha reportado que los péptidos Pp-AMP1 y Pp-AMP2 poseen una potente actividad contra varios fitopatógenos, incluyendo *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium radiobacter*, *Clavibacter michiganensis* y *Curtobacterium flaccumfaciens*, en una concentración de 13-25 mg mL⁻¹. (Witherup et al., 1994). Además, las proteínas tipo heveína Ac-AMP1 y Ac-AMP1 causan la inhibición del crecimiento de *Bacillus megaterium* y *Sarcina lutea* en concentraciones de 40 y 250 g mL⁻¹, respectivamente (Martins et al., 1996).

Para las circulinas AB y ciclopsicotrida pertenecientes a las ciclótidas se ha reportado efecto antibacteriano contra los patógenos humanos, tales como *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris* y *K. oxytoca* en concentraciones micromolares (Tam et al., 1999)

Otros ejemplos de péptidos y proteínas con actividad antibacteriana son Cn-AMP1 de 876 Da de *Cocos nucifera* (cocotero) y la Cy-AMP2 de *Cycas revoluta* (cica o palma de iglesia) de 4577.4 Da que actúa contra microorganismos gram positivos y negativos (Mandal et al., 2009), la ginkbilobina de *Ginkgo biloba* (Ginkgo o árbol de los cuarenta escudos) de 4213.8 Da (Wang y Ng, 2000); también la kalata B2 aislada de la planta africana *Oldenlandia affinis* de 2979.4 Da que actúa contra bacterias gram positivas (Jennings et al., 2001) y la Pg-AMP1 de *Psidium guajava* (guayabo) de 6029.4 Da que actúa contra bacterias gram negativas (Pelegri et al., 2008).

Adicionalmente se reporta una glicoproteína de 28 KDa aislada de la raíz del tubérculo de *Withania somnifera* (ginseng) con actividad contra algunos hongos fitopatógenos como *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticilloides* y contra bacterias como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Esta glicoproteína produce también la inhibición de crecimiento de los hongos por efecto sobre su espora (Girish et al., 2006).

La glicoproteína llamada Mj-AMPs aislada de *Mirabilis jalapa* (Don Diego de noche) de 8000 Da de semillas posee actividad antifúngica contra *F. culmorum*. (Bruno *et al.*, 1992).

Muchas familias de péptidos con actividad antifúngica han sido aisladas de plantas. PP-tionina, por ejemplo, exhibe actividad contra *Rhizobium meliloti*, *Xanthomonas campestris*, *M. luteus*, y *Clavibacter michiganensis* a una concentración de 1 mg mL⁻¹. (Daly *et al.*, 1999).

2.4.4. Proteínas, péptidos y glicoproteínas en *Aloe vera*.

Koike *et al.* (1995) reportaron una lectina aislada del *A. vera* de 35 kDa con actividad de estimulación mitótica de linfocitos, activación del complemento, alternativa, antiinflamatoria, antiúlceras y antitumoral, además de presentar actividad mitogénica.

Por otro lado, se ha reportado la glicoproteína del *A. vera* aloectina A que posee propiedades antitumorales y efectos antiúlceras. De igual manera se aisló una glicoproteína de 29 KDa que aumenta la proliferación de las células dérmicas normales en el humano (Yagi *et al.*, 1997)

También se reportó una glicoproteína aislada del *A. vera*, G1G1M1DI2 de 5.5 kDa con actividad proliferativa y de migración celular (Choi *et al.*, 2001).

Das *et al.* (2010) reportaron una proteína del *A. vera* de 14 KDa, la cual mostró una actividad antifúngica contra *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. albicans*.

Desde *A. arborescence* se han aislado dos lectinas, la aloptina A (7.5 kDa) y aloptina B (24 kDa) que exhiben actividad inmunomoduladora (Im *et al.*, 2010).

Resulta interesante remarcar la actividad antitumoral y antioxidante de un octapéptido presente en *A. vera* (El *et al.*, 2010).

2.5. Proteómica.

El término proteoma fue acuñado desde 1994 y es el equivalente lingüístico al concepto de genoma. Este término se define como el grupo completo de proteínas que son expresadas por el genoma completo durante el tiempo de vida de una célula. Actualmente la tendencia en el área proteómica es hacia el estudio de proteomas completos, interactomas, fosfoproteomas, secretomas y búsqueda de biomarcadores que a diferencia de los métodos basados en DNA y RNA, la ventaja de los marcadores proteómicos es su diversidad. Recientemente se ha desarrollado la proteómica para el estudio de los productos naturales, siendo las plantas una de las matrices más estudiadas dentro de ésta área. Han sido codificados entre 20-30,000 genes en el genoma de las plantas de las cuales, casi 1,000 corresponden a proteasas, y más de un centenar pertenecen a las 15 familias conocidas de proteasas ricas en cisteína las cuales se sintetizan como pro-enzimas (Brown, 2008).

Las proteínas y péptidos son motivo de estudio en diversas disciplinas dado que se ha demostrado que no únicamente presentan actividad estructural, sino que pueden presentar actividad biológica favorable para el ser humano o para la planta. Siendo los péptidos los más estudiados, ya que el propio fragmento puede presentar una actividad no relacionada con la proteína de origen. Dicho estudio es realizado muchas veces, por técnicas proteómicas, atribuyendo actividades biológicas variadas a estos compuestos, desde antimicrobianos contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, fungicida, hasta inmunomoduladores y anticancerígenos, así como otros usos en el área de la salud.

Actualmente, con las herramientas de la proteómica se han desarrollado estudios que permiten la caracterización de proteínas y péptidos expresados por el genoma, con lo cual se han identificado y clasificado respecto a su función.

Asimismo, ha sido posible establecer las interacciones entre estos compuestos y así esclarecer las redes funcionales y su dinámica en los procesos fisiológicos y patológicos, lo cual permite en consecuencia, la identificación de marcadores para el diagnóstico de enfermedades de humanos y plantas y su uso potencial como nuevos fármacos debido a su actividad biológica reportada.

La sinergia entre la genómica, bioinformática y la proteómica, ha aportado avances significativos a la Ciencia Médica, marcando un área importante de estudio para innovaciones futuras.

3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones son las principales causas de enfermedad en México y lo anterior aunado a las resistencias que han desarrollado los microorganismos a los medicamentos disponibles, existe la necesidad urgente del desarrollo nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

El mundo de las plantas medicinales se continúa usando como tratamientos culturalmente adecuados para diversos padecimientos, es importante documentar sus usos y desarrollar estudios acerca de sus actividades farmacológicas para asegurar su eficacia y seguridad.

Las proteínas, péptidos y glicoproteínas se han convertido en una interesante herramienta para el desarrollo de nuevos estudios y para la producción de nuevos fitofármacos para seres humanos.

Una planta que ha capturado el interés de científicos y médicos a través del mundo, es el *Aloe vera*, y se está trabajando para identificar los compuestos responsables de las propiedades curativas y calmantes, mismas que han sido atribuidas a esta planta por la Medicina Tradicional.

Por lo anterior, el propósito de este proyecto fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos de liofilizado de gel y hoja de *A. vera* e identificar los péptidos, proteínas y glicoproteínas presentes en el mismo, para posteriormente determinar la toxicidad del extracto proteico bioactivo.

4. HIPÓTESIS

Los péptidos, proteínas y glicoproteínas de *Aloe vera* presentan actividad antimicrobiana.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana e identificar los componentes de los extractos proteicos de *Aloe vera*.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener extractos proteicos puros de liofilizado del gel y hoja fresca de *Aloe vera*.
2. Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos proteicos de *Aloe vera*.
3. Evaluar la actividad antifúngica de los extractos proteicos de *Aloe vera*.
4. Identificar mediante espectrometría de masas los péptidos, proteínas y glicoproteínas contenidos en los extractos proteicos de *Aloe vera*.
5. Evaluar la toxicidad de los extractos proteicos bioactivos mediante el ensayo de letalidad de *Artemia salina*.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Material biológico.

Material vegetal: Liofilizado del gel de hoja y hoja completa fresca de *Aloe vera*.

Microorganismos:

- Bacterias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 20), *B. cereus* (ATCC 14579), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *S. typhi* (ATCC 6539) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619).
- Hongos: aislados clínicos de *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis*, *M. audouinii*, *M. cookie* y *M. gypseum*.

7.1.1. Ubicación de la especie vegetal.

Las muestras de *A. vera* fueron proporcionadas por la empresa Aloe Jaumave, S.A. de C.V., a partir de cultivos orgánicos (Liofilizado: Enero 2012; hoja completa: Mayo 2012 [Figura 2]). La empresa se ubica en Jaumave, Tamaulipas al Noreste de México a 23°24' latitud norte y 99° 24' de longitud oeste a una altura de 735 m sobre el nivel del mar, enclavada en la Sierra Madre Oriental, colinda al Noreste con el estado de Nuevo León.



Figura 2. Cultivo orgánico de *Aloe vera* de la empresa Aloe Jaumave y liofilizado obtenido a partir del gel de la misma.

7.1.2. Almacenamiento de muestras.

El liofilizado de gel de *A. vera* fue colocado con gel sílica en un recipiente de aluminio con tapa hermética para su transporte y almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, previo a su utilización.

Posterior a su colecta, las pencas de *A. vera* se colocaron en hielo para conservar el material vegetal durante su traslado a Nuevo León. Las pencas fueron lavadas con agua y almacenadas en bolsas resellables a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Los microorganismos para este estudio fueron almacenados a 4°C conservándose hasta su uso, con subcultivos frecuentes.

7.2. Obtención de extractos proteicos puros de *Aloe vera*.

7.2.1. Liofilizado de gel de *Aloe vera*.

A partir del liofilizado de gel de *A. vera*, se obtuvieron extractos proteicos mediante dos métodos. Por la técnica reportada por Costa *et al.* (1998), el Método 1 (**M1**) y el protocolo establecido por Faurobert *et al.* (2007), el Método 2 (**M2**). Ambos métodos con modificaciones (**Tabla 1**).

Para la extracción de las proteínas a partir del liofilizado de gel de *A. vera* por el **M1** (**Figura 3**), se resuspendió el liofilizado en solución de extracción A (NaNO_3 , KH_2PO_4 y NaN_3 [CTR, J.T. Baker y Spectrum respectivamente] y a pH 7) bajo agitación constante a 280 rpm por diferentes tiempos, en baño de hielo (**Tabla 1**). La suspensión resultante se filtró a través de una membrana de poro de 1 y $0.45\ \mu\text{m}$ y posteriormente se concentró a presión reducida. El concentrado obtenido se centrifugó a 3600 rpm \times 30 min a $4\ ^\circ\text{C}$ y el sobrenadante resultante se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (J.T. Baker) al 80% (p/v). El precipitado se lavó con acetona (CTR) y se resuspendió en la solución de extracción B (Urea, NH_4HCO_3 y EDTA [J.T. Baker, CTR y CTR respectivamente]). El sobrenadante producto de la resuspensión, fue filtrado a través de una membrana de corte de 3 kDa obteniendo así, el extracto proteico (**EPLM1**).

Para determinar la pérdida y eficiencia de extracción proteica en este proceso de filtrado, así como la integridad de las membranas de 3 kDa y mejorar el proceso de purificación de los extractos, se realizó una cuantificación proteica preliminar de **EPLM1**, así como un monitoreo por espectrofotometría UV-Vis (equipo Nadodrop [ThermoScientific]) a 280 nm y por espectrometría de masas (equipo ortogonal cuadrupolo-tiempo de vuelo modelo Q-TOF Premier), utilizando como estándar la albúmina sérica bovina (ASB).

Los extractos proteicos que resultaron de la primera filtración descrita anteriormente a través de las membranas de 3 kDa, se monitorearon a 280 nm. Tras llevar la lectura y la obtención del espectro de absorción, se procedió a realizar una segunda filtración a través de las mismas membranas con la finalidad de optimizar el proceso de

purificación. Los extractos proteicos obtenidos, nuevamente se monitorearon a 280 nm.

Posteriormente, en la búsqueda de obtener extractos con una mayor pureza se realizó una cromatografía de intercambio iónico (resina SCX Millipore®) sobre los mismos. Los extractos obtenidos a partir de dicha cromatografía, fueron monitoreados por espectrofotometría a 280 nm.

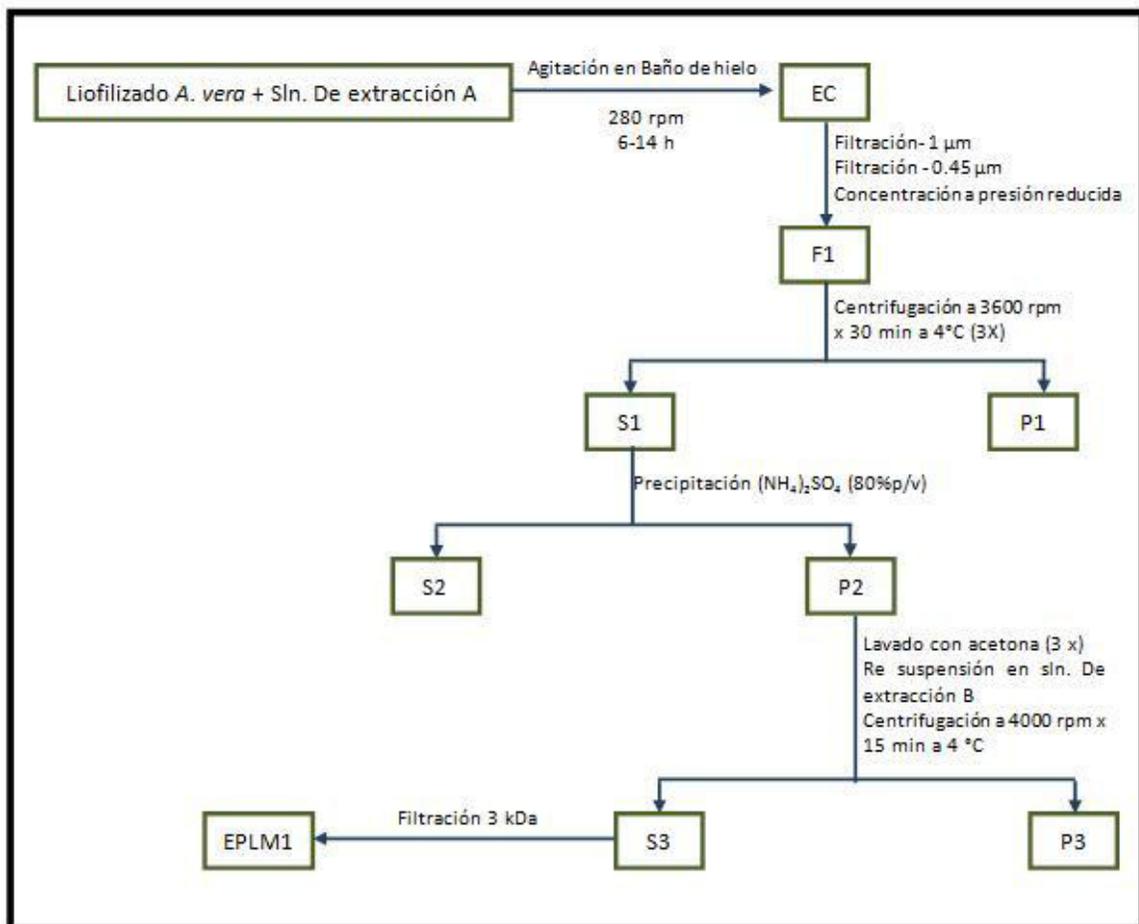


Figura 3. Método 1 (Costa *et al.*, 1998) aplicado a liofilizado de gel de *A. vera*. EC: Extracto crudo; F1: Filtrado 1; S1: Sobrenadante 1; P1: Precipitado 1; S2: Sobrenadante 2; P2: Precipitado 2; S3: Sobrenadante 3; P3: Precipitado 3; **EPLM1**: Extracto Proteico de Liofilizado por **M1**.

Finalmente para comprobar la integridad de las membranas, se realizó un monitoreo por espectrometría de masas de los extractos utilizando como control una mezcla de proteínas (lactoalbúmina, mioglobina de caballo y ASB) que también fueron filtradas por las membranas de 3 kDa. Para dicho monitoreo, posterior a su filtración se procedió con una hidrólisis enzimática del estándar ASB y de la mezcla de proteínas junto con los extractos proteicos. Los estándares y extractos digeridos, fueron inyectados en el espectrómetro de masas de acuerdo a lo descrito en el apartado (apartado **7.5**).

Para la obtención del extracto por el **M2 (Figura 4)** se trabajó solo con liofilizado dado los resultados obtenidos para hoja en **M1**. El liofilizado de gel de *A. vera*, se resuspendió en solución de extracción A (Tris-HCl [J.T. Baker], sacarosa, SDS y de β -mercaptoetanol [Sigma], a pH 8), dicha solución se mantuvo en agitación constante por diferentes tiempos a 280 rpm en baño de hielo (**Tabla 1**), para posteriormente mantenerlo a 4 °C por 12 h. Al término se realizó una centrifugación para eliminar material insoluble y posteriormente se hizo una extracción fenólica con una solución saturada relación 1:3 solución *A. vera*: fenol (Sigma). El extracto resultante se centrifugó a 4000 rpm a 4°C x 15 min. La solución fenólica se recuperó y se precipitó con CH₃COONH₄ (Monterrey, Reactivo Analítico) 0.1 M en MeOH:H₂O (50:50), se agitó y se dejó en reposo durante toda la noche a -20 °C, para su posterior centrifugación a 4000 rpm x 15 min a 4 °C. El precipitado se recuperó y se lavó tres veces con acetona (CTR) y finalmente se resuspendió en la solución de extracción B (Urea, NH₄HCO₃ y EDTA [J.T. Baker, CTR y CTR respectivamente]), obteniendo así el extracto proteico (**EPLM2**).

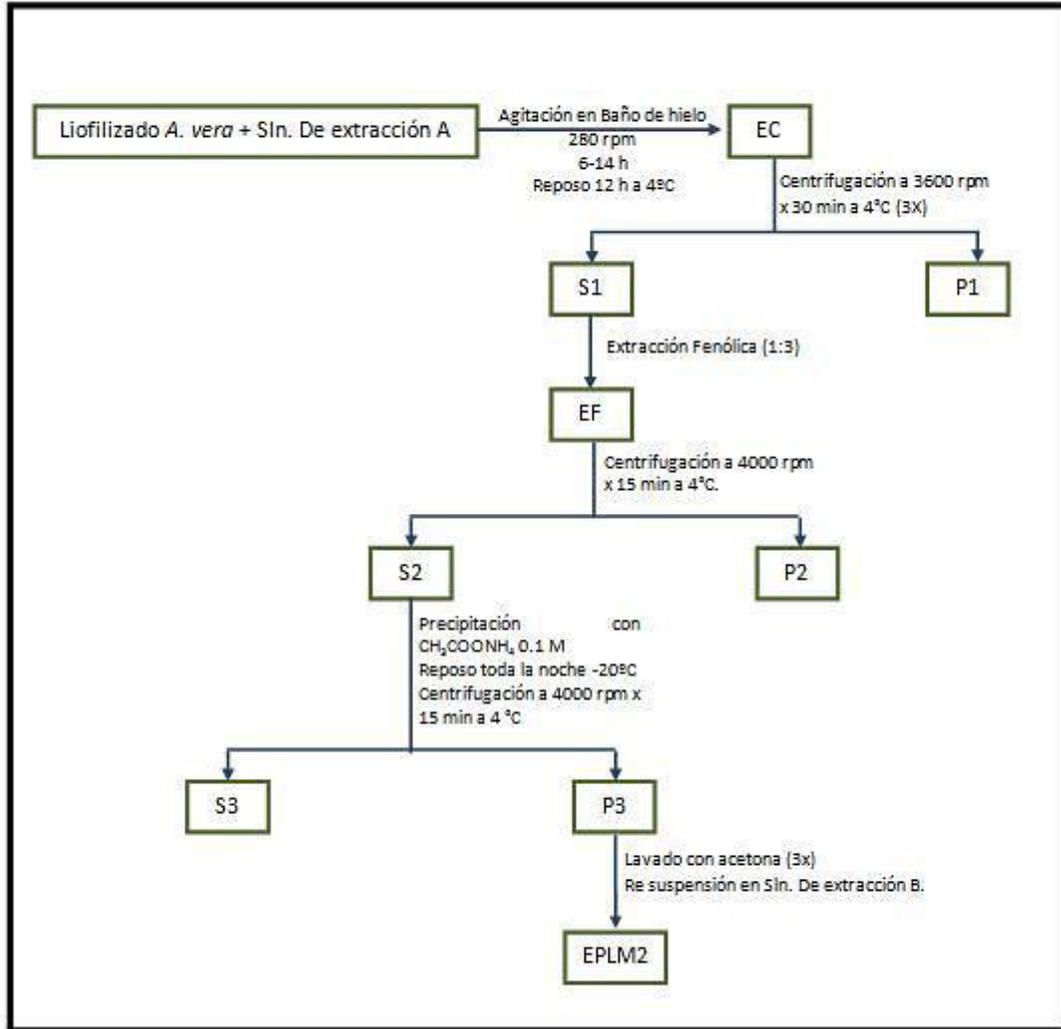


Figura 4. Método 2 (Faurobert *et al.*, 2007) aplicado a liofilizado de *A. vera*. EC: Extracto crudo; S1: Sobrenadante 1; P1: Precipitado 1; EF: Extracto fenólico; S2: Sobrenadante 2; P2: Precipitado 2; S3: Sobrenadante 3; P3: Precipitado 3; **EPLM2:** Extracto Proteico de Liofilizado por **M2**.

7.2.2. Hoja de *Aloe vera*.

A partir de la hoja de *A. vera* se obtuvieron extractos proteicos mediante **M1** con modificaciones (**Tabla 1**), tal como se realizó para el liofilizado de gel (apartado **7.2.1.1.**) pero con algunas adecuaciones dentro del proceso dado la naturaleza de la muestra. Dichas adecuaciones consistieron en que transcurrido el tiempo de agitación de la hoja con la solución de extracción A, se realizó una filtración con la finalidad de eliminar las partículas de mayor tamaño y el mucílago, seguido de una segunda filtración por una membrana de 1 μm . Además, posterior a la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% (p/v), el extracto se dejó en reposo a 4 °C toda la noche. Finalmente, otra de las adecuaciones consistió en que posterior a la recuperación del segundo precipitado, se concentró hasta aproximadamente 0.5 mL mediante una filtración en una membrana de 3 kDa, recuperando de esta manera el extracto proteico ([**EPHM1**] **Figura 5**).

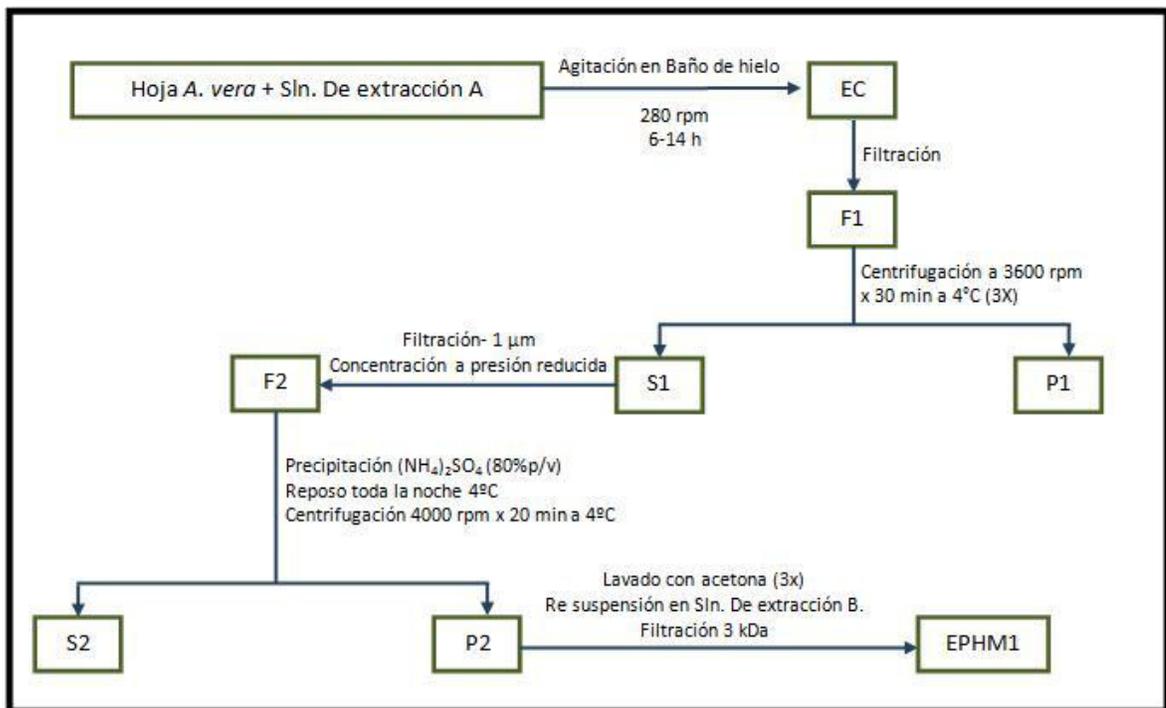


Figura 5. Método 1 (Costa *et al.*, 1998) para la obtención del extracto proteico a partir de hoja de *A. vera*.

EC: Extracto crudo; F1: Filtrado 1; S1: Sobrenadante 1; P1: Precipitado 1; F2: Filtrado 2; S2: Sobrenadante 2; P2: Precipitado 2; **EPHM1**: Extracto Proteico de Hoja por **M1**.

7.2.3. Optimización y selección del método de extracción.

Con la finalidad de optimizar el método de extracción por el cual se obtuviera mayor cantidad de proteínas totales, se establecieron sistemas en donde se modificaron tres variables: peso de material vegetal (g), tiempo de agitación (h) y volumen de solución de extracción A (mL).

Posteriormente, se determinó el contenido de proteínas totales en **EPLM1**, **EPHM1** y **EPLM2** obtenidos por el **M1** y **M2**, mediante espectrofotometría UV-Vis en el equipo Nadodrop (ThermoScientific) a una longitud de onda de 280 nm y empleando como estándar la ASB.

Todos los extractos se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Tabla 1. Condiciones modificadas para la extracción proteica de hoja y liofilizado de gel de *A. vera* por **M1** y **M2**.

Material	Peso Material vegetal (g)					Tiempo agitación (h)					Solución de extracción A (mL)				
	m1	m2	m3	m4	m5	t1	t2	t3	t4	t5	v1	v2	v3	v4	v5
Variable															
Hoja	125	150	270	300	500	6	8	10	12	14	250	500	1000	1500	2000
Liofilizado	1	2.5	5	8	10	6	8	10	12	14	250	500	1000	1500	2000

En función de la mayor concentración de proteína total obtenida en el parámetro evaluado de peso de material vegetal (g), se eligió la condición óptima del mismo para continuar con la evaluación de los diferentes tiempos de agitación (h). De la misma manera, tras obtener la condición óptima de tiempo de agitación, se continuó con la evaluación de los diferentes volúmenes de solución de extracción A (mL).

A continuación, las variables continuas de peso de material vegetal, tiempo de agitación y volumen de solución de extracción A, fueron analizadas respecto a su distribución con un análisis gráfico de distribución de cuartiles para observar su normalidad y fueron expresadas en media y desviación estándar. En caso de que no se cumpliera con criterios de normalidad, mediana y rango intercuartil, las variables discretas fueron expresadas en proporción. El análisis de los ambos métodos, se realizó respecto a la variable de salida “concentración de proteínas totales” a través de un análisis de comparación de medias paramétrico y no paramétrico, en caso de que se cumpliera el criterio de normalidad y no normalidad, respectivamente.

Los resultados de la cuantificación de proteína total de los extractos obtenidos por **M1** y **M2**, se sometieron a una comparación de medias por el análisis estadístico de t de student y Tukey determinando presencia o ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre cada tratamiento evaluado (**Tabla 1**) en cada variable, permitiendo seleccionar el método de mayor concentración de proteínas totales.

El análisis de la optimización de **M1** y **M2** se realizó a través de un análisis de ANOVA (programa SPSS 10.0) considerando las réplicas realizadas en cada tratamiento (**m**, **t** y **v**) en ambos métodos, permitiendo definir las condiciones óptimas de extracción.

7.3. Evaluación de actividad antimicrobiana de EPHM1, EPLM1 y EPLM2.

7.3.1. Actividad antibacteriana.

Los inóculos bacterianos se prepararon por resiembra desde cultivos en medio sólido C. Rivas (Patente IMPI MX/10892) pH 7.0 a tubos de ensayo que contenían 5 mL de caldo de cultivo C. Rivas. Estos tubos se incubaron a 37 °C × 18–24 h.

En placas de Petri conteniendo medio sólido C. Rivas, se inocularon con 100 μL de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC mL^{-1} (que corresponde 0.5 de la escala de Mc Farland). Posteriormente se realizaron orificios con una pipeta Pasteur en el agar, en los cuales se les depositaron 50, 200 y 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de **EPHM1**, **EPLM1** o **EPLM2** en medio C. Rivas. Como control negativo y positivo se utilizaron 25 μL de medio C. Rivas y gentamicina respectivamente (32 mg mL^{-1}); las placas se incubaron a $37^\circ\text{C}/48 \text{ h}$.

Posteriormente a la incubación se midieron los halos inhibición con ayuda de un Vernier y los resultados se expresaron en cm (Vega *et al.*, 2013).

7.3.2. Actividad antifúngica.

La preparación del inóculo de *C. albicans* se llevó a cabo igual que lo descrito con anterioridad para actividad antibacteriana, pero para los hongos filamentosos se siguió la metodología de Padrón *et al.* (2003). Una asada de micelio se depositó en una caja Petri con medio sólido C. Rivas a pH 5.5 y se incubó a 30°C de 7–14 d. Posteriormente se recuperaron las conidias por arrastre de superficie con ayuda de un hisopo, se filtraron y se transfirieron a un tubo con 3 mL de H_2O destilada estéril. Se realizó el conteo de conidias mL^{-1} en una cámara de Newbauer y se ajustó la densidad a $1-2 \times 10^4$ UFC mL^{-1} .

Para el ensayo de actividad antifúngica, se prepararon cajas Petri con medio sólido C. Rivas y se inoculó con 100 μL de cada cepa en su respectiva caja. Se hicieron orificios con una pipeta Pasteur y se colocaron en cada pocillo 50, 200 y 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de **EPHM1**, **EPLM1** o **EPLM2** en medio C. Rivas. Como control positivo y negativo se colocaron 25 μL de ketoconazol disuelto en H_2O estéril (32 mg mL^{-1}) y medio C. Rivas respectivamente.

Las placas se incubaron a 30 °C por 24 h para *C. albicans* y de 7–14 d para los hongos filamentosos. Posteriormente se midieron los halos de inhibición con un Vernier y los resultados se expresaron en cm.

7.4. Reobtención de EPLM2.

Una vez seleccionado el método óptimo por el cual se obtuvo una mayor concentración proteica y pureza, se prosiguió a reobtener el **EPLM2 (Figura 5)** para continuar con su identificación.

Adicionalmente con la finalidad de conservar los extractos obtenidos, se llevaron a sequedad total mediante un equipo CENTRIVAP (Labconco®) a 4 °C. Finalmente, se conservaron a -20 °C hasta su uso.

7.4.1. Rendimiento de EPLM2.

Se determinó la masa de **EPLM2** seco y se obtuvo el rendimiento de la extracción proteica con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{PE}{PI} \times 100$$

Donde:

PE = Peso obtenido después de la extracción

PI = Peso inicial del material vegetal empleado.

7.5. Identificación de péptidos, proteínas y glicoproteínas en los extractos proteicos de *A. vera*.

7.5.1. Hidrólisis enzimática de los extractos proteicos.

A los extractos proteicos (**EPHM1**, **EPLM1** y **EPLM2**) se les realizó una hidrólisis enzimática con tripsina, que consistió en cuatro etapas consecutivas. En la primera etapa, se tomaron 100 μL de la muestra del extracto proteico ajustada a 1.0 mg mL^{-1} de proteína, equivalente a 100 μg de la misma y se les adicionaron 5 μL de ditioneitol (DTT; [Pro-Pure]), para posteriormente incubarse a $65 \text{ }^\circ\text{C} \times 45 \text{ min}$. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 20 μL de yodoacetamida (derivatización), incubándose nuevamente por 45 min a temperatura ambiente en oscuridad. Para detener la reacción, se agregaron 20 μL de DTT y se incubaron por 45 min a TA; transcurrido este tiempo, se añadieron 5 μL de tripsina (PROMEGA® [$1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$]) para finalmente ser incubados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 16 h. La reacción enzimática se detuvo agregando 10 μL de ácido trifluoroacético (TFA) y posteriormente los extractos digeridos se centrifugaron por 10 min a 10 000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

7.5.2. Separación cromatográfica e identificación del EPHM1 y EPLM1.

De los hidrolizados de **EPHM1** y **EPLM1** se inyectaron 2 μL en el sistema de nanocromatografía modelo nanoAcquity (Waters) utilizando como fase estacionaria una columna BHE ($75 \mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$ y $1.7 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula). En este sistema de separación, se utilizó como fase móvil un gradiente de Agua: ACN (97:3 a 40:60 por 30 min).

La detección de los péptidos se realizó en un espectrómetro de masas (ortogonal cuadrupolo-tiempo de vuelo modelo Q-TOF Premier), configurado con una interfase nano electrospray.

7.5.2.1. Procesamiento de datos.

El proceso de bioinformática para la secuenciación e identificación se llevó a cabo con el software ProteinLynx Global server ver 2.5, el cual usó el algoritmo MASCOT para la obtención de la secuencia de aminoácidos de los péptidos, y para la alineación con las secuencias proteicas se usó la base de datos de *Arabidosis thaliana* en formato FASTA.

7.5.3. Separación cromatográfica e identificación del EPLM2.

7.5.3.1. Fraccionamiento y concentración.

Los **EPLM2** se resuspendieron en 100 μ L de NH_4HCO_3 100 mM. Posteriormente, 50 μ L de dicha solución fueron tomados e inyectados en el equipo HPLC marca Waters modelo Alliance 2695 XE a una columna Atlantis C-18, 5 μ , 4.6 x 75 mm, a 45 °C aplicando un gradiente 95/5 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ durante 25 min. Las proteínas fueron detectadas y colectadas a 280 nm con un detector de arreglo de fotodiodos marca Water modelo 996. Las fracciones colectadas fueron concentradas en un equipo CENTRIVAP (Labconco®) hasta llevar casi a sequedad, para posteriormente ser resuspendidas en 100 μ L de NH_4HCO_3 100mM.

7.5.3.2. Separación e identificación.

El sistema utilizado fue un equipo nanoAcquity con un esquema de conexiones para la realización de separaciones 2D con la modalidad On line (**Figura 6**). Bajo este esquema se realizó una estrategia para la obtención de 5 fracciones y una fracción de lavado. Cabe mencionar que se inyectó un blanco de ACN 100% después de cada muestra para evitar efectos de arrastre entre muestra y muestra.

Tabla 2. Concentraciones de ACN utilizadas para la separación cromatográfica de **EPLM2**.

Fracción	% de H₂O	% de ACN
1	88.9	11.1
2	85.5	14.5
3	82.6	17.4
4	79.2	20.8
5	55	45
6	35	65

Se inyectó 1.0 μ L del **EPLM2**, considerando tener 1.0 μ g de proteína en carga aproximadamente. En esta se aplicaron seis gradientes con diferentes concentraciones de ACN como fase B (**Tabla 2**) y usando HCOONH₄ 20 mM como fase A. Esta separación fue de contenido básico.

Además se empleó una columna de trampa Symmetry C-18, 5 μ , 150 μ x 2 cm y una columna analítica BEH, 1.7 μ , 75 μ x 25 cm, en la cual se usó como fase B ACN con 0.1% de CH₂O₂. Dicha columna fue acondicionada a 40 °C y se conectó a la interface nanoelectroSpray. Las condiciones de la separación analítica, se describen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Condiciones de la separación analítica empleadas en el **EPLM2**.

Tiempo (min)	Agua/0.1% AF	ACN	Curva de gradiente
0	99	1	0
5	90	10	6
45	50	50	6
50	50	50	6
65	40	60	6
75	95	5	6

Finalmente tras la separación del **EPLM2**, las fracciones fueron dirigidas al espectrómetro de masas (ortogonal cuadrupolo-tiempo de vuelo modelo Q-TOF Premier), configurado con una interfase nano electrospray. Las condiciones de detección en dicha interfase se describen en la **Tabla 4**.

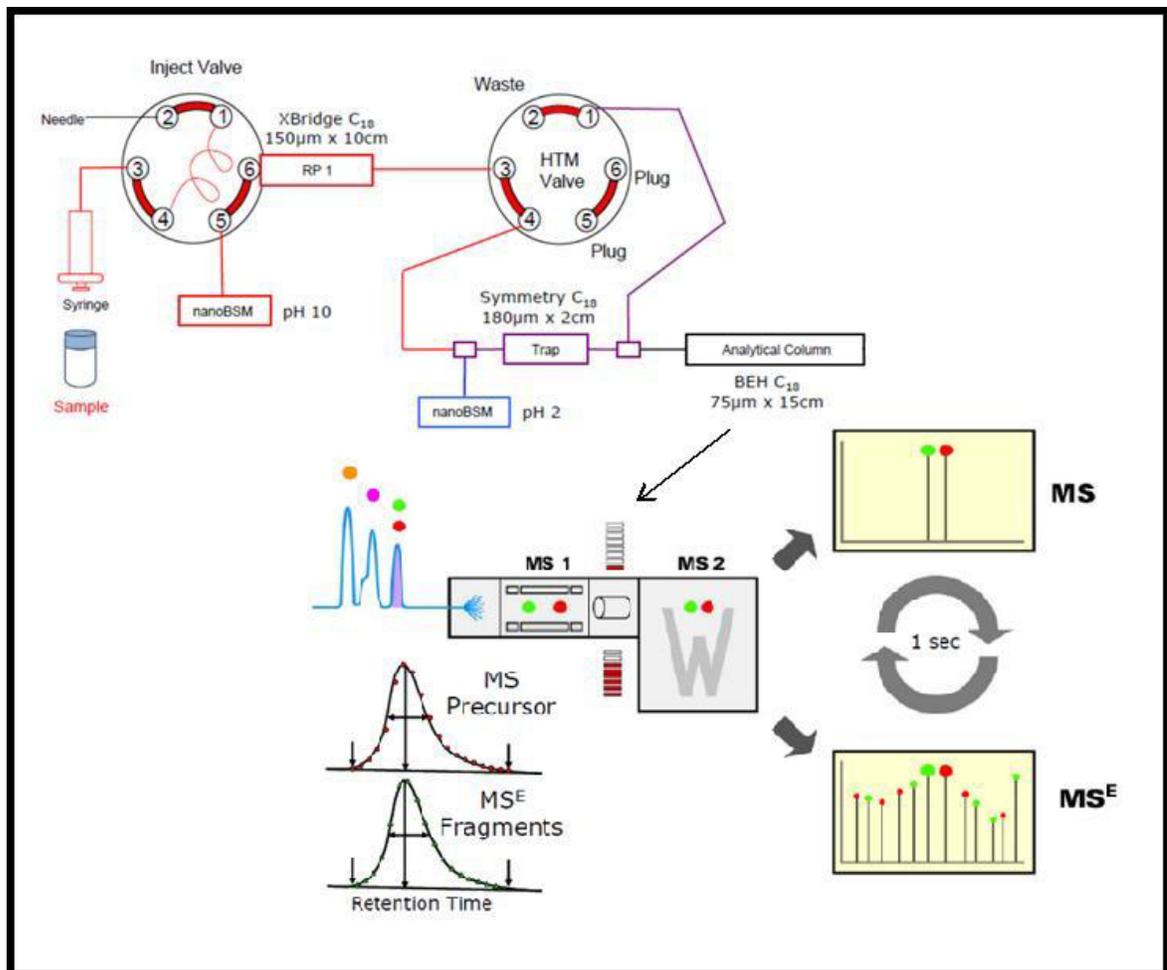


Figura 6. Diagrama de conexiones del sistema nanoAcquity acoplado al sistema de espectrometría de masas q-TOF premier XE, empleada para la separación e identificación del **EPLM2**

Tabla 4. Condiciones de detección utilizadas en la interfase nano electrospray en el espectrómetro de masas, para la identificación del **EPLM2**.

Condiciones	Valores
Voltaje de capilar (V)	4000
Voltaje de cono de extracción (V)	40.0
Voltaje de cono de muestra (V)	5.0
Guía de iones	5.0
Temperatura de la interface (°C)	100
Flujo de nitrógeno (L h ⁻¹)	1.7
Voltaje del detector MCP (V)	1800

7.5.3.3. Procesamiento de datos.

Todas las fracciones fueron exportadas en formato RAW para ser procesadas con el software ProteinLinx Global Server ver 3.0 usando la base de datos Uniprot y el algoritmo MASCOT.

7.6. Ensayo de letalidad sobre *Artemia salina* de EPLM2

El ensayo de letalidad sobre *A. salina* se realizó según lo descrito por Meyer *et al.* (1982), con algunas modificaciones. En un eclosionador de vidrio de 25 x 15 cm con tapa y dividido en dos secciones por la mitad, con una sección oscura, se colocaron 0.1 g de huevecillos de *A. salina* en 300 mL de agua de mar simulada (40 g de sal de mar [Coralife Scientific Grand Marine Salt] y 6 g de levadura aforando a 1 L de agua destilada pH 7.8) con aireación continua (bomba de acuario ELITE 799) y con luz blanca irradiada de una lámpara de 11 W a 20 cm del eclosionador. Finalmente se cerró con la tapa y se incubaron por 48 h.

Una vez eclosionados, se colocaron 10 nauplios de *A. salina* en el 2° estadio en una microplaca de 96 pozos en un volumen de 100 µL de agua de mar. Posteriormente se colocaron las concentraciones a probar en un volumen de 100 µL. Las soluciones de

EPLM2 de *A. vera* (50, 150, 300, 500, 800 μg), así como la de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (control positivo), fueron preparadas en agua de mar. Los nauplios de *A. salina* estuvieron expuestos a las soluciones de los extractos proteicos durante de 24 h bajo las mismas condiciones.

Después del tiempo de incubación, se contabilizaron los nauplios vivos en cada pozo. Los resultados fueron expresados como DL50 (Dosis letal que causa la muerte del 50% de los miembros de una población) mediante el análisis de PROBIT en el paquete estadístico SPSS 10.0. El criterio de toxicidad fue el asignado por Nguta y Mbaria (2013). El extracto proteico será no tóxico si la DL50 muestra una concentración mayor a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Obtención de extractos proteicos puros de *Aloe vera*.

El proceso de optimización permitió la obtención de una concentración media de 7 y 8.6 mg mL⁻¹ de proteínas totales en los extractos mediante el **M1** en hoja y liofilizado respectivamente y 16 mg mL⁻¹ por el **M2** en liofilizado.

Dentro del proceso de optimización del **M1** se verificó la eficiencia de extracción tanto en hoja como en liofilizado mediante un monitoreo por UV-Vis y por espectrometría de masas, ambas enfocadas en verificar la integridad de las membranas de 3 kDa empleadas en la última etapa con la finalidad de purificar, así como de la pérdida de proteínas en el proceso de filtración a través de las mismas.

En cuanto al monitoreo por UV-Vis, las lecturas a 280 nm tanto para hoja, como para liofilizado, arrojaron un espectro de absorción donde se muestra una señal característica a dicha longitud de onda. Sin embargo en el caso de la extracción proteica en hoja con una sola filtración a través de la membrana de 3 kDa, se obtuvo una concentración de proteínas totales media de 1.19 mg mL⁻¹, observando una señal con un pico máximo de absorción desplazado (**Figura 7a**). Lo anterior, aunado a la baja concentración obtenida por este método en la primera etapa, impedía continuar con el enriquecimiento y la evaluación biológica de los mismos, por lo que como parte de la optimización del mismo, se optó por una segunda filtración a través de las mismas membranas, permitiendo obtener un espectro en donde se observa que la señal a 280 nm se encuentra más cercana en su pico máximo de absorción (**Figura 7b**) y la concentración proteica media se incrementó a 2.32 mg mL⁻¹.

Finalmente, buscando una mayor pureza en los extractos proteicos por el **M1** se procedió a realizar una cromatografía de intercambio iónico.

Tras llevarse a cabo la cromatografía en los extractos de hoja y someterlo a una lectura a 280 nm, el espectro de absorción mostró nuevamente una clara señal a 280 nm con una mayor pureza permitiendo visualizar un pico máximo de absorción más definido a la longitud de onda establecida. Sin embargo, se obtuvo una baja concentración media de proteínas totales que oscila en 0.14 mg mL^{-1} , disminuyendo considerablemente la concentración proteica comparada con las lecturas anteriores (**Figura 7c**).

En este sentido, aunque la cromatografía de intercambio iónico permitió la obtención de un extracto proteico más puro, la concentración del mismo disminuye considerablemente a tal grado de perder alrededor del 88.24% de lo recuperado inicialmente.

En el caso de los extractos proteicos obtenidos a partir de liofilizado por el **M1**, mostraron un comportamiento similar a los extractos de hoja. Tras una primera filtración por las membranas de 3 kDa la señal característica a 280 nm se encuentra desplazada en el pico máximo de absorción demostrando una menor pureza en el extracto y permitiendo obtener una concentración media de proteínas totales de 2.13 mg mL^{-1} (**Figura 7a**). De igual manera que para los extractos de hoja de acuerdo a lo anterior, era imposible continuar con el enriquecimiento y la evaluación biológica de los mismos, por lo que se realizó una segunda filtración a través de las mismas membranas, obteniendo un espectro en donde se observa que la concentración proteica aumentó hasta 4.22 mg mL^{-1} , representando cerca de un 98.12% de incremento en función a una sola filtración para liofilizado y un 81.9% y en referencia a lo obtenido en la misma etapa para hoja. Aunado a lo anterior, se observó una mayor pureza en el extracto a partir de liofilizado al obtener el pico máximo de absorción más cercano a 280 nm (**Figura 7b**).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta etapa de estandarización, las filtraciones a través de la membrana de 3 kDa resultan importantes dentro de la etapa de purificación. Si bien se demostró un enriquecimiento del extracto proteico a través de las mismas, también se garantiza una recuperación con una mayor pureza, representando un punto crítico dentro del proceso de purificación de los extractos.

Por otro lado, tras llevarse a cabo la cromatografía de intercambio iónico en el extracto a partir de liofilizado y someterlo a una lectura a 280 nm, el espectro de absorción mostró

nuevamente una señal característica a 280 nm con una mayor pureza ya que su pico máximo de absorción se encuentra más definido a la longitud de onda establecida (**Figura 7c**). Pese a la pureza lograda en esta etapa, la concentración proteica media disminuyó considerablemente oscilando en los 0.09 mg mL^{-1} . Aunque la cromatografía de intercambio iónico permitió la obtención de un extracto proteico más puro, la concentración disminuyó considerablemente representando una pérdida del mismo, de alrededor de 95.77% respecto a lo recuperado en la primera etapa. De acuerdo a lo anterior, se optó por descartar la realización de una cromatografía de intercambio iónico dentro de la etapa de purificación en el **M1**.

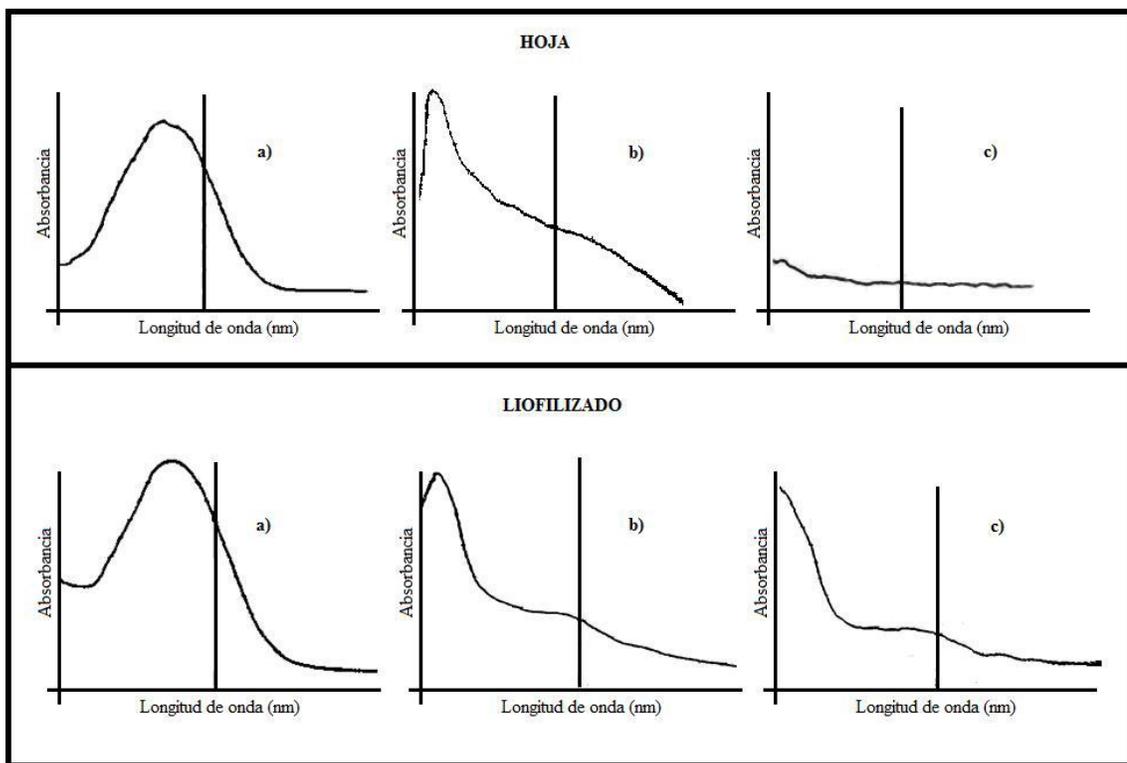


Figura 7. Espectro UV-VIS del **EPHM1** y **EPLM1** de *A. vera* ($\lambda = 280 \text{ nm}$).
a) Extracto proteico tras una filtración a través de la membrana de 3 kDa; b) Extracto proteico tras una segunda filtración a través de la membrana de 3 kDa; c) Extracto proteico después de una cromatografía de intercambio iónico.

El monitoreo realizado por UV-Vis para el **M1** en la etapa de purificación con las membranas de 3 kDa y con la cromatografía de intercambio iónico, muestra que los extractos proteicos obtenidos a partir de liofilizado reflejan una mayor pureza en las tres etapas de purificación monitoreadas. Además, el manejo del liofilizado con respecto a la hoja se facilitó permitiendo una mejor optimización para el mismo, aunado a la baja pérdida que representa su manipulación.

En cuanto al monitoreo de la eficiencia de extracción del **M1** por espectrometría de masas, primeramente el estándar de ASB fue sometido a una digestión enzimática para posteriormente ser dirigido al espectrómetro de masas con la finalidad de garantizar que las condiciones empleadas para la identificación eran las adecuadas, así como la sensibilidad del equipo. Como se puede observar en el espectro de la **Figura 8**, tras llevar a cabo la primera etapa de identificación como monitoreo por espectrometría de masas, el equipo permitió la identificación del estándar con un total de 58 péptidos asociados, por lo que se procedió a verificar la integridad de las membranas de 3 kDa, así como de la pérdida de proteínas a través de las mismas mediante la identificación de los extractos.

En el caso del monitoreo por espectrometría de masas de los extractos a partir de hoja, no se logró la identificación de péptidos presentes en el mismo. Sin embargo, el espectro obtenido a partir del **EPHM1** con una mezcla de proteínas, las cuales se hicieron pasar a través de la membrana de 3 kDa permitió la identificación de las proteínas presentes en dicha mezcla. Si bien en el **EPHM1** no se lograron observar péptidos o proteínas, el espectro permitió comprobar que a través de la membrana de 3 kDa se garantiza la recuperación de proteínas mayores a ese tamaño.

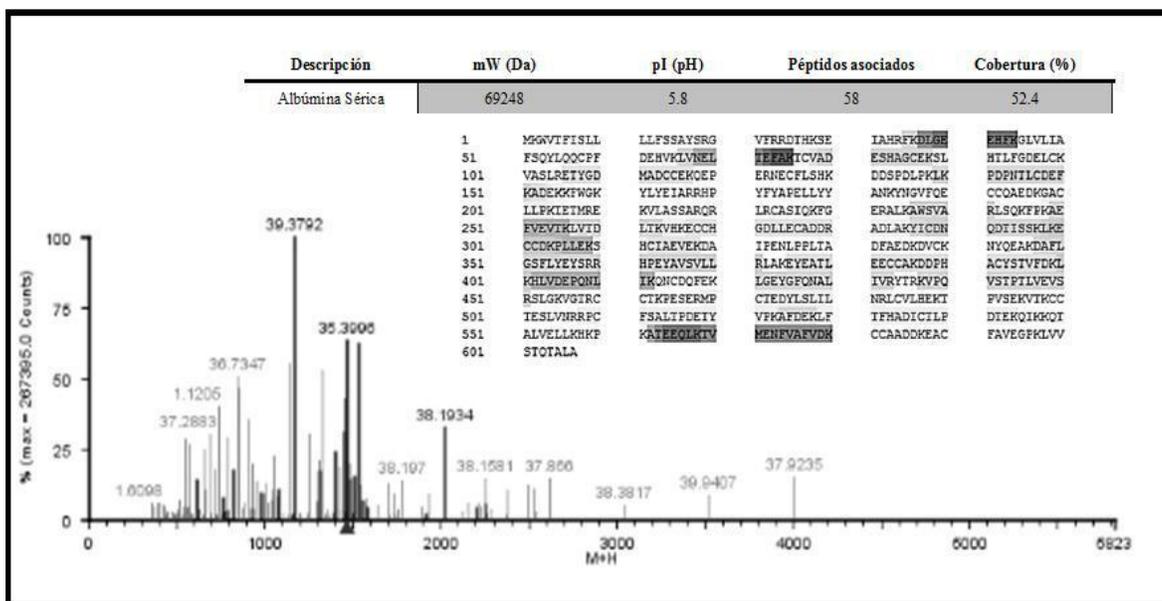


Figura 8. Espectro de masas obtenido para el estándar de ASB.

Por otro lado, en el monitoreo por espectrometría de masas en el extracto a partir de liofilizado, se obtuvo un espectro en donde se identifica claramente las proteínas presentes en la mezcla con las que se hizo pasar el **EPLM1** a través de la membrana de 3 kDa. Además, se pudo identificar dos péptidos presentes en el mismo asociados a la enzima eterol O-aciltransferasa 1 y una glicoproteína de matriz. Lo anterior nuevamente corrobora que a través de la membrana se recuperan proteínas mayores a 3 kDa.

De acuerdo al monitoreo por UV-Vis y por espectrometría de masas, se determinó que a partir del liofilizado se puede obtener un extracto proteico de mayor pureza, a una mayor concentración y la identificación de las proteínas posibles, por lo que se optó por continuar enriqueciendo el extracto proteico únicamente con el liofilizado de *A. vera*.

En la búsqueda de la obtención de un mejor rendimiento proteico, se procedió por probar el **M2** para liofilizado llevando a cabo un monitoreo por UV-Vis en el **EPLM2**. Las lecturas a 280 nm permitieron obtener un espectro de absorción en donde se observa claramente una señal característica a la longitud de onda establecida, además de que el pico máximo de absorción se encuentra más cercano a la misma (**Figura 9**), obteniendo

una concentración media de 16.55 mg mL^{-1} . Este resultado arrojó información importante respecto a la obtención de un extracto proteico de mayor pureza y una mayor concentración de proteínas totales, con una menor manipulación evitando pérdidas importantes del mismo. Por lo anterior, se procedió a establecer y seleccionar el método que permitiera la obtención de un extracto con una mayor concentración de proteínas totales a partir de liofilizado.

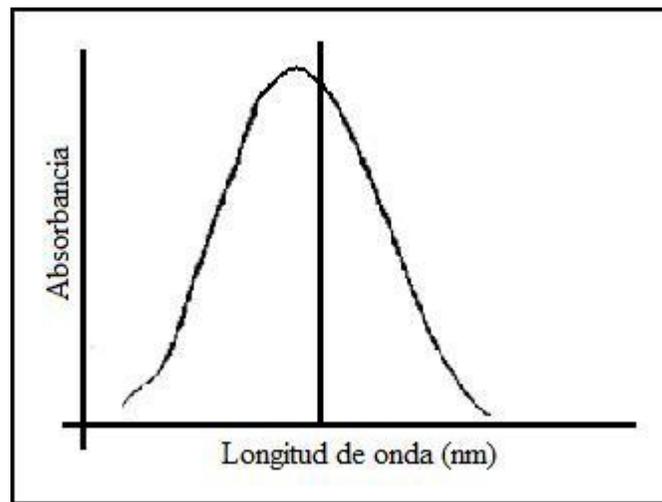


Figura 9. Espectro UV-VIS del **EPLM2** de *A. vera* ($\lambda = 280 \text{ nm}$).

Tras continuar con la extracción proteica de liofilizado por el **M1** y **M2** y proceder con las lecturas de los mismos a 280 nm , se obtuvieron las concentraciones en mg mL^{-1} para cada una de las repeticiones de extracción realizadas, considerando las condiciones modificadas (peso de material vegetal, tiempo de agitación y solución de extracción A) para cada método (**Tabla 5**).

Con la finalidad de estandarizar y optimizar el método por el cual se obtuviera la mayor concentración de proteínas totales a partir de liofilizado, así como las condiciones óptimas de extracción, se analizaron los resultados con un parámetro estadístico descriptivo de t de student, prueba de Tukey y un ANOVA.

Tabla 5. Concentración media de proteínas totales (mg mL^{-1}) para los diferentes tratamientos y selección de los parámetros de mayor contenido de éstas por **M1** y **M2** de hoja y liofilizado del gel de *A. vera* ($n = 5$).

Parámetros evaluados		MÉTODO 1		MÉTODO 2
		Concentración de proteína total (mg mL^{-1})		
		Hoja	Liofilizado	Liofilizado
Peso de material vegetal (g)	<i>m1</i>	5.9	8.6	15.4
	<i>m2</i>	5.0	7.8	14.9
	<i>m3</i>	5.1	7.4	14.7
	<i>m4</i>	4.9	7.9	13.0
	<i>m5</i>	5.2	7.9	13.2

Se seleccionó **m1** debido a la mayor obtención de proteínas totales para los liofilizados por los **M1** y **M2**.

Tiempo de agitación (h)	<i>t1</i>	7.1	8.7	15.4
	<i>t2</i>	6.4	8.2	14.8
	<i>t3</i>	6.3	7.9	15
	<i>t4</i>	6.1	7.7	15.3
	<i>t5</i>	5.8	7.9	14.9

Se seleccionó **t1** debido a la mayor obtención de proteínas totales para los liofilizados por los **M1** y **M2**.

Solución de extracción A (mL)	<i>v1</i>	7.3	8.6	16.0
	<i>v2</i>	7.9	8.0	15.6
	<i>v3</i>	8.5	7.9	15.8
	<i>v4</i>	7.4	8.1	15.0
	<i>v5</i>	7.0	8.0	15.4

En base a los resultados obtenidos para **M1** y **M2**, se obtuvo una concentración media máxima de 8.6 (DE \pm 0.1140) y 15.4 (DE \pm 0.0894) mg mL⁻¹ respectivamente en el tratamiento **m1** en relación a la variable de peso de material vegetal (**Tabla 5**). La comparación de esta variable entre el **M1** y **M2** en función de las medias de concentración de proteína total obtenidas de las cinco repeticiones para cada tratamiento, muestra que **m1** es significativamente mayor para **M2** [t (7.5)=104, p= 2.8 X 10⁻¹³ (IC 95% 6.6-6.9)].

En base a lo anterior, se continuó con el tratamiento **m1** en ambos métodos para proceder con el análisis de la siguiente condición: tiempo de agitación.

La respuesta concentración en los extractos proteicos en función del tiempo de agitación utilizando **m1**, mostró una concentración media máxima de proteínas de 8.7 (DE \pm 0.1140) y 15.4 (DE \pm 0.0894) mg mL⁻¹ al **t1** para el **M1** y **M2** respectivamente (**Tabla 5**). Mediante el análisis estadístico de comparación de medias, se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre la media de concentración de proteína total de **M1** y **M2**, siendo mayor para el **M2** [t (7.5)=103, p= 3.34 X 10⁻¹³ (IC 95% 6.5-6.8)].

De acuerdo a las concentraciones proteicas máximas obtenidas en función de las condiciones modificadas, se continuó con el tratamiento **m1** y **t1** en ambos métodos para evaluar la siguiente condición: volumen de solución de extracción A.

En función del volumen de solución de extracción A, para el **M1** y **M2** se mostró una concentración proteica máxima media de 8.6 (DE \pm 0.1140) y 16.0 (DE \pm 0.1949) mg mL⁻¹ respectivamente al **v1** (**Tabla 5**). Se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre la media de **M1** y **M2** mediante la comparación de medias, resultando mayor para **M2** [t (6.4)= 74, p= 1.07 X 10⁻¹⁰ (IC 95% 7.23-7.7)].

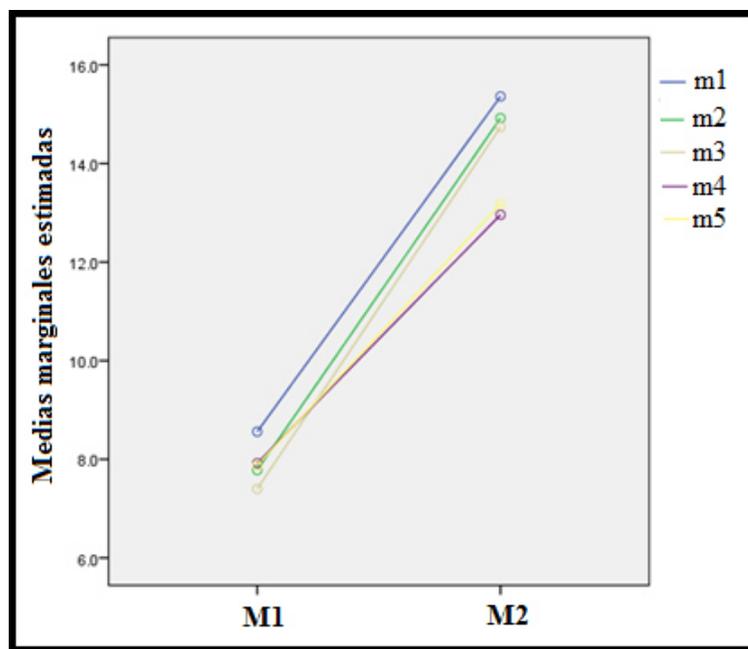


Figura 10. Gráfico de perfil de las medias marginales estimadas de concentración de proteínas totales en función de la variable peso de material vegetal en **EPLM1** y **EPLM2**.
m1= 1 g; **m2**= 2.5 g; **m3**= 5 g; **m4**= 8 g; **m5**= 10 g.

Mediante la prueba de Tukey (α 0.05) se demostró si existía diferencia significativa en las concentraciones medias obtenidas para cada tratamiento en función de la variable de peso de material vegetal para ambos métodos. En la **Figura 10**, se puede observar que bajo el tratamiento **m2** y **m3** de liofilizado, la concentración media de extracto proteico resulta estadísticamente igual, así mismo para el tratamiento **m4** y **m5**. Sin embargo el tratamiento **m1** de liofilizado muestra una clara diferencia en la concentración media para ambos métodos, además de que se visualiza sin interacción con respecto a los otros cuatro tratamientos.

Además reveló que de acuerdo a las medias de concentración proteica observadas en la variable de tiempo de agitación, se tiene sólo dos grupos homogéneos con una α de 0.05.

Uno de los grupos corresponde al tiempo **t4**, **t3**, **t4** y **t2** de agitación que resultan estadísticamente iguales, mientras que el otro grupo corresponde a **t1**, el cual refleja una notable diferencia en su concentración media para ambos métodos resultando el mejor para **M2** con una mayor concentración proteica.

En función del volumen de solución de extracción A, la prueba de Tukey (α 0.05) estableció que el tratamiento volumen de solución de extracción A **v4**, **v5**, **v2** y **v3** no presentan una diferencia significativa, mientras que el tratamiento **v1** mostró diferencia estadísticamente significativa, además de presentar una mayor concentración por el **M2**.

De acuerdo al análisis estadístico, se seleccionó el **M2** en base a la mayor concentración de proteínas totales en los diferentes parámetros evaluados (**Tabla 6**).

Tabla 6. Concentración media de proteínas totales ($\text{mg mL}^{-1} \pm \text{DE}$) de **EPLM1** y **EPLM2**, en función de las variables óptimas modificadas (**m1**, **t1** y **v1**)

	Peso de material Vegetal	Tiempo de agitación	Solución amortiguadora
M1	8.6 \pm 0.1140	8.7 \pm 0.1140	8.6 \pm 0.1140
M2	15.4 \pm 0.0894	15.4 \pm 0.0894	16.0 \pm 0.1949

Para establecer las condiciones óptimas de extracción en el **M2**, se realizó un análisis de ANOVA para comparar las posibles diferencias entre los diferentes tratamientos (**m1**, **m2**, **m3**, **m4**, **m5**) respecto a las cinco repeticiones evaluadas de la variable peso de material vegetal. Se observaron diferencias estadísticamente

significativas entre los diferentes tratamientos [F (4)= 52, p= 2.5 X 10⁻¹⁰], siendo el tratamiento predominante el **m1** con una media de 15.4 mg mL⁻¹ de proteína total (**Figura 11a**).

Respecto al tiempo de agitación se determinó una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos (**t1, t2, t3, t4, t5**) respecto a las cinco repeticiones evaluadas [F (4)= 8, p= 0.0004], siendo el grupo predominante el **t1** obteniendo una mayor concentración de proteína total (**Figura 11b**).

Finalmente en la variable de volumen de solución de extracción A, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (**v1, v2, v3, v4, v5**) respecto a las cinco repeticiones evaluadas [F (4)= 8, p= 0.0004], siendo el grupo predominante el **v1** con una mayor concentración de proteína total (**Figura 11c**).

Esto permitió determinar los tratamientos en los cuales se presentó una mayor concentración, estableciendo las condiciones óptimas de la extracción en el **M2: m1, t1, v1**.

Otro parámetro evaluado fue la absorbancia a 280 nm para la selección del método de mayor concentración de proteínas totales. El **M2** presentó un extracto de mayor concentración de proteínas totales, con una señal característica de proteínas y de mayor pureza comparada con el **M1**, esta se muestra en la **Figura 12**.

El **EPLM1** mostró también una señal característica de la presencia de proteínas a 280 nm con el punto máximo de absorción desplazado. El equipo utilizado fue equipo NanoDrop (ThermoScientific), éste permite determinar el rendimiento en mg mL⁻¹ de las proteínas extraídas utilizando como estándar de referencia ASB y además está adaptado para determinar la pureza de proteínas purificadas, estableciendo un radio ~1.8-2.00 para indicar la misma.

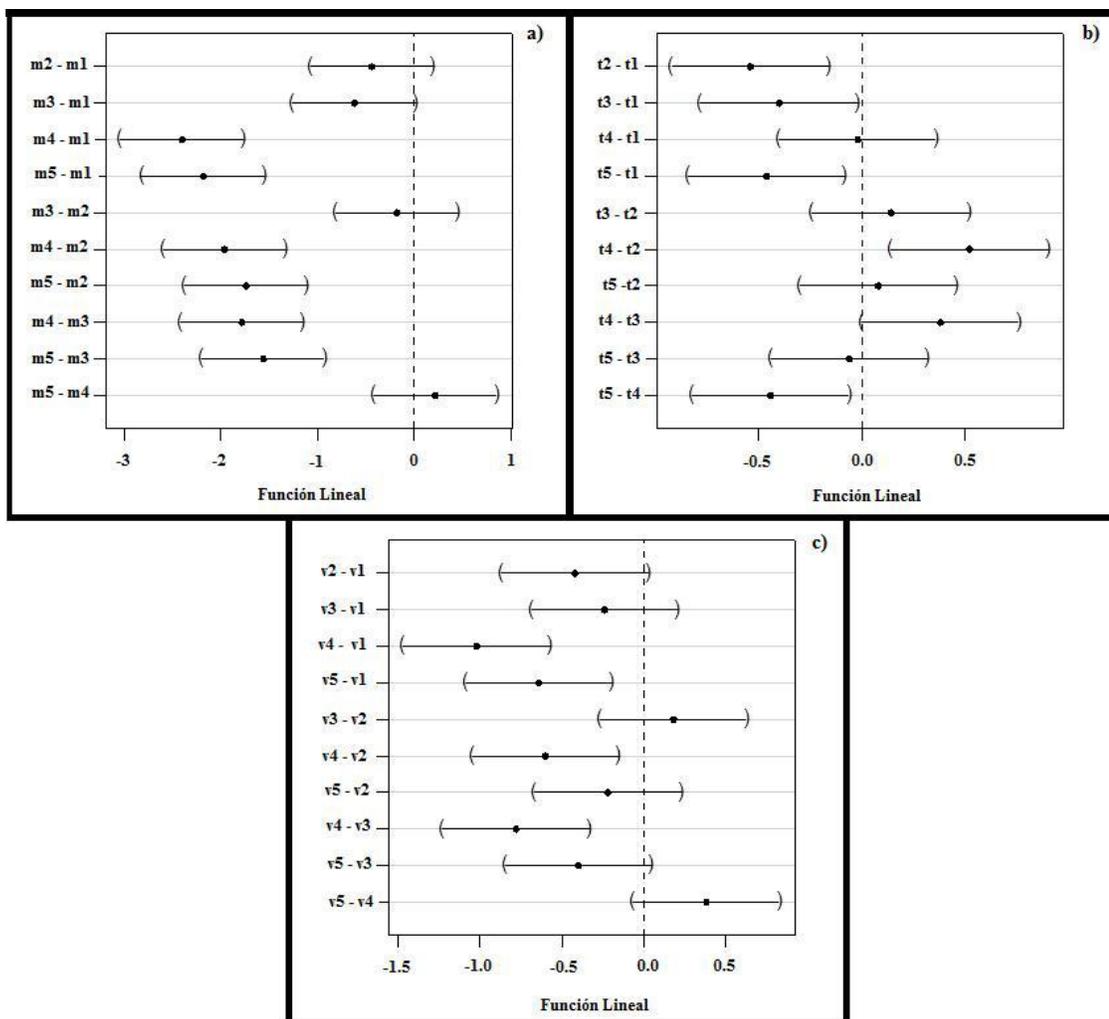


Figura 11. Gráfico que muestra las diferencias estadísticamente significativas en función a la comparación de las medias de concentración de proteína total de los diferentes tratamientos para las tres variables evaluadas en el **M2**; **a)** peso de material vegetal, **b)** tiempo de agitación y **c)** volumen de solución de extracción A.

El incremento en la “pureza” del espectro UV-Vis del **EPLM1** vs **EPLM2** utilizando como precipitante al fenol, éste favoreció una mayor remoción de sustancias interferentes disminuyendo la interacción molecular entre las proteínas y otros componentes como los azúcares (Faurobert *et al.*, 2007) brindando la ventaja al **M2** en cuanto al porcentaje de recuperación y de concentración de proteínas totales.

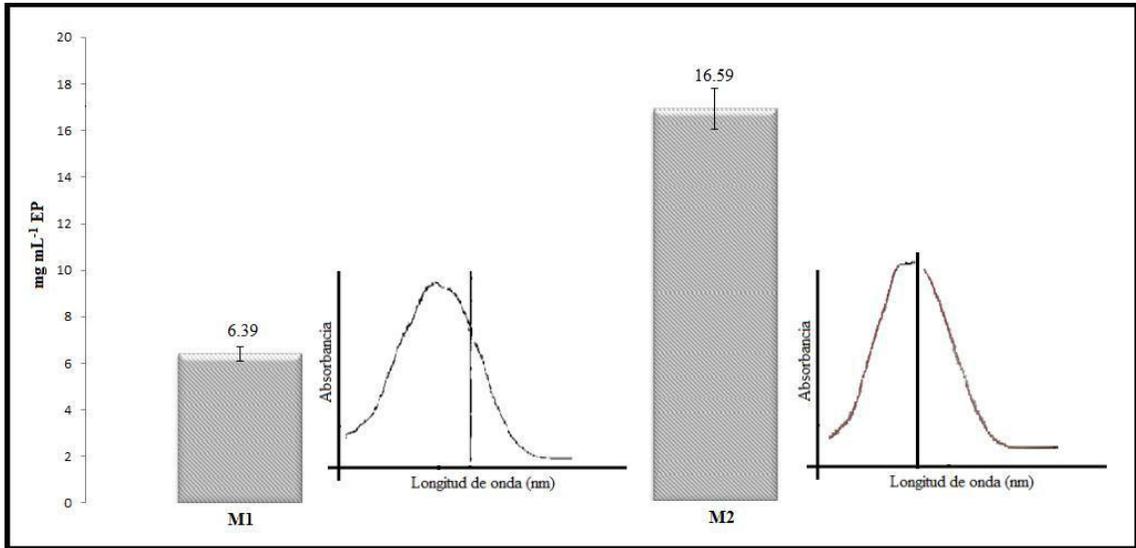


Figura 12. Comparación de la concentración media de proteína total de liofilizado de gel de *A. vera* obtenidos por **M1** y **M2**, con sus respectivos espectros de absorción a 280 nm.

Por lo anterior y basados en las condiciones para la obtención de un extracto de mayor concentración de proteínas totales, se continuó con el enriquecimiento del extracto utilizando únicamente el **M2**.

8.2. Evaluación de actividad antimicrobiana de EPHM1, EPLM1 y EPLM2.

La evaluación antibacteriana se llevó a cabo tanto para el **EPHM1**, **EPLM1**, como para el **EPLM2**. **EPHM1** y **EPLM1** no mostraron actividad contra las bacterias evaluadas. Sin embargo para el caso de **EPLM2**, éste mostró actividad inhibitoria del crecimiento contra *S. aureus* a $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ con un halo de inhibición de 0.8 cm (**Figura 13**).

A la fecha, no existen reportes de proteínas o extractos proteicos de *A. vera* con actividad contra *S. aureus*, sólo se tiene reporte de actividad contra la misma, de extractos etanólicos y metanólicos de la planta (Ajabnoor, 1990; Pecere *et al.*, 2000).

De acuerdo a lo anterior, sería necesario establecer con certeza el responsable de la actividad mostrada por el **EPLM2**, permitiendo de esta manera la obtención de una nueva molécula con actividad anti- *S. aureus*. El determinar la actividad inhibitoria del mismo, permitiría establecer el o los componentes farmacológicamente activos. Aunado a lo anterior, es importante reconocer a los otros componentes químicos que pueden influir en su actividad (coadyuvantes), por ejemplo, modulando su biodisponibilidad o la estabilidad, así como materiales inactivos o inertes e inclusive en ocasiones constituyentes potencialmente alérgicos o tóxicos, tal como lo menciona Franz y Vlietinck (2001). Puntos críticos dentro de la búsqueda de nuevas alternativas a los fármacos actualmente disponibles, aunado a la biodisponibilidad que presentan las proteínas y péptidos.

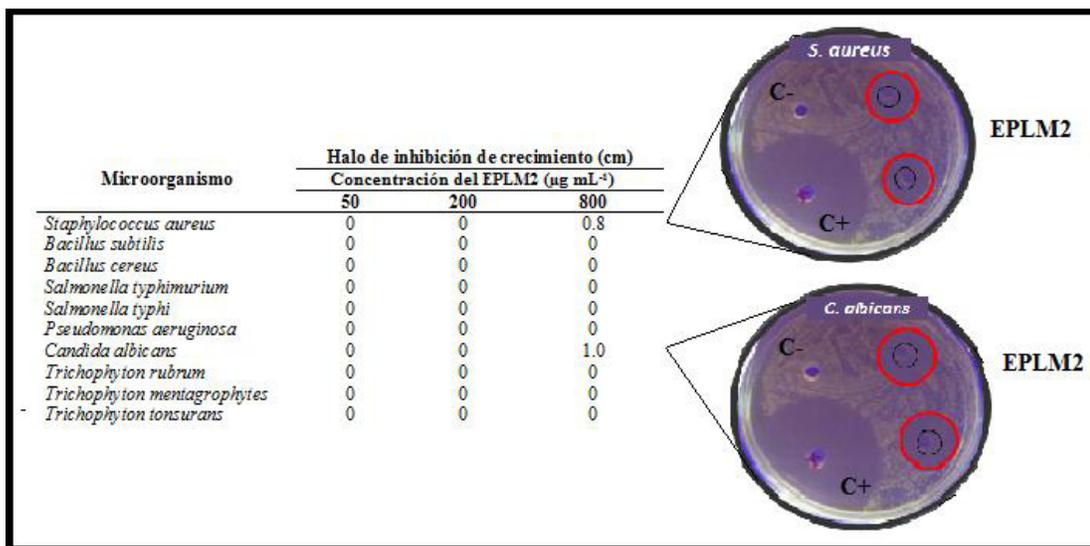


Figura 13. Actividad antimicrobiana expresada en cm (halos de inhibición) a una concentración de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ de **EPLM2**. C+= Control positivo: gentamicina; C- = Control negativo: Medio C. Rivas.

En cuanto a la evaluación antifúngica, los resultados muestran que el **EPLM1** no mostró actividad contra los hongos evaluados, en tanto que **EPLM2** mostró actividad inhibitoria del crecimiento contra *C. albicans* a $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ con un halo de inhibición de 1 cm y no exhibió actividad inhibitoria para el resto de los hongos filamentosos (**Figura 13**). En este sentido, ya existe el reporte de una proteína con dicha actividad. Das *et al.* (2010) reportaron una proteína de *A. vera* de 14 kDa con actividad antifúngica contra *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. albicans*. Además, Doddanna *et al.* (2013) reportaron actividad contra *C. albicans* para extractos alcohólicos a partir de *A. vera*.

Si bien se ha reportado una proteína con actividad contra *C. albicans*, en este caso no se establece que dicha proteína sea la misma, responsable de la actividad mostrada por el **EPLM2**. Por lo tanto, sería necesario evaluar individualmente a las proteínas presentes en el extracto para corroborar dicha información, además de determinar la posible presencia de coadyuvantes.

8.3. Reobtención de EPLM2.

Dentro del proceso de reobtención del extracto proteico por el **M2**, se logró recuperar 852.9 mg aproximadamente ($n = 52$).

Del total de **EPLM2** recuperado, parte del mismo fue destinado a la evaluación biológica y la otra parte se utilizó para la identificación de péptidos en el mismo. Los **EPLM2** fueron almacenados a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Se obtuvo una concentración media de 16.59 mg mL^{-1} de **EPLM2** ($\text{DE} \pm 1.2529$) a las condiciones óptimas seleccionadas, que corresponde a 32.8 mg de extracto proteico recuperado, representando un 3.2% de rendimiento. De acuerdo a lo anterior, el **M2** resultó ser 2.6 veces más eficiente que el **M1**. Murillo *et al.* (2014), reportaron un rendimiento de 146.70 y 96.92 mg g^{-1} de proteína total para

colénquima y parénquima de *A. vera* respectivamente sin someterse a estrés salino con NaCl. El porcentaje de recuperación obtenido en este trabajo se encuentra por debajo de lo reportado por Murillo *et al.*, lo anterior atribuido a que la extracción y determinación de proteínas realizadas por dichos autores fue a partir de tejido seco que fue homogeneizado en una solución amortiguadora de extracción (KH₂PO₄, EDTA, polivinilpirrolidona), y una centrifugación de la mezcla y la recuperación el sobrenadante en donde se cuantificó las proteínas totales por el método de Bradford. En este trabajo es importante señalar que la cuantificación de proteínas totales fue realizada para el extracto proteico resultado de un proceso de purificación.

8.4. Identificación de péptidos, proteínas y glicoproteínas en los extractos proteicos de *A. vera*

Las secuencias reportadas para **EPLM1** y **EPLM2** poseen una confiabilidad superior al 90%.

En el **EPLM1** no bioactivo se logró identificar la presencia de un par péptidos dentro del proceso de estandarización del **M1** en la etapa de monitoreo de la eficiencia de extracción. Dichos péptidos presentan una actividad relacionada con el metabolismo de lípidos y con los mecanismos de transporte a través de la membrana y en el tráfico intracelular y para los cuales sería recomendable realizar su aislamiento y evaluar su actividad contra los microorganismos ensayados, determinando de esta manera su actividad efectiva.

A partir de **EPLM1** se permitió la visualización de los péptidos obteniendo información de los mismos. Dichos péptidos fueron ontológicamente alineados con la enzima eterol O-aciltransferasa 1 y una glicoproteína de matriz, respectivamente. La primera de ellas con la secuencia SAAMLAVFALSAVVHEYALAICLSYFYPVLFVLFMFFGMAFNFIVN, está

asociada al catabolismo de esteroides por lo que se dice que topológicamente tiene un dominio transmembrana. La base de datos relacional reporta interacción directa con proteínas de la familia de Lipasa 3 y con la peptidil-prolil-cis-trans- isomerasa de cloroplasto. Chen *et al.* (2007) y Ang *et al.* (2003), han reportado el aislamiento de esta enzima de *Arabidopsis thaliana* demostrando una notable actividad en el metabolismo de esteroides en la mejora de la calidad de las semillas. Cabe mencionar que no existen reportes de su actividad antimicrobiana. Hay reportes de que la enzima participa en los procesos inflamatorios en la respuesta inmune a la infección ocasionada por muchos microorganismos tales como *P. aeruginosa*.

La segunda proteína aislada a partir de **EPLM1**, es reportada como una glicoproteína de matriz 2, también alinea fuertemente con un supuesto activador RAB GTPasa (NP_001118517.1) de *A. thaliana*, la cual participa ampliamente en los mecanismos de transporte a través de la membrana y en el tráfico intracelular. Funciona como canal iónico formando parte de las proteínas estructurales de la membrana, pero no se ha reportado ninguna actividad antimicrobiana (Ang *et al.*, 2003). Sería necesario evaluar su actividad contra los microorganismos involucrados en este estudio.

Para el **M2** con fenol (**EPLM2**) ha permitido la identificación de 15 secuencias de péptidos alineados a diferentes proteínas. Del total de las secuencias identificadas, según la literatura tres de ellas resultaron no estar asociadas a alguna actividad para ningún organismo ([STRING Consortium, 2016; KEGG, 2016] **Tabla 7. P5, P8 y P12**); esto representa un área importante de desarrollo dentro de la investigación proteómica puesto que se hace necesario realizar la evaluación de las mismas para atribuirles una actividad biológica o bien, determinar asociaciones con otros organismos.

Además, dentro del proceso de identificación resultaron tres secuencias más de proteínas no caracterizadas a partir de *Arabidopsis thaliana*; la primera de ellas de 132 aminoácidos (**Tabla 7. P1**) presenta similitud a una proteína de *Brassica rapa*, sin embargo no se asocia actividad a ninguna de ellas. La segunda de 232

aminoácidos (**Tabla 7. P7**) presenta homología con los dedos de zinc, permitiendo la estabilización de los pliegues conformacionales de la misma proteína. Se le asocia a un funcionamiento modular en la interacción del ADN, ARN, proteínas y moléculas pequeñas. La tercera de 167 aminoácidos (**Tabla 7. P10**), presenta similitud a proteínas provenientes de diferentes organismos por ejemplo de *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa*, *Vitis vinífera*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Oryza sativa* Japonica por citar algunas, sin embargo tampoco se les ha atribuido actividad en ninguno de ellos (STRING Consortium, 2016; KEGG, 2016).

También se identificó la secuencia MEVNILAFIATALFILVPTAFLLIYVKTVSQND (**Tabla 7. P2**); ésta, tiene una probable actividad dentro del centro de reacción fotosintética en las plantas, de manera específica como la subunidad M dentro del fotosistema II (STRING Consortium, 2016; KEGG, 2016). Se ha reportado que este centro representa un complejo de varias proteínas, pigmentos y otros cofactores que tienen como función el llevar a cabo reacciones que garanticen la obtención de energía para las plantas por medio de la fotosíntesis; de manera general, se dice que la energía de la luz absorbida se utiliza para extraer un electrón de una molécula de clorofila en el centro de reacción y transferirlo, a través de varios pigmentos diferentes, al aceptor de electrones primarios Qg (quinona), el cual está adherido débilmente a un sitio sobre la cara citosólica de la membrana. (Järvi *et al.*, 2016). El fotosistema II de plantas verdes (plantas superiores y algas verdes) contiene aproximadamente 20 subunidades proteicas, conocidas como PSBA-Z, en función del nombre de los genes que las codifican, dando una masa molecular aproximada de 320 kDa y encontrándose fisiológicamente en forma de dímero (Hankamer *et al.*, 2001). Se tiene el reporte de que la mayoría de las proteínas del fotosistema II son intrínsecas de membrana, con una estimación total de unas 35 hélices transmembranales; un gran número de dichas proteínas poseen una baja masa molecular que oscila entre 3-6 kDa, con función específica no totalmente conocida (Shi y Schröder, 2004). En este sentido, Balsera *et al.* (2004) reportó una proteína de la subunidad M del fotosistema II de 3.8 kDa en *Spinacia oleracea* a la cual no se le pudo atribuir una función conocida, sin embargo parece ser importante para la formación de dímeros

del fotosistema II , los cuales permiten llevar a cabo las reacciones de transferencia de electrones provocadas por excitaciones moleculares, generalmente procedente directamente de la luz solar y de trazar los caminos específicos de los electrones durante y después de la absorción de la luz. Sin embargo, la secuencia identificada no ha sido reportada para *A. vera* pero se sugiere que está involucrada en reacciones que conlleven transferencia de electrones, como es el caso de la absorción de la luz, favoreciendo la reacción de fotosíntesis en la planta.

Aunado a lo anterior, se identificó la secuencia NIEAVREEIPWTQPCVCHAVCVEGGMALAAVTALFSGYIDPQTTVVICGLF FAWWMCGIYSGLFR (**Tabla 7. P4**), con un total de 5 péptidos asociados. A dicha secuencia se le relaciona con la familia de proteínas con motivos PLAC8 de 244 aminoácidos, los cuales se encuentran presentes tanto en hongos, algas, plantas, como en animales superiores (STRING Consortium, 2016; KEGG, 2016). Pese a que forman parte del genoma de las plantas, el conocimiento sobre la función de estas proteínas es aún limitado. Se sabe que en la mayoría de ellas, su estructura consta de dos alfa-hélices que abarcan la membrana celular, por lo que son consideradas como proteínas intrínsecas de membrana. De manera específica en las plantas, ya existen reportes que describen a algunas proteínas con motivos PLAC8 las cuales han sido involucradas dentro del proceso de desarrollo fisiológico de las plantas, específicamente en la determinación del tamaño del fruto mediante la regulación del número de células (Jiménez *et al.*, 2012). Además se ha reportado que juegan un papel probable en el transporte de metales pesados dentro de la planta, tales como cadmio o zinc, inclusive se indica que podrían actuar como transportadores de estos cationes divalentes mediante la formación de homomultímeros, de hecho se le asocia de manera funcional con la proteína CW7 que posee un dominio de unión al zinc y que se expresa en plantas superiores estando involucrada en la reestructuración de la cromatina, el reconocimiento de la metilación, la regulación epigenética y principios del desarrollo embrionario (Song *et al.*, 2015).

En este sentido, aun cuando se ha reportado esta familia de proteínas en plantas, no existen reportes de dicha secuencia en *A. vera*, por lo que se infiere que posee una función de transporte dentro de la misma, favoreciendo por ende el desarrollo de la planta.

Además se identificó, la secuencia SADVAAAPVVKEKPITDKEVTIPTPVAEKEEVAAPVSDEK (**Tabla 7. P11**) que se asocia a la proteína PATL1 (573 aminoácidos), la cual se encuentra involucrada en tráfico a membrana uniéndose a moléculas hidrofóbicas y promoviendo la transferencia de las mismas entre los distintos sitios celulares, siendo clave para la construcción de la placa celular durante la citocinesis en las plantas (Osugi *et al.*, 2012). Se tiene el reporte de un estudio del genoma de *Arabidopsis*, en donde se sugiere que PATL1 es reclutado desde el citoplasma a la placa de células en expansión y maduración, apuntando a la implicación de los fosfoinosítidos en la biogénesis de las células de la placa (Peterman *et al.*, 2004). También se tiene el reporte de que PATL1 fue clonado y caracterizado a partir de calabacín (*Cucurbita pepo*), el cual fue expresado en toda la planta, demostrando también que es una proteína de membrana periférica que apoya en los eventos de tráfico de membrana (Peterman *et al.*, 2006). Con lo anterior, se reporta una segunda secuencia de péptidos asociadas a la facilitación de transporte para *A. vera*, sin embargo ya existe el antecedente de Hamman y Vijoen (2008) quienes reportaron que el gel de *A. vera* presenta una actividad facilitadora del transporte posiblemente atribuida a macromoléculas. Si bien ya ha sido reportada dicha actividad, no se ha caracterizado a los responsables de la misma.

También se identificó la secuencia FFSLSLVLCFLLWMASPTESNSKDAVEAASGLTNDGANAATGWDNHGWFY ISV R (**Tabla 7. P14**) con un total de 12 péptidos asociados, relacionada con una proteína de membrana transportadora (translocador) de ATP/ADP (511 aminoácidos). La secuencia que se reporta no está aún caracterizada y aunque ya existen reportes de varias proteínas de la misma naturaleza, la información con la que se cuenta acerca de su función, es aún limitada (STRING Consortium, 2016;

KEGG, 2016). En este sentido, se tiene el reporte de la ameba *Protochlamydia amoebophila* en donde se estudió dicha proteína desde el principio de la producción de energía (Trentmann *et al.*, 2007). Además algunas bacterias poseen un metabolismo de nucleótidos restringido, la cual se caracteriza por su incapacidad para sintetizar nuevos nucleótidos o regenerar los ya presentes (Stephens *et al.*, 1998; Horn *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 1998), con lo cual tratan de compensar dicha limitación con el uso de proteínas transportadoras de ATP/ADP, ya sea para la captación neta de nucleótidos, la importación de NAD⁺ o el intercambio de ATP y ADP; sin embargo no se ha explicado satisfactoriamente aún cómo se mantiene la absorción neta requerida de energía mientras el ATP y ADP externo compiten en el sitio de unión (Tjaden *et al.*, 1999). Se sugiere por lo tanto, que el *A. vera* hace uso de dichos transportadores con la finalidad de compensar su limitación en la síntesis de nucleótidos. De hecho, se tiene reporte de la misma proteína con dos isómeros (AtNTT1 y AtNTT2) en la planta modelo *Arabidopsis*, mostrando que las plantas que carecían de estos transportadores, se encontraban en un estadio de desarrollo más atrasado, además de que exhibían un fenotipo clorótico y lesiones necróticas espontáneas (Reiser *et al.*, 2004; Reinhold *et al.*, 2007), por lo que se infiere que esta proteína de membrana está implicada de la misma manera en dichos procesos para el *A. vera*.

Por otro lado se identificó la secuencia YIETVVVTGSMGQYVPMLNYYCNDLPLVSTTYGSSETTFGINLDPLCKPEDVSYT FMPNMSYFEFIPMDGGDK (**Tabla 7. P6**) a la cual se le asociaron 10 péptidos con la enzima PBS3, que cataliza la conjugación de aminoácidos específicos (por ejemplo, Glu y, posiblemente, His, Lys, y Met [STRING Consortium, 2016; KEGG, 2016]). Se tiene el reporte que en *Arabidopsis*, PBS3 disminuyó el crecimiento de la cepa virulenta de *Pseudomonas syringae*, indicando que una de las funciones de PBS3 es la restricción de la difusión de patógenos virulentos (Okrent *et al.*, 2009). Se sabe que el salicilato (SA, 2-hidroxibenzoato) es una fitohormona conocida por su papel como mediador crítico de las respuestas de defensa de las plantas. En respuesta a patógenos, tales como *P. syringae*, SA se sintetiza y activa la expresión

génica generalizada. En este sentido se reporta que PBS3 catalizó la conjugación de aminoácidos específicos, sugiriendo un mecanismo general para la rápida regulación para este microorganismo (Jagadeeswaran *et al.*, 2007). Por lo tanto se deduce que la sábila produce esta enzima para la modulación de defensa de ella misma. Pese a que no existen reportes de dicha actividad contra los microorganismos evaluados en este trabajo, se infiere que dicha proteína es una de las probables responsables de la actividad antimicrobiana mostrada por el **EPLM2**. Sin embargo, sería necesario corroborar que su mecanismo sea similar al ya reportado, además de evaluarla de manera individual sobre cada microorganismo.

También se identificó la secuencia TLNAYPPATSATSTFEAAVATLHLGVSYANNAAGFAGEAAKENPQLK (**Tabla 7. P9**) con 5 péptidos asociados. Dicha secuencia fue relacionada a la enzima de 174 aminoácidos denominada como pectina metilesterasa/invertasa (STRING Consortium, 2016; KEGG, 2016). Esta enzima exhibe un dominio que se ha implicado en la regulación del desarrollo de la fruta, el metabolismo de hidratos de carbono y la extensión de la pared celular. También se dice que puede estar implicado en la inhibición de patógenos microbianos, por la presencia de dos puentes disulfuro y una conformación principalmente alfa-helicoidal (Srivastava *et al.*, 2012; Giovane *et al.*, 2004). A nivel postraducciona, la actividad de estas enzimas son comúnmente reguladas por diversos mecanismos como la fosforilación, glicosilación, y la interacción con inhibidores específicos (Bode y Huber, 1992). De manera específica en las plantas, las invertasas convierten la sacarosa de transporte en fructosa y glucosa, de hecho se tienen reportes en donde se ha demostrado que tiene efectos sobre el crecimiento y el desarrollo de las mismas, jugando un papel importante en la respuesta a estrés (Cheng *et al.*, 1996; Ehness *et al.*, 1997; Roitsch *et al.*, 2003).

Tabla 7. Secuencias identificadas en el **EPLM2** de *A. vera* asociadas a diferentes proteínas

	PROTEÍNA	SECUENCIA	PÉPTIDOS ASOCIADOS	% COBERTURA
P1	No caracterizada	MGSLVVNGAALLALLWFNVFVVNYVA AREGVTFGKDEEEK	5	46.5116
P2	De membrana	MEVNILAFIATALFILVPTAFLLIIVKT VSQND	4	100
P3	De tolerancia a estrés	LLELPSSIGNAINLQNLLEDCCSSLELP SSIGNATNLVYMNLSNCSNLVELPLSIG NLQK	9	47.7723
P4	De membrana	NIEAVREEIPWTQPCVCHAVCVEGGM ALAAVTALFSGYIDPQTTVVICEGLFFA WWMCGIYSGLFR	5	48.7705
P5	No reportada	EVGEKETEIDKEVGQGDSDIFDGNKDM ELNKEVAESTIGVAESEKDKEVTESEKD KEVAESEIGVPESEK	31	40.3252
P6	Enzima	YIETVVTGSMGQYVPMNLNYCNDLPL VSTTYGSSETTFGINLDPLCKPEDVSYT FMPNMSYFEFIPMDGGDK	10	37.0435
P7	No caracterizada	QVDIPAAMINEMGQENDGDPKEKDGD LEKDGQEKDPKEKDPKEKDPKEKDP K	15	53.2468
P8	No reportada	TEEPSLTEQDPENVEEEEEEEEEKEEEE KEEEEEEGEEEEEEEEEEEEKEEEENV GGESSDDSTR	35	40.8392
P9	Enzima	TLNAYPPATSATSTFEAAVATLHLGVS YANNAAGFAGEAAKENPQLK	5	58.2857
P10	No caracterizada	QVNREIEANIQVTREIESQIGNCSETESA LSVKEAELTK	3	26
P11	De membrana	SADVAAAPVVKEKPITDKEVTIPTPVAE KEEVAAPVSDEK	5	35.461
P12	No reportada	GSEERERERERERERERERERERERER ERERERERERERERERERERERER	6	58.8235
P13	Enzima	QSGSGISWLFPPVDGHPPLGWYDTVAY LVLPVLLIASQYVSMEMKPPQTDDPAQ K	12	53.0093
P14	De membrana	FFSLSLVLCFLLWMASTPESNSKDAVE AASGLTNDGANAATGWDNHGWFYISV R	12	50.9595
P15	De tolerancia a estrés	EANNVASQSQNNNNCGAREFDLPKPVL VDEREGHVVEEHMKDEDDVEEENL PPGSYEILQLEK	10	38.5714

La pectina metilesterasa se encarga de catalizar la esterificación de metilo del homogalacturonano, los cuales corresponden a polímeros altamente heterogéneos y a componentes de las pectinas, siendo un importante constituyente de la pared celular primaria (Vorwerk *et al.*, 2004). Se tiene el reporte de la actividad de dicha enzima en el desarrollo de raíces, la elongación del tallo y la maduración del fruto; además se le implica en la interacción planta-patógeno al servir como un receptor para patógenos,

de manera específica se tiene referencia del virus del mosaico del tabaco (Brummell y Harpster, 2001; Chen *et al.*, 2000; Chen y Citovsky, 2003). Lo anterior sugiere que la sábila produce esta enzima con fines de desarrollo y defensa, por lo que podría ser otra de las proteínas posiblemente responsables de la actividad exhibida en el **EPLM2**.

Otra de las secuencias identificadas asociada a una enzima, es la QSGSGISWLFPPVDGHPPLGWYDTVAYLVLPVLLIASQYVSMEIMKPPQTDD PA QK (**Tabla 7. P13**) con 12 péptidos relacionados con la translocasa ALB3 (462 aminoácidos) presente en la membrana tilocoidal de los cloroplastos, la cual realiza un papel homólogo al de Oxa1p en la membrana mitocondrial externa (Woolhead *et al.*, 2001). Se dice que esta enzima es necesaria para la inserción de algunas proteínas de unión a clorofila capaces de captar luz (LHCP) y para la biogénesis de los tilacoides. En *Arabidopsis* se estudió un homólogo de ALB3 (ALB4), el cual se propuso para ser partícipe en la estabilización del complejo de ATP sintasa, sin embargo se demostró que ALB3 y ALB4 coinciden significativamente en su función, aunado a que se requieren ambas proteínas para la inserción eficiente de citocromo F, así como otras subunidades de los complejos de proteínas portadoras de pigmento (Trösch *et al.*, 2015). Por otro lado, existe evidencia de una interacción entre ALB3 y la translocasa cpSecY, atribuida a las interacciones por la región C-terminal de ALB3, dicha interacción es tal vez un indicio de que el papel de ALB3 se extiende más allá a un papel más amplio que implica proteínas de membrana de los tilacoides (Aldridge *et al.*, 2009).

Además se identificó la secuencia SIGNATNLVYMNLSNCSNLVELPLSIGNLQK con un total de 9 péptidos asociados (**Tabla 7. P3**). Dicha secuencia se relaciona a una proteína de resistencia a enfermedades causada por patógenos, clase TIR-NBS-LRR por sus siglas en inglés (Toll/Interleukin1 receptor-nucleotide binding site leucine-rich repeat [STRING Consortium, 2016; KEGG, 2016]). En este sentido, se sabe a detalle que las plantas han desarrollado mecanismos sofisticados para reconocer y protegerse contra patógenos. Dicha resistencia, con frecuencia se rige por el reconocimiento específico entre los genes de resistencia a patógenos y a

resistencia a enfermedades en las plantas, la cual por lo general se acompaña de una respuesta de hipersensibilidad que conduce a la restricción del crecimiento de patógenos. En este sentido, la secuencia identificada en *A. vera* está asociada a la familia de genes NBS-LRR conocidos por dar resistencia a enfermedades y es una de las familias génicas con mayor presencia en los genomas del reino *Plantae*. Estos genes poseen un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y una región rica en residuos de Leucina (LRR) y de manera específica se le asocia un papel dentro del reconocimiento de patógenos y la señalización de la respuesta de defensa. Respecto al dominio NBS, se dice que contiene varios motivos conservados que se encuentran típicamente en ATP o en proteínas de unión a GTP y también presentes en varios reguladores que son estructuralmente relacionados de la apoptosis de los animales (Traut, 1994).

Se tiene el reporte de que la familia NBS-LRR se puede dividir en dos subfamilias basadas en dominios estructurales N-terminales. Una de ellas es la denominada TIR-NBS-LRR o TNL que codifica un dominio con similitud a los dominios de señalización intracelular del Toll de *Drosophila* y al receptor de interleucina1 de mamífero (con similitud en secuencia de aminoácidos de 42 y 41% respectivamente), lo cual indica que el dominio TIR estaría actuando en las vías de transducción por la similitud que presenta con dichos dominios citoplasmáticos; además, podría estar implicado en el reconocimiento específico del patógeno e involucrado en la inducción de muerte celular. (Meyers *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000). Se tiene el reporte de que dichos dominios ya han sido motivo de clonación a partir de numerosas especies de plantas que les confiere resistencia a una amplia gama de patógenos de plantas (bacterias, hongos, oomicetos, virus y nematodos [Dangl y Jones, 2001; Meyers *et al.*, 2002; DeYoung e Innes, 2006]), inclusive ya se han propuesto mecanismos como la duplicación, la recombinación ectópica, la conversión de genes, entre otras con la finalidad de contribuir a la estructura de dicho dominio y aportar ciertas características específicas de resistencia (Michelmore y Meyers, 1998; Young, 2000; Sun *et al.*, 2001). Sin embargo, a la fecha no se ha trabajado directamente en *A. vera*, aunque sí se tiene reporte en la planta del tabaco frente al virus del mosaico, en el lino frente *M. lini* o en

Arabidopsis frente al hongo *Peronospora parasítica*, por lo que se dice que en *A. vera* se presenta con la misma actividad. Esta secuencia identificada no se asocia directamente contra los microorganismos evaluados, sin embargo se podría deducir que el efecto reportado para microorganismos patógenos en las plantas, sería el mismo causado para los evaluados en este trabajo. Para confirmar lo anterior, sería necesario evaluar el péptido sobre los mismos microorganismos.

Finalmente se identificó la secuencia EANNVASQSQNNNCGAREFDLPKPVLDEREGHVVEEHMKDEDDVEEG EN LPPGSYEILQLEK (**Tabla 7. P15**) con un total de 10 péptidos asociados, relacionada con una proteína sensible a rizotoxicidad por protones (STOP1, por sus siglas en inglés sensitive to proton rhizotoxicity 1; 499 aminoácidos), la cual desempeña un papel fundamental en la tolerancia a los principales factores de estrés en los suelos ácidos, tales como protones H⁺ y el aluminio Al³⁺ (STRING Consortium, 2016; KEGG, 2016), además de que se requiere para la expresión de genes en respuesta al estrés ácido (por ejemplo ALMT1 y MATE). Se tiene el reporte en *Arabidopsis*, en donde a partir de semillas mutadas con etil metanosulfonato se aisló un mutante hipersensible a rizotoxicidad por H⁺, en donde a través de una clonación posicional se determinó que el gen mutado codifica para una proteína de dedos de zinc tipo-Cys2His denominada STOP1, tratándose de una mutación sin sentido en el dominio de dedos de zinc de dicha proteína, dicha mutación no presenta sensibilidad a cadmio, cobre, lantano, manganeso, ni a cloruro de sodio, pero causa hipersensibilidad a rizotoxicidad por Al³⁺ (Sawaki *et al.*, 2009). Por otro lado, Hoekenga *et al.* (2006) sugieren que STOP1 juega un papel importante en la tolerancia a aluminio en suelos ácidos en *Arabidopsis* ya que su análisis del transcriptoma demostró que varios genes son regulados negativamente en este mutante, lo cual indicaba que este factor de transcripción estaba involucrado en la vía de transducción de señales a través de la regulación de la expresión génica en la respuesta a H⁺ y aluminio, sin verse implicado en el mecanismo de variación fenotípica de tolerancia a los mismos. De igual manera, en el eucalipto se identificaron una serie de genes para la tolerancia a Al³⁺, en el cual se incluye un gen similar a STOP1 reportado en *Arabidopsis* (Sawaki *et al.*, 2014). Con lo anterior se

infiere que el *A. vera* posee una proteína similar a STOP1, la cual le proporciona tolerancia a estrés causada por la acidez en el suelo, proporcionando una herramienta útil para su producción molecular. Aunado a esto, derivado del resultado del alineamiento obtenido con BLAST el porcentaje de similitud es del 100% con una probabilidad de alineamiento al azar de 7×10^{-36} . Por lo cual es posible que esta proteína de *A. vera* tenga homología con la proteína de rizotoxicidad reportada en *Arabidopsis*

8.4. Ensayo de letalidad sobre *Artemia salina* de EPLM2

Mediante el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*, se obtuvo una DL_{50} de $594.405 \mu\text{g mL}^{-1}$ con una X^2 de 14.188 (**Figura 14**) para el **EPLM2** utilizando el método de PROBIT en el programa SPSS 10.0.

Hamidi *et al.* (2014) reportaron mediante el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina* que el extracto de *A. vera* posee una CL_{50} de 3.59 mg mL^{-1} , la cual compararon con la DL_{50} de $120.65 \text{ mg kg}^{-1}$ obtenida por modelos experimentales con ratones resultando extractos tóxicos y muy tóxicos según los criterios de Meyer *et al.* (1982) y Gosselin *et al.* (1984) respectivamente.

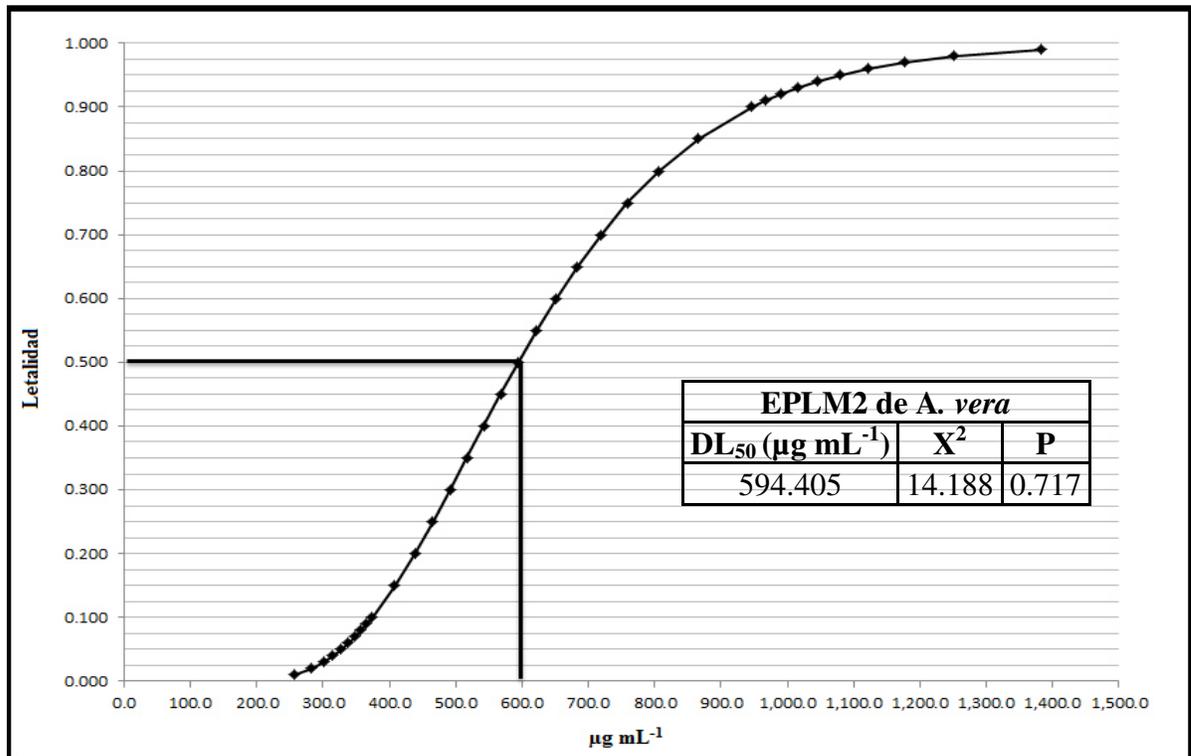


Figura 14. Gráfico de letalidad sobre *A. salina* del EPLM2 de *A. vera* en función de los µg mL⁻¹.

Tabla 8. Criterios de toxicidad según Nguta y Mbaria (2013) para extractos de plantas.

Dosis (µg mL ⁻¹)	Toxicidad
≤ 100	Alta
100-500	Moderada
500-1000	Baja
> 1000	No tóxico

Si bien existen reportes de extractos de *A. vera* con alta toxicidad, no existen reportes de la misma para fracciones proteicas por lo que de acuerdo a lo reportado por Nguta y Mbaria (2013) para extractos de plantas, el **EPLM2** es considerado de toxicidad baja (**Tabla 8**). Lo anterior atribuido a que el gel de la planta de la sábila puede contener algunos compuestos citotóxicos que se pueden manifestar en una concentración baja según lo ya reportado en una evaluación sobre *Artemia napuliii* (Cock y Sirdaarta, 2011).

9. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos proteicos obtenidos a partir de *A. vera* y se identificaron algunos componentes que podrían ser los responsables de esta actividad.

- En el método 1 (**M1**) donde se utilizó un buffer extractante (NaNO_3 , KH_2PO_4 y NaN_3) a pH 7, permitió la obtención de extractos proteicos de hoja (**EPHM1**) y liofilizado de gel (**EPLM1**) de *A. vera*, mientras que por el método 2 (**M2**) donde se utilizó otro buffer extractante (Tris-HCl, sacarosa, SDS y de β -mercaptoetanol) a pH 8 y una solución saturada de fenol, se obtuvo un extracto proteico del liofilizado de gel de *A. vera* (**EPLM2**), siendo este último el que contenía mayor concentración de proteínas totales y mayor pureza comparada con los obtenidos por **M1**.
- El **EPLM2** presentó una concentración de proteínas totales significativamente mayor respecto al **EPLM1**, en relación a los parámetros evaluados de: peso de material vegetal (**m1**), tiempo de agitación (**t1**) y volumen de solución de extracción A (**v1**), determinando como condiciones óptimas de extracción, 1 g de liofilizado, 6 h de agitación en baño de hielo y 250 mL de solución de extracción A.
- En el proceso de reobtención del **EPLM2**, se logró obtener un rendimiento de 3.2 %, siendo este mayor comparado con el rendimiento obtenido previo a la optimización del **M2** (1.4%) y muy por encima de lo reportado para la planta (0.01%).
- En la evaluación de la actividad antimicrobiana de **EPLH1**, **EPLM1** y **EPLM2**, solamente el último mostró actividad sobre *S. aureus* y *C. albicans*. Éste es una fuente prometedora de moléculas con actividad anti-*S. aureus* y -*C. albicans*.

- El **EPLM1** nos permitió la visualización de dos péptidos que fueron ontológicamente alineados con la enzima eterol O-aciltransferasa 1 y una glicoproteína de matriz. La primera de ellas está asociada al catabolismo de esteroides por lo que se dice que topológicamente tiene un dominio transmembrana, mientras que la segunda es reportada como una glicoproteína de matriz 2, asociada a un supuesto activador RAB GTPasa, la cual participa ampliamente en los mecanismos de transporte a través de la membrana y en el tráfico intracelular.
- En **EPLM2** se identificaron un total de 15 péptidos que fueron asociados con proteínas de membrana, las cuales poseen posibles actividades asociadas de transferencia de electrones (absorción de la luz), desarrollo fisiológico de las plantas (tamaño del fruto mediante la regulación del número de células) y transporte de ATP/ADP. Además se identificaron secuencias a las que se les asocia con el proceso dentro de la tolerancia al estrés en suelos; también se identificaron secuencias que fueron asociadas a enzimas relacionadas a la absorción de luz y a la protección contra patógenos, obteniendo la caracterización de nuevas proteínas con posible actividad antimicrobiana.
- El extracto bioactivo **EPLM2** exhibió baja toxicidad sobre el modelo de nauplios de *A. salina* de acuerdo a lo reportado por Nguta y Mbaria (2013 [500-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$]) con una DL_{50} de 594.405 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

10. PERSPECTIVAS

- Continuar con la búsqueda específica de las proteínas contenidas en **EPLM2** responsables de la actividad antimicrobiana mediante diferentes ensayos con cada fracción recuperada y reportada en este trabajo, sobre todo aislar aquellas que de acuerdo a la base de datos STRING y KEGG, fueron asociadas a la protección de microorganismos patógenos.
- Continuar con la identificación y caracterización completa de los péptidos y proteínas en el **EPLM2** de *A. vera*.
- Sintetizar y modificar nuevas secuencias proteicas potencializando su actividad y/o favoreciendo su estabilidad química.
- Determinar el mecanismo molecular de la actividad presentada por parte de los péptidos o proteínas, apoyándose de herramientas proteómicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu A, Lovio Z, Larrondo RJ. 1998. Dermatología en la atención primaria de salud. *Avances Médicos*. 5(16):8-10.
- Abbaszadegan A., Sahebi S., Gholami A., Delroba A., Kiani A., Iraj A., Abbott PV. 2016. Time-dependent antibacterial effects of *Aloe vera* and *Zataria multiflora* plant essential oils compared to calcium hydroxide in teeth infected with *Enterococcus faecalis*. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*. 7(1):93-101.
- Ahmadi A. 2012. Potential prevention: Aloe vera mouthwash may reduce radiation-induced oral mucositis in head and neck cancer patients. *Chin J Integr Med*. 18(8):635-40. doi: 10.1007/s11655-012-1183-y. Epub.
- Ajabnoor M. 1990. Effect of Aloes on blood glucose levels in normal and alloxan diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 28: 215-220
- Akey, G. Turkay, A. Can, A. Gurel, F. Yidiz, H. Yardibi, E.E. Ekiz, H. Uzun. 2007 *Phytotherapy Research*. 21: 1070-1075.
- Akhoondinasab MR, Akhoondinasab M, Saberi M. 2014. Comparison of healing effect of aloe vera extract and silver sulfadiazine in burn injuries in experimental rat model. *World J Plast Surg*:29-34.
- Aldridge C., Cain P., Robinson C. 2009. Protein transport in organelles: Protein transport into and across the thylakoid membrane. *FEBS Journal*. 276(5):1177-86.
- Andersson SG., Zomorodipour A., Andersson JO., Sicheritz-Ponten T., Alsmark UC. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133–140.

- Andrade A. 2009. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. 112: 163-171.
- Ang A, Folsch H, Koivisto U, Pypaert M, Mellman I. 2003. The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*. 163, 339-350.
- Arunkumar S, Muthuselbam M. 2009. Analysis of Phytochemical constituents and antimicrobial activities of *Aloe vera* L. against clinical pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*. 5(5): 572-576.
- Bahramsoltani R, Farzaei MH, Rahimi R. 2014. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. *Arch Dermatol Res*. 2014 Sep;306(7):601-17. doi: 10.1007/s00403-014-1474-6. Epub.
- Balsera M., Menéndez M., Sáiz JL., de Las Rivas J., Andreu JM., Arellano JB. 2004. Structural stability of the PsbQ protein of higher plant photosystem II. *Biochemistry*. 43(44):14171-9.
- Baradaran A, Nasri H, Nematbakhsh M, Rafieian-Kopaei M. 2014. Antioxidant activity and preventive effect of aqueous leaf extract of *Aloe Vera* on gentamicin-induced nephrotoxicity in male Wistar rats. *Clin Ter*. 165(1):7-11. doi: 10.7471/CT.1653.
- Berg JM., Stryer L., Tymoczko JL. 2008. *Bioquímica*. Editorial Reverté S.A. Barcelona, España. 316.
- Bode W., Huber R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry*. 204: 433–451.
- Bretthauer RK. 1995. Indiana University. [Online] Disponible en: <http://www.science.nd.edu/chemistry/bretthauer.html>

- Brown, T. 2008. Genomes. Wiley-Liss: Nueva York, pp. 394-406
- Brummell DA., Harpster MH. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*. 47: 311–340
- Bruno PA., Cammue M., De Bolle M., Terras F., Proost P. 1992. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *Journal of Biological Chemistry*. 267 (4): 2228-2232.
- Cellini L, Di Bartolomeo S, Di Campli E, Genovese S, Locatelli M, Di Giulio M. 2014. In vitro activity of Aloe vera inner gel against Helicobacter pylori strains. *Lett Appl Microbiol*. 59(1):43-8. doi: 10.1111/lam.12241. Epub
- Chakraborty R., Samanta R. 2015. Alphonso Mango Enrichment with *Aloe Vera* (*Aloe barbadensis*) by Sequential Drying: Optimization, Kinetics and Quality Evaluation. *Journal of Food Processing and Preservation* 39(6): 2698–2709.
- Cheesbrough, M. 2000. District Laboratory Manual for Tropical Countries. Cambridge University press, U.K.
- Chen MH., Citovsky V. 2003. Systemic movement of a to-bamovirus requires host cell pectin methylesterase. *Plant Journal*. 35: 386–392.
- Chen MH., Sheng J., Hind G., Handa AK., Citovsky V. 2000. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO Journal*. 19: 913–920.
- Chen Q, Steinhauer L, Hammerlindl J, Keller W, Zou J. 2007. Biosynthesis of Phytosterol Esters: Identification of a Sterol O-Acyltransferase in *Arabidopsis*1[OA]. *Plant Physiol*. 145: 974–984.

- Cheng WH., Taliercio EW., Chourey PS. 1996. The Miniature seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell*. 8: 971–983.
- Chihara T, Shimpo K, Kaneko T, Beppu H, Higashiguchi T, Sonoda S, Tanaka M, Yamada M, Abe F. 2015. Dietary aloe vera gel powder and extract inhibit azoxymethane- induced colorectal aberrant crypt foci in mice fed a high- fat diet. *Asian Pac J Cancer Prev*.
- Chinsembu, K.C., Hjarunguru, A., Mbang, A. 2015. Ethnomedicinal plants used by traditional healers in the management of HIV/AIDS opportunistic diseases in Rundu, Kavango East Region, Namibia. *South African Journal of Botany*. 100: 33-42.
- Choi S., Son V., Son Y., Park Y., Lee S., Chung M. 2001. The wound healing effect of a glycoprotein fraction isolated from *Aloe vera*. *Journal of Dermatology*. 145(4):535-45.
- Choonhakarn C, Busaracome P, Sripanidkulchai B, Sarakarn P. 2010. A prospective, randomized clinical trial comparing topical aloe vera with 0.1% triamcinolone acetonide in mild to moderate plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*.(2):168-72.
- Cifuentes E., Blumenthal UJ., Ruiz G., Bennett S., Peasey A. 1994. Escenario epidemiológico del uso agrícola del agua residual: el Valle del Mezquital, México. *Salud Pública. México*. 36(1): 3-9.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Disponible en: <http://clsi.org/>.
- Cock IE., Sirdarta J. 2011. The toxicity of *Aloe barbadensis* Miller juice is due to the induction of oxidative stress. *Advances Environmental Biology*. 5(2): 288-299.

- Coelho, F.H., Salvadori, G., Rados, P.V., Magnusson, A., Danilevicz, C.K., Meurer, L., Martins, M.D. 2015. Topical Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller) Extract Does Not Accelerate the Oral Wound Healing in Rats. *Phytotherapy Research*. 29 (7): 1102-1105.
- Coria E, Espinosa S, Espinosa F, Vargas M., Blancas L. 2010. Panorama epidemiológico de las inmunodeficiencias primarias en México. *Rev Alergia Mex*. 57(5): 159-163.
- Costa S, Pessoa A, Roberto I. Xylanase recovery. 1998. Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental design. *Appl Biochem Biotechnol*. 70-72:629-39.
- Daburkar M, Lohar V, Rathore AS, Bhutada P, Tangadpaliwar S. 2014
An in vivo and in vitro investigation of the effect of Aloe vera gel ethanolic extract using animal model with diabetic foot ulcer.
- Daly NL., Koltay A., Gustafson KR., Boyd MR., Casas JR, Craik DJ. 1999. "Solution structure by NMR of circulin A: a macrocyclic knotted peptide having anti-HIV activity," *Journal of Molecular Biology*. 285. 1. 333–345.
- Daly NL, Rosengren KJ, Craik DJ. 2009. "Discovery, structure and biological activities of cyclotides," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61. 11. 918–930.
- Dangl JL., Jones JD. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 411: 826–833
- Das S., Mishra B., Gill K., Ashraf MS., Singh AK., Sinha M., Sharma S., Xess I., Dalal K., Sing TP., Dey S. 2010. Isolation and characterization of novel protein with antifungal and antiinflammatory properties from *Aloe vera* leaf gel. *International Journal of Biological Macromolecules*. 48: 38-43.

- Davis RH., Leitner MG., Russo JM., Byrne ME. 1989. Wound healing. Oral and topical activity of *Aloe vera*. Journal of the American Podiatric Medical Association. 79(11): 559-562.
- Davis RH., Parker WL., Samson RT., Murdoch DP. 1991. Isolation of a stimulatory system in Aloe extract. Journal of the American Podiatric Medical Association 81: 473-478.
- De Caleyá RF, González B, García F., Carbonero P. 1972. "Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro," Applied microbiology.23 (5): 998–1000.
- De Freitas Cuba L., Braga Filho A., Cherubini K., Salum FG., Figueiredo MA. 2016. Topical application of *Aloe vera* and vitamin E on induced ulcers on the tongue of rats subjected to radiation: clinical and histological evaluation. Support Care Cancer Journal. 24(6):2557-64.
- De Rodríguez J., Hernández D., Rodríguez R., Ángulo JL. 2005. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. Industrial Crops and Products. 21(1): 81-87.
- De Young B., Innes J. 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. Nature Immunology. 7(12): 1243–1249.
- Déciga M., Rivero I., Arriaga M., Castañeda G., Ángeles GE., Naverrete A., Mata R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology. 110: 334-342.
- DGE Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos. 2015. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>.
- Doddanna S., Patel S., Sundarrao M., Veerabhadrapa R. 2013. Antimicrobial activity of plant extracts on *Candida albicans*: an *in vitro* study. Indian Journal of Dental Research. 24(4):401-5.

- Duranti M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*. 77(2), 67-82.
- Ege S. 2004. *Química orgánica: estructura y reactividad*. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. (2): 1197-1934.
- Eghdampour F, Jahdie F, Kheyrikhah M, Taghizadeh M, Naghizadeh S, Hagani H. 2013. The Impact of *Aloe vera* and *Calendula* on Perineal Healing after Episiotomy in Primiparous Women: A Randomized Clinical Trial. *J Caring Sci* 2(4):279-86. doi: 10.5681/jcs.2013.033. eCollection.
- Ehness R., Ecker M., Godt DE., Roitsch, T. 1997. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 9: 1825–1841.
- El HA., Aboul MA, Nassr AA, Aboul KM, Kabash A., Yagi A. 2010. Antitumor properties and modulation of antioxidant enzymes activity by *Aloe vera* leaf active principles isolated via supercritical carbon dioxide extraction. *Current Medicinal Chemistry*. (17): 129-138.
- Esquivel HM., Flores R., Galván I., Labrada SJ. 2010. Panorama epidemiológico en México. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Medicina. Departamento de Salud Pública.
- El HA., Aboul MA., Nassr AA., Aboul KM., Kabash A., Yagi A. 2010. Antitumor properties and modulation of antioxidant enzymes activity by *Aloe vera* leaf active principles isolated via supercritical carbon dioxide extraction. *Current Medicinal Chemistry*. 17(2): 129-138.
- Ernst, E. 2000. Adverse effects of herbal drugs in dermatology. *British Journal of Dermatology*. 143: 923-929.

- Farrokhi N., Whitelegge JP., Brusslan JA. 2008. Plant peptide and peptidomics. *Plant Biotechnology Journal*. 6: 105-134
- Faurobert M, Pelpoir E, Chaïb J. 2007. *Methods in Molecular Biology. Plant Proteomics: Methods and Protocols*. Thiellement H, editores. New York: Springer. p. 335.
- Femenia A., Sanches ES., Simal S., Rosello C. 1999. Compositional features of polysaccharide from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate Polymers*. 39: 109-117.
- Fen C., Meng Y. 2008. Protein extraction from leaves of *Aloe vera* L., a succulent and recalcitrant plant, for proteomic analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*. 26:292–300
- FitzGerlad RJ., Meisel H. 2003. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: PF. Fox y PLH. Editorial McSweeney. Vol. 1: Proteins. 3^o edición. 675-698.
- Franz G., Vlietinck A. 2001. Results and methods of work of the european pharmacopoeia. *Proceedings of the International Symposium on Herbal Medicinal Products: Quality Evaluation. Contribution of the European Pharmacopoeia*. Pharmaeuropa, nombre especial, pp. 17-25.
- Fricker, LD., Lim J., Pan H., Che FY. 2006 Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. *Journal of Mass Spectrometry*. 25: 327-344.
- Gabriel, N.N., Qiang, J., Ma, X.Y., He, J., Xu, P., Liu, K. 2015. Dietary Aloe vera improves plasma lipid profile, antioxidant, and hepatoprotective enzyme activities in GIFT-tilapia (*Oreochromis niloticus*) after *Streptococcus iniae* challenge. *Fish Physiology and Biochemistry*. 12 p. Article in Press.

- Giovane A., Servillo L., Balestrieri C., Raiola A., D'Avino R., Tamburrini M., Ciardiello MA., Camardella L. 2004. Pectin methylesterase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1696(2):245-52.
- Girish KS., Machiah KD, Ushanandini S., Kumar H., Nagaraju KS, Govindappa M., Kemparaju K. 2006. Antimicrobial properties of a non-toxic glycoprotein (WSG) from *Withania somnifera* (Ashwagandha). *Journal of Basis Microbiology*. 46: 365-374.
- Gómez AM. 2003. Cartas al director. [Online] Disponible en: <http://www.elsevier.es>
- Gordon AN., Fleagle JT., Guthrie D., Parkin DE., Gore ME., Lacave AJ. 2001. Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomised phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *Journal of Clinical Oncology*. 19: 3312–3322.
- Gosselin RE., Smith RP., Hodge HC., Braddock J. 1984. Clinical toxicology of commercial products (5th ed.). Williams & Wilkins: Baltimore, pp. 1428
- Goudarzi M, Fazeli M, Azad M, Seyedjavadi SS, Mousavi R. 2015. *Aloe vera* Gel: Effective Therapeutic Agent against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Recovered from Burn Wound Infections. *Chemother Res Pract*. doi: 10.1155/2015/639806
- Graf J. 2000. Herbal anti-inflammatory agents for skin disease. *Skin Therapy letter journal*. 5(4): 3-5.
- Grindlay D., Reynolds T. 1986. The *Aloe vera* phenomenon. *Journal of Ethnopharmacology*. 16: 117-151.
- Hamidi M., Jovanova B., Panovska T. 2014. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. Review paper. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 60 (1) 9 - 18

- Hamman JH. 2008. Composition and application of *Aloe vera* gel. *Journal Molecules*. 13: 1599-1616.
- Hamman JH., Viljoen AM. 2008. Use of *Aloe vera* for increasing the bioavailability of poorly absorbable drugs. SA patent application 2008/01542.
- Hankamer B., Morris E., Nield J., Carne A., Barber J. 2001. Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. *FEBS Letters*. 504(3):142-51.
- Hernández M., Sastre A. 1999. *Tratado de Nutrición*. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España. Pg. 67 y 68
- Hoekenga OA., Maron LG., Pinos MA., Cançado G., Shaff J., Kobayashi Y., Ryan P., Dong B., Delhaize E., Sasaki T., Matsumoto H., Yamamoto Y., Koyama H. y Kochian L. 2006. AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 9738-9743.
- Horn M., Collingro A., Schmitz-Esser S., Beier CL., Purkhold U. 2004. Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science* 304: 728–730.
- Huang X, Xie W, Gong Z. 2000. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Lett.* **478**:123–126.
- Im SA., Lee YR., Lee YH., Lee MK., Park YI., Lee S., Kim K., Lee CK. 2010. *In vivo* evidence of immunomodulatory activity of orally administered *Aloe vera* gel. *Archives of Pharmacal Research*. 33(3):451-456.
- Ingraham JL., Ingraham CA. 1998. *Introducción a la microbiología*. Editorial Reverté. Barcelona España. (2): 399-405.
- Jagadeeswaran G., Raina S., Acharya BR., Maqbool SB., Mosher SL., Appel HM., Schultz JC., Klessig DF., Raina R. 2007. *Arabidopsis* GH3-LIKE DEFENSE

- GENE 1 is required for accumulation of salicylic acid, activation of defense responses and resistance to *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal*. 51(2):234-46.
- Järvi S., Isojärvi J., Kangasjärvi S., Salojärvi J., Mamedov F., Suorsa M., Aro EM. 2016. Photosystem II Repair and Plant Immunity: Lessons Learned from Arabidopsis Mutant Lacking the THYLAKOID LUMEN PROTEIN 18.3. *Frontiers in Plant Science*. 31; 7:405.
- Jennings C., West J., Waine C., Craik D., Anderson M. 2001. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: The cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. Universidad de Melbourne, Australia. PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
- Jimenez-Preitner M., Berney X, Thorens B. 2012. Plac8 is required for white adipocyte differentiation in vitro and cell number control in vivo. *PLoS One*. 7(11):e48767.
- Joseph B., Raj SJ. 2010. Pharmacognostic and phytochemical properties of *Aloe vera* Linn- an overview. *Interdisciplinary Research Unit*. 4(2): 106-110.
- Kaithwas G, Singh P, Bhatia D. 2014. Evaluation of in vitro and in vivo antioxidant potential of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel. *Drug Chem Toxicol*. 37(2):135-43. doi: 10.3109/01480545.2013.834350. Epub.
- KEGG Databases. 2016. [Online] Disponible en: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ath:ArthCp016
- Khan AW, Kotta S, Ansari SH, Sharma RK, Kumar A, Ali J. 2013. Formulation development, optimization and evaluation of aloe vera gel for wound healing. *Pharmacogn Mag. (Suppl 1)*:S6-S10. doi: 10.4103/0973-1296.117849.
- Kim K., Kim H., Kwon J., Lee S., Kong H., Im SA., Lee YH., Lee YR., Oh ST., Jo TH., Park YI., Lee CK., Kim K. 2009. Hypoglycemic and hypolipidemic effects

- of processed *Aloe vera* gel in a mouse model of noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Phytomedicine*. 16(9): 856-863.
- Kitts DD., Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Application of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*. 9: 1309-1323.
- Klein A., Penneys N. 1988. *Aloe vera*. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 18(4): 714-720.
- Koike TT., Beppu H., Kuzuya H., Maruta K., Shimpo K., Suzuki M., Titani K., Fujita K. 1995. A 35 kDa manossa-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from Kidachi Aloe (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Beger). *Journal of Biochemistry*. 118(6):1205-1210
- Koneman W., Allen SD., Dowell VR., Sommers M. 1989. *Diagnostico Microbiologico*. 1º edición. Edición Médica Panamericana. Madrid, España. 380-402.
- Korhonen H., Pihlanto A. 2003. Food derived bioactive peptides- opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*. 9: 1297-1308.
- Krapp KL., Longe J. 2001. *The Gale Encyclopedia of Alternative Medicine*. Gale Group. Detroit, Michigan. 114, 516-521.
- Kumara K., Goh KM., Scott WR., Frampton CM. 2001. Effects of ¹⁵N-labelled crop residues and management practices on subsequent winter wheat yields, nitrogen benefits and recovery under field conditions. *Cambridge Journals: Journal of Agricultural Science*. 136:35-53.
- Langmead L., Makins RJ., Rampton DS. 2004. Antiinflammatory effects of *Aloe vera* gel in human colorectal mucosa in vitro. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 19(5): 521-527.

- Lin LX., Wang P., Wang YT., Huang Y., Jiang L., Wang XM. 2016. *Aloe vera* and *Vitis vinifera* improve wound healing in an in vivo rat burn wound model. *Molecular Medicine Reports*. 13(2):1070-6.
- Liu YK., Leung CM., Koon LF., Zhu YZ., Hui B., Yu KP. 2006. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Fung. *International Immunopharmacology* 6: 1634-1641.
- López A., Cisneros F. 2000. *Planta de vida, jugo de salud*. Ed. Silueta cubana. La Habana Cuba. 13.
- López R., Manzano P., Hernández F., Bazán E., Méndez LJ. 2010. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. *Medical Mycology*. 48(3): 476-479.
- Madal KS., Nazma I., Harwinder SR., Ramnik S. 2008. Immunomodulatory properties of *Aloe vera* gel in mice. *International Journal of Green Pharmacy*. 2(3): 152-154.
- Mandal SM., Dey S., Mandal M., Sarkar S, Neto MS., Franco OL. 2009. "Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water," *Peptides*. 30(4): 633–637.
- Martins JC., Maes D., Loris R. 1996. "H NMR study of the solution structure of Ac-AMP2, a sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*," *Journal of Molecular Biology*. 258(2): 322–333
- Meisel, H. 1998. Overview on Milk Protein-derived Peptides. *International Dairy Journal*. 8(5-6), 363-373.
- Meyers BC., Dickerman AW., Michelmore RW., Sivaramakrishnan S., Sobral BW., Young ND. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal*. 20: 317–332.

- Meyer BN., Ferrigni NR., Putnam JE., Jacobsen LB., Nichols DE., McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: A Convenient general bioassay for active plant constituents. *Plantamedica* 45: 31-34.
- Meyers BC., Morgante M., Michelmore RW. 2002. TIR-X and TIR-NBS proteins: Two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. *Plant Journal*. 32: 77–92.
- Michelmore RW., Meyers BC. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research*. 8: 1113–1130.
- Miroddi, M., Navarra, M., Calapai, F., Mancari, F., Giofrè, S.V. , Gangemi, S. , Calapai, G. 2015. Review of clinical pharmacology of *Aloe vera* L. in the treatment of psoriasis. *Phytotherapy Research*, 29 (5), pp. 648-655.
- Mirshafiey A., Aghily B., Namaki S., Razavi A., Ghazavi A., Ekhtiari P., Mosayebi G. 2010. Therapeutic approach by *Aloe vera* in experimental model of multiple sclerosis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 32(3): 410-415.
- Murillo B, Córdoba M, Villegas J, Hernández L, Troyo E, García J. 2014. Ineral Content and Biochemical Variables of *Aloe vera* L. under Salt Stress. *PLoS One*. (4): e94870.
- Nguta J., Mbaria J. 2013. Brine shrimp toxicity and antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Msambweni district of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*. 148(3):988-92
- MNM. Página del Programa Universitario, México Nación Multicultural, UNAM. 2008. [Online]. Disponible en: www.nacionmulticultural.unam.mx.
- Noiva R. 2010. Glicoproteínas. [Online] Disponible en: <http://www.chemistryexplained.com/Ge-Hy/Glycoprotein.html>

- Okamura N., Hine NS., Fujioka T., Mijasill K., Yagi A. 1996. Three chromone components from *Aloe vera* leaves. *Journal of Phytochemistry*. 43(2): 495-498.
- Okamura N., Hine NS., Tateyama Y., Nakazawa M., Fujioka, T., Mihashi K., Yagi, A. 1997. Three chromones of *Aloe vera* leaves. *Journal of Phytochemistry*, 45: 1511–1513.
- Okrent RA., Brooks MD., Wildermuth MC. 2009. Arabidopsis GH3.12 (PBS3) conjugates amino acids to 4-substituted benzoates and is inhibited by salicylate. *Journal of Biological Chemistry*. 284(15):9742-54.
- Okyar A., Can A., Akev N., Baktir G., Sutlupinar N. 2001. Effect of *Aloe vera* leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. *Phytotherapy Research Journal*. 15: 157-161.
- OMS Organización Mundial de la Salud. 2015. Las 10 causas principales de defunción en el mundo. 2015. [Online] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html>.
- OMS Organización Mundial de la Salud. 2015. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>.
- OMS Organización Mundial de la Salud. 2015. Una atención más limpia es una atención más segura. <http://www.who.int/gpsc/background/es/>.
- Oryan A, Mohammadalipour A, Moshiri A, Tabandeh MR. 2014. Topical Application of *Aloe vera* Accelerated Wound Healing, Modeling, and Remodeling: An Experimental Study With Significant Clinical Value. *Ann Plast Surg*.
- Osugi K., Suzuki H., Nomura T., Ariumi Y., Shibata H., Maki M. 2012. Identification of the P-body component PATL1 as a novel ALG-2-interacting

- protein by in silico and far-Western screening of proline-rich proteins. . Journal of Biochemistry. 151(6):657-66.
- Padrón B, Oranday A, Rivas C, Verde M. 2003. Identificación de compuestos de *Melia Azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomun zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. Ciencia UANL. 3: 333-338.
- Pan QL., Wendel J., Fluhr R. 2000. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. Journal of Molecular Evolution. 50: 203-213
- Park YI., Son BY. 2006. Chapter 3.2: Proteins in Aloe. In New perspective in Aloe. Editorial Springer Science Business Media, LLC. 35-56.
- Pecere T., Gazzola MV., Mucignat C., Parolin C., Vecchia FD., Cavaggioni A., Basso G., Diaspro A., Salvato B., Carli M., Palu G. 2000. Aloe-emodin Is a New Type of Anticancer Agent with Selective Activity against Neuroectodermal Tumors. Cancer Research 60: 2800-2804.
- Pelegri PB y Franco OL. 2005. "Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins," International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 37(11): 2239–2253.
- Pelegri PB., Murad AM., Silva LP. 2008. "Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria," Peptides. 29(8): 1271–1279.
- Pereira GG, Guterres SS, Balducci AG, Colombo P, Sonvico F. 2014. Polymeric films loaded with vitamin E and aloe vera for topical application in the treatment of burn wounds. Biomed Res Int. 2014;2014:641590. doi: 10.1155/2014/641590. Epub.

- Peterman TK., Ohol YM., McReynolds LJ., Luna EJ. 2004. Patellin1, a novel Sec14-like protein, localizes to the cell plate and binds phosphoinositides. *Plant Physiology*. 136(2):3080-94.
- Peterman TK., Sequeira AS., Samia JA., Lunde EE. 2006. J 2006. Molecular cloning and characterization of patellin1, a novel sec14-related protein, from zucchini (*Cucurbita pepo*). *Plant Physiology*. 163(11):1150-8.
- Plaskett LG. 1996. The health and medical use of *Aloe vera*. Editorial Life Sciences. Tacoma, Washington. 93-97
- Rahmani N, Khademloo M, Vosoughi K, Assadpour S. 2014. Effects of *Aloe vera* cream on chronic anal fissure pain, wound healing and hemorrhaging upon defecation: a prospective double blind clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 18(7):1078-84.
- Rajasekaran S., Sivagnanam K., Ravi K., Subramanian S. 2004. Hypoglycemic effect of *Aloe vera* gel on streptozotocin-induced diabetes in experimental rats. *Journal of Medicinal Food*. 7: 61-66.
- Rajasekaran S., Sivagnanam K., Ravi K., Subramanian S. 2005. Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacological Reports Online*. 57: 90-96.
- Ranade AN, Wankhede SS, Ranpise NS, Mundada MS. 2012. Development of bilayer floating tablet of amoxicillin and *Aloe vera* gel powder for treatment of gastric ulcers. *AAPS PharmSciTech*. 2012 Dec;13(4):1518-23. doi: 10.1208/s12249-012-9882-4. Epub.
- Reiser J., Linka N., Lemke L., Jeblick W., Neuhaus HE. 2004. Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 136: 3524–3536.

- Reinhold T., Alawady A., Grimm B., Beran KC., Jahns P. 2007. Limitation of nocturnal import of ATP into Arabidopsis chloroplasts leads to photooxidative damage. *Plant Journal*. 50: 293–304.
- Reynolds, T. 1996. Chemotaxonomy of *Aloe turkanensis* and *Aloe scabrifolia* from Kenya. *Biochemical Systematics and Ecology*. 24: 347-352.
- Reynolds T., Dweck AC. 1999. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*. 68 (1-3): 3-37.
- Rodrigues D., Viotto AC., Checchia R., Gomide A., Severino D., Itri R., Baptista MS., Martins WK. 2016. Mechanism of *Aloe Vera* extract protection against UVA: shelter of lysosomal membrane avoids photodamage. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 15(3):334-50.
- Roitsch T., Balibrea ME., Hofmann M., Proels R., Sinha, AK. 2003. Extracellular invertase: Key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*. 54: 513–524.
- Saka WA, Akhigbe RE, Ishola OS, Ashamu EA, Olayemi OT, Adeleke GE. 2011. Hepatotherapeutic effect of *Aloe vera* in alcohol-induced hepatic damage. *Pak J Biol Sci*. 14(14):742-6.
- Salas CE., Badillo JA., Ramírez G., Oliver C. 2015. Biologically active and antimicrobial peptides from plants. *Biomed Research International*. 2015:102129
- Sawaki Y., Iuchi S., Kobayashi Y., Kobayashi Y., Ikka T., Sakurai N., Fujita M., Shinozaki K., Shibata D., Kobayashi M. y Koyama H.. 2009. STOP1 Regulates Multiple Genes That Protect Arabidopsis from Proton and Aluminum Toxicities. *Plant Physiology*. 150(1): 281–294.
- Sawaki Y., Kobayashi Y., Kihara-Doi T., Nishikubo N., Kawazu T., Kobayashi M., Kobayashi Y., Iuchi S., Koyama H., Sato S..2014. Identification of a STOP1-like

- protein in Eucalyptus that regulates transcription of Al tolerance genes. *Plant Science*. 223:8-15.
- Selitrennikoff CP. 2001. "Antifungal Proteins," *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7): 2883–2894.
- Sessmann OA., Mattos L., Restrepo A. 2001. Resistencia bacteriana. Unidad de Infectología, Hospital Universitario San Ignacio.
- Shahid Muhammad. 2007. Purification and Characterization of Bioactive Peptides/Proteins from Medicinal plants. Departamento de Química (Bioquímica). Universidad de Agricultura. Tesis.
- Shahidi F., Zhong Y. 2008. Bioactive Peptides. *Journal of AOAC International*. 91(4), 914-931.
- Shi LX., Schröder WP. 2004. The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1608(2-3):75-96.
- Shimizu M. 2004. Food derived peptides and intestinal functions. *Current Pharmaceutical Design*. 21: 43-47.
- Snezana S. 2007. Anti-genotoxic effect of *Aloe vera* gel on the mutagenic action of ethyl methanesulfonate *Archives of Biological Sciences*. 59 (3): 223-226.
- Song WY., Lee HS., Jin SR., Ko D., Martinoia E., Lee Y., An G., Ahn SN. 2015. Rice PCR1 influences grain weight and Zn accumulation in grains. *Plant Cell and Environment*. 38(11):2327-39.
- Speranza G., Corti S., Manitto P. 1994. Isolation and chemical characterization of a new constituent of Cape Aloe having the 1,1-diphenylethane skeleton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 2002-2006.

- Srivastava S., Gupta SM., Sane AP., Nath P. 2012. Isolation and characterization of ripening related pectin methylesterase inhibitor gene from banana fruit. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 18(2):191-5.
- Stephens RS., Kalman S., Lammel C., Fan J., Marathe R. 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282: 754–759.
- Stevens N. 2006. *Aloe Vera*. Málaga España. Editorial Sirio 7° edición. 8.
- STRING Consortium 2016. Versión 10.0. [Online] Disponible en: <http://string-db.org/>
- Sun Q., Collins NC., Ayliffe M., Smith SM., Drake J., Pryor A., Hulbert SH. 2001. Recombination between paralogues at the rp1 rust resistance locus in maize. *Genetics* 158: 423–438.
- Tabolacci, C., Cordella, M., Turcano, L., Rossi, S., Lentini, A., Mariotti, S., Nisini, R., Sette, G., Eramo, A., Piredda, L., De Maria, R., Facchiano, F., Beninati, S. 2015. Aloe-emodin exerts a potent anticancer and immunomodulatory activity on BRAF-mutated human melanoma cells. *European Journal of Pharmacology*. 762: 283-292.
- Tam JP., Lu YA., Yang JL., Chiu KW. 1999. “An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(16): 8913–8918.
- Tanaka M, Misawa E, Yamauchi K, Abe F, Ishizaki C. 2015. Effects of plant sterols derived from *Aloe vera* gel on human dermal fibroblasts in vitro and on skin condition in Japanese women. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. doi: 10.2147/CCID.S75441

- Terras FR, Eggermont K., Kovaleva V. 1995. "Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense," *Plant Cell*, vol. 7, no. 5, pp. 573–588
- Thimmegowda, N.R., Park, C, Shwetha, B., Sakchaisri, K., Liu, K., Hwang, J., Lee, S., Jeong, S.J., Soung, N.K., Jang, J.H., Ryoo, I., Ahn, J.S., Erikson, R.L., Kim, B.Y. 2015. Synthesis and antitumor activity of natural compound Aloe emodin derivatives. *Chemical Biology and Drug Design*. 85 (5), pp. 638-644.
- Tjaden J., Winkler HH., Schwöppe C., van der Laan M., Möhlmann T. 1999. Two nucleotide transport proteins in *Chlamydia trachomatis*, one for net nucleoside triphosphate uptake and the other for the transport of energy. *Journal of Bacteriology*. 181: 1196–1202.
- Traut TW. 1994. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. *European Journal of Biochemistry*. 222: 9-19.
- Trentmann O., Matthias H., Anke C. Terwisscha van S., Neuhaus E., Haferkamp I. 2007. Enlightening Energy Parasitism by Analysis of an ATP/ADP Transporter from *Chlamydiae*. Research Article. *PLOS Biology*. 5(9):e231.
- Trösch R., Töpel M., Flores-Pérez Ú., Jarvis P. 2015. Genetic and Physical Interaction Studies Reveal Functional Similarities between ALBINO3 and ALBINO4 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 169(2):1292-306.
- U.S. Department of Health and Human Services. FDA. U.S. Food and Drug Administration. 2009. [Online] Disponible en: <http://www.fda.gov/ICECI/EnforcementActions/WarningLetters/1998/ucm157025.htm>
- Vázquez B., Ávila G., Segura D., Escalante B. 1996. Anti-inflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. *Journal of Ethnopharmacology*. 55: 69-75.

- Vega M, Verde J, Oranday A, Morales M, Núñez M, Rivera M, Serrano L, Rivas C. 2013. Actividad antibacteriana y Citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnst del Norte contra *Staphylococcus aureus* de Aislados Clínicos. Rev Mex Cienc Farm. 44 (2): 24-30.
- Viljoen AM., Van BE., Dagne E. 1996. The chemotaxonomic value of 10-hydroxyaloin B and its derivatives in *Aloe* species *Asperifoliae* Berger. Kew Bulletin. 51: 159–168.
- Vorwerk S., Somerville S., Somerville C. 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. Trends in Plant Science. 9: 203–209.
- Waihenya RK. 2002. Investigation on the Bioactivities of *Aloe secundiflora* (Aloeaceae) on the Newcastle disease and Fowl typhoid in local chickens (*Gallus domesticus*) thesis in Tanzania. Sokoine University of Agriculture. Unpublished PhD Thesis.
- Waihenya RK., Mtambo MM., Nkwengulila G., Minga UM. 2002. Efficacy of the crude extract of *Aloe secundiflora* against *Salmonella gallinarum* in experimentally infected free range chickens in Tanzania. Journal of Ethnopharmacology. 79: 317-323
- Wang H y Ng TB. 2000. “Ginkbilobin, anovel antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds with sequence similarity to embryo-abundant protein,” Biochemistry and Biophysics Research Communications. 279: 407–411.
- Witherup KM., Bogusky MJ., Anderson PS. 1994. “Cyclopsychotride A, a biologically active, 32-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*,” Journal of Natural Products. 57(12): 1619–1625
- Witkowska D., Bartyś A., Gamian A. 2008. “Defensins and cathelicidins as natural peptide antibiotics,” *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, vol. 62, pp. 694–707.

- Woolhead CA., Thompson SJ., Moore M., Tissier C., Mant A., Rodger A., Henry R., Robinson C. 2001. Distinct Albino3-dependent and -independent pathways for thylakoid membrane protein insertion. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 40841–40846.
- Yagi A., Egusa T., Arase M., Tanabe M., Tsuji H. 1997. Isolation and characterization of the glycoprotein fraction with a proliferation-promoting activity on human and hamster cells *in vitro* from *Aloe vera* gel. *Journal of Planta Medica*. 63: 18–21.
- Yongchaiyudha S., Rungpitarangsi V., Bunyaphatsara N., Chokechaijaroenporn O. 1996. Antidiabetica activity of *Aloe vera* L. juice. I. Clinical trial in new cases of diabetes mellitus. *Phytomedicine*. 3: 241-243
- Young ND. 2000. The genetic architecture of resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 285-290.
- Yusuf S., Agunu A., Diana M. 2004. The effect of *Aloe vera* A. Berge (Liliaceae) on gastric acid secretion and acute gastric mucosal injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 93(1): 33-37.
- Zhang L., Tizard IR. 1996. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. *Immunopharmacology*. 35(2): 11928.
- Zhou, Y.-X., Xia, W., Yue, W., Peng, C., Rahman, K., Zhang, A. 2015. Rhein: A Review of Pharmacological Activities. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Aart. no. 578107.
- Zonta F., Bogoni P., Masotti P., Micali G. 1995. High performance liquid chromatographic profiles of Aloe constituents and determination of aloin in beverages, with reference to the EEC regulation for flavouring substances. *Journal of Chromatography A*. 718: 99-1

RESUMEN BIOGRÁFICO

Ethel Daniela Cabello Ruiz

Candidato a obtener el grado de
Doctor en Ciencias con acentuación en Química de Productos Naturales.

**Tesis: AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS,
PROTEÍNAS Y GLICOPROTEÍNAS DE *Aloe vera* CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA**

Campo de estudio: Química de Productos Naturales

Datos personales: Nacida en San Juan del Río, Qro., el 6 de abril de 1989. Hija de Mario Cabello Chávez y Gloria Esther Ruiz Rico.

Educación: Egresada en el 2010 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el título de Licenciado en Ciencia de Alimentos. Perteneciente al grupo de Talentos de la UANL y titulada de Licenciatura con mención honorífica.

Experiencia profesional: Docente de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, desde 2012.

Trabajo Científico

Actividad antimicrobiana del extracto proteico de hojas de *Aloe vera*

Antimicrobial activity of protein extract of *Aloe vera* leaves

Ethel Daniela Cabello Ruiz,¹ Gloria María Molina Salinas,² Víctor Manuel Torres de la Cruz,^{3,4} María Adriana Núñez González,¹ Azucena Oranday Cárdenas,¹ María Julia Verde Star,¹ Laura Elia Martínez de Villarreal,⁴ Catalina Rivas Morales¹

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

² Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Ignacio García Téllez, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mérida, Yucatán, México

³ Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México

⁴ Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

Resumen

Las enfermedades infecciosas son un problema de Salud Pública que se agrava con microorganismos resistentes. Esto conduce al desarrollo de nuevos fármacos. Recientemente surgió el estudio de actividades farmacológicas de proteínas de fuentes naturales. En esta investigación se realizó la extracción de proteínas del gel de *Aloe vera* y su evaluación antimicrobiana. Se obtuvieron extractos proteicos de *A. vera* por dos métodos: Extracto 1 (EP1) precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y extracto 2 (EP2) extracción con fenol. El rendimiento para el método 2 (0.33 % recuperación). Análisis por espectrometría de masas EP1 permitió identificar un péptido y una proteína de 5 y 31 kDa, relacionada con glicoproteínas de *Arabidopsis thaliana*. EP2 mostró actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. *A. vera* es una fuente prometedora de proteínas con actividad anti-*S. aureus* y -*C. albicans*.

Abstract

Infectious diseases remain a public health problem that is exacerbated by the presence of resistant organisms leading to development of novel drugs. Study of pharmacological proteins from natural sources recently emerged. In this research extraction of proteins from gel of *Aloe vera* and antimicrobial evaluation were done. Protein extracts from *Aloe vera* were obtained by two methods: extract 1(EP1) by precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and (EP2) by phenol extraction. The yield for method 2 (0.33 % recovery). Analysis by mass spectrometry of EP1 identified with a high degree of confidence, peptide 5 and 31-kDa protein, whose identity has been associated with the glycoproteins of *Arabidopsis thaliana*. EP2 exhibited inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *A. vera* extract comprises a promising source of protein with anti-*S. aureus* and anti-*C. albicans* activity.

Palabras clave: *Aloe vera*, proteínas, actividad antimicrobiana.

Key words: *Aloe vera*, protein, antimicrobial activity.

Correspondencia:

Dra. Catalina Rivas Morales
Laboratorio de Química Analítica
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México
Tel. 81 8329 4000 Ext. 3652 Fax 81 8352 5011
E-mail: catalinarivas@yahoo.com.mx

Fecha de recepción: 05 de marzo de 2015

Fecha de recepción de modificaciones: 17 de junio de 2015

Introducción

Las infecciones de las vías respiratorias bajas son la principal causa infecciosa de defunción. Tan solo 1 de cada 100 muertes corresponde a niños menores de 15 años. En los países de ingresos bajos, aproximadamente 4 de cada 10 muertes ocurren en niños menores de 15 años, y tan solo 2 de cada 10 muertes corresponden a personas de 70 años o más. La causa predominante de defunción son las enfermedades infecciosas: en conjunto, las infecciones de las vías respiratorias bajas, la infección por el VIH/sida, las enfermedades diarreicas, el paludismo y la tuberculosis causan casi una tercera parte de las muertes en esos países.¹

Según un informe de la Organización Panamericana de la Salud, que actúa como Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud en las Américas hay una elevada resistencia por parte de algunos microorganismos. Ejemplo de ello, *Escherichia coli* resulta resistente a las cefalosporinas de tercera generación y a las fluoroquinolonas, dos clases importantes y muy utilizadas de fármacos antibacterianos. La resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a las cefalosporinas de tercera generación también es elevada y generalizada. En algunos entornos, hasta un 90 % de las infecciones por *Staphylococcus aureus* son resistentes a la meticilina, lo cual significa que el tratamiento con los antibióticos habituales no funciona. En este último caso, se calcula que las personas infectadas por *S. aureus* resistentes a la meticilina tienen una probabilidad de morir un 64 % mayor que las infectadas por cepas no resistentes.²

En México las infecciones causadas por bacterias son una de las principales causas de enfermedades en la población, lo cual ha provocado que se destaque por la prevalencia de las mismas. Se calcula que 450 000 casos de infección relacionada con la atención sanitaria causan 32 muertes por cada 100 000 habitantes por año.^{3,4}

Otro padecimiento frecuente es la micosis superficial en piel y uñas,⁵ la mayoría causada por dermatofitos. De éstos las especies más frecuentemente encontradas son: *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Epidermophyton floccosum*, destacándose a *T. rubrum* como el microorganismo de mayor incidencia en nuestro país.⁶ A lo anterior se suma que algunos microorganismos han desarrollado resistencia a distintos fármacos, además de que en México existen sesgos en la prevalencia de las inmunodeficiencias primarias debido al subregistro de los casos, producto del desconocimiento de los médicos sobre estos trastornos.^{2,7} Con lo anterior, surge la necesidad de la búsqueda de alternativas para el control de estas enfermedades; una de ellas es el empleo de plantas medicinales.

Aloe vera es una de las especies vegetales medicinales más importantes en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diversos padecimientos como: tos, diabetes, erisipela, inflamación e infección de la piel, dolor de estómago y como vermífugo.⁸ Esta planta es comúnmente conocida como sábila y ha capturado el interés por sus múltiples actividades biológicas.

Recientemente se ha incrementado el estudio de la química y actividades farmacológicas presentadas por las proteínas, péptidos y glicoproteínas provenientes de fuentes naturales.^{9,10} Koike et al. (1995) reportaron una lectina aislada del *A. vera* de 35 kDa con actividad de estimulación mitótica de linfocitos, activación del complemento, alternativa, antiinflamatoria, antiúlcera y antitumoral, además de presentar actividad mitogénica.¹¹ Yagi et al. (1997) reportaron una glicoproteína de 29 kDa que aumenta la proliferación de las células dérmicas normales en el humano.¹² Choi et al. (2001) reportaron una glicoproteína que nombraron GIG1MIDI2 de 5.5 kDa aislada de *A. vera* con actividad proliferativa y de migración celular¹³ y Das et al. (2010) reportaron una proteína de 14 kDa aislada de *A. vera*, la cual mostró actividad antifúngica contra *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. albicans*.¹⁴ El et al. (2010) reportaron un octapéptido de *A. vera* con actividad antitumoral y antioxidante.¹⁵

El propósito de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos proteicos del liofilizado de gel de *A. vera*.

Material y método

Material biológico

Planta: Liofilizado del gel de hoja *Aloe vera* proporcionado por la empresa Aloe Jaumave, S.A. de C.V. Jaumave, Tamaulipas México.

Bacterias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 20), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Salmonella typhi* (ATCC 6539) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619).

Hongos: aislados clínicos de *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*.

Extracción de proteínas del liofilizado de gel de *A. vera*

La extracción de las proteínas se llevó a cabo a partir del liofilizado de gel de *A. vera* mediante dos métodos. Para el método 1 (M1) se siguió la técnica reportada por Costa et al., (1998)¹⁶ con modificaciones: 5 g del liofilizado de *A. vera* se resuspendieron en 250 mL de una solución amortiguadora A (NaNO_3 , KH_2PO_4 y NaN_3 [CTR, J.T. Baker y Spectrum respectivamente] y a pH 7) bajo agitación constante a 180 rpm

por 6 h en baño de hielo. La suspensión resultante se pasó a través de una membrana de poro de 1 y 0.45 μm y posteriormente se concentró a presión reducida. El concentrado obtenido se centrifugó a 3600 rpm \times 30 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ y el sobrenadante recuperado se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (J.T. Baker) al 80 % (p/v). El precipitado se lavó con acetona (CTR) y se resuspendió en la solución amortiguadora B (Urea, NH_4HCO_3 y EDTA [J.T. Baker, CTR y CTR respectivamente]). El sobrenadante producto de la resuspensión, fue ultrafiltrado a través de una membrana de corte de 3 kDa y se obtuvo el extracto proteico 1 (EP1). Este procedimiento se repitió 5 veces.

Para la obtención del extracto por el método 2 (M2)¹⁷ se utilizaron 5 g de liofilizado de gel de *A. vera*, que se resuspendieron en 250 mL de una solución amortiguadora C (Tris-HCl [J.T. Baker], sacarosa, SDS y de β -mercaptoetanol [Sigma], a pH 8) y se mantuvieron en agitación constante a 180 rpm por 6 h en baño de hielo, para posteriormente mantenerlo a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 12 h. Al término se realizó una centrifugación para eliminar material insoluble, posteriormente se hizo una extracción fenólica con una solución saturada en una relación 1:3 solución *A. vera*: fenol (Sigma) y posteriormente se centrifugó a 3600 rpm a 4 $^{\circ}\text{C}$ \times 30 min. La solución fenólica se recuperó y se precipitó con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Monterrey, Reactivo Analítico) 0.1 M en $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (50:50), se agitó y se dejó en reposo durante la noche a -20 $^{\circ}\text{C}$, después se centrifugó nuevamente. El precipitado se recuperó y se lavó 3 veces con acetona y finalmente se resuspendió en la solución amortiguadora B, obteniendo así el extracto proteico (EP2). Se realizaron 5 réplicas.

La concentración de proteínas de los extractos proteicos EP1 y EP2 se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis en el equipo Nadodrop (ThermoScientific) a una longitud de onda de 280 nm. Los EPs se conservaron a -20 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Determinación de la masa molecular

A los extractos proteicos EP1 y EP2s se les realizó una hidrólisis enzimática con tripsina, que consistió en cuatro etapas consecutivas. En la primera etapa, a 100 μL del EP1 o EP2 se les adicionaron 5 μL de Ditiotreitól (DTT; Pro-Pure) y se incubaron a 65 $^{\circ}\text{C}$ \times 45 min; en la segunda y tercera etapas se añadieron 4 μL de $\text{C}_2\text{H}_5\text{INO}$ (Pro-Pure) y 20 μL de DTT, respectivamente y se incubaron a temperatura ambiente \times 45 min; finalmente a ambas digestiones se les adicionó tripsina, en una relación 1:20 (proteína: tripsina [Promega]) y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ \times 18 h.

De los hidrolizados de EP1 y EP2 se inyectaron 2 μL en el sistema de nanocromatografía modelo nanoAcquity (Waters) utilizando como fase estacionaria una columna BHE (75 μm \times 150 mm y 1.7 μm de tamaño de partícula); como fase móvil se utilizó un gradiente de Agua:ACN (97:3 a 40:60 en 30 min).

La detección de los péptidos se realizó en un espectrómetro de masas (ortogonal cuadrupolo-tiempo de vuelo modelo Q-TOF Premier), configurado con una interfase nano *electrospray*. El proceso de bioinformática para la secuenciación e identificación se llevó a cabo con el software ProteinLynx Global server ver 2.5, en el cual se usó el algoritmo MASCOT para la obtención de la secuencia de aminoácidos de los péptidos y para la alineación con las secuencias proteicas se usó la base de datos de *Arabidopsis thaliana* en formato FASTA.

Evaluación de actividad antimicrobiana

Actividad antibacteriana¹⁸

Los inóculos bacterianos se prepararon por resiembra desde cultivos en medio sólido C. Rivas (Patente IMPI MX/10892) a tubos de ensayo que contenían 5 mL de caldo de cultivo C. Rivas. Estos tubos se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ \times 18–24 h.

En placas de Petri conteniendo medio sólido C. Rivas se inocularon con 100 μL de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC mL^{-1} (que corresponde 0.5 de la escala de Mc Farland). Posteriormente se realizaron orificios con una pipeta Pasteur en el agar, en los cuales se les depositaron 50, 200 y 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EP1 o EP2 en medio C. Rivas. Como control negativo y positivo se utilizaron 25 μL de medio C. Rivas y gentamicina respectivamente (32 mg mL^{-1}); las placas se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ \times 48 h, posteriormente se midieron los halos inhibición con ayuda de un Vernier y los resultados se expresaron en cm.¹⁵

Actividad antifúngica¹⁹

La preparación del inóculo de *C. albicans* se llevó a cabo de acuerdo a lo marcado anteriormente para actividad antibacteriana, en tanto que para los hongos filamentosos, una asada de micelio se depositó en una caja Petri con medio sólido C. Rivas y se incubó a 30 $^{\circ}\text{C}$ de 7–14 d. Posteriormente se recuperaron las conidias por arrastre de superficie con ayuda de un hisopo, se filtraron y se transfirieron a un tubo con 3 mL de H_2O destilada estéril. Se realizó el conteo de conidias mL^{-1} en una cámara de Neubauer y se ajustó la densidad a $1-2 \times 10^4$ UFC mL^{-1} .

Para el ensayo contra hongos, se prepararon cajas Petri con medio sólido C. Rivas y se inoculó con 100 μL de cada cepa en su respectiva caja. Se hicieron orificios con una pipeta Pasteur y se colocaron en cada pocillo 50, 200 y 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EP1 o EP2 en medio C. Rivas. Como control positivo y negativo se colocaron 25 μL de ketoconazol disuelto en H_2O estéril (32 mg mL^{-1}) y medio C. Rivas respectivamente. Las placas se incubaron a 30 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h para *C. albicans* y de 7–14 d para los hongos filamentosos. Posteriormente se midieron los halos de inhibición con un Vernier y los resultados se expresaron en cm.²⁰

Resultados y discusión

Extracción de proteínas del liofilizado de gel de *A. vera*

En la extracción por el M1 se obtuvo un rendimiento promedio de 6.2 mg (DE \pm 1.26) de EP1 que corresponde a un porcentaje de recuperación de 0.1 % y por el M2 se obtuvo un rendimiento medio de 14.9 mg de EP2 (DE \pm 1.24) y que corresponde a un porcentaje de 0.3 %; de tal forma el M2 resultó ser 2.4 veces más eficiente que el M1. Murillo *et al.*, reportaron un rendimiento de 146.70 y 96.92 mg g⁻¹ de proteína total para colénquima y parénquima de *A. vera* respectivamente sin someterse a estrés salino con NaCl.²¹ El porcentaje de recuperación obtenido en este trabajo se encuentra por debajo de lo reportado por Murillo *et al.*, lo anterior atribuido a que la extracción y determinación de proteínas realizadas por dichos autores fue a partir de tejido seco que fue homogeneizado en una solución amortiguadora de extracción (KH₂PO₄, EDTA, polivinilpirrolidona) para posteriormente centrifugar la mezcla y recuperar el sobrenadante en donde se cuantificó proteínas totales por el método de Bradford. En este trabajo es importante señalar que la cuantificación de proteínas totales fue realizada para el extracto, resultado de un proceso de purificación.

En el espectro de UV de los extractos proteicos de *A. vera* que se muestran en la Figura 1, en EP1 se observa una señal característica de la presencia de proteínas a 280 nm, con el punto máximo de absorción desplazado y una mayor área bajo la curva mientras que EP2 mostró la señal más próxima a 280 nm y una banda más estrecha lo cual indica mayor pureza.

Espectro UV de EP1 vs EP2

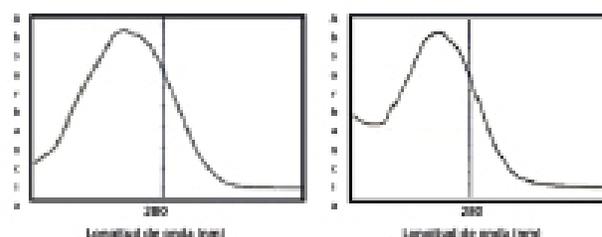


Figura 1. Comparación de la pureza de los extractos proteicos del gel liofilizado de *Aloe vera* EP1 (M1) y EP2 (M2)

Cabe señalar que el equipo NanoDrop (ThermoScientific) permite determinar el rendimiento en mg mL⁻¹ de las proteínas extraídas empleando como estándar ASB y además está adaptado para determinar la pureza de proteínas purificadas, estableciendo un radio ~1.8-2.00 para indicar la misma.

El incremento en la "pureza" del espectro UV-Vis del EP1 vs

EP2 utilizando como precipitante al fenol es debido a que el fenol favoreció una mayor remoción de sustancias interferentes disminuyendo la interacción molecular entre las proteínas y otros componentes como los azúcares¹⁷ brindando la ventaja al M2 en cuanto a su porcentaje de recuperación y de rendimiento proteico.

Determinación de la masa molecular

En el EP1 se identificaron por espectrometría de masas, péptidos los cuales fueron ontológicamente alineados con la enzima esteroil O-aciltransferasa 1 y una glicoproteína de matriz M2, respectivamente (Figura 2). La primera de ellas producida por células hepáticas, relacionada con el metabolismo de lípidos, particularmente en el catabolismo de esteroides por lo que se dice que topológicamente tiene un dominio transmembrana. La base de datos relacional reporta interacción directa con proteínas de la familia de Lipasa 3 y con la peptidil-proil-cis-trans- isomerasa de cloroplasto. Chen *et al.*, han reportado el aislamiento de esta enzima de *Arabidopsis thaliana* demostrando una notable actividad en el metabolismo de esteroides en la mejora de la calidad de las semillas.^{22, 23} Cabe mencionar que no existen reportes de su actividad antimicrobiana, sin embargo se infiere que la enzima participa en los procesos inflamatorios en la respuesta inmune a la infección por ciertos microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*.

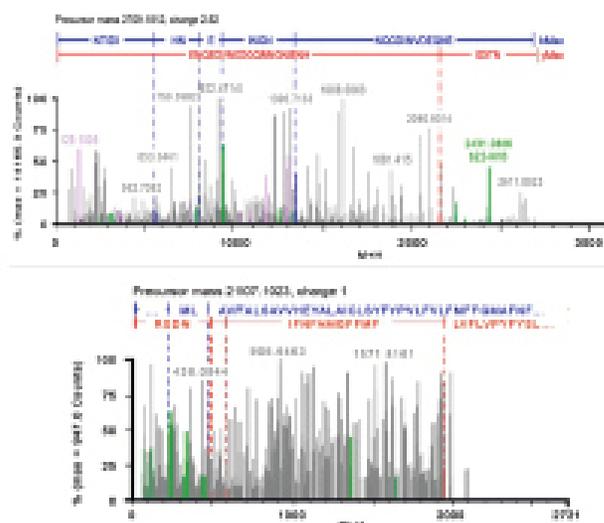


Figura 2. Espectros de masas de los péptidos de 31 y 5kDa (superior e inferior respectivamente) obtenidos del EP1 de *A. vera*.

La segunda proteína, reportada como una glicoproteína de matriz 2, también alinea fuertemente con una supuesta activador RAB GTPasa (NP_001118517.1) de *Arabidopsis thaliana*,

la cual participa ampliamente en los mecanismos de transporte a través de la membrana y en el tráfico intracelular. Funciona como canal iónico formando parte de las proteínas estructurales de la membrana, pero no se ha reportado ninguna actividad antimicrobiana directa.²³

El método de extracción (M2) con fenol ha permitido la identificación de proteínas, sin embargo no se detectaron los fragmentos necesarios relacionados con los precursores o péptidos detectados para asignar la secuencia de acuerdo a la base de datos MASCOT. Dado el muy bajo contenido de proteína de la planta resulta necesario la concentración de las muestras para lograr identificar un grupo mayor de proteínas o de secuencias peptídicas y lograr el fraccionamiento de proteínas a las cuales podamos atribuir la actividad antimicrobiana observada.

Cabe señalar que aunque han sido identificadas varias secuencias, las reportadas son las de confiabilidad superior al 90%.

Evaluación de actividad antimicrobiana

Nuestros resultados muestran que el EPI no mostró actividad contra las bacterias y hongos evaluados, en tanto que EP2 mostró actividad inhibitoria del crecimiento contra *S. aureus* y *C. albicans* a $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ con un halo de inhibición de 0.8 y 1 cm, respectivamente y no exhibió actividad inhibitoria para el resto de las bacterias y los hongos filamentosos (Tabla 1). Para el EP2 bioactivo vs *S. aureus* y *C. albicans* no se lograron identificar sus componentes mediante el análisis por EM realizado. En tanto que para el EPI no bioactivo, se logró identificar la presencia de un par de péptidos que presentan una actividad relacionada con el metabolismo de lípidos y con los mecanismos de transporte a través de la membrana y el tráfico intracelular.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana del extracto proteico (EP2) de liofilizado de gel de *A. vera*

Microorganismo	Halo de inhibición de crecimiento (cm)		
	Concentración de EP2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	50	200	800
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0.8
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0
<i>Salmonella typhi</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	0	1.0
<i>Trichophyton rubrum</i>	0	0	0
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0	0	0
<i>Trichophyton tonsurans</i>	0	0	0

EP2 mostró actividad inhibitoria sobre *S. aureus* y *C. albicans*, no existen reportes previos con actividad antiestafilocócica del extracto proteico de *A. vera*, pero sí de actividad anti-*C. albicans*, por lo cual resulta necesario corroborar si la actividad mostrada por EP2 se trata de la proteína reportada y definir a quién se le atribuye la actividad antiestafilocócica, por lo cual el extracto proteico de sábila resulta una fuente prometedora de moléculas con actividad contra *S. aureus* y *C. albicans*.

Conclusiones

El método de extracción M2 permitió la obtención de un extracto proteico del liofilizado de gel de *A. vera* con mayor rendimiento y pureza EP2 comparado con el EPI obtenido por el método M1. Se identificó en EPI la proteína esterol-*o*-aciltransferasa1 (ATSAT1), esta enzima se ha aislado de *Arabidopsis thaliana* y la glicoproteína de matriz 2 alínea fuertemente con un activador RAB GTPasa (NP_001118517.1) de *Arabidopsis thaliana*. EP2 mostró actividad sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* y no existen reportes previos con actividad antiestafilocócica del extracto proteico de *A. vera*. El extracto proteico de sábila resulta una fuente prometedora de moléculas con actividad anti-*S. aureus* y -*C. albicans*.

Agradecimientos

Al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT: Becario número 399911. Así como a la Fundación Educación Superior-Empresa FESE y a la empresa Aloe Jauvave S.A. de C.V.

Referencias

1. OMS Organización Mundial de la Salud. Las 10 causas principales de defunción en el mundo. 2015. [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html>. Acceso 4 Ene 2015.
2. OMS Organización Mundial de la Salud. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. 2015. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>. Acceso 9 Ene 2015.
3. OMS Organización Mundial de la Salud. Una atención más limpia es una atención más segura. 2015. <http://www.who.int/gpsc/background/es/>. Acceso 9 Ene 2015.
4. DGE Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos. 2013. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>. Acceso 7 Ene 2015.

5. Abreu A, Lovio Z, Larrondo R. Dermatología en la atención primaria de salud. *Avan Med.* 1998; 5(16): 8-10.
6. López R, Manzano P, Hernández F, Bazán E, Méndez L. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. *Med Mycol.* 2010; 48(3): 476-479.
7. Coria E, Espinosa S, Espinosa F, Vargas M, Blancas L. Panorama epidemiológico de las inmunodeficiencias primarias en México. *Rev Alergia Mex.* 2010; 57(5): 159-163.
8. Andrade A. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol Hidalgo, Mexico. *J Ethnopharmacol.* 2009; 112: 163-171.
9. Korhonen H, Pihlanto A. Food derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Design.* 2003; 9: 1297-1308.
10. Farrokhi N, Whitelegge J, Brusslan J. Plant peptide and peptidomics. *Plant Biotech J.* 2008; 6: 105-134.
11. Koike T, Beppu H, Kuzuya H, Maruta K, Shimpo K, Suzuki M, Titani K, Fujita K. A 35 kDa manosa-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from Kidachi Aloe (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Beger). *J Biochem.* 1995; 118(6): 1205-1210.
12. Yagi A, Egusa T, Arase M, Tanabe M, Tsuji H. Isolation and characterization of the glycoprotein fraction with a proliferation-promoting activity on human and hamster cells *in vitro* from Aloe vera gel. *Planta Med.* 1997; 63: 18-21.
13. Choi S, Son V, Son Y, Park Y, Lee S, Chung M. The wound healing effect of a glycoprotein fraction isolated from Aloe vera. *J Dermatol.* 2001; 145(4): 535-45.
14. Das S, Mishra B, Gill K, Ashraf M, Singh A, Sinha M, Sharma S, Xess I, Dalal K, Sing T, Dey S. Isolation and characterization of novel protein with antifungal and anti-inflammatory properties from Aloe vera leaf gel. *Int J Biol Macromol.* 2010; 48: 38-43.
15. El H, Aboul M, Nassr A, Aboul K, Kabash A, Yagi A. Antitumor properties and modulation of antioxidant enzymes activity by Aloe vera leaf active principles isolated via supercritical carbon dioxide extraction. *Curr Med Chem.* 2010; 17: 129-138.
16. Costa S, Pessoa A, Roberto I. Xylanase recovery: Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental design. *Appl Biochem Biotechnol.* 1998; 70-72: 629-39.
17. Faurobert M, Pelpoir E, Chaïb J. Methods in Molecular Biology. Plant Proteomics: Methods and Protocols. Thiellement H, editores. New York: Springer; 2007. p. 335.
18. Vega M, Verde J, Oranday A, Morales M, Núñez M, Rivera M, Serrano L, Rivas C. Actividad antibacteriana y Citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berf) I.M. Johnston del Norte contra *Staphylococcus aureus* de Aislados Clínicos. *Rev Mex Cienc Farm.* 2013; 44 (2): 24-30.
19. Padrón B, Oranday A, Rivas C, Verde M. Identificación de compuestos de *Melia Azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Citrusmomum zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. *Ciencia UANL.* 2003; 3: 333-338.
20. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. <http://clsi.org/>. Acceso 12 Dic 2014.
21. Murillo B, Córdoba M, Villegas J, Hernández L, Troyo E, García J. Ineral Content and Biochemical Variables of Aloe vera L. under Salt Stress. *PLoS One.* 2014; (4): e94870.
22. Chen Q, Steinhauer L, Hammerlindl J, Keller W, Zou J. Biosynthesis of Phytosterol Esters: Identification of a Sterol O-Acyltransferase in *Arabidopsis*[OA]. *Plant Physiol.* 2007; 145: 974-984.
23. Ang A, Fölsch H, Koivisto U, Pypaert M, Mellman I. The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 2003; 163: 339-350.

Capítulo 10

Actividad biológica de proteínas y péptidos

Ethel Daniela Cabello-Ruiz¹, María Adriana Núñez-González¹,
Víctor Manuel Torres de la Cruz²

¹Laboratorio Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Ave Universidad S/N., San Nicolás de los Garza Nuevo León, México. CP 66451.

²Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social. Monterrey, Nuevo León, México.

ethel.cabellorz@uanl.edu.mx,
victortorres@accuramonterrey.com

maria.nunezrd@uanl.edu.mx,

Referenciar este capítulo

Ethel Daniela Cabello-Ruiz, María Adriana Núñez-González, Víctor Manuel Torres de la Cruz

(2016). **Actividad biológica de proteínas y péptidos**. En C. Rivas- Morales, M A Oranday Cárdenas, M J Verde Star. (Eds), Investigación en plantas de importancia médica. (pp. 205-229). Barcelona OmniaScience.

1 Introducción

Las proteínas son uno de los constituyentes primarios de los organismos vivos. Incluso en las plantas, donde los carbohidratos son los componentes estructurales más abundantes, las proteínas se encuentran presentes en aquellas partes que son responsables del crecimiento y la reproducción. La estructura fundamental de las proteínas es relativamente sencilla; son largas cadenas de aminoácidos unidos entre sí por enlaces amida, también llamados enlaces peptídicos, entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro. Estas cadenas se denominan polipéptidos. Una proteína puede estar constituida por una única cadena polipeptídica o por varias asociadas entre sí y están constituidas por unos veinte aminoácidos diferentes (Ege, 2004).

Los efectos benéficos a la salud por parte de las proteínas, podrían ser atribuidos a numerosas secuencias de péptidos que poseen actividades antimicrobianas, antioxidativas, antitrombóticas, antihipertensiva, inmunomoduladoras, entre otras. La actividad se basa en la composición inherente y la secuencia de sus aminoácidos, así como de su estructura. El tamaño de las secuencias activas puede variar de dos a veinte aminoácidos, y algunos péptidos son conocidos por sus propiedades multifuncionales (Korhonen & Pihlanto, 2003; H Meisel & FitzGerald, 2003; Shimizu, 2004).

Los péptidos de plantas, moléculas menores de 10 kDa, pueden ser divididas esencialmente dentro de dos categorías: péptidos bioactivos y péptidos degradadores que resultan de la actividad de enzimas proteolíticas (Fricker, Lim, Pan, & Che, 2006).

Los péptidos bioactivos han sido definidos como fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones del cuerpo y que finalmente pueden, influenciar en la salud (Kitts & Weiler, 2003).

En las plantas, muchas de las proteínas ubicadas en el compartimiento extracelular y la endomembrana están glicosiladas, es decir, un grupo azúcar se une de forma covalente a una proteína para formar una glicoproteína, lo cual trae como consecuencia un gran impacto tanto es sus propiedades fisicoquímicas como para sus funciones biológicas. Las glicoproteínas, participan en la formación de la pared celular, diferenciación de tejidos, embriogénesis y adhesión sexual en algunas especies de plantas (Berg, Stryer, Tymoczko, & Macarulla, 2008; Ren, Bretthauer, & Castellino, 1995).

Las secuencias glucídicas de las glicoproteínas son muy variadas, según los tipos moleculares y las especies estudiadas. Sin embargo, las secuencias mejor conocidas presentan analogías en las zonas próximas a la unión con la proteína. Si bien las distintas cadenas glucídicas de una glicoproteína son aparentemente iguales, se han encontrado ligeras modificaciones estructurales entre ellas. La composición de la fracción proteica es variable de unas glicoproteínas a otras. No está claro cuáles son los aminoácidos implicados en la unión con la cadena glucídica, sin embargo las funciones tan diversas de las

glicoproteínas son resultado directo de sus estructuras (Hernández Rodríguez & Sastre Gallego, 1999).

Los carbohidratos están presentes en un porcentaje en peso mucho menor en las glicoproteínas que en los proteoglicanos, de hecho muchas de las glicoproteínas se forman por la unión de carbohidratos a proteínas solubles. La naturaleza hidrofílica y polar de los azúcares pueden cambiar dramáticamente las características químicas de la proteína a la cual están glicosilando (Berg *et al.*, 2008; Noiva, 2010).

Las plantas representan una fuente importante de proteínas y péptidos con numerosas actividades biológicas no sólo como parte de su metabolismo, sino también benéficas para el ser humano.

Los péptidos y proteínas han sido aislados de las raíces, semillas, flores, tallos y hojas de plantas y han demostrado diversas actividades.

2 Proteínas

Las proteínas son macromoléculas orgánicas, constituidas básicamente por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N); aunque pueden contener también azufre (S) y fósforo (P) y, en menor proporción, hierro (Fe), cobre (Cu), magnesio (Mg), yodo (I), entre otros (Calvo Bruzos, Gómez Candela, Royo Bordonada, & López Nomdedeu, 2012). Estas moléculas corresponden a las estructuras primarias dentro del metabolismo de los seres vivos, junto con los carbohidratos y lípidos. En general, las proteínas pueden clasificarse de acuerdo a:

1. Sus propiedades físicas y/o químicas: grupos de proteínas basados en su tamaño, estructura, solubilidad o grado de basicidad.
2. El tipo de moléculas al que pueden unirse: lipoproteínas (grupo prostético lipídico), nucleoproteínas (grupo prostético núcleo proteico), cromoproteínas (grupo prostético pigmento), metaloproteínas (grupo prostético metálico) y glicoproteínas (grupo prostético carbohidrato).
3. La función en la célula: pueden ser agrupadas en tres clases generales basadas en su función, las cuales corresponden a proteínas estructurales (proteínas de membranas, paredes celulares o citoesqueletos), proteínas de almacenamiento y enzimas.

De acuerdo a ésta última clasificación, en las plantas, las proteínas de almacenamiento son encontradas en forma abundante en las semillas, sirven como fuentes de nitrógeno y de aminoácidos que son utilizados durante su germinación. Durante su desarrollo, las semillas sintetizan relativamente grandes cantidades de reservas alimenticias que son acumuladas en tejidos de almacenamiento tales como el cotiledón o endosperma. Estos materiales de reserva son los que permitirán el crecimiento y desarrollo de la plántula, hasta que ésta pueda establecerse como una unidad fotosintetizadora y comenzar su vida autótrofa

independiente. Entre estas sustancias de reserva se incluyen lípidos, carbohidratos, proteínas, y varios componentes inorgánicos (Duranti, 2006).

Las proteínas de reserva, denominadas de este modo por creerse que no desempeñan función metabólica o estructural alguna, están acumuladas en cuerpos específicos, cuerpos proteicos, que se encuentran al azar en el citoplasma. Durante la germinación, estas sustancias son hidrolizadas y transportadas al eje embrionario en crecimiento, produciendo un cambio en las estructuras. Durante esta etapa, los cuerpos proteicos sufren un aumento de tamaño, y las proteínas empiezan a ser desnaturalizadas por las enzimas proteolíticas (Duranti, 2006; Hong *et al.*, 2008).

En general, las proteínas de origen vegetal presentan muy diversas actividades biológicas no sólo como parte de la estructura de la planta o como parte fundamental de almacenamiento, además en la defensa contra diferentes plagas. Dichas proteínas son actualmente motivo de estudio por sus posibles aplicaciones dentro de la agricultura. Además, el enfoque de la proteómica dentro de los productos naturales ha tomado importancia por su potencial aplicación dentro la biotecnología.

Las propiedades antimicrobianas de proteínas y péptidos de diferentes fuentes han sido estudiadas por cerca de 4 décadas, debido al incremento en la resistencia de los microorganismos a los fármacos disponibles. Los péptidos y proteínas expresan su actividad antimicrobiana ocasionando lisis por unión y ruptura de la membrana de los microorganismos, otros penetran la membrana e interactúan con el interior de la célula u ocasionan la formación de poros produciendo fuga del contenido intracelular y por ende, causando su muerte (X. Huang, Xie, & Gong, 2000).

Los péptidos y proteínas han sido aislados de raíces, semillas, flores, tallos y hojas de plantas y han demostrado actividad contra fitopatógenos, así como contra bacterias patógenas para los seres humanos (Pelegriani & Franco, 2005; Selitrennikoff, 2001; Terras *et al.*, 1995).

3 Péptidos

Los péptidos funcionales o bioactivos han sido definidos como tales, desde hace casi dos décadas. Desde aquel tiempo, se definieron como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrolisis química o enzimática (Hans Meisel, 1998). Sin embargo, unos años después, (Kitts & Weiler, 2003) retomaron el concepto para definirlo como fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones del cuerpo o condiciones y que pueden finalmente, influenciar en la salud. Generalmente estas moléculas son de un tamaño pequeño que va de 3 a 20 aminoácidos, aunque en ocasiones puede exceder esa longitud (Shahidi & Zhong, 2008). Inclusive se sabe que al administrarse por vía oral al ser humano, estas moléculas pueden ejercer efectos sobre los diversos sistemas, tales como el circulatorio, digestivo, inmunológico y nervioso (Korhonen & Pihlanto, 2003; H

Meisel & FitzGerald, 2003). En este sentido, se cuentan con reportes científicos de que estas moléculas pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a nivel sistémico; por tanto, se dice que los péptidos bioactivos podrían influir en el metabolismo celular del ser humano y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Roberts & Zaloga, 1994).

Más tarde mencionan que los péptidos bioactivos forman parte de la respuesta innata provocada por la mayoría de los organismos. La mayoría de los péptidos bioactivos producidos en las plantas poseen propiedades microbicidas, también forman parte de la señalización celular. Mencionan que la acción biológica de péptidos bioactivos inicia con la unión a la membrana diana seguido por permeabilización de la membrana y ruptura (Salas, Badillo-Corona, Ramirez-Sotelo, & Oliver-Salvador, 2015).

Desde entonces, las proteínas de diferente origen (animal y vegetal) han sido utilizadas para el aislamiento de péptidos con diferentes actividades biológicas para el ser humano, así como su empleo en la biotecnología (Korhonen & Pihlanto, 2003). Inclusive dada la importancia que han tomado los péptidos por sus múltiples actividades, desde el 2006 se tiene el reporte de estudios donde se dedicaron a obtener péptidos modificados, diseñados a partir de péptidos naturales, con el fin de incrementar la actividad de estos últimos (Martínez Augustin & Martínez de Victoria, 2006).

Pese a la tecnología que se aplica sobre estas moléculas, para la optimización de un efecto benéfico para el ser humano, actualmente estas moléculas siguen siendo estudiadas, siendo ya reportadas algunas de ellas con diversas actividades.

En la actualidad, algunas cepas de microorganismos patógenos han desarrollado resistencia a los antibióticos convencionales y actualmente disponibles. Esto refleja una gran amenaza a la salud de las personas, por lo que el desarrollo de nuevos tipos de antibióticos es una manera eficaz para resolver el problema que se ha generado por parte de los microorganismos. Un gran grupo de compuestos naturales de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana ha sido aislado de plantas y animales, como lo son los péptidos con la mayor generalización, los cuales representan una nueva generación de antimicrobianos y precisamente entre una de las actividades más estudiadas para péptidos, es la antimicrobiana.

TABLA 1. Proteínas y péptidos con actividad biológica.

Proteína o péptido	Origen	Actividad biológica	Referencia
Tioninas (defensinas) ciclotidas (ricas en glicina) albúminas 2S heveína		Antibacteriana	(Daly, Rosengren, & Craik, 2009; Pelegrini & Franco, 2005; Selitrennikoff, 2001; Witkowska, Bartys, & Gamian, 2008)
Heveína (Ac-AMP1 y Ac-AMP1)		Inhibición de <i>Bacillus megaterium</i> y <i>Sarcina lutea</i> en concentraciones de 40 y 250 g/mL, respectivamente	(Martins <i>et al.</i> , 1996)
Circulinas AB y ciclopsicotrida	Ciclótidas	Inhibición <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i> en concentraciones micromolares	(Tam, Lu, Yang, & Chiu, 1999)
Cn-AMP1 (876 Da)	<i>Cocos nucifera</i>	Antibacteriana contra Gram positivas y Gram negativas	(Mandal <i>et al.</i> , 2009)
Cy-AMP2 (4577.4 Da)	<i>Cycas revoluta</i>		
Ginkbilobina (4213.8 Da)	<i>Ginkgo biloba</i>		(H. Wang & Ng, 2000)
Kalata B2 (2979.4 Da)	<i>Oldenlandia affinis</i>	Antibacteriana contra Gram positivas	(Jennings, West, Waive, Craik, & Anderson, 2001)
Pg-AMP1 (6029.4 Da)	<i>Psidium guajava</i>	Antibacteriana contra Gram negativas	(Pelegrini <i>et al.</i> , 2008)
Defensinas, lectinas		Antifúngica contra fitopatógenos	(Yan <i>et al.</i> , 2015)
Glicoproteína (28 kDa)	<i>Withania somnifera</i> (tubérculo)	Antifúngica contra fitopatógenos: <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. verticilloides</i> Antibacteriana contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i>	(Girish <i>et al.</i> , 2006)
Glicoproteína AMPs (8 Da)	Mj- <i>Mirabilis jalapa</i>	Antifúngica contra <i>F. culmorum</i> .	(Cammue <i>et al.</i> , 1992)
Proteína (14 kDa)	<i>Aloe vera</i>	Antifúngica contra <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i> y <i>Candida albicans</i>	(Das <i>et al.</i> , 2011)
500 proteínas	Hojas de arroz	Unión, enzimática, facilitador de transporte, inhibidor, constituyente estructural, catalítica	(Cao <i>et al.</i> , 2014)
Lectina (8.7 kDa)	<i>Allium chinense</i>	Aglutinante 60 mg/mL Potencial anticancerígeno	(Xiao <i>et al.</i> , 2015)
Proteasas (M36, M35, M43, y S8)	<i>Onygena corvina</i>	Proteasas	(Y. Huang, Busk, Herbst, & Lange, 2015)
Frataxina subcelular	<i>Arabidopsis</i>	Bbiosíntesis del grupo hemo y azufre (Fe-S) en la región	(Turowski <i>et al.</i> , 2015)

		mitocondrial	
Lectina (35 kDa)	<i>Aloe vera</i>	Estimulación mitótica de linfocitos, activación del complemento, alternativa, antiinflamatoria, antiúlceras y antitumoral, además de presentar actividad mitogénica.	(Koike <i>et al.</i> , 1995)
Purotionina	<i>Triticum aestivum</i>	Capacidad de inhibir el crecimiento de algunos fitopatógenos tales como <i>Pseudomonas solanacearum</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> y <i>Corynebacterium michiganense</i>	(Fernandez de Caleyá, Gonzalez-Pascual, Garcia-Olmedo, & Carbonero, 1972)
Peptidomiméticos		Antibacteriana	(Citterio <i>et al.</i> , 2016)
Péptidos Pp-AMP1 y Pp-AMP2		Actividad contra varios fitopatógenos, incluyendo <i>Erwinia carotovora</i> , <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> y <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> , en una concentración de 13-25 mg/mL	(Witherup <i>et al.</i> , 1994)
SmAMP3	<i>Stellaria media L.</i>	Antifúngica a una concentración micromolar	(Rogozhin <i>et al.</i> , 2015)
Péptidos ricos en cisteína (NCR)	<i>Rhizobium</i>	Promueve la importación de péptidos NCR y proporciona protección contra microorganismos.	(Guefrachi <i>et al.</i> , 2015)
Beta-defensinas	<i>Oreochromis niloticus</i>	Potenciador de respuesta inmune	(Dong <i>et al.</i> , 2015)
Péptidos antifúngicos		Insecticida, antifúngico	(Faruck, Yusof, & Chowdhury, 2015)
Iturina A	<i>Bacillus</i>	Antifúngico	(Kawagoe <i>et al.</i> , 2015)
Péptidos antimicrobianos sintéticos (AMPS)		Antimicrobiana	(Datta <i>et al.</i> , 2015)
Péptido derivado de RhoA		Antiviral	(Ortega-Berlanga <i>et al.</i> , 2015)
Péptidos	Leche y los productos lácteos	Inmunomoduladores	(Gauthier, Pouliot, & Saint-Sauveur, 2006; Mulero Cánovas, Zafrilla Rentero, Martínez-Cachá Martínez, Leal Hernández, & Abellán Alemán, 2011)
Péptidos	Gluten de trigo	Estimulación postprandial de liberación de insulina	(Fukudome, Shimatsu, Suganuma, & Yoshikawa, 1995)
Péptidos	Hidrolizados de gelatina, de clara de huevo y productos lácteos, etc.	Antioxidantes	(Davalos, Gomez-Cordoves, & Bartolome, 2004; Gibbs, Zougman, Masse, &

			Mulligan, 2004; Gobbetti, Stepaniak, De Angelis, Corsetti, & Di Cagno, 2002; Graszkievicz, Żelazko, Trziszka, & Polanowski, 2007; Kim, Byun, Park, & Shahidi, 2001; Venereo Gutiérrez, 2002)
Polisacárido polimanano acetilado (APMP)	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	Todas las características que determinaron, indicaban que la actividad estabilizada dentro de la APMP pertenece a la familia peroxidasa secretora básica con varios usos biotecnológicos	(Vittori, Martin, & Sabater, 2012)
Péptidos	<i>Anethum graveolens</i>	Actividad membrano trófica (Cito tóxica).	(Kulikova <i>et al.</i> , 2015)
Péptido secuencia SVTIHHLGGGS	<i>Oryza sativa</i> y <i>Triticum urartu</i>	Reducción de la actividad <i>in vitro</i> de la poligalacturonasa.	(Warren, Kasun, Leonard, & Kirkpatrick, 2016)
Proteasas recombinantes pertenecientes a la familia Queratina S8	<i>Onygena corvina</i>	Actividad de degradación	(Y. Huang <i>et al.</i> , 2015)

4 Proteómica: un nuevo enfoque de estudio.

El término proteoma fue acuñado desde 1994 y es el equivalente lingüístico al concepto de genoma. Este término se define como el grupo completo de proteínas que son expresadas por el genoma completo durante el tiempo de vida de una célula. Actualmente la tendencia en el área proteómica es hacia el estudio de proteomas completos, interactomas, fosfoproteomas, secretomas y búsqueda de biomarcadores que a diferencia de los métodos basados en DNA y RNA, la ventaja de los marcadores proteómicos es su diversidad. Recientemente se ha desarrollado la proteómica para el estudio de los productos naturales, siendo las plantas una de las matrices más estudiadas dentro de ésta área. Han sido codificados entre 20-30000 genes en el genoma de las plantas de las cuales, casi 1000 corresponden a proteasas, y más de un centenar pertenecen a las 15 familias conocidas de proteasas ricas en cisteína las cuales se sintetizan como pro-enzimas (Brown, 2008).

De acuerdo a lo anterior, las plantas han evolucionado para sintetizar una variedad de compuestos nocivos para hacer frente a circunstancias desfavorables, entre los cuales se encuentran un gran grupo de proteínas tóxicas que juegan un papel crítico en la defensa de la planta contra los depredadores y los microorganismos. Hasta ahora, una amplia gama de

proteínas perjudiciales ha sido descubiertas en plantas incluyendo lectinas, proteínas inactivadoras de ribosomas, inhibidores de la proteasa, ureasas, péptidos antimicrobianos y toxinas formadoras de poros. Para desempeñar su papel en la defensa de las plantas, estas proteínas presentan diversos grados de toxicidad para animales, insectos, bacterias u hongos. Numerosos estudios se han llevado a cabo para investigar los efectos tóxicos y modo de acción de estas proteínas vegetales con el fin de explorar su posible aplicación. De hecho, a causa de sus actividades biológicas, proteínas vegetales tóxicas son también consideradas como herramientas potencialmente útiles en la protección de cultivos y en aplicaciones biomédicas, tales como el tratamiento del cáncer. Los genes que codifican proteínas vegetales tóxicas se han introducido en los genomas de los cultivos utilizando tecnología de ingeniería genética con el fin de aumentar la resistencia de la planta frente a patógenos y enfermedades (Dang & Van Damme, 2015).

En la era post-genómica, muchas herramientas se han desarrollado para acelerar la investigación de las funciones de los genes. Las proteínas fluorescentes han sido ampliamente utilizadas como etiquetas de proteínas para estudiar su localización subcelular en las plantas. En este sentido, se han generado varios marcadores con fluorescencia de orgánulos en dicotiledóneas. Sin embargo, en el modelo de la planta de arroz, faltaban las líneas de marcador fluorescente u orgánulos útiles y fiables por lo que (Wu *et al.*, 2016) desarrollaron ocho marcadores de orgánulos basados en las buenas prácticas agrarias del arroz transgénico y crearon un conjunto de vectores de enlace basados en DsRed para combinar con las líneas de marcador. La co-localización de líneas de marcador GFP-fusión y las proteínas DsRed de fusión proporcionaron una plataforma conveniente *in vivo* o *in vitro* para el análisis de la localización subcelular de las proteínas de arroz.

Además recientemente (Li *et al.*, 2015) compararon las propiedades bioquímicas y enzimáticas de cuatro proteínas oxalato oxidasa (OsOx1-4) purificadas a partir de las hojas de plantas transgénicas del arroz. Las enzimas oxalato oxidasas representan un grupo de moléculas importantes dentro del metabolismo de las plantas ya que producen la oxidación de los oxalatos, provocando una menor biomineralización en las plantas y por ende, su incapacidad de adaptación hacia ciertos ambientes. Dichos autores, mencionan que la alineación de sus secuencias de aminoácidos reveló divergencia principalmente en los péptidos de señalización. La masa de OsOx01 resultó muy similar a la del OsOx03, pero fue menor que la del OsOx02 y OsOx04, mientras que la subunidad de la primera (OsOx01) fue menor que la de OsOx03. El OsOx01 y OsOx04 tuvieron una alta actividad enzimática a pH 8,5 resultando cercano al pH óptimo (4,0); el OsOx03 no tuvo mucha variabilidad en el pH 6-9. El OsOx 02 y OsOx03 mantuvieron su actividad enzimática al calentarse por una hora a 70° C, mientras que OsOx01 y OsOx04 perdieron el 30% de su actividad. Esto permitió establecer algunas condiciones para la actividad enzimática de las proteínas ya mencionadas, proporcionando de esta manera información valiosa para la producción de plantas transgénicas.

Se conoce que la traducción es uno de los procesos que requieren de mayor energía en una célula viva y por lo tanto está regulado cuidadosamente. Dicha actividad, está estrechamente

vinculada con el control del crecimiento y el mecanismo de regulación del mismo en las plantas. El ribosoma eucariota, el centro de estos procesos importantes, se compone de cerca de ochenta proteínas diferentes (dependiendo de la especie) y cuatro grandes RNAs reunidos en dos subunidades altamente conservadas. En las plantas y en menor medida en las levaduras, las R-proteínas están codificadas por más de un gen transcrito activamente. Con frecuencia los genes no codifican proteínas idénticas y están reguladas por las condiciones de crecimiento y desarrollo, por tanto, los ribosomas poseen un contenido heterogéneo de proteínas. La importancia fisiológica de regulación y de esta heterogeneidad es aún desconocida. Sin embargo actualmente se sabe que los ribosomas citosólicos de *Arabidopsis thaliana* son grandes complejos que contienen cerca de 81 proteínas ribosomales (R-proteínas) distintas, cuatro ARN ribosómicos (ARNr) y proteínas asociadas (no-ribosomales), además de que en las plantas las r-proteínas de los ribosomas citosólicos están codificadas por diferentes genes. (Hummel *et al.*, 2015) realizaron una investigación proteómica de la traducción activa de los ribosomas citosólicos en diferentes etapas de desarrollo de la planta *A. thaliana*, ya que las distinciones en las secuencias de los miembros de la familia de genes que codifican a las R-proteínas, son una fuente de variación entre los ribosomas. Estos autores identificaron un total de 70 diferentes R-proteínas marcando una base importante para futuras investigaciones sobre la estructura dinámica y la función de los ribosomas de plantas.

Se ha reportado también, que la traducción mitocondrial implica una compleja interacción entre características y funciones, que aunque se han reconocido los componentes básicos de la traducción mitocondrial, se han identificado muy pocos factores proteicos que ayuden a los ribosomas para la codificación (ARNm) en plantas superiores. (Haili *et al.*, 2016) identificaron una proteína (Mtl1) de la misma planta modelo *A. thaliana*, demostrando que es esencial para la traducción de la subunidad mitocondrial NADH deshidrogenasa 7. Además, establecieron que la proteína Mtl1 es fundamental para entender la multifuncionalidad de las proteínas como parte del metabolismo de las plantas y los mecanismos que rigen la traducción del ARNm y el empalme de intrones en las mitocondrias de plantas.

En el mismo año, Panstruga, Baumgarten, & Bernhagen, encontraron que el genoma de *A. thaliana* alberga tres genes, de los cuales dos están principalmente expresados en órganos aéreos, mientras que el tercer gen muestra la acumulación de transcripción inducible por estrés. El producto de este último gen probablemente se localiza en los peroxisomas. La predicción de la estructura sugiere, según los autores, que las tres proteínas denominadas como MDL (MIF-HsDDT) de *Arabidopsis* se asemejan a la estructura secundaria y terciaria de MIF humano. Además se tiene que las proteínas similares a MIF se encuentran en todas las especies del reino vegetal, con una complejidad cada vez mayor conforme avanza evolutivamente los taxones vegetales. Finalmente, predijeron que las proteínas vegetales MDL carecen de actividad oxidoreductasa, pero posiblemente compartan la actividad con la tautomerasa humana MIF/DDT.

Igualmente la replicación del ADN y la transcripción regulan el desarrollo de plantas que son dependientes de la accesibilidad a la cromatina. Las proteínas pertenecientes a la familia de dominio AgeNet/Tudor son conocidas como histonas con modificación de "lectores" y se clasifican como proteínas de remodelación de la cromatina. Las modificaciones de las histonas y remodelación de la cromatina tienen profundos efectos sobre la expresión génica, así como en la replicación del ADN, sin embargo, el cómo de estos procesos están integrados estos procesos, no ha sido completamente dilucidado. (Brasil *et al.*, 2015) analizaron la familia de proteínas de dominio AgeNet/Tudor en el reino vegetal y estudiaron la organización de esta familia durante la evolución de las plantas. Dentro del desarrollo de este estudio, caracterizaron un miembro de proteínas de *A. thaliana* con nombre AIP1, que alberga dominios AgeNet/Tudor y DUF724. Demostraron que AIP1 interactúa con ABAP1, un regulador de replicación del ADN y la transcripción de genes en la planta, con una modificación de las histonas de la planta "lector" (LHP1) y con las histonas no modificadas. De acuerdo con los autores AIP1 se expresa en los tejidos reproductivos y determina la temporización, retrasos y regulación del desarrollo de la flor, sentando de esta manera la posible intervención dentro de la regularización del desarrollo de las plantas.

Dentro de la clasificación de las proteínas de acuerdo con su función se encuentran también las enzimas, que aunque se han reconocido ampliamente y ya han sido estudiadas desde un enfoque biotecnológico en plantas, recientemente han sido estudiadas como indicadores de crecimiento vegetal. En este sentido, *Trichoderma atroviride* es un hongo simbiótico que interactúa con las raíces y estimula el crecimiento vegetal y la defensa. Las plántulas de *Arabidopsis* cultivadas con *T. atroviride* han mostrado una raíz alterada y una mayor biomasa comparándolas con las plantas cultivadas axénicamente. Estos efectos se relacionaron con la actividad incrementada de la proteína mitogen-activada quinasa 6 (MPK6) ya que las raíces primarias mutantes de MPK6 mostraron inhibición del crecimiento por *T. atroviride*. Se sabe que *T. atroviride* produce etileno (ET), el cual aumenta con L-metionina, por lo tanto se ha demostrado que *T. atroviride* altera el sistema de raíces MPK6, así como su modulación de la actividad, la producción de ET y la acción de auxina (Contreras-Cornejo *et al.*, 2015).

Además se tiene el reporte de una proteína ligasa hect ubiquitina (UPL) que se caracteriza por que contiene un dominio hect conservado de aproximadamente 350 aminoácidos en el extremo C terminal. Actualmente se sabe que algunas UPLs pueden estar involucradas en el desarrollo de tricomas y la senescencia de las hojas en *Arabidopsis*. Esto ha permitido asociar la función de las mencionadas proteínas especialmente en las plantas rosáceas (Xu, Xing, Cui, Chen, & Wang, 2016).

La formación de órganos laterales en las plantas está muy bien regulada por factores de transcripción y hormonas tales como auxinas y brasinoesteroides. Bajo esta premisa, identificaron al péptido denominado como TAX1 como el primer péptido de una planta con una actividad de señalización, el cual influye en la separación lateral de órganos e implica la existencia de una cascada de señales que regulan el desarrollo de la planta modelo *Arabidopsis*. Estos autores confirman que la formación de órganos está regulada por la

transcripción y por hormonas como auxinas y brasinoesteroides. Además establecieron que el péptido de señalización encontrado (TAX1) es rico en cisteína, sin embargo la sobre explotación de la misma causó menor brote y un menor desarrollo de la raíz primaria (Colling *et al.*, 2015).

Otra planta de interés comercial es la *Nicotiana tabacum*. En este caso, la proteína 4/1 es de función desconocida pero está codificada por un gen de una sola copia en la mayoría de las plantas superiores. Se ha demostrado que la proteína 4/1 de *N. tabacum* (proteína Nt-4/1) posee una estructura alfa-helicoidal y se ha expresado predominantemente en los tejidos conductores. (Morozov *et al.*, 2015) realizaron el análisis de genes 4/1 y las proteínas codificadas de las plantas rastreras, sugiriendo que dichas proteínas son probablemente importantes para el desarrollo de plantas pero no necesarias para una función metabólica primaria en las mismas.

Se tiene bien establecido por otro lado, que los genomas de las plantas codifican varias secuencias pequeñas de RNAs que funcionan en distintas vías de silenciamiento. Sin embargo, la abundancia y diversidad de clases pequeñas de ARN varía entre las especies de plantas, lo que sugiere la coevolución entre adaptaciones ambientales y mecanismos de silenciamiento de genes. La biogénesis de los pequeños RNAs en las plantas se sabe, pero actualmente se está empezando a descubrir su regulación y actividad compleja. (Borges & Martienssen, 2015) mostraron la biogénesis de los pequeños ARN de plantas, como microRNAs, RNAs secundarios y RNAs heterocromáticas, así como sus diversas funciones celulares y de desarrollo, en particular en las transiciones reproductivas, la importancia genómica y para mutación.

Asimismo se tiene el reporte de proteínas con zinc, las cuales se caracterizan por la presencia de tres residuos de cisteína y un residuo de histidina, desempeñando papeles importantes en el procesamiento del ARN en las plantas. Las proteínas con zinc han mostrado capacidades para funcionar en tolerancia de estrés. (Chen *et al.*, 2015), analizaron dichas proteínas en *Zea mays*, *Oryza sativa*, y *Sorghum bicolor*. Estas, se dividieron en cuatro grupos basados en el análisis filogenético y reportaron inversiones, duplicaciones y supresión, demostrando que esto sucede en el transcurso de la evolución además de que investigaron los patrones que se producen dentro del proceso evolutivo de algunos pares de genes que confieren tolerancia al estrés abiótico.

Actualmente se sabe que la región básica de leucina (bzip) es uno de los factores de transcripción (TF) importante en familias vegetales, asociadas también con respuestas a estrés abiótico. (Que *et al.*, 2015) clasificaron 10 factores bZIP en la zanahoria con base en sus dominios de unión al ADN. Se analizaron las que actúan como reguladores en cis y estados plegables de estos 10 factores. Los autores sugieren su importancia durante el curso de la evolución de las plantas. Además de que actúan en elementos cis y el estado de plegado de las proteínas, son importantes para la unión al ADN y podrían afectar a la expresión génica. De acuerdo con los autores seis genes mostraron respuestas a estrés abiótico.

Igualmente se sabe que los cambios intracelulares en iones de calcio (Ca^{2+}) en respuesta a diferentes estímulos bióticos y abióticos, son detectados por diversas proteínas de sensor en la célula vegetal. La calmodulina (CaM) es una de las proteínas de detección de Ca^{2+} más ampliamente estudiada y ha demostrado estar implicada en la transducción de señales por presencia de Ca^{2+} . Una serie de proteínas de unión a CaM también han sido implicados en las respuestas al estrés en las plantas, destacando el papel central desempeñado por la CaM en la adaptación a las condiciones ambientales adversas. La identificación y caracterización de proteínas CaM modulada en relación a diferentes estreses abióticos podría, llegar a ser esencial para una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares implicados en la tolerancia al estrés abiótico en plantas. Inclusive se ha demostrado que CaM puede modular varias actividades de quinasas y fosfatasa, proporcionando así mayor versatilidad a las vías de transducción de señales de estrés asociada. (Virdi, Singh, & Singh, 2015) proponen a CaM como un integrador de diferentes vías de señalización de estrés, que permite a las plantas mantener la homeostasis entre los diferentes procesos celulares y sus implicaciones en el aumento de la tolerancia al estrés abiótico en plantas.

Adicionalmente se sabe que las plantas han evolucionado un gran número de factores de transcripción (TF), los cuales se han enriquecido a través de genes duplicados, destacando sus funciones en redes reguladoras complejas. Los genes similares a AP2 / EREBP constituyen una gran familia de factores de transcripción en plantas y participan en el desarrollo y las respuestas al estrés. Para sondear la conservación y divergencia de los genes AP2 / EREBP, (Zeng *et al.*, 2015) analizaron los patrones de duplicación de la familia *Brassicaceae* e identificaron las proteínas de *Arabidopsis* que interactúan con las proteínas AP2 / EREBP. Encontraron que muchos duplicados AP2 / EREBP son generados en un estadio temprano en la historia *Brassicaceae* pero que se pierden rápidamente, pero muchos otros fueron retenidos en todas las especies de *Brassicaceae* probadas, lo que sugiere divergencia temprana funcional seguida de conservación persistente. Los autores suponen que la interacción de las proteínas AP2 participa en muchas funciones del desarrollo y las respuestas al estrés, incluyendo la fotomorfogénesis, el desarrollo de flores, patogenicidad, respuestas a la sequía y al frío, al ácido abscísico y la señalización de la auxina.

Uno de los factores de mayor importancia dentro del estrés abiótico, es la oxidación o también denominado como estrés oxidativo debido al exceso de especies de radicales de oxígeno (ROS), los cuales contribuyen al desarrollo de diferentes enfermedades. El uso de antioxidantes puede prevenir estas enfermedades al contrarrestar los niveles de ROS. (Torres-Fuentes, Contreras, Recio, Alaiz, & Vioque, 2015) identificaron y secuenciaron algunos péptidos con actividad antioxidante. Las principales secuencias que determinaron fueron ALEPDHR, TETWNPNHPEL, FVPH y SAEHGSLH las cuales, según los autores, son parte principal de una proteína de semilla. La mayoría de los péptidos que fueron identificados contenían histidina a lo que se le ha demostrado una actividad antioxidante. Estos resultados muestran que los péptidos antioxidantes representan un foco de interés para las industrias alimentarias y farmacéuticas para el desarrollo de nuevos productos nutracéuticos y alimentos funcionales.

Por otro lado las rizobacterias, son promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) que facilitan el crecimiento y mejoran la resistencia sistémica inducida (ISR) de las plantas contra una variedad de problemas ambientales. (Kwon *et al.*, 2016) realizaron un análisis integrador en el proteoma, transcriptoma y metaboloma de la raíz y brotes de *Arabidopsis* para investigar respuestas a la conocida cepa *Paenibacillus polymyxa* (*P. polymyxa*) E681. Se reporta que los pesos de raíces secas y brotes frescos incrementaron, mientras que la longitud de la raíz se redujo mediante con el tratamiento con *P. polymyxa* E681. Mediante el enfoque 2DE en conjunto con el análisis MALDI-TOF/ TOF revelaron un total de 41 proteínas (17 puntos en la raíz, 24 puntos en brote) que son expresadas diferencialmente en respuesta a *P. polymyxa* E681. Mediante procesamiento biológico y análisis de la bioinformática basada en la función molecular dieron lugar a su clasificación en siete grupos diferentes de proteínas. De éstos, 36 proteínas que incluyen el metabolismo de aminoácidos, antioxidantes, fotosíntesis, defensa y respuesta al estrés y proteínas relacionadas con las hormonas vegetales fueron enriquecidas, mientras que cinco proteínas incluyendo tres hidratos de carbono y un aminoácido estaban relacionados con el metabolismo, y una proteína identificada que resultó desconocida. Los autores sugieren que *P. polymyxa* E681 podría funcionar como un promotor de crecimiento inducido por el metabolismo, además de ayudar a la defensa de las plantas en contra de hongos patógenos mediante la activación de proteínas relacionadas con la defensa.

Recientemente se ha demostrado que los transcritos primarios de algunos péptidos (miPEPs), son codificados por miRNA y son capaces de aumentar la transcripción de su miRNA asociado. (Couzigou, Laouressgues, Becard, & Combiere, 2015) discuten la posibilidad de utilizar miPEPs como una nueva herramienta para el análisis funcional de los miembros individuales de las familias miARN en plantas, incluso en plantas no modelo lo que podría evitar la transformación transgénica y minimizar la interpretación de artefactos. También plantean varias preguntas fundamentales y cruciales que deben ser la dirección de una comprensión más profunda de los mecanismos celulares y moleculares que subrayan la actividad reguladora de miPEPs.

Por otro lado, el ABC (transportador de unión a ATP) corresponde a la familia de transportadores en las plantas superiores en donde se sabe que son altamente distribuidos, en comparación con los de los mamíferos. Algunos miembros del transportador ABC vegetal, de la subfamilia B (ABCB) presentan una especificidad muy alta por cierto sustrato en comparación con sus homólogos de mamíferos que a menudo se asocian con fenómenos de resistencia. (Aryal, Laurent, & Geisler, 2015) exponen las funciones destacadas de transportadores ABC de mamíferos y plantas y resumen su función sobre la regulación post-transcripcional con un enfoque en la fosforilación de proteínas. Según los autores, tomados en conjunto, parece que los transportadores ABC muestran una regulación evolutiva conservada, pero al mismo tiempo compleja por la fosforilación de proteínas, que aparentemente es estrechamente conectada con las interacciones proteína-proteína.

Como se ha descrito anteriormente los microorganismos, principalmente bacterias, han desarrollado resistencia a múltiples fármacos. Los péptidos antimicrobianos (AMP)

derivados de animales y plantas emergen como una posible alternativa terapéutica, donde se propone la sustitución del antimicrobiano convencional. Se tienen algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos, no solo de origen vegetal, tal es el caso de los anuros los cuales son una de las fuentes naturales más ricas de AMP. (Nacif-Marcal *et al.*, 2015) trabajaron varios ciclos de clonación de ADNc de la piel de la rana arborícola brasileña (*Hypsiboas semilineatus*) que condujeron al aislamiento de una secuencia que codifica un precursor nueva AMP. El AMP Hs-1, tiene 20 residuos de aminoácidos, la mayoría en hélice alfa y con un peso molecular de 2144.6 Da. Éste péptido mostró una actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas pero no mostró ningún efecto contra bacterias Gram-negativas, lo que sugiere que Hs-1 puede tener una selectiva acción para las bacterias Gram-positivas.

Asimismo se ha estudiado la actividad de proteínas con actividad antimicrobiana desde un enfoque proteómico. Se tiene el reporte de que proteínas pequeñas ricas en cisteína derivadas de patógenos (SSCP) son conocidas por ser una fuente común de efectores de hongos que provocan la resistencia o susceptibilidad de plantas hospedantes. Este grupo de proteínas no han sido bien estudiadas pese a que son la causa principal de fusariosis de la espiga (FHB), una enfermedad devastadora de trigo. (Lu & Edwards, 2016) reportaron un análisis exhaustivo de SSCPs codificadas en el genoma de este hongo y la selección de las proteínas efectoras a través de la proteómica y la secuencia de la transcripción. Identificaron un total de 190 SSCPs en el genoma de *Fusarium graminearum* en base a la presencia de secuencias N-terminales del péptido señal, tamaño y el contenido de cisteína ($\geq 2\%$) de la proteínas maduras. La secuencia de análisis sugirió que 17 SSCPs conservan dominios funcionales, incluyendo dos homólogas a Ecp2, un efector conocido producido por el *Cladosporium fulvum*, un patógeno del tomate. El método basado en secretoma-*in vitro* que los autores proponen, puede ser aplicable para la identificación de efectores candidatos en otros patógenos ascomicetos de plantas de cultivo.

Por otro lado, durante la nodulación de las leguminosas suele presentarse infecciones en los pelos radiculares. Dicha infección requiere una reorganización del citoesqueleto de actina para permitir el establecimiento de estructuras de infección producidos por plantas llamados hilos de infección. (Qiu *et al.*, 2015) identificaron un gen necesario para la infección en los pelos radiculares de *Lotus japonicus* por *Mesorhizobium loti*, denominado Scarn (SCAR-nodulación). Aunque la proteína Scarn está relacionada con SCAR2 y SCAR4 proveniente de *Arabidopsis thaliana*, identificaron otras proteínas-Scarn en las legumbres, inclusive los análisis de filogenia hicieron que sugiriera que Scarn puede haber surgido a partir de una duplicación de genes y adquirido funciones especializadas en simbiosis nódulo de la raíz.

Adicionalmente, se sabe que *Apolygus lucorum* es una de las plagas agrícolas más importantes con amplia gama de huéspedes con hábitos de alimentación crípticos en China. El comportamiento químico sensorial juega un papel importante en muchas etapas cruciales en la vida de *A. lucorum*, tales como la detección de señales de feromonas sexuales durante la época de reproducción y fragantes olores durante la floración de la planta huésped. Las proteínas de unión a odorantes (OBP)-están implicadas en las etapas iniciales de

reconocimiento bioquímicos en la percepción semiquímica. (Yuan *et al.*, 2015) utilizaron un enfoque basado en transcriptómica para identificar potenciales OBP en *A. lucorum*. Identificaron en total 38 genes putativos de OBP, en donde el análisis filogenético reveló que las proteínas OBP de *A. lucorum* están más estrechamente relacionados con las proteínas OBP de otras chinches. La mayoría de los ortólogos tenían patrones de expresión similares, lo que indica fuertemente que estos genes tienen la misma función en el olfato y gusto lo cual tiene una implicación importante en cultivos.

De igual manera, *Ralstonia solanacearum* es uno de los fitopatógenos más letales del mundo. Debido a su amplia gama de huéspedes, puede causar la enfermedad de marchitamiento en muchas especies de plantas de interés económico. (Elhenawy *et al.*, 2016) identificaron una O-oligosacaryltransferasa (O-OTasa) responsable de la proteína de la O-glicosilación en *R. solanacearum*. Mediante un análisis de la glicoproteomas revelaron que 20 proteínas, incluyendo pilinas de tipo IV son sustratos de este sistema de glicosilación. Aunque identificaron múltiples formas de glucano, la mayoría de los glicopéptidos se modificaron con un pentasacárido compuesto de HexNAc- (Pen) -Hex3, similar a la subunidad antígeno O del lipopolisacárido presente en múltiples cepas de *R. solanacearum*. Además, los autores llevaron a cabo un análisis proteómico comparativo, que permitió revelar que la pérdida de la glicosilación no está asociada con cambios proteoma.

Además, se ha estudiado las plantas modificadas genéticamente que expresan proteínas insecticidas. Uno de los estudios reportados es contra *Bacillus thuringiensis* (Bt), los cuales ofrecen opciones valiosas para el manejo de las plagas de insectos con beneficios ambientales y económicos. El maíz (*Zea mays*) híbrido ha tenido éxito en el control del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). (Bernardi *et al.*, 2015) optaron por realizar un tamizaje, seguida por la posterior selección del maíz MON 89034, el cual lo utilizaron para seleccionar una cepa de *S. frugiperda* capaz de sobrevivir contra Bt, tal como en el caso del maíz MON 89034, que expresa las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2. De acuerdo con los autores, la falta de una resistencia significativa a Cry2Ab2, la combinación de maíz MON 89034 con prácticas de gestión apropiadas sigue ofreciendo un control eficaz de *S. frugiperda* en Brasil.

En contraste con los mamíferos que poseen inmunidad adaptativa, las plantas dependen de su inmunidad innata basada en la inmunidad patrón desencadenada (PTI) y la inmunidad provocada por efector (ETI) para la defensa contra patógenos. De acuerdo con (Balmant *et al.*, 2015) las especies reactivas del oxígeno, conocidas por jugar un papel crucial en el PTI y ETI, pueden perturbar la homeostasis redox celular y conducir a cambios en las proteínas sensibles a redox a través de la modificación de los grupos sulfhidrilo de cisteína. Aunque la regulación redox es importante en distintos procesos biológicos, se sabe poco sobre las proteínas redox y cómo funcionan en el PTI y ETI. Dichos autores utilizaron tecnología proteómica para identificar las similitudes y diferencias de las modificaciones de la proteína redox en los genotipos susceptibles de resistencia en tomate y en respuesta a la infección por *Pseudomonas syringae*. Sus resultados en cuanto a los cambios redox los

compararon y corrigieron con los cambios en el nivel de proteínas. Identificaron un total de 90 proteínas redox con funciones en hidratos de carbono y metabolismo de la energía, biosíntesis de cisteína, sacarosa y brasinoesteroides, biogénesis de la pared celular, biosíntesis del almidón, en el desarrollo de la cutícula, el metabolismo de lípidos, la proteólisis, ciclo del ácido tricarbóxico, proteína de direccionamiento a vacuola, y la oxidación-reducción.

Adicionalmente se tiene reporte de una proteína antifúngica que fue denominada ginkbilobina, la cual fue purificada y clonada a partir de las semillas de *Ginkgo biloba*. Los homólogos de esta proteína pueden ser detectados en todas las plantas de semillas y el helecho *Selaginella heterosporic*. Dichos homólogos se conservan con respecto a ciertos dominios, fracciones peptídicos y zonas de cisteína específicas. Se considera que ginkbilobina puede activar la muerte celular actina-dependiente (Gao *et al.*, 2015).

Por otro lado, (Santamaria, Arnaiz, Diaz-Mendoza, Martinez, & Diaz, 2015) analizaron el papel potencial de C1A, un pro-peptido que actúa como regulador de las proteasas de cisteína con actividad contra artrópodos, coleópteros y ácaros. Comprobaron que las plantas de *Arabidopsis* transgénicas generaron y expresaron diferentes fragmentos de HvPap-1, un gen que contiene la secuencia de pro-peptido que posee actividad acaricida. Los autores establecieron que los pro-peptidos pueden controlar las plagas de ácaros y que dicha molécula podría ser aplicada como proteínas de defensa en los sistemas biotecnológicos.

Además de lo anteriormente descrito, se tienen actividades muy variadas que han sido reportadas desde un enfoque proteómico. En este sentido, se sabe que la prevención de la aparición y desarrollo de la inflamación es una estrategia terapéutica importante para el tratamiento de la lesión pulmonar aguda (ALI). Se ha demostrado que una gran cantidad de alimentos naturales y plantas tienen una potencial actividad anti-inflamatoria. La mangiferina, una xantona C-glucosil natural, se obtiene principalmente de las cáscaras y almendras de frutos de mango y de la corteza del árbol Mangifera. Se han desarrollado microesferas magnéticas modificadas con mangiferina-(MMS) sobre la base de la química modular para capturar las proteínas de mangiferina. Por espectrometría de masas y acoplamiento molecular, se identificó una proteína de 70 kDa de proteína con un choque térmico de 5 (Hspa5), y tirosina 3-monooxigenasa (ywhae) como proteínas de unión de mangiferina. Mediante un ensayo ELISA, la mangiferina indicó que ejerció un efecto anti-inflamatorio mediante la unión Hspa5 y ywhae para suprimir vías de señalización MAPK (J. Wang *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha estudiado el mecanismo de enfriamiento en *Physcomitrella patens*, determinando proteínas que están activas. La proteína RSP se localiza en grano, junto con el fotosistema II (PSII), pero la proteína LHCSR se encuentra principalmente en las membranas del estroma expuesto junto con el fotosistema I (PSI), y su distribución no cambia tras el tratamiento con luz. Cuando se utiliza la proteína fluorescente como un patrón interno, ésta permite la evaluación independiente de PSI y PSII en cuanto al rendimiento de fluorescencia. De acuerdo con (Pinnola *et al.*, 2015), debido a la contribución de la LHCII, *P. patens* tiene una concentración de PSI dos veces más grande con respecto al de las plantas superiores. Por lo tanto, LHCII que es muy abundante en las

membranas del estroma, puede ser empleado como blanco de enfriamiento por LHCSR. La toxina fotoactivada, cercosporina, producida por especies de *Cercospora* tiene una toxicidad casi universal a las células debido a su producción de especies de oxígeno reactivo, incluyendo oxígeno singulete. Por esa razón, especies de *Cercospora*, que son altamente resistentes a su propia toxina, son buenos candidatos para identificar genes para la resistencia a la misma y a las especies reactivas de oxígeno que produce. Se tiene el reporte de que el factor de transcripción de clúster zinc CRG1 (cercosporina gen de resistencia 1) es crucial para la resistencia por parte de las especies de *Cercospora* contra cercosporina (Beseli, Noar, & Daub, 2015). Adicionalmente se tienen reportes del estudio proteómico para una aplicación de calidad de algunos vegetales. Así, se tiene el reporte de *Phyllostachys vivax*, el cual es un bambú ornamental con hojas perennes. El tallo de esta planta puede exhibir un fondo de color amarillo dorado, marcado al azar con rayas verdes estrechas y amplias, pero a veces es de color verde claro con rayas amarillas. (Xia *et al.*, 2015) identificaron el mecanismo molecular que causa esta variación y encontraron que los niveles de expresión de EST, incluyendo PvESTs-F641 (JZ893845), PvESTs-F681 (JZ893885) y PvESTs-F798 (JZ894002), fueron significativamente mayores en las muestras verdes que en las muestras de color amarillo, mientras que PvESTs- R200 (JZ894906), PvESTs-R541 (JZ895247), PvESTs-R333 (JZ895039) y PvESTs-R266 (JZ894972) se encontraron en un nivel superior en las muestras de color amarillo. Los autores teorizan que las ESTs juegan un papel en la variación de color en las plantas, además la insuficiencia de proteína en la membrana fotosintética y lípidos en los tejidos de color amarillo podrían provocar la disfunción del cloroplasto y pueden dar lugar a la aparición de color amarillo en ciertas plantas.

Igualmente se tiene el reporte de los microARN (miRNA), los cuales representan una familia de pequeños ARN no codificantes que juegan un importante papel regulador en diversos procesos biológicos. Uno de estos procesos, es el de maduración de frutos en distintas plantas modelo. Sin embargo los miRNAs que se relacionan con el proceso de maduración de los frutos del plátano o también conocido como banano, siguen siendo desconocidos. (Bi, Meng, Ma, & Yi, 2015) investigaron la prevalencia de miARN de frutos de banano en respuesta a etileno o al tratamiento con 1-MCP usando un enfoque en secuenciación y análisis bioinformático combinado con la validación mediante RT-PCR cuantitativo. Fueron identificados un total de 125 miRNAs conocidos y 26 nuevos miRNAs a partir de tres bibliotecas. Descartaron algunos genes como factores de transcripción y otras proteínas funcionales implicadas estrechamente en el desarrollo y la maduración en otras especies de plantas, pero reportaron un total de 82 miRNAs expresados diferencialmente, los cuales están estrechamente asociados con el proceso de maduración. Un número limitado de hongos puede causar la enfermedad de marchitamiento en las plantas a través de la colonización del sistema vascular, el más conocido es *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporum*. Mediante secuenciación de todo el genoma y el uso de tamizajes proteómicos, (de Sain & Rep, 2015) identificaron algunas proteínas generalmente ricas en cisteína y enzimas que inducen necrosis. Aplicando experimentos de supresión de genes los autores proporcionan pruebas de que algunas de estas proteínas son necesarias para la patogenicidad, mientras que el papel de otras proteínas secretadas sigue siendo enigmática.

Por otro lado, el sistema inmune de la planta puede reconocer algunas proteínas secretadas o sus acciones, lo que resulta en la resistencia a enfermedades. Otro de los compuestos que son ampliamente conocidos por sus usos dentro de la industria, es el gossipol. Este compuesto corresponde a un polifenol que se produce en las plantas de algodón como defensa y protección contra plagas y patógenos. La biosíntesis de éste implica el acoplamiento oxidativo de hemi-gossipol y dos atropisómeros debido a la rotación impedida alrededor del enlace central binaftilo. Tal es su importancia económica, que (Effenberger *et al.*, 2015) identificaron los factores de producción de gossipol en la formación de algodón, para investigar su potencial para la síntesis de biarilo asimétrico. Dentro de su estudio, dichos autores encontraron una proteína dirigente de *Gossypium hirsutum* (GhDIR4) para conferir selectividad al acoplamiento de hemi-gossipol en presencia de la lacasa y O₂ como un agente oxidante. Finalmente con su estudio, lograron obtener el gossipol en más del 80% de exceso enantiomérico en comparación con gossipol racémico, en ausencia de la proteína GhDIR4. Con esto, la identificación de GhDIR4 puso de relieve el papel tan importante de las proteínas dentro del metabolismo secundario vegetal y eventualmente, como en este caso, la posibilidad de elevar la producción de un compuesto de interés para la industria.

5 Conclusión

Las proteínas y péptidos son motivo de estudio en diversas disciplinas dado que se ha demostrado que no únicamente presentan actividad estructural, sino que pueden presentar actividad biológica favorable para el ser humano o para la planta. Siendo los péptidos los más estudiados, ya que el propio fragmento puede presentar una actividad no relacionada con la proteína de origen.

La actividad biológica de estos compuestos es muy variada, desde antimicrobianos contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, fungicida, hasta inmunomoduladores y anticancerígenos, así como otros usos en el área de la salud.

Actualmente, con las herramientas de la proteómica se han desarrollado estudios que permiten la caracterización de proteínas y péptidos expresados por el genoma, con lo cual se han identificado y clasificado respecto a su función. Asimismo, ha sido posible establecer las interacciones entre estos compuestos y así esclarecer las redes funcionales y su dinámica en los procesos fisiológicos y patológicos, lo cual permite en consecuencia, la identificación de marcadores para el diagnóstico de enfermedades de humanos y plantas y su uso potencial como nuevos fármacos debido a su actividad biológica reportada.

La sinergia entre la genómica, bioinformática y la proteómica, ha aportado avances significativos a la ciencia médica, marcando un área importante de estudio para innovaciones futuras.

6 Referencias

- Aryal, B., Laurent, C., & Geisler, M. (2015). Learning from each other: ABC transporter regulation by protein phosphorylation in plant and mammalian systems. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 966-974. <http://doi.org/10.1042/BST20150128>
- Balmant, K. M., Parker, J., Yoo, M.-J., Zhu, N., Dufresne, C., & Chen, S. (2015). Redox proteomics of tomato in response to *Pseudomonas syringae* infection. *Horticulture Research*, 2, 15043. <http://doi.org/10.1038/hortres.2015.43>
- Berg, J. M., Stryer, L., Tymoczko, J. L., & Macarulla, J. M. (2008). *Bioquímica*. Barcelona, España: Reverté.
- Bernardi, D., Salmeron, E., Horikoshi, R. J., Bernardi, O., Dourado, P. M., Carvalho, R. A., ... Omoto, C. (2015). Cross-Resistance between Cry1 Proteins in Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) May Affect the Durability of Current Pyramided Bt Maize Hybrids in Brazil. *PloS One*, 10(10), e0140130-e0140130. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140130>
- Beseli, A., Noar, R., & Daub, M. E. (2015). Characterization of *Cercospora nicotianae* Hypothetical Proteins in Cercosporin Resistance. *PloS One*, 10(10), e0140676-e0140676. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140676>
- Bi, F., Meng, X., Ma, C., & Yi, G. (2015). Identification of miRNAs involved in fruit ripening in Cavendish bananas by deep sequencing. *BMC Genomics*, 16, 776. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1995-1>
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(12), 727-741.
- Brasil, J. N., Cabral, L. M., Eloy, N. B., Primo, L. M. F., Barroso-Neto, I. L., Grangeiro, L. P. P., ... Hemerly, A. S. (2015). AIP1 is a novel Agenet/Tudor domain protein from *Arabidopsis* that interacts with regulators of DNA replication, transcription and chromatin remodeling. *BMC Plant Biology*, 15, 270. <http://doi.org/10.1186/s12870-015-0641-z>
- Brown, T. (2008). *Genomas/ Genome*. Editorial Medica Panamericana Sa de.
- Calvo Bruzos, S. C., Gómez Candela, C., Royo Bordonada, M. Á., & López Nomdedeu, C. (2012). *Nutrición, salud y alimentos funcionales*. Madrid, España: UNED.
- Cammue, B. P., De Bolle, M. F., Terras, F. R., Proost, P., Van Damme, J., Rees, S. B., ... Broekaert, W. F. (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(4), 2228-2233.
- Cao, X., Gong, J., Chen, M., Yu, S., Bian, Y., & Cao, Z. (2014). [Analysis of rice leaves proteomes by liquid chromatography-tandem, mass spectrometry based on the purification using a novel affinity detergent removal spin column]. *Se pu = Chinese journal of chromatography / Zhongguo hua xue hui*, 32(11), 1181-1186.
- Chen, W.-J., Zhao, Y., Peng, X.-J., Dong, Q., Jin, J., Zhou, W., ... Ma, Q. (2015). Significant Microsynteny with New Evolutionary Highlights Is Detected through Comparative Genomic Sequence Analysis of Maize CCCH IX Gene Subfamily. *International Journal of Genomics*, 2015, 824287. <http://doi.org/10.1155/2015/824287>

- Citterio, L., Franzyk, H., Palarasah, Y., Andersen, T. E., Mateiu, R. V., & Gram, L. (2016). Improved in vitro evaluation of novel antimicrobials: potential synergy between human plasma and antibacterial peptidomimetics, AMPs and antibiotics against human pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 167(2), 72-82. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.10.002>
- Colling, J., Tohge, T., De Clercq, R., Brunoud, G., Vernoux, T., Fernie, A. R., ... Pauwels, L. (2015). Overexpression of the Arabidopsis thaliana signalling peptide TAXIMIN1 affects lateral organ development. *Journal of Experimental Botany*, 66(17), 5337-5349. <http://doi.org/10.1093/jxb/erv291>
- Contreras-Cornejo, H. A., Lopez-Bucio, J. S., Mendez-Bravo, A., Macias-Rodriguez, L., Ramos-Vega, M., Guevara-Garcia, A. A., & Lopez-Bucio, J. (2015). Mitogen-Activated Protein Kinase 6 and Ethylene and Auxin Signaling Pathways Are Involved in Arabidopsis Root-System Architecture Alterations by Trichoderma atroviride. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 28(6), 701-710. <http://doi.org/10.1094/MPMI-01-15-0005-R>
- Couzigou, J.-M., Lauressergues, D., Becard, G., & Combier, J.-P. (2015). miRNA-encoded peptides (miPEPs): A new tool to analyze the roles of miRNAs in plant biology. *RNA Biology*, 12(11), 1178-1180. <http://doi.org/10.1080/15476286.2015.1094601>
- Daly, N. L., Rosengren, K. J., & Craik, D. J. (2009). Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(11), 918-930. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2009.05.003>
- Dang, L., & Van Damme, E. J. M. (2015). Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, 117, 51-64. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.020>
- Das, S., Mishra, B., Gill, K., Ashraf, M. S., Singh, A. K., Sinha, M., ... Dey, S. (2011). Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from Aloe vera leaf gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 38-43. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.010>
- Datta, A., Ghosh, A., Airoidi, C., Sperandeo, P., Mroue, K. H., Jimenez-Barbero, J., ... Bhunia, A. (2015). Antimicrobial Peptides: Insights into Membrane Permeabilization, Lipopolysaccharide Fragmentation and Application in Plant Disease Control. *Scientific Reports*, 5, 11951. <http://doi.org/10.1038/srep11951>
- Davalos, A., Gomez-Cordoves, C., & Bartolome, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48-54. <http://doi.org/10.1021/jf0305231>
- de Sain, M., & Rep, M. (2015). The Role of Pathogen-Secreted Proteins in Fungal Vascular Wilt Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23970-23993. <http://doi.org/10.3390/ijms161023970>
- Dong, J.-J., Wu, F., Ye, X., Sun, C.-F., Tian, Y.-Y., Lu, M.-X., ... Chen, Z.-H. (2015). Beta-defensin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Sequence, tissue expression, and anti-bacterial activity of synthetic peptides. *Gene*, 566(1), 23-31. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.025>
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77(2), 67-82. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.11.008>

- Effenberger, I., Zhang, B., Li, L., Wang, Q., Liu, Y., Klaiber, I., ... Schaller, A. (2015). Dirigent Proteins from Cotton (*Gossypium* sp.) for the Atropselective Synthesis of Gossypol. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 54(49), 14660-14663. <http://doi.org/10.1002/anie.201507543>
- Ege, S. (2004). *Química orgánica: estructura y reactividad*. Reverté.
- Elhenawy, W., Scott, N. E., Tondo, M. L., Orellano, E. G., Foster, L. J., & Feldman, M. F. (2016). Protein O-linked glycosylation in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Glycobiology*, 26(3), 301-311. <http://doi.org/10.1093/glycob/cwv098>
- Faruck, M. O., Yusof, F., & Chowdhury, S. (2015). An overview of antifungal peptides derived from insect. *Peptides*. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.06.001>
- Fernandez de Caleyá, R., Gonzalez-Pascual, B., Garcia-Olmedo, F., & Carbonero, P. (1972). Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro. *Applied Microbiology*, 23(5), 998-1000.
- Fricker, L. D., Lim, J., Pan, H., & Che, F.-Y. (2006). Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(2), 327-344. <http://doi.org/10.1002/mas.20079>
- Fukudome, S., Shimatsu, A., Suganuma, H., & Yoshikawa, M. (1995). Effect of gluten exorphins A5 and B5 on the postprandial plasma insulin level in conscious rats. *Life Sciences*, 57(7), 729-734.
- Gao, N., Wadhvani, P., Muhlhauser, P., Liu, Q., Riemann, M., Ulrich, A. S., & Nick, P. (2015). An antifungal protein from *Ginkgo biloba* binds actin and can trigger cell death. *Protoplasma*. <http://doi.org/10.1007/s00709-015-0876-4>
- Gauthier, S. F., Pouliot, Y., & Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1315-1323. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.014>
- Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R., & Mulligan, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37(2), 123-131. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2003.09.010>
- Girish, K. S., Machiah, K. D., Ushanandini, S., Harish Kumar, K., Nagaraju, S., Govindappa, M., ... Kemparaju, K. (2006). Antimicrobial properties of a non-toxic glycoprotein (WSG) from *Withania somnifera* (Ashwagandha). *Journal of Basic Microbiology*, 46(5), 365-374. <http://doi.org/10.1002/jobm.200510108>
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., & Di Cagno, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(3), 223-239. <http://doi.org/10.1080/10408690290825538>
- Graszkiewicz, A., Żelazko, M., Trziszka, T., & Polanowski, A. (2007). Antioxidative capacity of hydrolysates of hen egg proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(4), 195-199.
- Guefrachi, I., Pierre, O., Timchenko, T., Alunni, B., Barriere, Q., Czernic, P., ... Mergaert, P. (2015). Bradyrhizobium BclA Is a Peptide Transporter Required for Bacterial Differentiation in Symbiosis with *Aeschynomene* Legumes. *Molecular Plant-Microbe*

- Interactions : MPMI*, 28(11), 1155-1166. <http://doi.org/10.1094/MPMI-04-15-0094-R>
- Haili, N., Planchard, N., Arnal, N., Quadrado, M., Vrielynck, N., Dahan, J., ... Mireau, H. (2016). The MTL1 Pentatricopeptide Repeat Protein Is Required for Both Translation and Splicing of the Mitochondrial NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT7 mRNA in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 170(1), 354-366. <http://doi.org/10.1104/pp.15.01591>
- Hernández Rodríguez, M., & Sastre Gallego, A. (1999). *Tratado de nutrición*. Madrid, España: Díaz de Santos.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., & Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? *Peptides*, 29(6), 1062-1071. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.02.005>
- Huang, X., Xie, W., & Gong, Z. (2000). Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from Ginkgo biloba. *FEBS Letters*, 478(1-2), 123-126.
- Huang, Y., Busk, P. K., Herbst, F.-A., & Lange, L. (2015). Genome and secretome analyses provide insights into keratin decomposition by novel proteases from the non-pathogenic fungus *Onygena corvina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9635-9649. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6805-9>
- Hummel, M., Dobrenel, T., Cordewener, J. J. H. G., Davanture, M., Meyer, C., Smeekens, S. J. C. M., ... Hanson, J. (2015). Proteomic LC-MS analysis of Arabidopsis cytosolic ribosomes: Identification of ribosomal protein paralogs and re-annotation of the ribosomal protein genes. *Journal of Proteomics*, 128, 436-449. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.004>
- Jennings, C., West, J., Waiane, C., Craik, D., & Anderson, M. (2001). Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10614-10619. <http://doi.org/10.1073/pnas.191366898>
- Kawagoe, Y., Shiraishi, S., Kondo, H., Yamamoto, S., Aoki, Y., & Suzuki, S. (2015). Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in Arabidopsis plants by activating SA and JA signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(4), 1015-1020. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.143>
- Kim, S. K., Byun, H. G., Park, P. J., & Shahidi, F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2992-2997.
- Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1309-1323.
- Koike, T., Beppu, H., Kuzuya, H., Maruta, K., Shimpo, K., Suzuki, M., ... Fujita, K. (1995). A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from «Kidachi Aloe» (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger). *Journal of Biochemistry*, 118(6), 1205-1210.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides--opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308.
- Kulikova, O. G., Maltsev, D. I., Ilyina, A. P., Burdina, A. V., Yamskova, V. P., & Yamskov,

- I. A. (2015). [Biologically Active Peptides Isolated from Dill *Anethum graveolens* L]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, *51*(3), 348-353.
- Kwon, Y. S., Lee, D. Y., Rakwal, R., Baek, S.-B., Lee, J. H., Kwak, Y.-S., ... Kim, S. G. (2016). Proteomic analyses of the interaction between the plant-growth promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681 and *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, *16*(1), 122-135. <http://doi.org/10.1002/pmic.201500196>
- Li, X. C., Liao, Y. Y., Leung, D. W. M., Wang, H. Y., Chen, B. L., Peng, X. X., & Liu, E. E. (2015). Divergent biochemical and enzymatic properties of oxalate oxidase isoforms encoded by four similar genes in rice. *Phytochemistry*, *118*, 216-223. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.019>
- Lu, S., & Edwards, M. C. (2016). Genome-Wide Analysis of Small Secreted Cysteine-Rich Proteins Identifies Candidate Effector Proteins Potentially Involved in *Fusarium graminearum*-Wheat Interactions. *Phytopathology*, *106*(2), 166-176. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-09-15-0215-R>
- Mandal, S. M., Dey, S., Mandal, M., Sarkar, S., Maria-Neto, S., & Franco, O. L. (2009). Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. *Peptides*, *30*(4), 633-637. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.12.001>
- Martínez Augustin, O., & Martínez de Victoria, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, *21*, 1-14.
- Martins, J. C., Maes, D., Loris, R., Pepermans, H. A., Wyns, L., Willem, R., & Verheyden, P. (1996). H NMR study of the solution structure of Ac-AMP2, a sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*. *Journal of Molecular Biology*, *258*(2), 322-333.
- Meisel, H. (1998). Overview on Milk Protein-derived Peptides. *International Dairy Journal*, *8*(5-6), 363-373. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00059-4](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00059-4)
- Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, *9*(16), 1289-1295.
- Morozov, S. Y., Milyutina, I. A., Bobrova, V. K., Ryazantsev, D. Y., Erokhina, T. N., Zavriev, S. K., ... Troitsky, A. V. (2015). Structural evolution of the 4/1 genes and proteins in non-vascular and lower vascular plants. *Biochimie*, *119*, 125-136. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.019>
- Mulero Cánovas, J., Zafrilla Rentero, P., Martínez-Cachá Martínez, A., Leal Hernández, M., & Abellán Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*, *23*(5), 219-227. <http://doi.org/10.1016/j.arteri.2011.04.004>
- Nacif-Marcal, L., Pereira, G. R., Abranches, M. V, Costa, N. C. S., Cardoso, S. A., Honda, E. R., ... Oliveira, L. L. (2015). Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae). *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, *99*, 16-22. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.03.006>
- Noiva, R. (2010). Glicoproteínas. Recuperado 1 de mayo de 2016, a partir de <http://www.chemistryexplained.com/Ge-Hy/Glycoprotein.html>

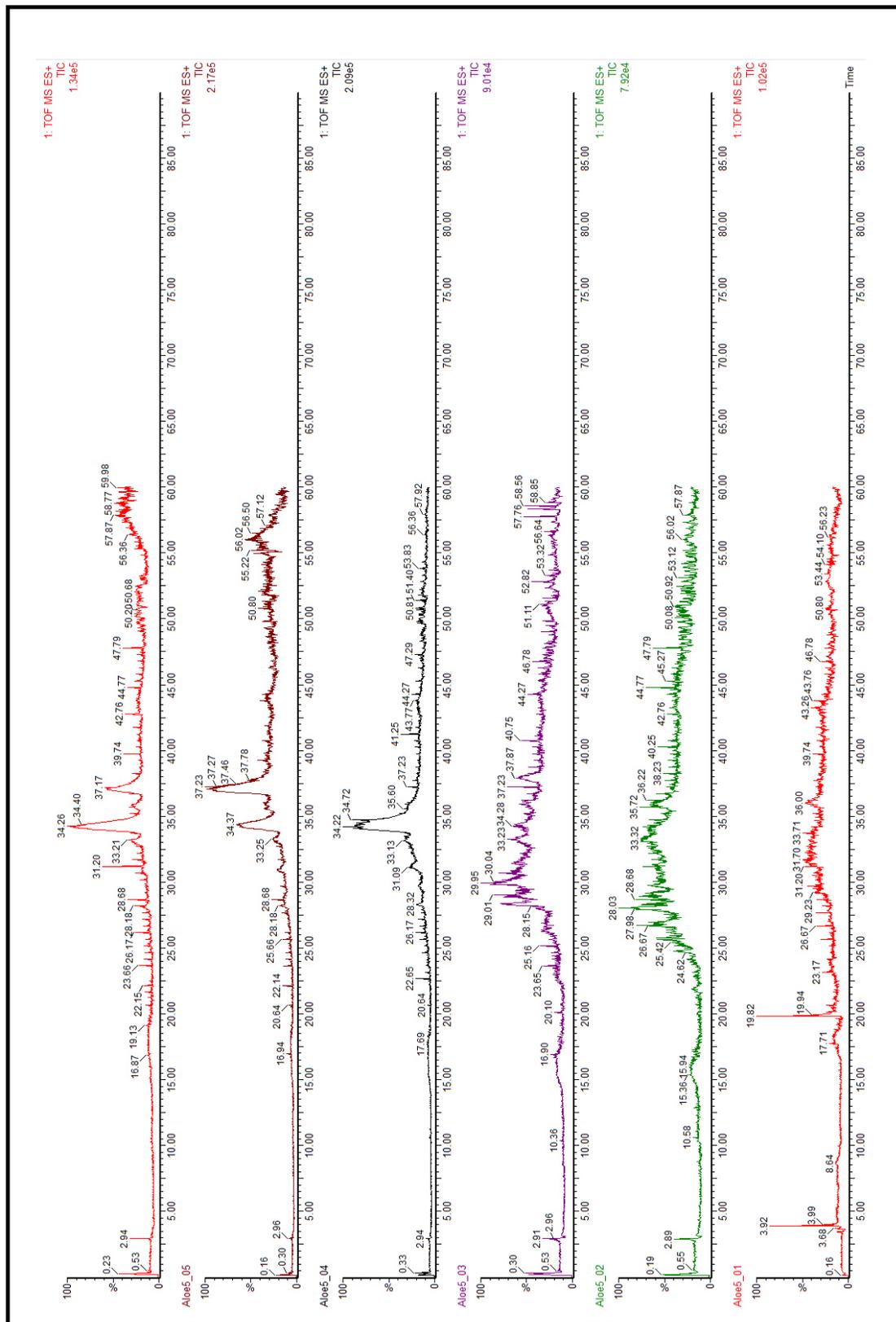
- Ortega-Berlanga, B., Musiychuk, K., Shoji, Y., Chichester, J. A., Yusibov, V., Patino-Rodriguez, O., ... Alpuche-Solis, A. G. (2015). Engineering and expression of a RhoA peptide against respiratory syncytial virus infection in plants. *Planta*. <http://doi.org/10.1007/s00425-015-2416-z>
- Panstruga, R., Baumgarten, K., & Bernhagen, J. (2015). Phylogeny and evolution of plant macrophage migration inhibitory factor/D-dopachrome tautomerase-like proteins. *BMC Evolutionary Biology*, *15*, 64. <http://doi.org/10.1186/s12862-015-0337-x>
- Pelegri, P. B., & Franco, O. L. (2005). Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *37*(11), 2239-2253. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.06.011>
- Pelegri, P. B., Murad, A. M., Silva, L. P., Dos Santos, R. C. P., Costa, F. T., Tagliari, P. D., ... Franco, O. L. (2008). Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. *Peptides*, *29*(8), 1271-1279. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.03.013>
- Pinnola, A., Cazzaniga, S., Alboresi, A., Nevo, R., Levin-Zaidman, S., Reich, Z., & Bassi, R. (2015). Light-Harvesting Complex Stress-Related Proteins Catalyze Excess Energy Dissipation in Both Photosystems of *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*, *27*(11), 3213-3227. <http://doi.org/10.1105/tpc.15.00443>
- Qiu, L., Lin, J.-S., Xu, J., Sato, S., Parniske, M., Wang, T. L., ... Xie, F. (2015). SCARN a Novel Class of SCAR Protein That Is Required for Root-Hair Infection during Legume Nodulation. *PLoS Genetics*, *11*(10), e1005623-e1005623. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005623>
- Que, F., Wang, G. L., Huang, Y., Xu, Z. S., Wang, F., & Xiong, A. S. (2015). Genomic identification of group A bZIP transcription factors and their responses to abiotic stress in carrot. *Genetics and Molecular Research: GMR*, *14*(4), 13274-13288. <http://doi.org/10.4238/2015.October.26.24>
- Ren, J., Bretthauer, R. K., & Castellino, F. J. (1995). Purification and properties of a Golgi-derived (alpha 1,2)-mannosidase-I from baculovirus-infected lepidopteran insect cells (IPLB-SF21AE) with preferential activity toward mannanose-6-N-acetylglucosamine-2. *Biochemistry*, *34*(8), 2489-2495.
- Roberts, P. R., & Zaloga, G. P. (1994). Dietary bioactive peptides. *New Horizons (Baltimore, Md.)*, *2*(2), 237-243.
- Rogozhin, E. A., Slezina, M. P., Slavokhotova, A. A., Istomina, E. A., Korostyleva, T. V., Smirnov, A. N., ... Odintsova, T. I. (2015). A novel antifungal peptide from leaves of the weed *Stellaria media* L. *Biochimie*, *116*, 125-132. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.014>
- Salas, C. E., Badillo-Corona, J. A., Ramirez-Sotelo, G., & Oliver-Salvador, C. (2015). Biologically active and antimicrobial peptides from plants. *BioMed Research International*, *2015*, 102129. <http://doi.org/10.1155/2015/102129>
- Santamaria, M. E., Arnaiz, A., Diaz-Mendoza, M., Martinez, M., & Diaz, I. (2015). Inhibitory properties of cysteine protease pro-peptides from barley confer resistance to spider mite feeding. *PloS One*, *10*(6), e0128323-e0128323. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0128323>

- Selitrennikoff, C. P. (2001). Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2883-2894. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2883-2894.2001>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive Peptides. *Journal of Aoac International*, 91(4), 914-931. <http://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00642.x>
- Shimizu, M. (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. *BioFactors (Oxford, England)*, 21(1-4), 43-47.
- Tam, J. P., Lu, Y. A., Yang, J. L., & Chiu, K. W. (1999). An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 8913-8918.
- Terras, F. R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., ... Vanderleyden, J. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell*, 7(5), 573-588.
- Torres-Fuentes, C., Contreras, M. del M., Recio, I., Alaiz, M., & Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194-202. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.046>
- Turowski, V. R., Aknin, C., Maliandi, M. V, Buchensky, C., Leaden, L., Peralta, D. A., ... Gomez-Casati, D. F. (2015). Frataxin Is Localized to Both the Chloroplast and Mitochondrion and Is Involved in Chloroplast Fe-S Protein Function in Arabidopsis. *PloS One*, 10(10), e0141443-e0141443. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0141443>
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.
- Virdi, A. S., Singh, S., & Singh, P. (2015). Abiotic stress responses in plants: roles of calmodulin-regulated proteins. *Frontiers in Plant Science*, 6, 809. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00809>
- Vittori, N., Martin, M., & Sabater, B. (2012). Proteomic identification of a basic peroxidase stabilized within acetylated polymannan polysaccharide of *Aloe barbadensis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(6), 1169-1172. <http://doi.org/10.1271/bbb.120025>
- Wang, H., & Ng, T. B. (2000). Ginkbilobin, a novel antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds with sequence similarity to embryo-abundant protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), 407-411. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3929>
- Wang, J., Nie, Y., Li, Y., Hou, Y., Zhao, W., Deng, J., ... Bai, G. (2015). Identification of target proteins of mangiferin in mice with acute lung injury using functionalized magnetic microspheres based on click chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(45), 10013-10021. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04439>
- Warren, J. G., Kasun, G. W., Leonard, T., & Kirkpatrick, B. C. (2016). A phage display-selected peptide inhibitor of *Agrobacterium vitis* polygalacturonase. *Molecular Plant Pathology*, 17(4), 480-486. <http://doi.org/10.1111/mpp.12293>
- Witherup, K. M., Bogusky, M. J., Anderson, P. S., Ramjit, H., Ransom, R. W., Wood, T., & Sardana, M. (1994). Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic

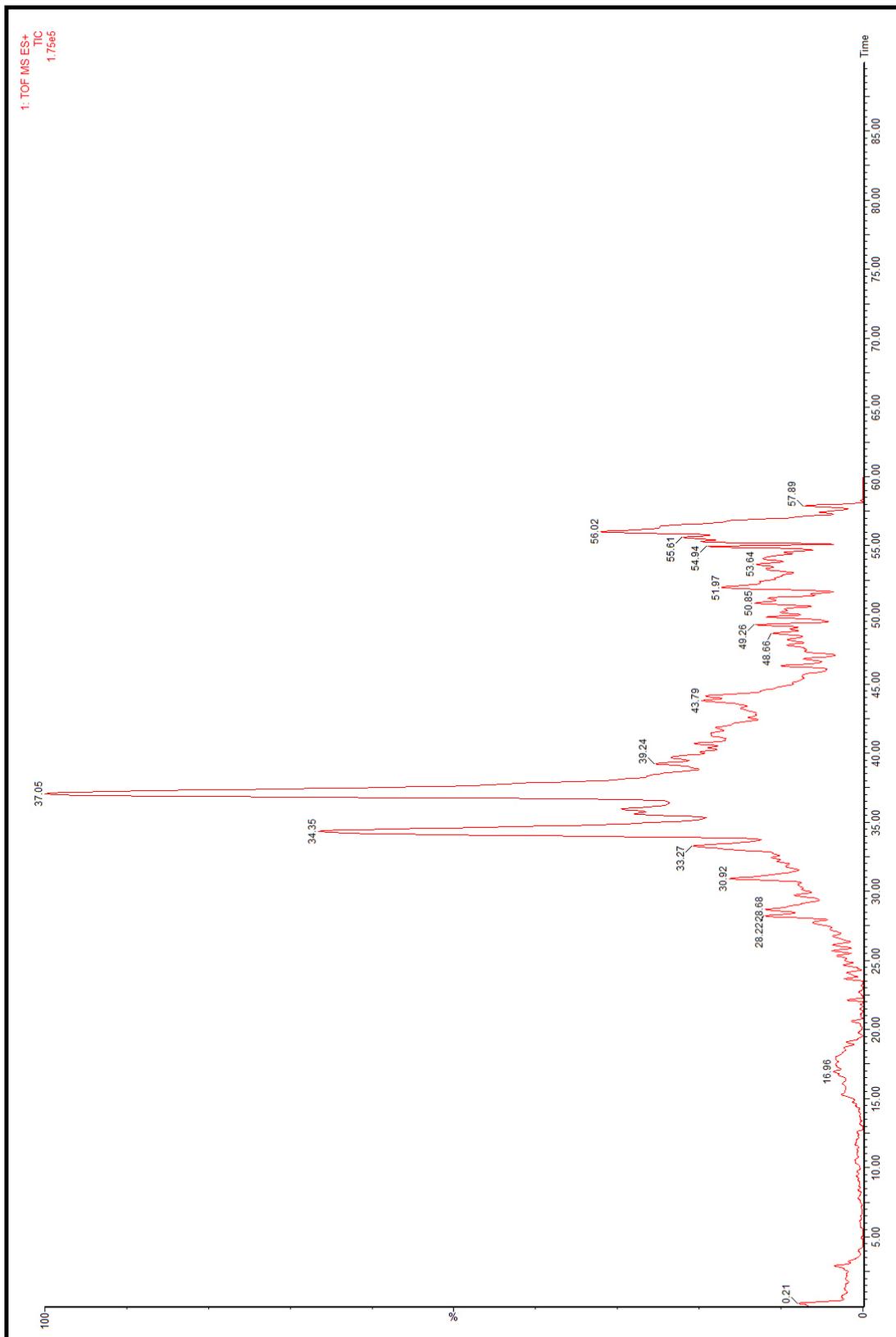
- peptide isolated from *Psychotria longipes*. *Journal of Natural Products*, 57(12), 1619-1625.
- Witkowska, D., Bartys, A., & Gamian, A. (2008). [Defensins and cathelicidins as natural peptide antibiotics]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 62, 694-707.
- Wu, T.-M., Lin, K.-C., Liao, W.-S., Chao, Y.-Y., Yang, L.-H., Chen, S.-Y., ... Hong, C.-Y. (2016). A set of GFP-based organelle marker lines combined with DsRed-based gateway vectors for subcellular localization study in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 90(1-2), 107-115. <http://doi.org/10.1007/s11103-015-0397-8>
- Xia, X., Gui, R., Yang, H., Fu, Y., Wei, F., & Zhou, M. (2015). Identification of genes involved in color variation of bamboo culms by suppression subtractive hybridization. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Societe Francaise de Physiologie Vegetale*, 97, 156-164. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.004>
- Xiao, X., He, H., Ding, X., Yang, Q., Liu, X., Liu, S., ... Xia, L. (2015). Purification and cloning of lectin that induce cell apoptosis from *Allium chinense*. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 22(2), 238-244. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.12.004>
- Xu, J., Xing, S., Cui, H., Chen, X., & Wang, X. (2016). Genome-wide identification and characterization of the apple (*Malus domestica*) HECT ubiquitin-protein ligase family and expression analysis of their responsiveness to abiotic stresses. *Molecular Genetics and Genomics : MGG*, 291(2), 635-646. <http://doi.org/10.1007/s00438-015-1129-0>
- Yan, J., Yuan, S.-S., Jiang, L.-L., Ye, X.-J., Ng, T. B., & Wu, Z.-J. (2015). Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12), 4961-4981. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6654-6>
- Yuan, H.-B., Ding, Y.-X., Gu, S.-H., Sun, L., Zhu, X.-Q., Liu, H.-W., ... Guo, Y.-Y. (2015). Molecular Characterization and Expression Profiling of Odorant-Binding Proteins in *Apolygus lucorum*. *PloS One*, 10(10), e0140562-e0140562. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140562>
- Zeng, L., Yin, Y., You, C., Pan, Q., Xu, D., Jin, T., ... Ma, H. (2015). Evolution and protein interactions of AP2 proteins in Brassicaceae: evidence linking development and environmental responses. *Journal of Integrative Plant Biology*. <http://doi.org/10.1111/jipb.12439>

ANEXOS

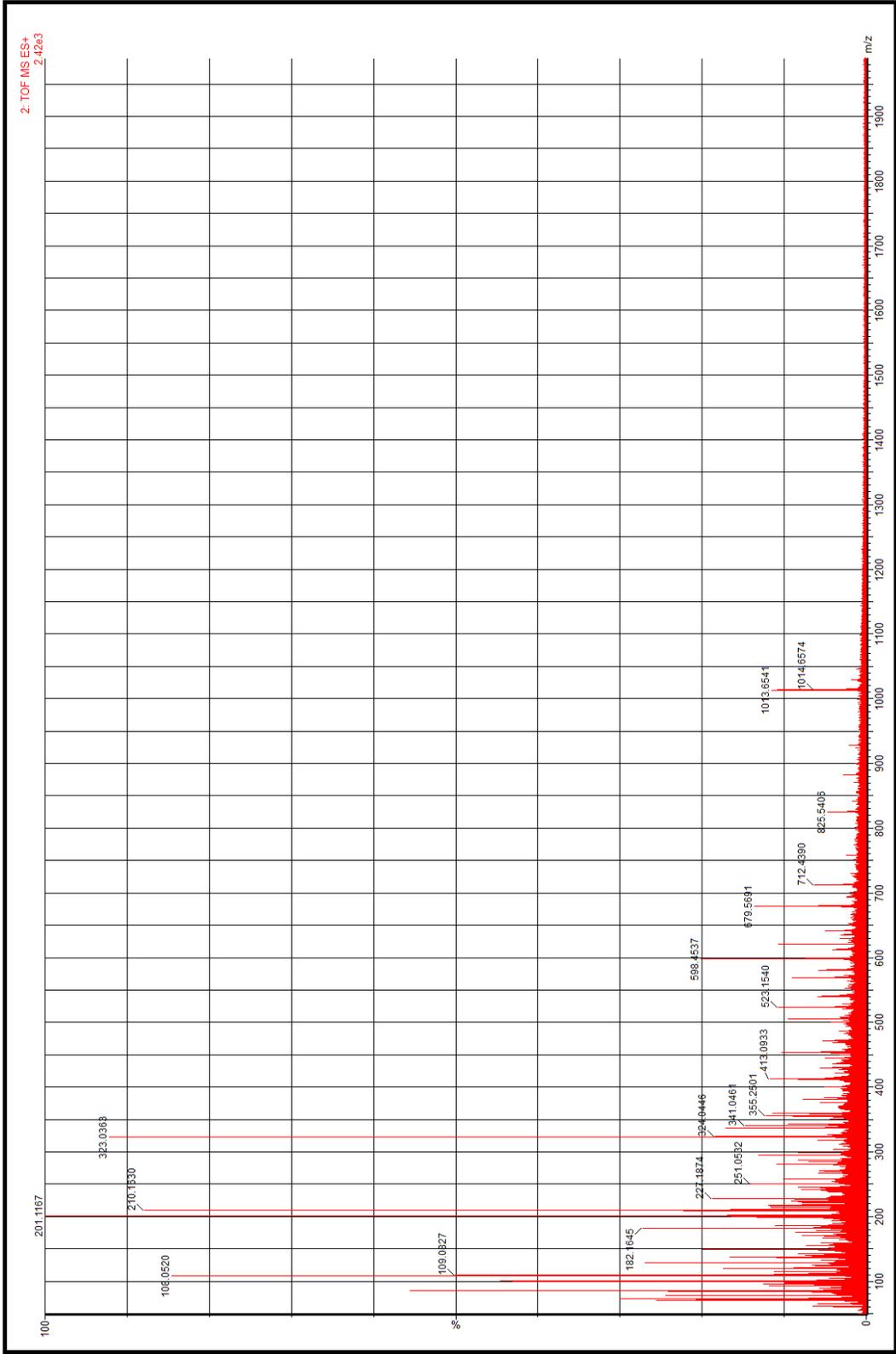
ANEXO 1.- Cromatograma fracciones proteicas obtenidas a partir de EPLM2.



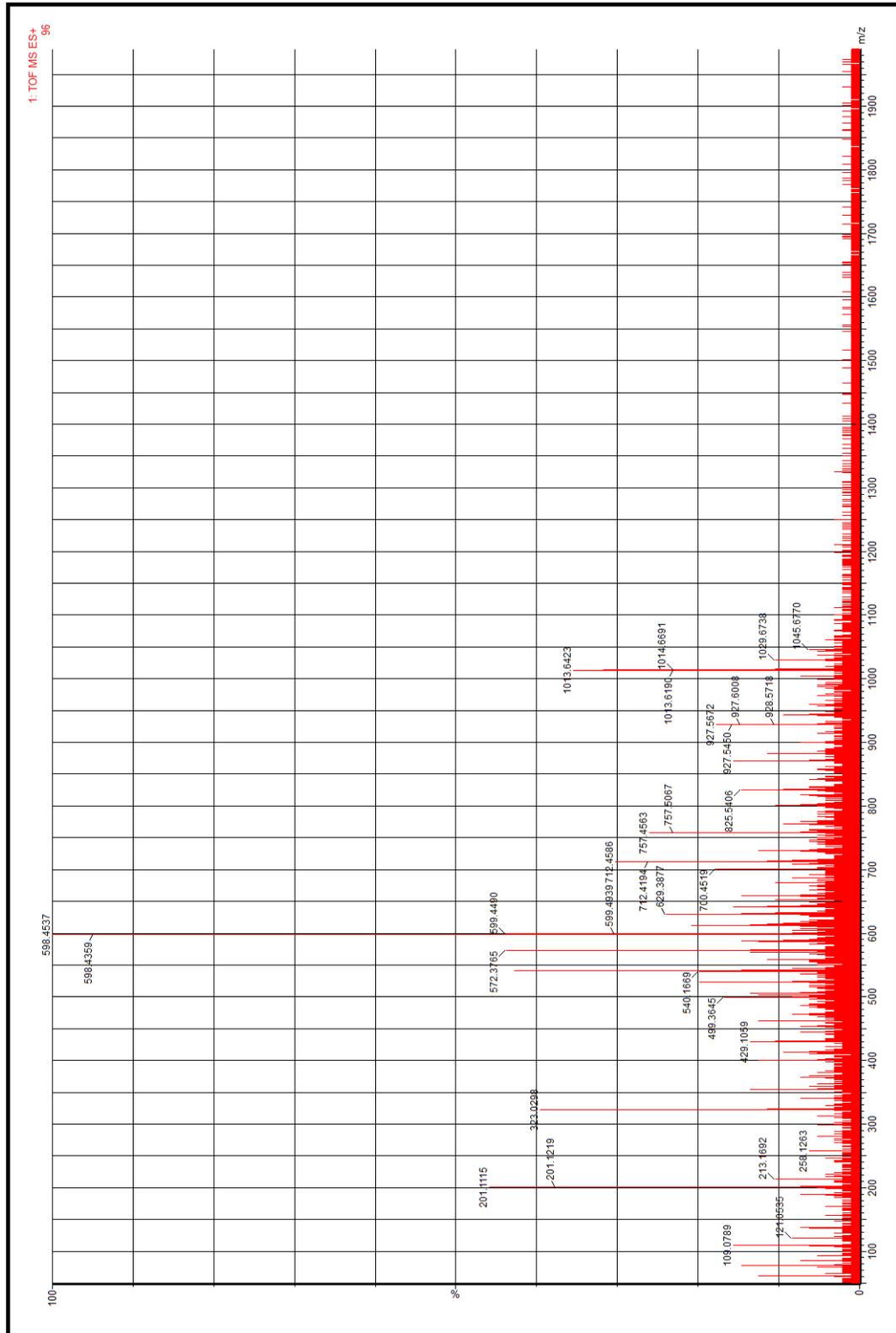
ANEXO 2.- Cromatograma fracción proteica 5 obtenida a partir de EPLM2.



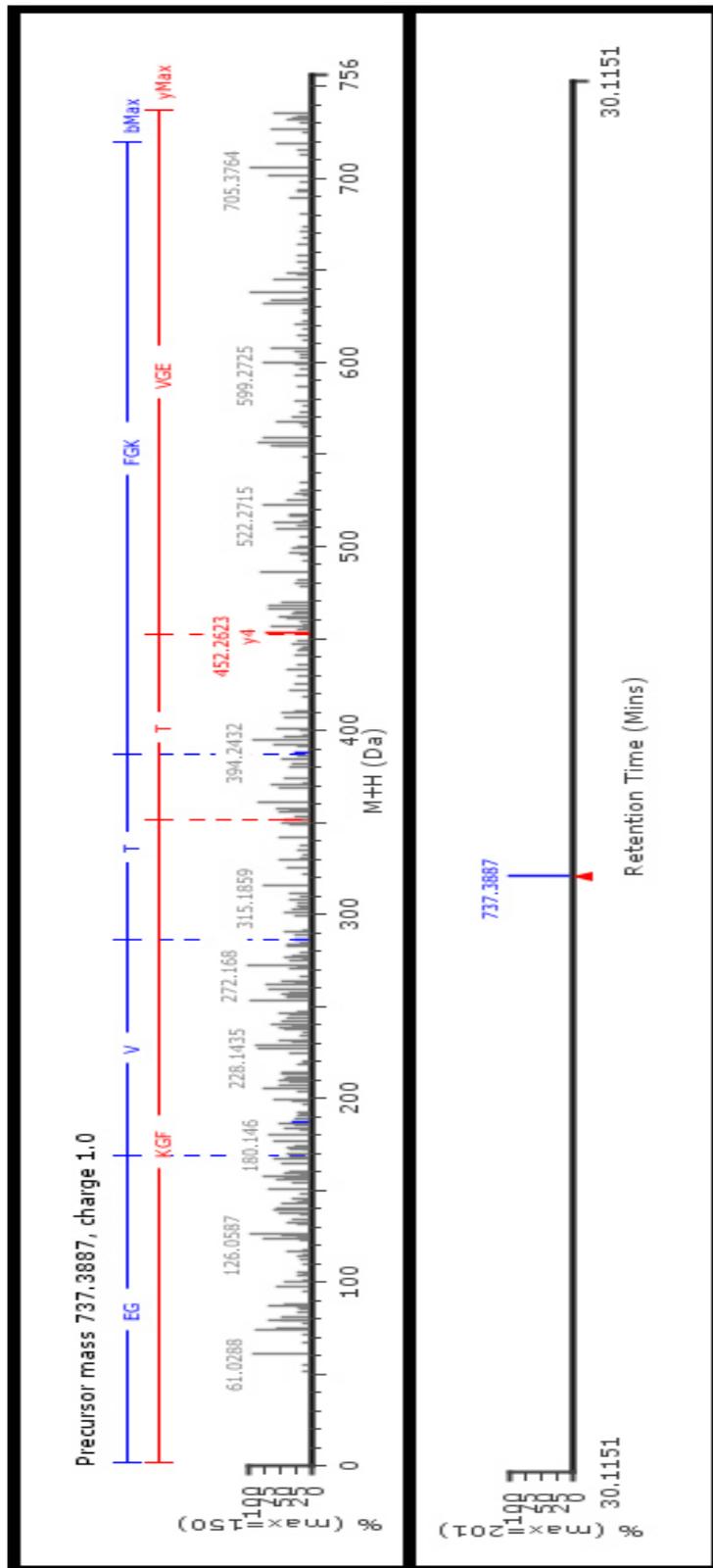
ANEXO 3.- Ejemplo de espectro de masas de alta energía de la fracción proteica 5 obtenida a partir de EPLM2.



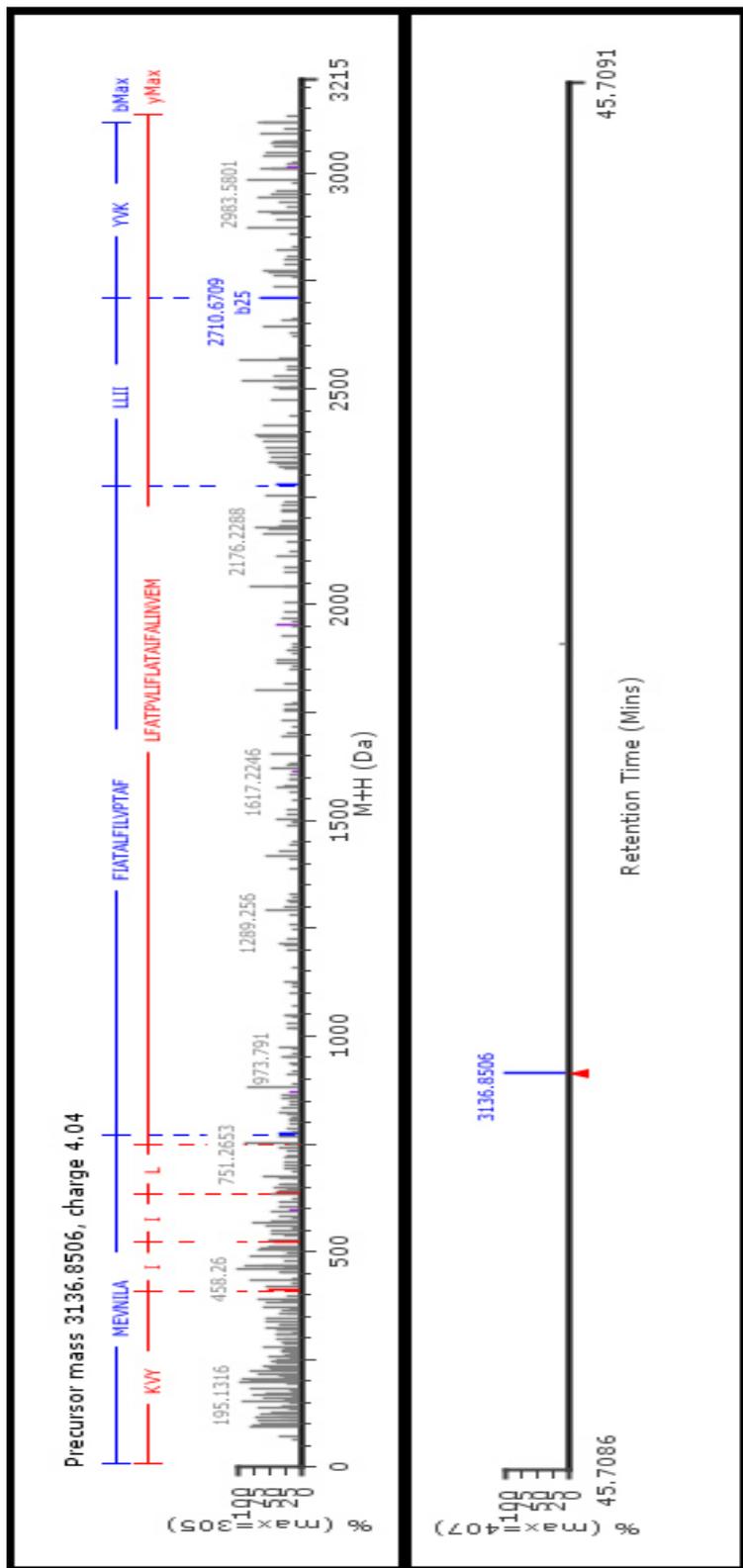
ANEXO 4.- Ejemplo de espectro de masas de baja energía de la fracción proteica 5 obtenida a partir de EPLM2.



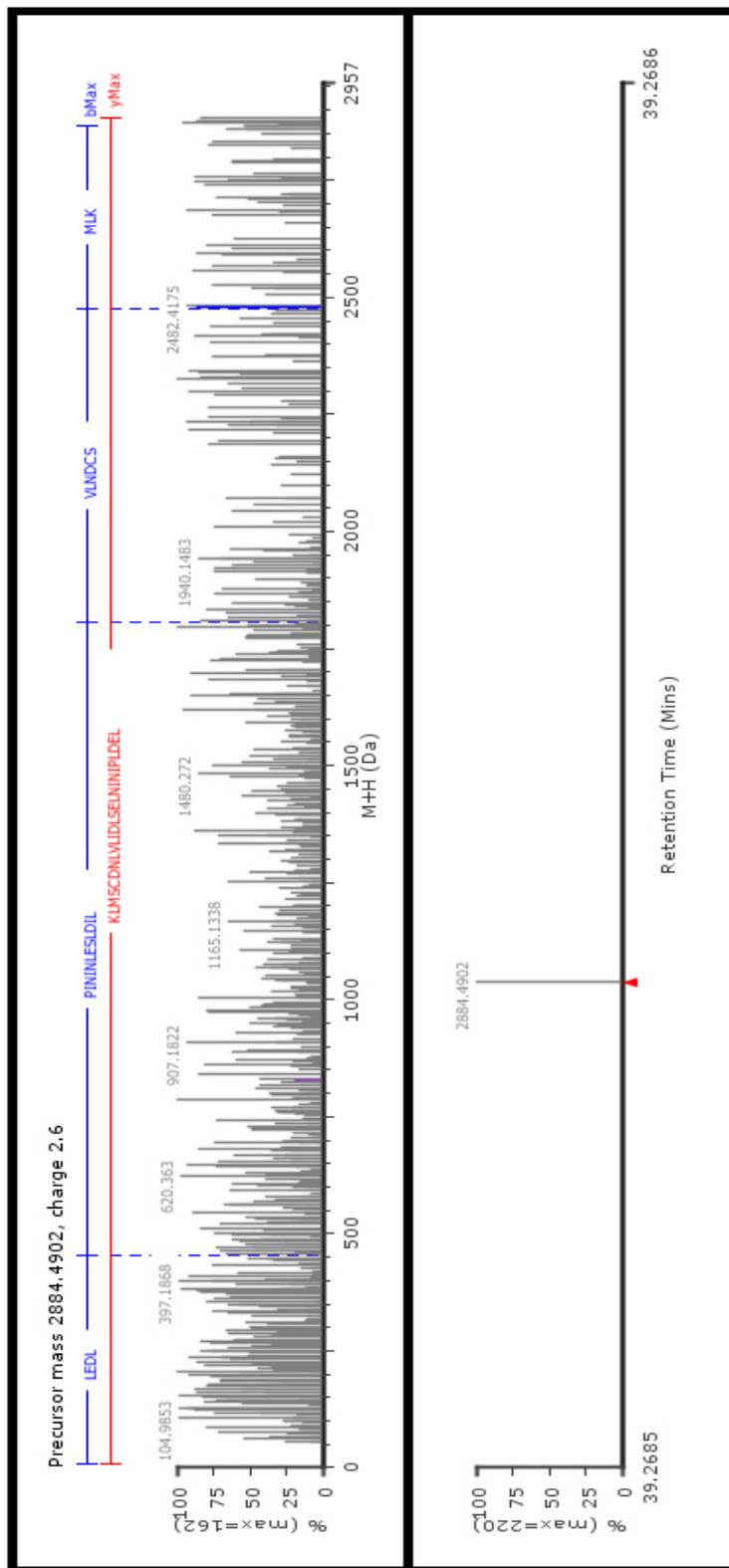
ANEXO 5.- Ejemplo de espectro de masas de P1 obtenida a partir de EPLM2.



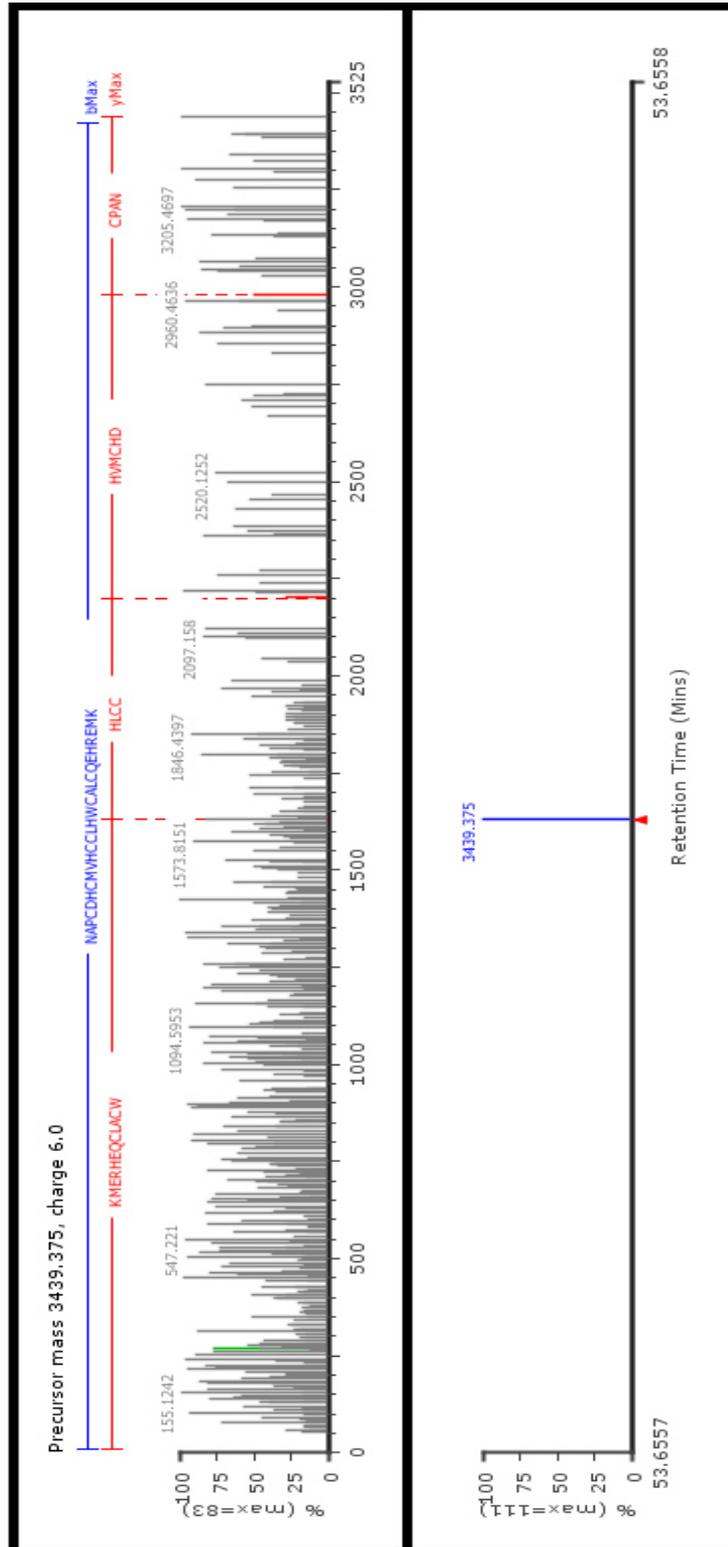
ANEXO 6.- Ejemplo de espectro de masas de P2 obtenida a partir de EPLM2.



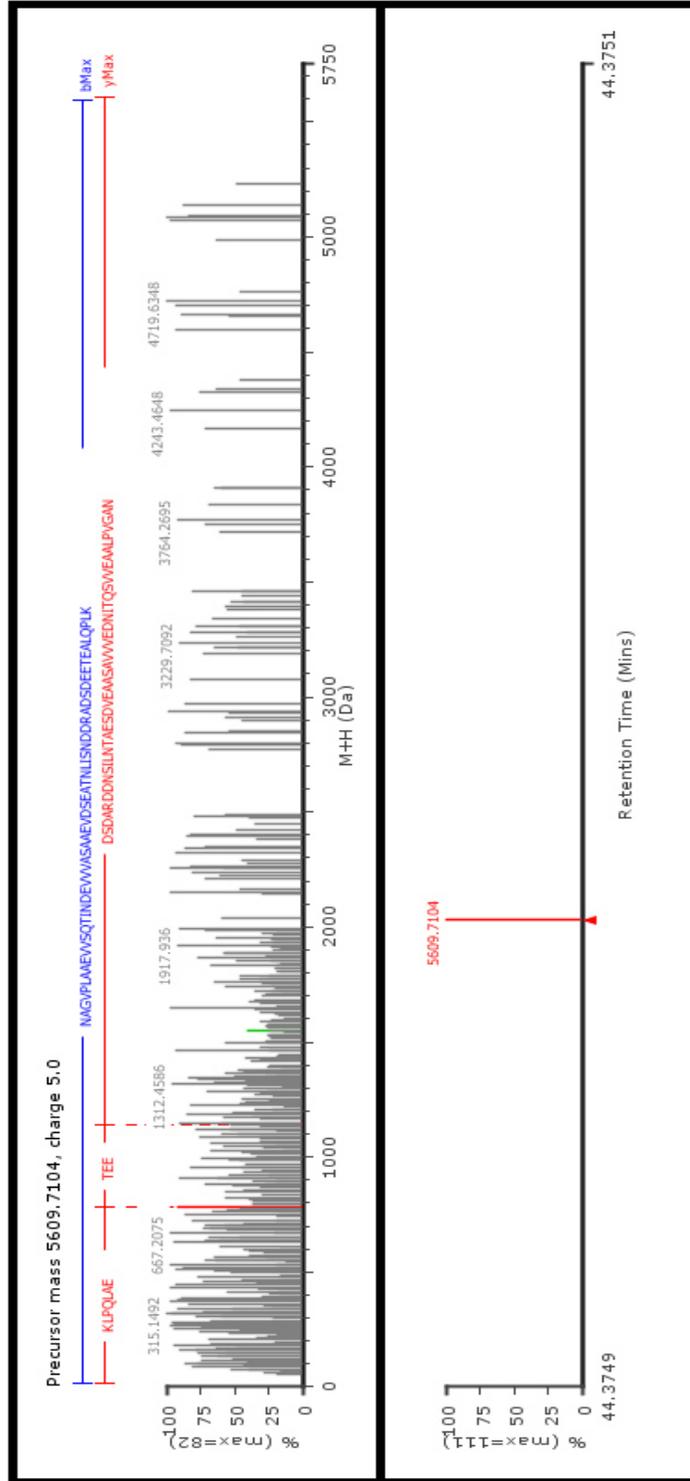
ANEXO 7.- Ejemplo de espectro de masas de P3 obtenida a partir de EPLM2.



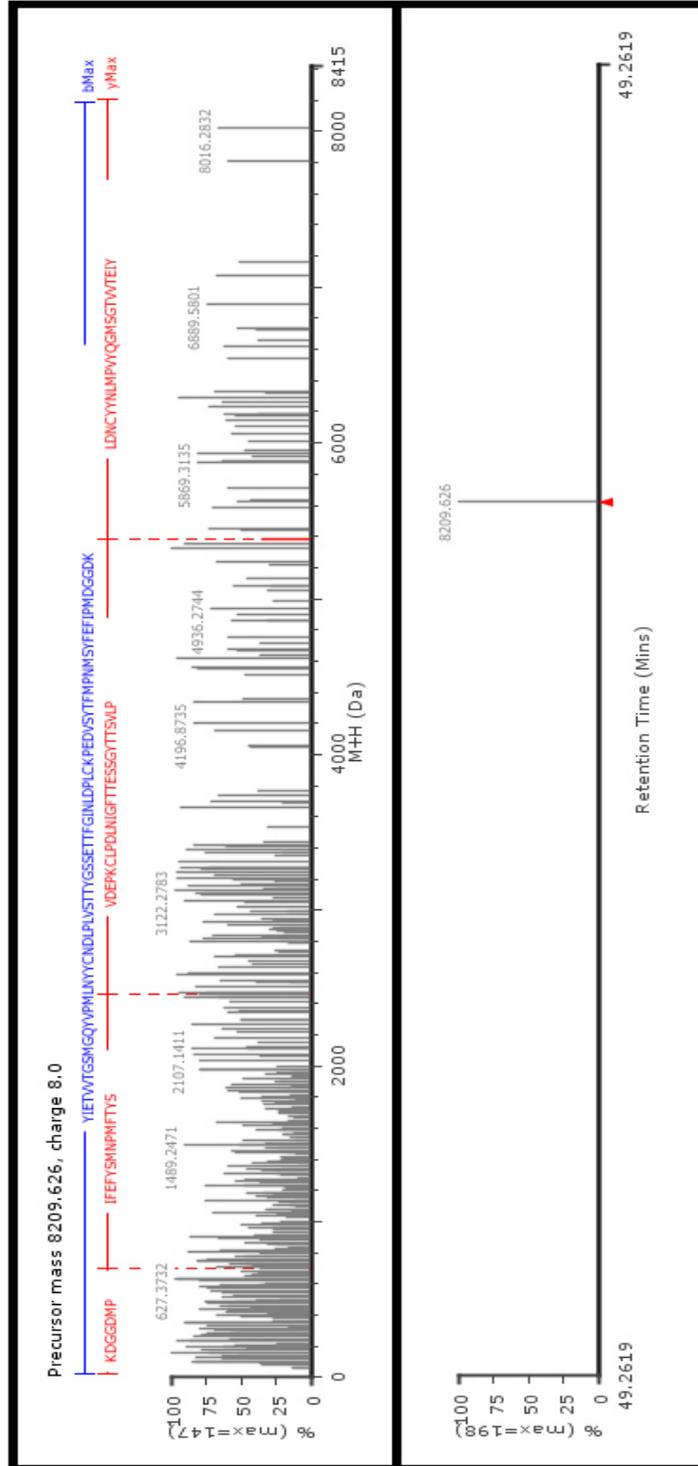
ANEXO 8.- Ejemplo de espectro de masas de P4 obtenida a partir de EPLM2.



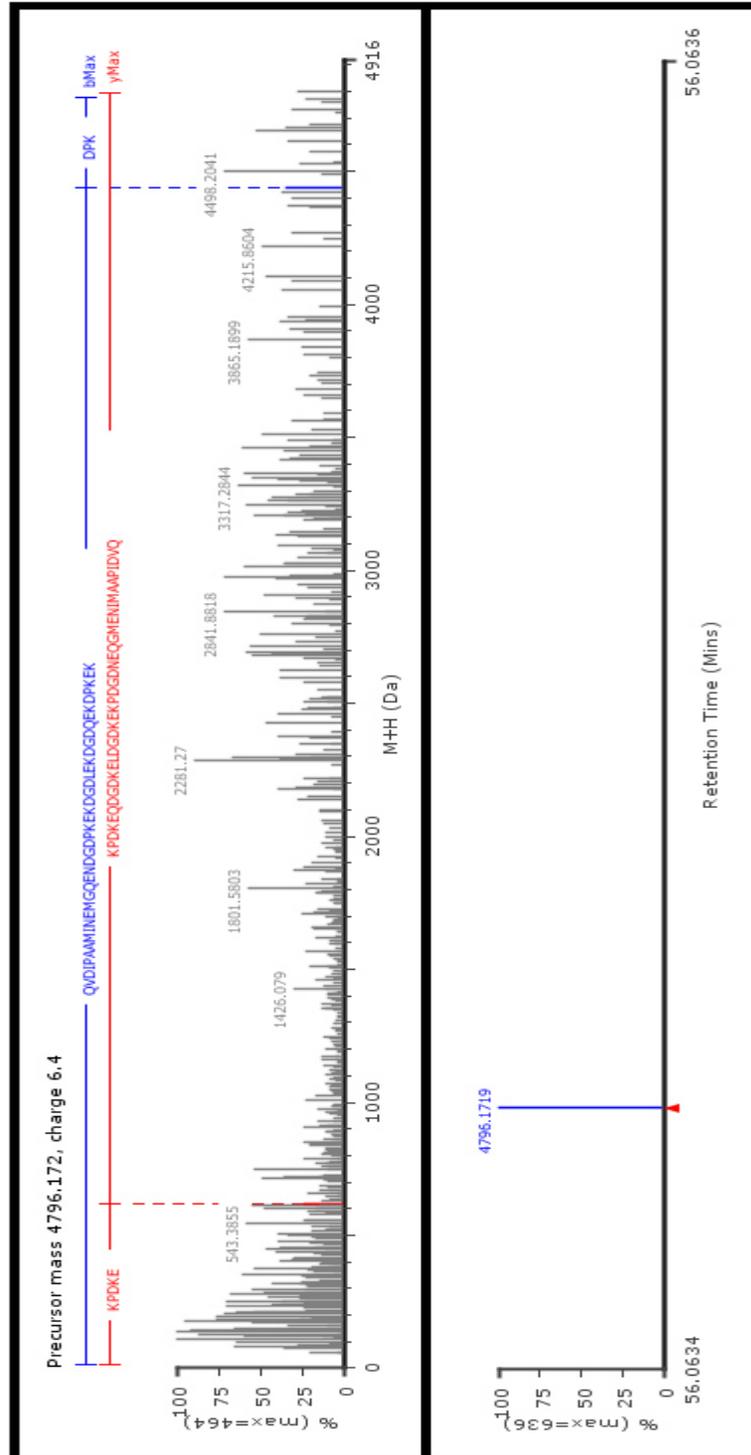
ANEXO 9.- Ejemplo de espectro de masas de P5 obtenida a partir de EPLM2.



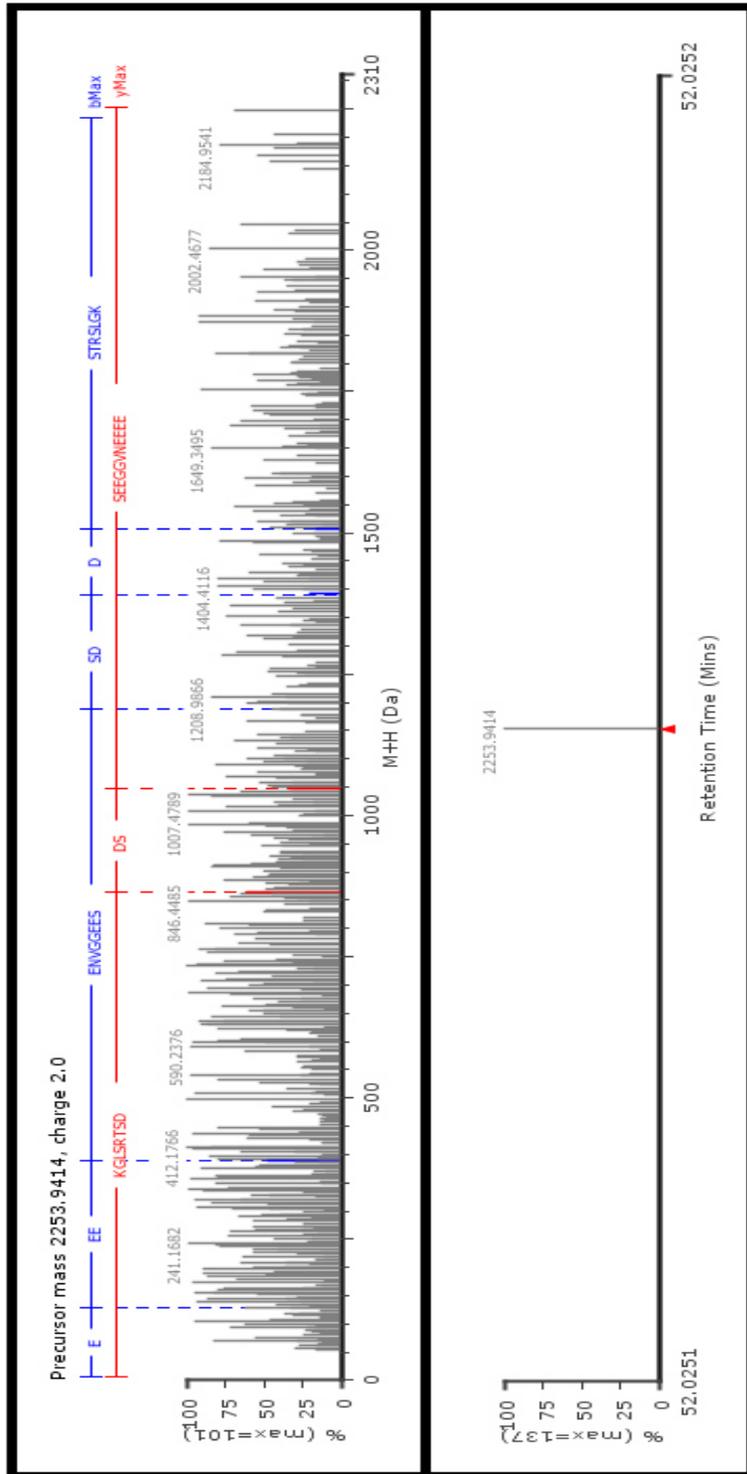
ANEXO 10.- Ejemplo de espectro de masas de P6 obtenida a partir de EPLM2.



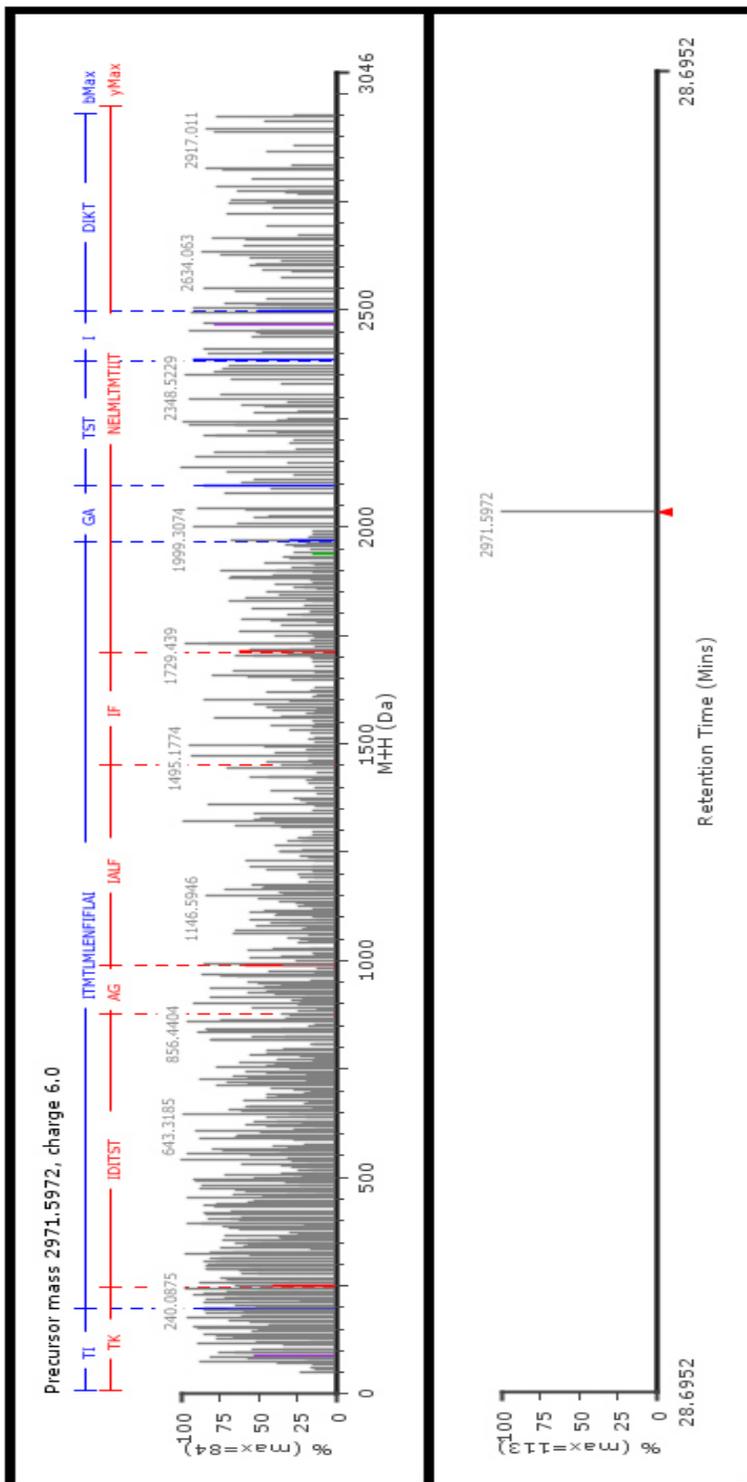
ANEXO 11.- Ejemplo de espectro de masas de P7 obtenida a partir de EPLM2.



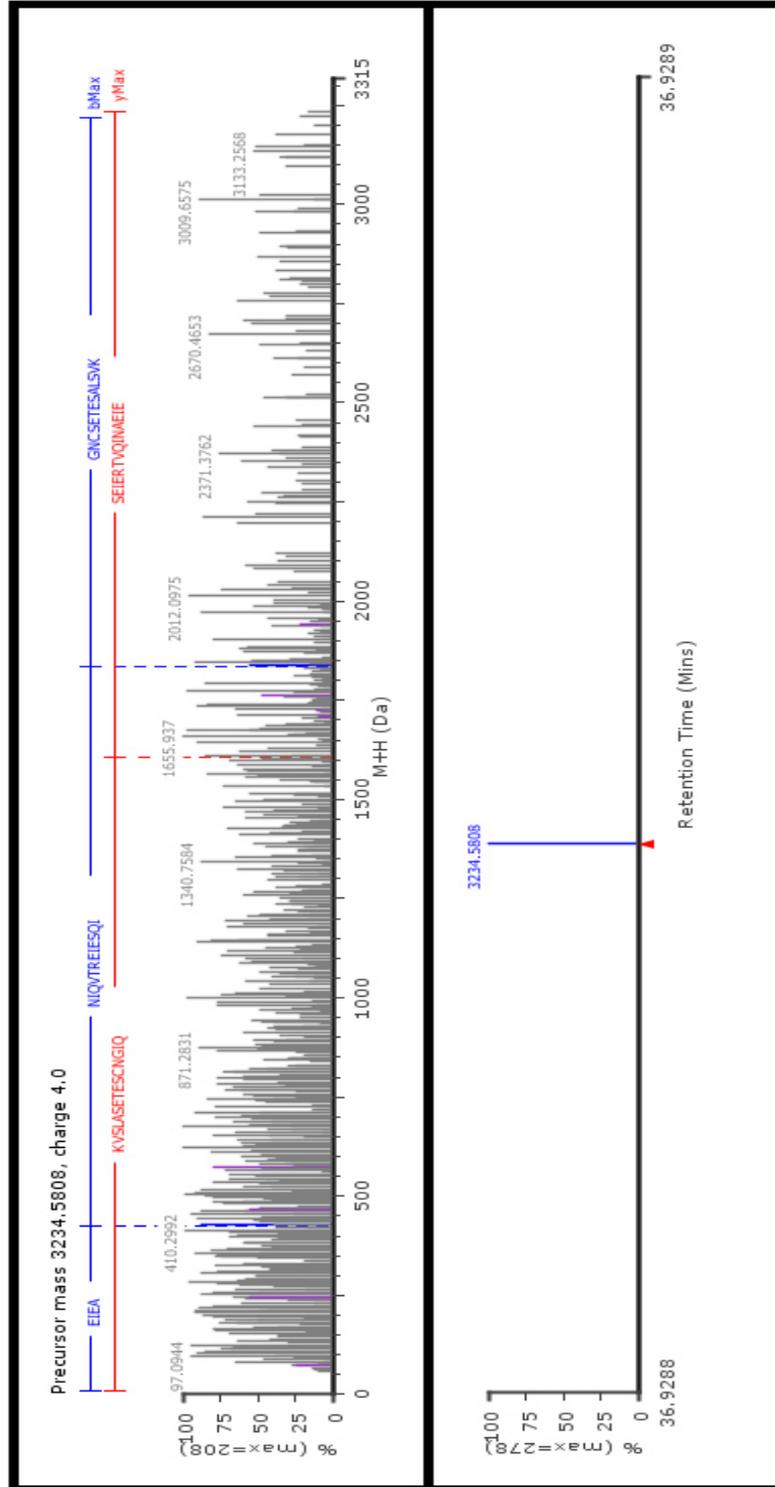
ANEXO 12.- Ejemplo de espectro de masas de P8 obtenida a partir de EPLM2.



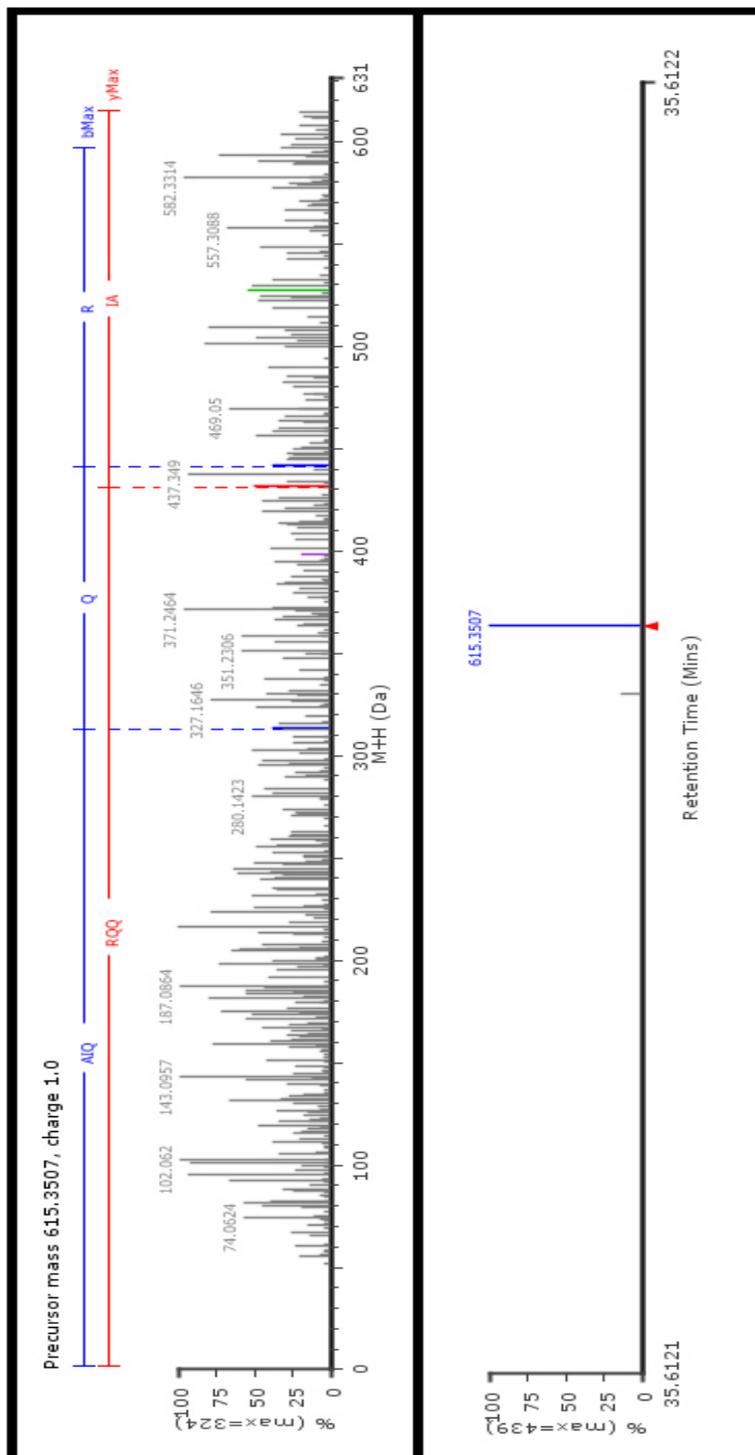
ANEXO 13.- Ejemplo de espectro de masas de P9 obtenida a partir de EPLM2.



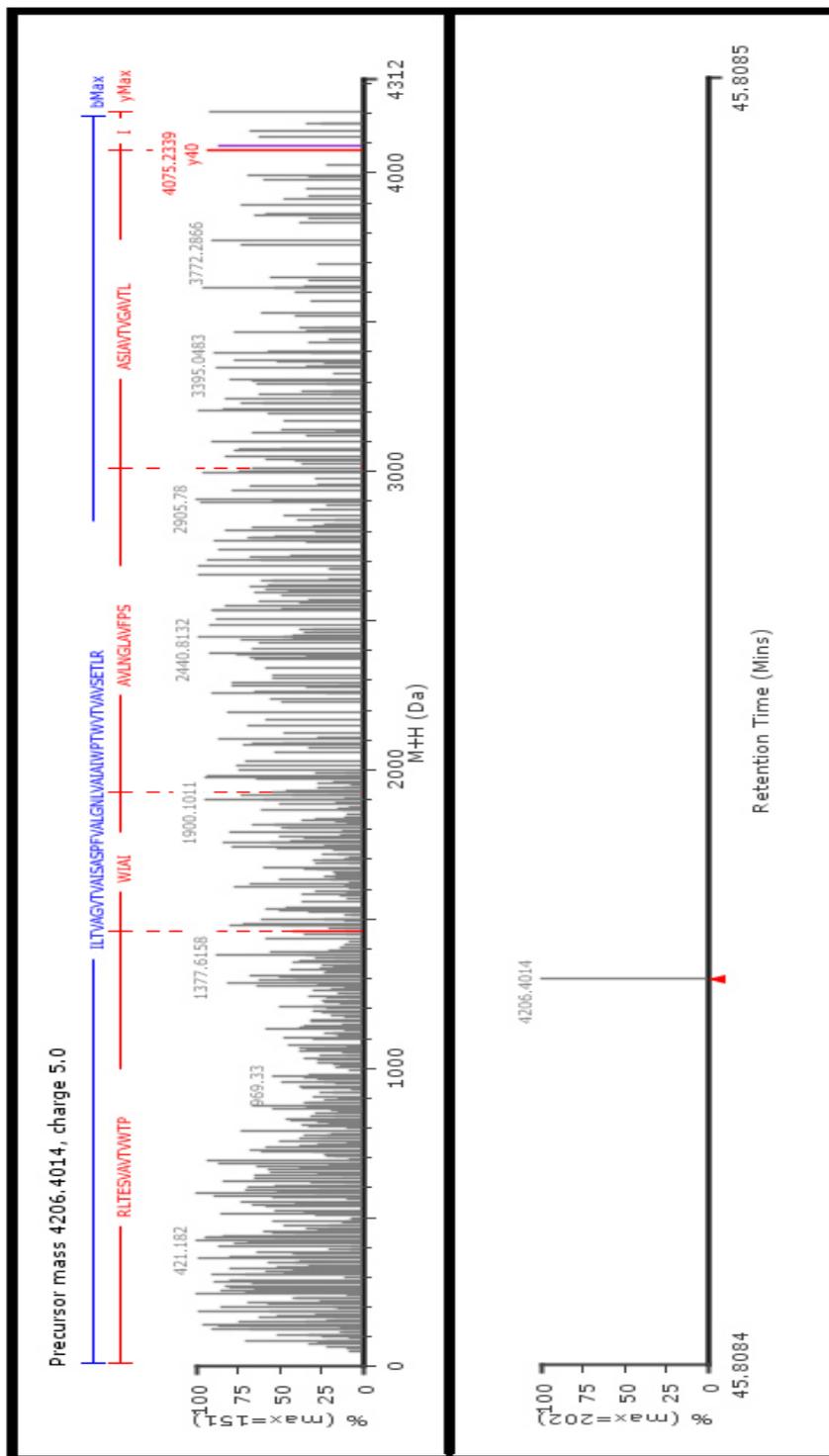
ANEXO 14.- Ejemplo de espectro de masas de P10 obtenida a partir de EPLM2.



ANEXO 17.- Ejemplo de espectro de masas de P13 obtenida a partir de EPLM2.



ANEXO 18.- Ejemplo de espectro de masas de P14 obtenida a partir de EPLM2.



ANEXO 19.- Ejemplo de espectro de masas de P15 obtenida a partir de EPLM2.

