



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

SOLICITUD DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	4	11	2020		5	11	2020

Datos del Alumno

Nombre : Raquel Artíguez Sánchez	
Matrícula : 2153063508	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Veracruz N°28	
Teléfono : 2292783678	Celular : 2292783678
Correo Electrónico : raquelartiguez96@gmail.com	CURP : AISR960511MVZRNQ03

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto :	Expresión de péptidos antimicrobianos en un modelo de infección in vitro						
Lugar donde se realizó el Servicio Social :	Laboratorio de inmunología en la UAM Xochimilco						
Dependencia :	Universidad Autónoma Metropolitana						
Entidad Federativa :	Distrito Federal						
Municipio :	Coyoacán						
Localidad :	Coyoacán						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	9	12	2020		9	6	2020

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.- Educativo	Tipo: 2.- Interno
Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición	

FIRMAS

Jorge Ismael Castañeda Sánchez N° 37622

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Araceli Paredes Rojas A180336

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Raquel Artíguez Sánchez

Alumno
Nombre, firma

Dra. María Angélica Gutiérrez Nava
Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza

Escriba el texto aquí



México, Ciudad de México a 5 de noviembre del 2020.

Mtra. Maria Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Xochimilco

PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a la comisión de servicio social que el alumno: **Raquel Artíguez Sánchez**, Matrícula **2153063508** con el proyecto de Servicio Social: “**Expresión de péptidos antimicrobianos en un modelo de infección in vitro**” ha finalizado sus actividades correspondientes, cubriendo el período del 09 de diciembre del 2019 al 09 de junio del 2020 con un total de 480 horas.

Agradeciendo de antemano su atención a la presente, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez
Número económico
37622

CCP. Dr. Juan Esteban Barranco Florido, Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-X



México, Ciudad de México a 5 de noviembre del 2020.

A quien corresponda:

PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a la comisión de servicio social que el alumno: **Raquel Artíguez Sánchez**, Matrícula **2153063508** con el proyecto de Servicio Social: “**Expresión de péptidos antimicrobianos en un modelo de infección in vitro**” ha finalizado sus actividades correspondientes, cubriendo el período del 09 de diciembre del 2019 al 09 de junio del 2020 con un total de 480 horas.

Agradeciendo de antemano su atención a la presente, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

M. en C. Araceli Paredes Rojas



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Xochimilco

Nombre del alumno: Raquel Artíguez Sánchez.

Lugar: Laboratorio de Inmunología en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Período de labores: Diciembre 2019 - Junio 2020.

Unidad académica: Xochimilco.

División académica: Ciencias Biológicas y de la Salud.

Licenciatura cursada: Químico Farmacéutico Biólogo.

Nombre del proyecto: **Expresión de péptidos antimicrobianos en un modelo de infección *in vitro*.**

Asesor interno: Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez. 37622

Asesor externo: M. en C. Araceli Paredes Rojas. A180336

INDICE

Introducción.....	3
1. Marco teórico.....	4
1.1 Esporotricosis.....	4
1.2 Epidemiología.....	5
1.3 Complejo <i>Sporothrix spp.</i>	5
1.4 La Piel.....	6
1.5 Fibroblastos.....	7
1.6 Melanocitos.....	8
1.7 Péptidos antimicrobianos.....	9
1.9 β -Defensinas.....	10
1.10 Catelicidinas.....	11
2. Objetivos.....	13
3. Justificación.....	14
4. Metodología y actividades realizadas.....	15
5. Objetivos alcanzados.....	18
6. Resultados.....	19
7. Discusión.....	23
8. Conclusión.....	26

Expresión de péptidos antimicrobianos en un modelo de infección *in vitro*

Introducción

Las infecciones humanas fúngicas se han incrementado dramáticamente en los últimos años, representando un problema de salud mundial. *Sporothrix schenckii* es un hongo dimórfico, perteneciente al complejo *Sporothrix spp.* y es responsable de una de las micosis subcutáneas que prevalece principalmente en regiones tropicales y subtropicales: la esporotricosis. En México es la micosis subcutánea más frecuente, y se ha encontrado en el sur de la Ciudad de México, Puebla, Guanajuato, Jalisco, Hidalgo, Veracruz, Michoacán, Oaxaca, San Luis Potosí y Estado de México. (Arenas, 2014). La inmunidad innata ha sido un área de gran interés en la investigación de la defensa inmunológica contra infecciones fúngicas, y sus funciones incluyen el control de la infección, mediante la producción de agentes antifúngicos en secreciones mucosas y la activación de leucocitos. El papel de las células epiteliales en el inicio de respuestas innatas a la infección por hongos es menos conocido. La evidencia reciente ha demostrado que las células epiteliales, consideradas una barrera física que previene la infección, juegan un papel muy activo en la respuesta inmune temprana a los patógenos. La liberación de mediadores inflamatorios de las células epiteliales es un paso crítico para la generación de respuestas protectoras del huésped, incluido el reclutamiento de células inflamatorias, así como la generación de factores antimicrobianos directos. Además de la liberación de citocinas, incluidos los potentes factores quimiotácticos, las células epiteliales también liberan pequeños péptidos antimicrobianos (AMP), que son capaces de ejercer efectos microbicidas directos. Los AMP comprenden una amplia gama de péptidos pequeños y pueden ser aniónicos o catiónicos. Los AMP se pueden clasificar en cuatro clases principales: 1) péptidos aniónicos pequeños que requieren zinc como cofactor; 2) péptidos catiónicos α -helicoidales pequeños (40 aa) que carecen de cisteínas; 3) péptidos catiónicos lineales ricos en prolina o triptófano pero que carecen de cisteínas; y 4) defensinas, que se caracterizan por la presencia de láminas β estabilizadas por dos enlaces disulfuro. (Tomalka et al., 2015). A ésta última clasificación pertenecen las β -Defensinas

Humanas de tipo 1 y 2. En el presente estudio se pretende determinar la expresión de dichas defensinas en células infectadas con *Sporothrix Schenckii*.

1. Marco Teórico

1.1 Esporotricosis

La esporotricosis humana es una micosis granulomatosa, adquirida por inoculación traumática, caracterizada por lesiones nodulares y causada por hongos dimórficos del complejo *Sporothrix schenckii*, que comprende cuatro especies de importancia clínica: *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei* y *S. schenckii*. (Arenas et al., 2018; Rojas et al., 2018) Aunque la enfermedad se produce en todo el mundo, la mayoría de los casos se notifican en zonas tropicales y subtropicales de América Latina, África y Asia. Por lo general, la esporotricosis es una micosis de implantación cuyos propágulos infecciosos se inoculan de varias fuentes ambientales como suelo, vegetales o madera en la piel, las mucosas o los sitios osteoarticulares. Con menos frecuencia, la infección puede ocurrir por inhalación, lo que resulta en enfermedad pulmonar. (Quiroz-Telles et al., 2019).

La esporotricosis se clasifica en dos categorías (esporotricosis cutánea y extracutánea), que comprende cuatro formas clínicas distintas: linfocutánea (LC), cutánea fija (FC), cutánea diseminada y extracutánea. Las formas LC y FC son presentaciones clínicas clásicas y más comunes. Típicamente, pero no exclusivamente, las formas cutáneas diseminadas y extracutáneas, consideradas severas, ocurren en huéspedes con inmunidad celular disminuida. (Quiroz-Telles et al., 2019).

En la esporotricosis cutánea primaria el hongo penetra por la piel a través de pequeñas heridas o excoiaciones producidas por vegetales o por mordeduras y picaduras de insectos; aparece un chancro dos semanas después de la inoculación y después un complejo cutáneo linfangítico que sigue los linfáticos regionales. A veces la lesión inicial se extiende por contigüidad, también puede haber múltiples chancros de inoculación. (Arenas, 2014)

1.2 Epidemiología

La esporotricosis se ha descrito en todo el mundo, sin embargo, existe una curiosa divergencia con respecto a la distribución geográfica y la incidencia de los agentes etiológicos. De hecho, algunas especies son más ubicuas que otras. En Asia, especialmente en China, se estima que *S. globosa* es el agente etiológico en el 99.3% de los casos de esporotricosis humana. En otras áreas endémicas, como Australia y Sudáfrica (94%), también en América del Norte y parte de América del Sur. (89%), *S. schenckii* es la especie predominante. En las regiones del sur y sureste de Brasil, *S. brasiliensis* (88%) es el principal agente etiológico de la esporotricosis humana y animal. (Orofino-Costa et al., 2017). La esporotricosis ha sido reportada como enfermedad endémica en áreas como Perú, Brasil, México, Uruguay, Costa Rica, Guatemala, Colombia y Venezuela, y se ha presentado como una infección fúngica importante en las últimas dos décadas debido a los cambios en la distribución epidemiológica, la evolución taxonómica y los brotes múltiples. La esporotricosis en México ocurre principalmente en regiones con un clima tropical y húmedo. Si bien se han notificado casos en todo el país, la mayor prevalencia se ha observado en dos zonas: los estados de Jalisco y Puebla. Las especies de *Sporothrix* difieren en su distribución geográfica. (Rojas et al., 2018)

1.3 Complejo *Sporothrix spp*

Sporothrix schenckii es un hongo termófilo dimórfico, por lo tanto la morfología macroscópica varía dependiendo de la temperatura. A temperatura promedio de 26 a 27°C el crecimiento es de 3 a 5 días, se prefiere utilizar medios de gelosa Sabouraud solo o con antibióticos y agar sangre cuando se cultiva a temperatura ambiente. Al principio la colonia es cremosa o un poco pigmentada y brillante, después es membranosa; algunas son color beige y otras tienen pigmentación variable café o negra. En la parte central presenta acúmulos de filamentos o coremios. A temperatura de 35 o 37 °C en agar sangre líquido o en agar cerebro-corazón crece en forma de levadura y adopta el aspecto de colonia bacteriana de color gris o crema. (Arenas, 2014)

De manera similar a sus características macroscópicas, las microscópicas también varían de acuerdo a la temperatura. A 25°C se observan hifas hialinas de 1 a 2 micrómetros, septadas y ramificadas. Su reproducción es por conidios acrógenos o simpodulosporas que se forman a los lados del filamento, dispuesto en racimos y dan la imagen típica de “duraznos en floración”, son hialinos a marrones, ovals y de paredes delgadas. También pueden ser conidios pleurógenos los cuales son marrones, ovalados o triangulare, de paredes gruesas, y nacen en un corto pedículo o esterigma, y se conocen como radulosporas que al desprenderse dejan los pequeños pedículos. Éste último tipo de conidios está típicamente presente solo en cepas recién aisladas. A 37 ° C, *Sporothrix schenckii* produce células de levadura ovals o en forma de cigarro (también llamadas "cuerpos de cigarro"). (Arenas, 2014).

1.4 La Piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo y representa aproximadamente el 15% del peso corporal total de los adultos. Realiza muchas funciones vitales, incluida la protección contra agresores externos físicos, químicos y biológicos, así como la prevención del exceso de pérdida de agua del cuerpo y un papel en la termorregulación. (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011)

El sistema integumentario está formado por la piel y sus estructuras derivadas. La piel está compuesta de tres capas: la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo. Figura 1. (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011)

El nivel más externo, la epidermis, consiste en un conjunto específico de células conocidas como queratinocitos, que funcionan para sintetizar la queratina, una proteína larga y filosa con un papel protector. La capa media, la dermis, está formada fundamentalmente por la proteína estructural fibrilar conocida como colágeno. La dermis se encuentra en el tejido subcutáneo, o panículo, que contiene pequeños lóbulos de células grasas conocidas como lipocitos. El grosor de estas capas varía considerablemente, dependiendo de la ubicación geográfica en la anatomía del cuerpo. (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011)



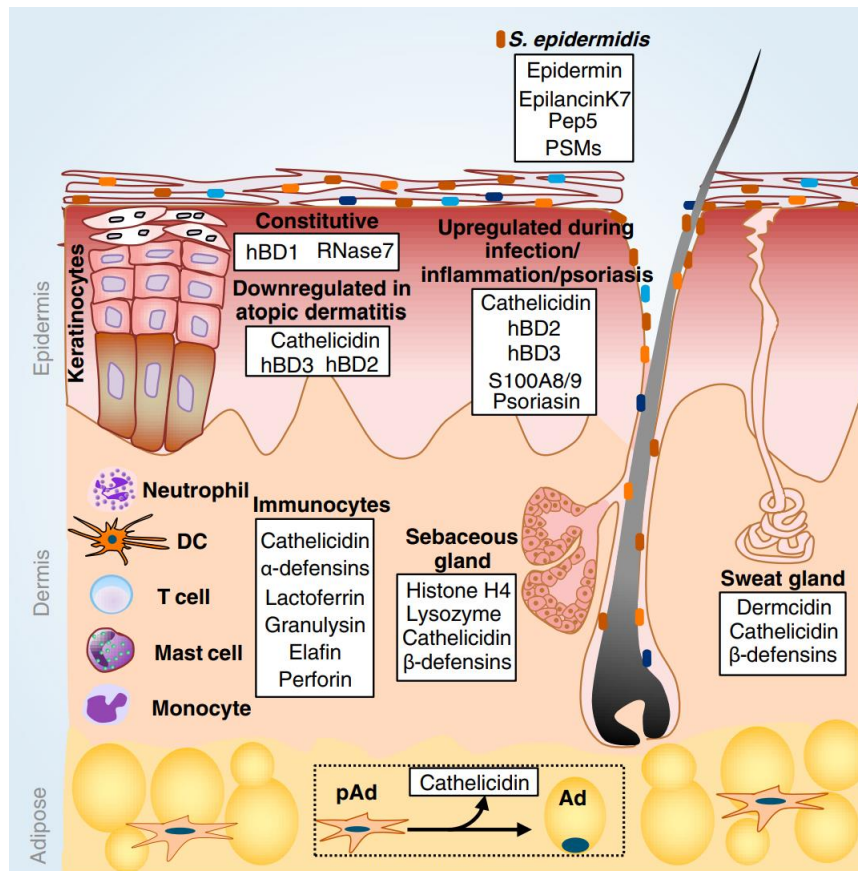


Figura 1. La defensa de los AMP "en capas" utilizada por la piel humana. La imagen describe una lista representativa pero incompleta de AMP expresados por piel humana. Los queratinocitos epidérmicos expresan constitutivamente la beta-defensina 1 humana (hBD1) y la RNasa7, mientras que otros AMP son regulado a la baja en la dermatitis atópica (EA) o regulado al alza durante la infección e inflamación o en soriasis. Las bacterias comensales, como *S. epidermidis*, producen varios AMP, como modulinas solubles en fenol (PSM). En la dermis, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas ecninas también secretan AMP. Inmunocitos, incluidos neutrófilos, células dendríticas (DC), células T, mastocitos y monocitos, se reclutan en la piel tras la infección o la inflamación, y los AMP producidos por esas células se enlistan. En la capa adiposa dérmica, la catelicidina se produce durante la diferenciación de adipocitos (Ad) de preadipocitos (pAd). (Zhang & Gallo, 2016)

La dermis es un sistema integrado de fibras, filamentos y tejido conectivo amorfo que adapta la entrada inducida por estímulos de redes nerviosas y vasculares, apéndices derivados de la epidermis, fibroblastos, macrófagos y mastocitos. La dermis comprende la mayor parte de la piel y provee flexibilidad, elasticidad y fuerza de tensión. Ésta capa protege a la piel de agresiones físicas, retiene el agua, tiene papel en la termorregulación e incluye receptores y sensores de estimulación. La dermis interactúa con la epidermis para el mantenimiento de las propiedades de ambos tejidos. Los componentes de la matriz, incluyen colágeno y tejido conectivo elástico. (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011)

Los constituyentes de la dermis son mesodérmicos de origen, exceptuando los nervios, los cuales, como los melanocitos, derivan de la cresta neural. Hasta la sexta

semana de la vida en un feto, la dermis es mayoritariamente un conjunto de células en forma dendrítica llenas de ácidos-muco-polisacáridos, las cuales son precursores de fibroblastos. Por la semana 12, los fibroblastos están activos sintetizando las fibras del retículo, fibras elásticas y colágeno. Una red vascular desarrollada y células grasas han aparecido debajo de la dermis por la semana 24. La dermis en los infantes está compuesta por pequeños paquetes de colágeno, mientras que la dermis en un adulto contiene paquetes más delgados de colágeno. (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011)

1.4.1 Fibroblastos

El fibroblasto es una célula dinámica, la cual ejerce funciones tisulares a nivel local y del sistema inmune, y al evaluarlo en cultivo se ha encontrado de manera interesante, que los fibroblastos no son homogéneos entre sí, sino que presentan diferencias en morfología y función de acuerdo con la ubicación en la que se encuentren. (Acosta Gómez, 2006). Son las células más abundantes en los tejidos conectivos. Contribuyen principalmente a la secreción de material de profilaxis de matriz extrarrenal para mantener la integridad estructural de los tejidos conectivos. Éstas células son los precursores necesarios para la producción de todos los compuestos de matriz extracelular, incluyendo la matriz base y sus hebras. (Ali Nilforoushzadeh et al., 2017).

En los últimos años, se han realizado varios estudios para verificar la capacidad de los fibroblastos para regenerar la estructura de la piel. El daño tisular induce fibroblastos y mitosis. Por otro lado, en áreas lesionadas, estas células inician procesos de señalización celular, proliferan y migran a la herida, contribuyen a la producción de matriz extracelular y reparan tejidos. Las proteínas de la matriz extracelular actúan como un almacén para la migración de células inflamatorias y la producción de tejidos granulares. (Ali Nilforoushzadeh et al., 2017)

La formación de tejido granular proporciona un sustrato temporal para fortalecer los tejidos epiteliales de los queratinocitos. Con la formación de fibroblastos, producen elementos contráctiles para el cierre de la herida y forman colágeno tipo I para

acelerar el proceso de curación. El colágeno es la forma más común de envoltura extracelular, que forma fibras en un entorno extracelular; por lo tanto, determina la forma de los tejidos. El colágeno se almacena como precursor en las células fibroblásticas y se secreta al medio extracelular. Los fibroblastos inyectados estimulan la producción de proteínas de la matriz extracelular o la regeneración del tejido de la piel. (Ali Nilforoushzadeh et al., 2017)

1.4.2 Melanocitos

Los melanocitos son células que se originan a partir de la cresta neural. En la epidermis humana, forman una estrecha asociación con los queratinocitos a través de sus prolongaciones dendríticas. Los melanocitos son un tipo celular bien conocido por el papel que juegan en la pigmentación de la piel. (Mora-Mendoza, 2017).

Los melanocitos (5-10%) epidérmicos se presentan en el estrato basal y asociados con el folículo piloso. Estas células son elementos clave en el proceso de la pigmentación de la piel dada su capacidad para producir melanina mediante el proceso de la melanogénesis. (Mora-Mendoza, 2017).

Morfológicamente, los melanocitos se caracterizan por presentar largas prolongaciones, denominadas prolongaciones dendríticas, que se extienden y ramifican entre los queratinocitos vecinos. A través de estas prolongaciones cada melanocito hace contacto con alrededor de 30 - 40 queratinocitos; constituyendo, el conjunto formado por el melanocito y los queratinocitos con los que se relaciona, la denominada unidad melano-epidérmica. Esta asociación permite al melanocito transferir melanina a los queratinocitos, lo que determina el color de la piel y confiere protección frente a los efectos dañinos de la radiación ultravioleta (UVR). (Mora-Mendoza, 2017).

1.5 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMP) son moléculas de pequeño peso molecular, conformados a partir de 5 hasta 50 aminoácidos, representan la mayor defensa de la inmunidad innata en el epitelio, donde son secretados principalmente por los queratinocitos. Adicionalmente también contribuyen a los diversos mecanismos microbicidas, trabajando en la eliminación de bacterias, junto con los fagosomas de neutrófilos y otros fagocitos. Estos pueden ser estructuralmente divergentes y formar diferentes clases incluyendo péptidos lineales, entrelazados y otros más complicados, a menudo modificados post-traduccionalmente. En el humano los péptidos antimicrobianos más importantes pertenecen a la clase de las defensinas, los cuáles pueden ser clasificados en alfa y beta defensinas, y las catelicidinas, de las cuáles solo hay una presente en el humano. La mayoría de los AMP son catiónicos e interactúan con blancos aniónicos. (Cheung & Otto, 2018).

Las defensinas son el grupo más grande dentro de los AMP. Éstos péptidos son ricos en cisteína y tienen diversas secuencias y estructuras, estabilizadas en formas compactas por tres o cuatro puentes disulfuro de cisteína conservados.

Tienen al menos dos cargas positivas (residuos de lisina o arginina) y son moléculas pequeñas, que varían aproximadamente entre 12 a 50 aminoácidos. (Silva et al., 2014)

Las defensinas de los vertebrados se dividen en tres subfamilias: α -, β - y θ -defensinas. Las α -defensinas están presentes en mamíferos como humanos, monos y varias especies de roedores, siendo particularmente abundantes neutrófilos, ciertas poblaciones de macrófagos y células de Paneth del intestino delgado. Las β -defensinas se encuentran en una amplia gama de vertebrados, presentando un motivo estructural $\alpha\beta$ estabilizado con cisteína compuesto por una lámina β antiparalela y una hélice α . Como ejemplo, en neutrófilos bovinos, se han identificado hasta 13 β -defensinas. Sin embargo, en otras especies, las β -defensinas son producidas principalmente por células epiteliales que recubren diferentes órganos (ej., Epidermis, árbol bronquial y extracto genitourinario). Las θ -defensinas, presentes solo en los monos del viejo mundo, son cíclicas y derivan de las α -defensinas. (Silva et al., 2014)

1.5.1 β -Defensinas

La β -Defensina Humana de tipo 1 (hBD1) (figura2) es constitutivamente expresado normalmente en la piel humana, dentro de las funciones que realiza es la quimioatracción de MDDC, también aumenta los marcadores coestimuladores CD80, CD86 y CD40, así como los marcadores de maduración CD83 y HLA-DR, y el receptor del captador CD91. De igual manera induce la producción de TNF α , IL-6 e IL-12p70, y mejora la proliferación de células T mediada por DC. El péptido hBD1 también induce la migración de la línea de mastocitos inmaduros HMC-1 de una manera dependiente de la dosis. hBD1 induce la migración de HEK293 que expresa CCR6, el receptor del ligando 20 de quimiocinas (CCL20; también conocido como MIP-3 α); sin embargo, el papel de CCR6 en las funciones inmunes de hBD1 en las células primarias no está bien establecido. (Fruitwala et al., 2019)

La actividad de hBD1 contra patógenos fúngicos como *Candida albicans*, ya ha sido investigado anteriormente, demostrando efectividad en la actividad fungicida. (Krishnakumari et al., 2009).

La β -Defensina Humana de tipo 2 (hBD2) (figura 2) regula de manera positiva las IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, MIP-1 β y RANTES en PBMC, así como múltiples actividades en los mastocitos, incluida la inducción de la migración celular, desgranulación y producción de prostaglandina D2 . Los estudios sobre el papel de los hBD en la inflamación de la piel demuestran la interacción entre los hBD y las citocinas inflamatorias. Se encuentran niveles elevados de IL-17A, IL-22, oncostatina M, TNF α e IL-1 α en la piel psoriásica, y estas citocinas pueden inducir hBD2 en explantes de piel. En la dermatitis atópica, hBD2 mejora la producción de IL-22 y oncostatina M. La IL-22 y oncostatina M promueven la inducción de hBD2 en los queratinocitos. Las rutas de la quinasa MAPK, STAT3 y p38 están implicadas en la producción de hBD2 inducida por IL-22. MEK participa en la inducción de hBD2 inducida por oncostatina M, mientras que la vía NF- κ B participa en la producción de hBD2 mediada por oncostatina M. (Fruitwala et al., 2019).

La actividad de hBD2 contra patógenos fúngicos ya ha sido investigado anteriormente, demostrando la actividad fungicida en *Candida albicans*. (Vylkova et al., 2009).

Las hBD-3 (figura 2) al igual que las hBD-2 son inducibles por estímulos inflamatorios y pueden detectarse in vitro después de la coestimulación con IL-1 o TNF- α . Este tipo de defensinas son un poco más grandes (5kD) y su mecanismo de acción es similar al de las otras defensinas. La hBD-3 se puede detectar en células epiteliales del tracto respiratorio, genitourinario, en la piel y en las amígdalas y, al igual que las otras β -defensinas, tienen un amplio espectro antimicrobiano. La diferencia entre las hBD-2 y la hBD-3 es que esta última tiene acción bactericida más potente in vitro y mayor actividad en contra de *Staphylococcus aureus*. (Rivas-Santiago et al., 2006).

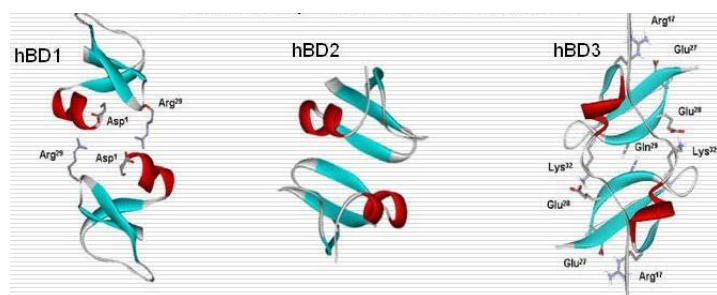


Figura 2. Estructura de las beta-defensinas humanas presentes en la piel.

1.5.2 Catelicidinas

En 1992, Zannetti descubrió en bovinos y cerdos un grupo de péptidos antimicrobianos diferente a los antes descritos, y los nombró catelicidinas, que actualmente se conocen con el nombre de PR-39 en cerdos y LL-37 en humanos. Estas catelicidinas son multifuncionales y tienen una clara importancia para la respuesta inmune del hospedero. (Rivas-Santiago et al., 2006)

La LL-37 (figura 3) se origina a partir de un precursor, una molécula de 18 kD denominada hCAP-18, la cual existe constitutivamente en los gránulos de los neutrófilos y es secretada por células epiteliales, monocitos, linfocitos T y células cebadas cuando estas células se encuentran en presencia de moléculas asociadas a patógenos. Además, se ha visto que las catelicidinas tienen un efecto

antimicrobiano muy alto, y que al igual que las defensinas, este tipo de péptidos actúan sobre la membrana de los patógenos formando poros que llevan a la lisis del microorganismo, y además pueden actuar directamente sobre el DNA, al unirse a los grupos fosfato del DNA por uniones electrostáticas para después insertarse en la cadena de nucleótidos del DNA. Se ha observado que la inserción a la cadena del DNA es más fuerte en la unión de los nucleótidos adenina-timina y citosina-guanina y que inhibe de esta forma la replicación del DNA. La quimiotáxis es otra actividad que se conoce de LL-37, principalmente sobre neutrófilos y linfocitos CD4+. La LL-37 es única en humanos y se encuentra en bajas concentraciones, por lo que es necesario producirla sintéticamente para su estudio. (Rivas-Santiago et al., 2006)



Figura 3. Estructura y secuencia de la catelicidina LL-37

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- a) Evaluar la expresión de péptidos antimicrobianos en una línea celular de fibroblastos y melanocitos humanos infectados con *Sporothrix schenckii*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Establecer un modelo de infección celular en fibroblastos (BJ ATCC) y melanocitos (B16F1) humanos infectados con *Sporothrix schenckii* con la forma levaduriforme del hongo.
- b) Evaluar la expresión de los péptidos antimicrobianos hBD1, hBD2, hBD3 y LL-37 en fibroblastos infectados con *Sporothrix schenckii*, con la forma levaduriforme del hongo.

3. Justificación

La resistencia a los antimicóticos era un fenómeno poco frecuente en los años ochenta, en el siglo pasado. Sin embargo, en los últimos años, el número de casos de micosis con falla terapéutica se ha incrementado en México y el mundo, lo cual es atribuible a una deficiencia en la función inmunológica, baja biodisponibilidad de los antimicóticos, alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos, interacciones medicamentosas y resistencia antifúngica primaria o secundaria. (Rivas-Santiago et al., 2006).

El potencial terapéutico de las defensinas en enfermedades infecciosas es muy amplio. En pacientes con quemaduras graves se ha demostrado la pérdida de la capacidad de producción de defensinas en la piel afectada, por lo que en estos pacientes las infecciones recurrentes son comunes y, en ocasiones, se convierten en complicaciones mortales. Se ha observado que la aplicación de defensinas por vía tópica en estos pacientes disminuye hasta en 90% las infecciones recurrentes, además de que la aplicación de los péptidos antimicrobianos induce una mejor cicatrización debido a que algunos péptidos antimicrobianos como las β -defensinas, pero sobre todo LL-37, estimulan la proliferación de las células epiteliales además de su efecto antimicrobiano. Esto ha sido demostrado por Nizet y colaboradores, quienes crearon un ratón knockout para CRAMP el cual es homólogo humano para LL-37. Estos ratones fueron infectados en la piel con *Streptococcus* del grupo A, y los resultados fueron contundentes. Los ratones que no producían CRAMP mostraron infección necrótica en la piel y una elevada carga bacteriana, al contrario de los ratones normales, los cuales no mostraron lesión alguna por la infección y las unidades formadoras de colonias fueron escasas. (Rivas-Santiago et al., 2006)

El amplio espectro y la baja incidencia de resistencia bacteriana de las β -defensinas y catelicidina, las sitúan como candidatas importantes para la investigación y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Su baja toxicidad, así como la posibilidad de una administración tópica o en forma sistémica, les dan una ventaja sobre otros antibióticos. (Rivas-Santiago et al., 2006)

4. Materiales y Métodos

4.1 Cultivo celular de fibroblastos

La línea celular de fibroblastos de la colección BJ-ATCC y los melanocitos de la línea celular B16F1. Se cultivaron en medio F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (biowest) más penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 mcg/ml). Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Se realizó el recambio de medio cada tercer día, hasta obtener un número suficiente de células para cada experimento.

4.2 Cultivo del microorganismo y suspensión

Se utilizó aislado clínico de *Sporothrix schenckii*, proporcionados por el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” La fase levaduriforme se obtuvo en medio BHI durante 5 días a 37 °C. Una vez crecida la cepa, se centrifugó y la biomasa se resuspendió en solución salina al 0.9 %, ajustando a una concentración de 300 x 10⁶ UFC/mL (tubo 1 de Mc Farland).

4.3 Ensayo de infección celular

Se realizaron cinéticas de infección independientes, para ello se obtuvieron monocapas de células en placas de seis pozos con 400 x10³ células/pozo, para el tiempo de infección correspondiente a 12 h. El control negativo (células sin infectar) y el control positivo, células estimuladas con PMA a una concentración de 1 ug por 1x10⁶ células. Se lavó una vez con PBS 1X para eliminar el suero del medio de cultivo. Los fibroblastos y melanocitos se infectaron con la suspensión de levaduras a una MOI 10:1, durante 2 h y se tomaron las muestras en el tiempo post-infección de 12 h. Para prevenir el crecimiento extracelular de *Sporothrix*, las monocapas infectadas se trataron con 1 µg/mL de anfotericina B, el cual se dejó hasta el término de la cinética.

A las células infectadas se les adicionó 500 µL de TRIzol (Invitrogen) directamente a cada pozo y se llevó a congelación para la extracción de RNA total y la amplificación de los genes de interés para péptidos antimicrobianos.

4.4 Extracción de ARN total y RT-qPCR para los fragmentos de los genes de péptidos antimicrobianos

Se infectaron células como se describió anteriormente, a las muestras celulares obtenidas en cada tiempo de infección, se les adicionó 500 µL de TRIzol (Invitrogen), y se almacenaron a -70°C para la extracción de ARN total. El RNA total fue aislado y purificado siguiendo las especificaciones del fabricante de TRIzol (Invitrogen).

4.4.1 Retrotranscripción: A 11 µL del ARN total obtenido de cada muestra, (entre 1 y 3 µg de ARN total) se le adicionó 5 µL del Buffer para la transcriptasa reversa (RT), 1 µL dNTPs 10 µM (Invitrogen), 1 µL de ditioneitol 0.5 mM (DTT), 1 µL de MgSO₄ y por último se agregó 1 µL de la RT MMLV (200 U, transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina, Invitrogen). Se precalentó el ARN incubándolo a 75°C por 10 minutos, posteriormente 2 minutos a temperatura ambiente y por último durante una hora a 42°C para obtener el cDNA. Se cuantificó la cantidad de cDNA en el equipo Nanodrop (ThermoScientific) ajustando la concentración a 100 ng/ µL y se realizó las PCRs cuantitativas.

4.4.2 PCR tiempo real (QPCR). Para amplificar los genes de interés se realizó la técnica de qPCR, usando una mezcla de reacción que contuvo: 2.5 µL del regulador 10X (KCl 50 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 9.3); 0.5 µL de MgCl₂ 50 mM; 0.5 µL de dNTP 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP mezcla); 0.5 µL de 10 µM de oligonucleótidos: forward (sentido) y reverse (antisentido), 1 µL del cDNA obtenida del procedimiento de RT; se usó Eva Green (Biotium) como fluorocromo y ROX (Invitrogen) como colorante de referencia pasiva. Los genes para todos los péptidos antimicrobianos fueron amplificados en un termociclador (Applied Biosystems StepOnePlus™, Real-Time PCR System, Thermal Cycling Block), bajo las siguientes condiciones: 35 ciclos a las temperaturas de 95 °C durante 15 seg (temperatura de desnaturalización), 58 °C durante 15 seg (temperatura de alineación) y 72 °C durante 15 seg (temperatura de extensión). Para todos los casos se utilizó el gen endógeno GAPDH y como calibrador del experimento las células sin infectar.

Los iniciadores específicos que se utilizaron se muestran en la tabla 1. Los genes para todos los péptidos fueron amplificados de la siguiente manera, 15 s de desnaturalización a 95°C, 15 s de alineamiento a 60°C por 35 ciclos y para todos los casos se realizaron curvas melt.

4.5 Análisis cuantitativo de la expresión de los genes

Todos los valores numéricos de cada gen fueron normalizados con su respectivo valor de gen endógeno GAPDH y los experimentos fueron calibrados utilizando el nivel basal de la expresión de cada gen como valor inicial (células sin infectar). Todos los valores fueron sometidos al análisis de expresión relativa de $\Delta\Delta Ct$ usando el software Step One V.2.3.1 de Life Technologies USA.

Tabla 1. Iniciadores para la detección de cada uno de los genes de péptidos antimicrobianos.

GEN	INICIADORES	TIPO
GAPDH	5'-GGTCATCCATGACAACCTTTGG-3'	Forward
	5'GTCATACCAGGAATTGAGCTTGAC-3'	Reverse
hBD1	5'- TGTCTGAGATGGCCTCAGGT-3'	Forward
	5'- CAGGTGCCTTTGAATTTTGGT-3'	Reverse
hBD2	5'-CATCAGCCATGAGGGTCT-3'	Forward
	5'- AGGCAGGTAACAGGATCG-3'	Reverse
hBD3	5'- TGTTTGCTTTGCTCTTCCTG-3'	Forward
	5'-CGCCTCTGACTCTGCAATAA- 3'	Reverse
LL37	5'- TCGGATGCTAACCTCTACCG-3'	Forward
	5'- ACAGGCTTTGGCGTGTCT-3'	Reverse

5. Objetivos alcanzados

- a) Se evaluó la expresión de péptidos antimicrobianos en una línea celular de fibroblastos humanos y melanocitos de ratón infectados con *Sporothrix schenckii*.
- b) Se estableció un modelo de infección celular en fibroblastos (BJ ATCC) humanos y melanocitos (B16F1) de ratón infectados con *Sporothrix schenckii* con la forma levaduriforme del hongo como herramienta para posteriores investigaciones.
- c) Se evaluó la expresión de los péptidos antimicrobianos: hBD1, hBD2, hBD3 y LL-37 en fibroblastos humanos y melanocitos de ratón infectados con *Sporothrix schenckii*, con la forma levaduriforme del hongo.

6. Resultados

6.1 Cultivo del hongo

El cultivo del hongo se llevó a cabo en medio BHI y se incubó durante 5 semanas a una temperatura de 37°C, para poder obtener la fase levaduriforme. El cultivo de *Sporothrix schenckii* presentó características macroscópicas propias de su forma levaduriforme, es decir un aspecto parecido al de una colonia bacteriana de color crema. De igual manera microscópicamente se pudo observar los llamados “cuerpos de cigarro” característicos de ésta fase (Figura 4).

6.2 Cultivo celular

El cultivo de ambas líneas celulares se llevó cabo bajo condiciones controladas, para la línea celular de melanocitos B16F1 se utilizó medio DMEM+F12 en proporciones 1:1 y para la línea celular de fibroblastos BJATCC se utilizó medio MEM. Se incubaron a una temperatura de 35°C durante 5 semanas hasta que se obtuvo la confluencia celular como se puede observar en las figuras 5 y 6.

6.3 Expresión de péptidos antimicrobianos.

Los resultados de los péptidos expresados por cada línea celular se presentan en los gráficos A y B. Se puede observar que la catelicidina humana LL-37 se presenta en una mayor proporción a comparación de las tres β defensinas humanas estudiadas en ambas líneas celulares al realizar la infección. De manera contraria la β defensina humana hBD3 es la que menor proporción presenta en fibroblastos, así como en los melanocitos junto con hBD1.

En la gráfica C se puede apreciar como la expresión de hBD1 entre ambas líneas celulares muestra una variabilidad casi imperceptible, a pesar de que entre sus respectivos controles positivos la diferencia es considerablemente mayor. Por otro lado, la expresión de hBD2 en melanocitos B16F1 parece duplicarse en comparación con los fibroblastos BJATCC. Asimismo, la expresión de hBD2 parece ser igual o mayor en contraste con sus respectivos controles positivos en ambas líneas celulares.

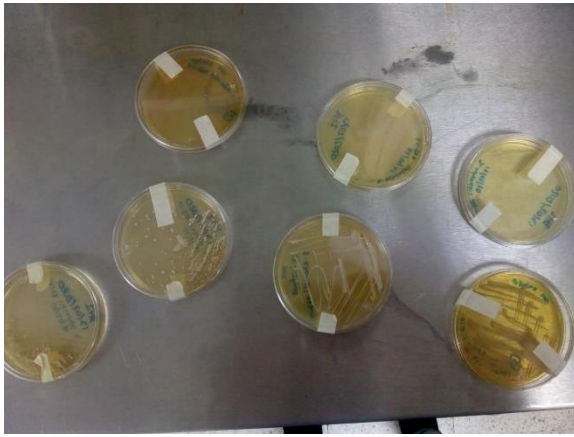


Figura 4. *Sporothrix schenckii* en fase levaduriforme.



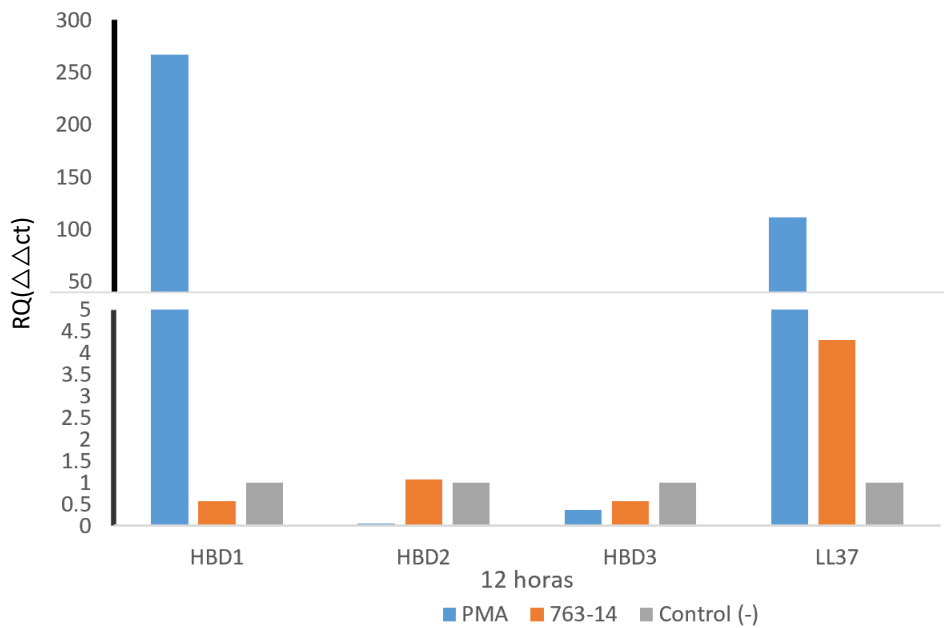
Figura 5. Melanocitos B16F1 en confluencia



Figura 6. Fibroblastos BJATCC en confluencia

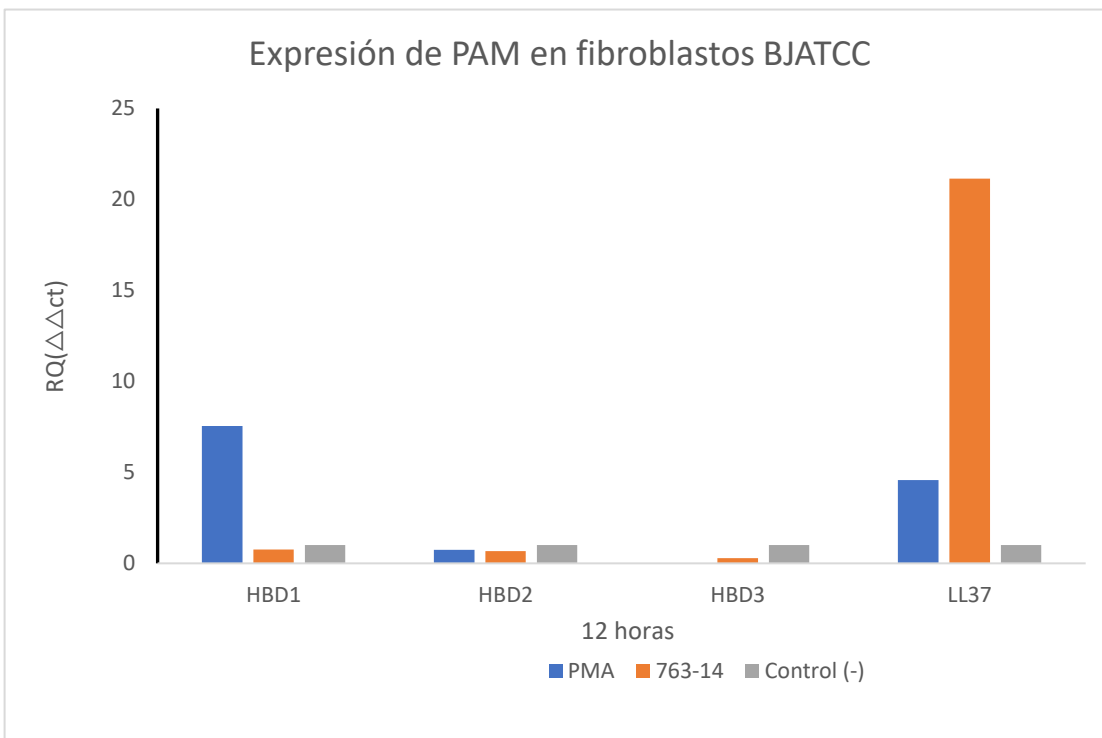
La gráfica D nos presenta una comparación y expresión de los péptidos con mayor y menor expresión, los cuales son hBD3 y LL-37. Como se mencionó anteriormente se puede observar que LL-37 se expresa en mayor medida a comparación de hBD3, siendo los fibroblastos los que presentan una mayor expresión de esta catelicidina. De manera contraria hBD3 presenta una mayor expresión en los melanocitos B16F1 que en los fibroblastos BJATCC.

Expresión de PAM en melanocitos B16F1



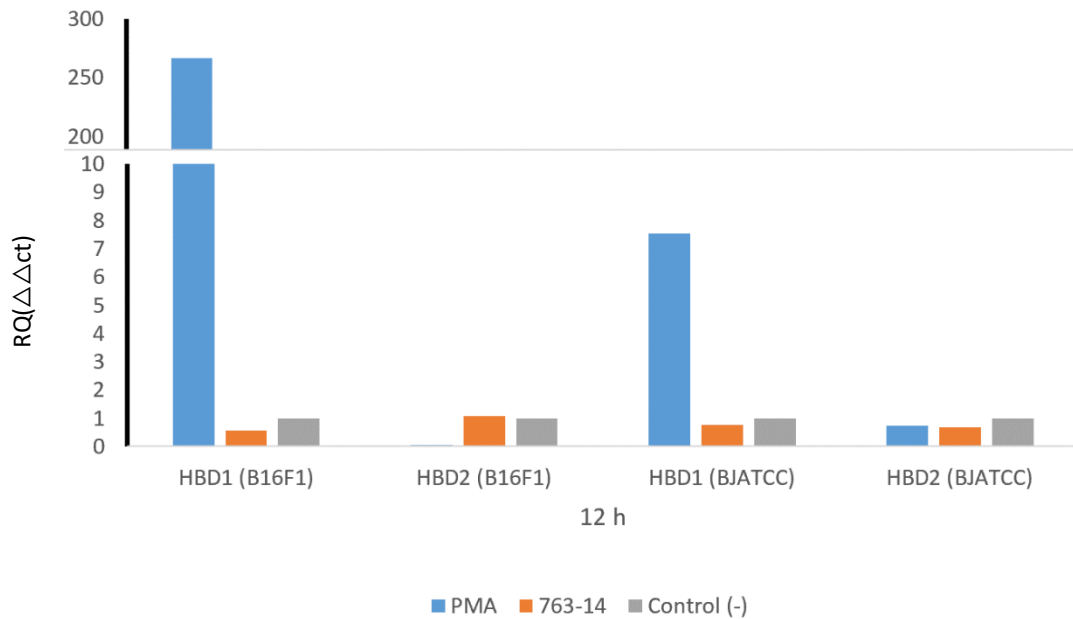
Gráfica A. Expresión de los PAM en unidades de expresión relativa $RQ(\Delta\Delta ct)$ a las 12 horas de la infección con sus respectivos controles positivos en la línea celular de melanocitos B16F1. células infectadas (763-14) y control positivo (PMA).

Expresión de PAM en fibroblastos BJATCC



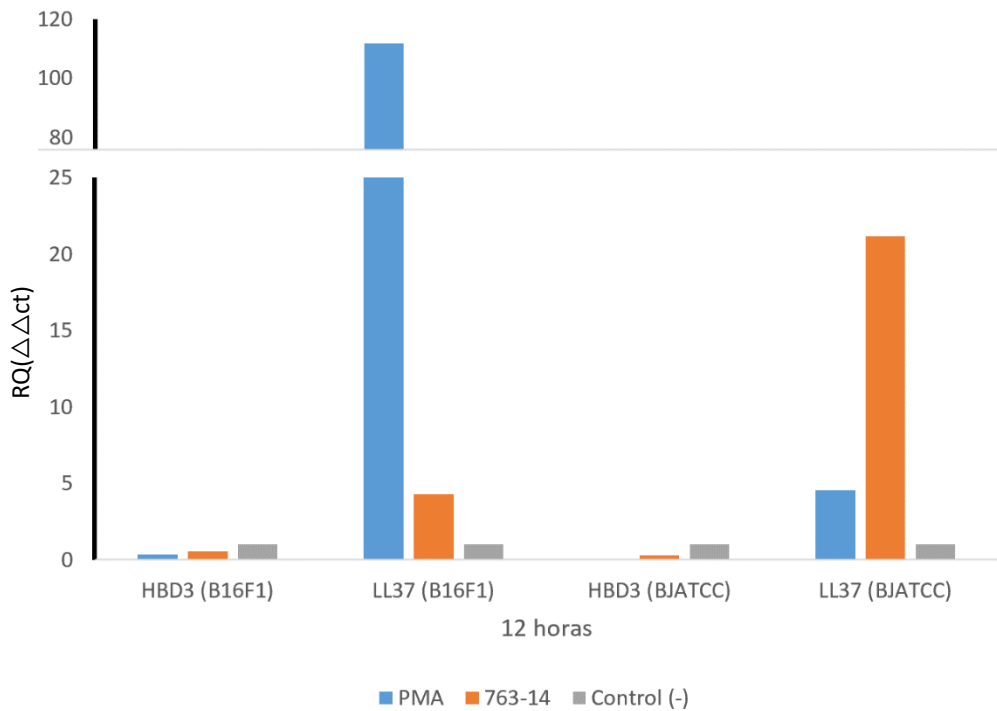
Gráfica B. Expresión de los PAM en unidades de expresión relativa $RQ(\Delta\Delta ct)$ a las 12 horas de la infección con sus respectivos controles positivos en la línea celular de fibroblastos BJATCC. Células infectadas (763-14) y control positivo (PMA).

Expresión de HBD1 y HBD2



Gráfica C. Comparación entre ambas líneas celulares (melanocitos B16F1 y fibroblastos BJATCC), células infectadas (763-14) y control positivo (PMA), para la expresión de hBD1 Y hBD2.

Expresión de HBD3 y LL37



Gráfica D. Comparación entre ambas líneas celulares (melanocitos B16F1 y fibroblastos BJATCC), células infectadas (763-14) y control positivo (PMA), para la expresión de hBD3 Y LL-37.

7. Discusión

Este estudio reporta la expresión in vitro de los ARNm de cuatro péptidos antimicrobianos pertenecientes a la respuesta inmune innata en fibroblastos humanos y melanocitos de ratón al realizar una infección con *S. Schenckii*, con la finalidad de obtener información valiosa para el posible desarrollo de un futuro tratamiento contra la esporotricosis. Se confirmaron y contradijeron algunas observaciones realizadas en investigaciones anteriores.

El forbol-12-miristato-13-acetato o también conocido como PMA es un éster utilizado ampliamente en investigación biomédica debido a su estructura análoga con el diacilglicerol, quien tiene la capacidad de activar la proteína quinasa C (PKC) por medio de una cascada de señalización (Sigma-Aldrich, 2002). La activación de la PKC induce la producción de proteínas con actividad inmunológica, como las interleucinas y algunas defensinas. De acuerdo a los resultados obtenidos por Kilsdonk y colaboradores el PMA indujo en gran medida el hBD1 y hBD2 en queratinocitos durante un estudio in vitro. Sin embargo, no se reportó incremento de las defensinas por el PMA en los fibroblastos durante el mismo ensayo in vitro (Kilsdonk et al., 2017). En los resultados obtenidos se puede observar que, aunque hBD1 fue inducida por el PMA, hBD2 y hBD3 no fueron inducidas por este mismo, siendo igual o incluso menor la expresión a comparación de las células infectadas con *S. Schenckii*, esto dificulta la interpretación de los resultados obtenidos. Esto puede ser porque la expresión de las defensinas por el PMA puede variar dependiendo de la célula analizada, o por razones que tiene que ver con el tiempo de expresión, como ocurrió en un estudio realizado por Castañeda y colaboradores en el cual se realizó un ensayo in vitro con fibroblastos, los cuales fueron infectados por distintas cepas de mycobacteria y se observó que la expresión de hBD1 alcanzaba los máximos picos a diferentes tiempos, dependiendo la cepa utilizada (a 24 o 48 horas después de la infección) (Castañeda-Sánchez et al., 2013). Es decir que posiblemente la expresión de ambas defensinas con el PMA en fibroblastos y melanocitos hubiera alcanzado una mejor producción con un mayor tiempo de espera post-infección.

Como se mencionó anteriormente la expresión de hBD1 no se vio afectada en ambas líneas celulares en el control positivo, esto nos permitió apreciar que la inducción de la expresión de hBD1 en fibroblastos y melanocitos infectados por *S. Schenckii* fue baja, siendo poco relevante para futuros alternativas a tratamientos médicos. Esta

información concuerda con los resultados por Donnarumma y colaboradores en el cual se observó durante un ensayo in vitro con queratinocitos, que *Malassezia furfur* no modifica la expresión de hBD1 (Donnarumma et al., 2014).

A pesar de haber tenido fallas en el control positivo con PMA, se puede apreciar que la expresión de hBD2 y hBD3 es mucho menor que HBD1 y LL-37 en los fibroblastos y que no existen diferencias con el control negativo, por lo tanto, se concluye que no hay relevancia en la expresión de ARNm de dichos péptidos. En los melanocitos de ratón el hBD2 presentó una expresión mayor que hBD1 y un ligero aumento a comparación de su control negativo, esta variación puede deberse a que se utilizaron células de ratón en vez de humanas, a pesar de esto la expresión de las 3 defensinas resultó casi igual o más baja que su control negativo, con esto se infiere que la expresión de las tres defensinas es escasa en la infección con *S. Schenckii*. En el estudio realizado por Donnarumma y colaboradores se observó que, aunque *M. furfur* no modifica la expresión de hBD1, si regula positivamente a hBD2 a través de PKC en queratinocitos humanos (Donnarumma et al., 2014).

En ambas líneas celulares el péptido LL37 fue el que tuvo una mayor inducción, demostrando que la infección con *S. Schenckii* induce una respuesta inmune en la que se ve involucrada la catelicidina LL-37. Se conoce que, ante la presencia de patógenos, el epitelio pulmonar humano responde aumentando rápidamente la secreción de LL-37 en las superficies de las vías respiratorias, que posteriormente mata a los microbios cercanos (Zasloff, 2002). El contacto bacteriano con las células epiteliales del tracto urinario provoca una rápida producción y secreción de LL-37 humano en la orina. (Chromek et al., 2006). La actividad fungicida de LL-37 también ha sido reportada anteriormente contra el hongo *C. albicans* interviniendo no solo en la muerte de *C. albicans*, sino también en la adhesión del hongo a las superficies celulares humanas. (Tsai et al., 2011).

De igual forma el estudio realizado por Castañeda y colaboradores en fibroblastos limbocorneales humanos infectados por micobacteria, obtuvo que LL-37 fue inducido a partir de las 6 horas post-infección con las tres cepas de mycobacteria, la mayor inducción del péptido se logró cuando se infectaron los fibroblastos con *M. abscessus* en el cual se llegó a obtener aproximadamente 400 unidades de expresión relativa. Coincidentemente este ensayo analizó hBD1, hBD2, hBD3 y LL-37 en fibroblastos

limbocorneales humanos, mismos péptidos analizados en este ensayo, obteniendo como resultado que HBD1 y LL-37 presentó variación en la expresión de sus ARNm dependiendo de la cepa utilizada, sin embargo, los ARNm de hBD2 y hBD3 no se expresaron después de la infección con ninguna de las cepas, micobacterianas. (Castañeda-Sánchez et al., 2013). Estos resultados son parecidos a los obtenidos en nuestros fibroblastos humanos.

8.Conclusión

El presente estudio realizado demuestra evidencia importante de que la infección de fibroblastos humanos y melanocitos de ratón con *S.Schenckii* modulan de manera positiva la producción de LL37 principalmente. Este hallazgo puede ser una contribución útil para posteriores estudios y el desarrollo de nuevos tratamientos contra la esporotricosis.

Bibliografía

- Acosta Gómez, A. (2006). El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Universitas Odontológica*, 26-33.
- Ali Nilforoushzadeh, M., Ahmadi Ashtiani, H. R., Jaffary, F., Jahangiri, F., Nikkhah, N., Mahmoudbeyk, M., . . . Zare, S. (2017). Dermal Fibroblast Cells: Biology and Function in Skin Regeneration. *Journal of Skin and Stem Cell*, 1-5.
- Arenas, R. G. (2014). *Micología Médica Ilustrada 5ta Edición*. México, D.F.: Mc Graw Hill.
- Arenas, R., Sánchez-Cardenas, C. D., Ramirez-Hobak, L., Ruíz Arriaga, L. F., & Vega Memije, M. E. (2018). Sporotrichosis: From KOH to Molecular Biology. *Journal of Fungi*.
- Castañeda-Sánchez, J. I., García-Peréz, B. E., Muñoz-Duarte, A. R., Baltierra-Urbe, S. L., Mejía-López, H., López-López, C., . . . Luna-Herrera, J. (2013). Defensin Production by Human Limbo-Corneal Fibroblasts. *Pathogens*, 13-32.
- Cheung, G. Y., & Otto, M. (2018). Do antimicrobial peptides and antimicrobial-peptide resistance play important roles during bacterial infection? *Future microbiology*.
- Chromek, M., Slamová, Z., Bergman, P., Kovács, L., Podracká, L., Ehrén, I., . . . Brauner, A. (2006). The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nature Medicine*, 636-641.
- Donnarumma, G., Paoletti, I., Buommino, E., Orlando, M., Tufano, M., & Baroni, A. (2004). Malassezia furfur induces the expression of α -defensin-2 in human keratinocytes in a protein kinase C-dependent manner. *Archives of Dermatological Research*, 474-481.
- Fruitwala, S., El-Naccache, D. W., & Chang, T. L. (2019). Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms. *Public Health Research Institute*.
- Kilsdonk, J., Jansen, P., Bogaard, E., Bos, C., Bergers, M., & Zeeuwen, P. (2017). The Effects of Human Beta-Defensins on Skin Cells in vitro. *Dermatology*.
- Kolarsick, P. A., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurse' Association*, 203-213.
- Krishnakumari, V., Rangaraj, N., & Nagaraj, R. (2009). Antifungal Activities of Human Beta-Defensins HBD-1 to HBD-3 and Their C-Terminal Analogs Phd1 to Phd3. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 256-260.
- Michael, Z. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 389-395.
- Mora-Mendoza, P. I. (2017). *Los Melanocitos: Función y su control por melanocortinas*. Universidad de la Laguna. Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética.
- Orofino-Costa, R., Rodrigues, A. M., Marques de Macedo, P., & Bernardes-Engemann, A. R. (2017). Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 606-620.

- Queiroz-Telles , F., Buccheri, R., & Benard, G. (2019). Sporotrichosis In Immunocompromised Hosts. *Journal of Fungi*.
- Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud pública de México*, 62-71.
- Rojas, O. C., Bonifaz , A., Campos , C., Treviño, R. J., González-Álvarez , R., & González, G. M. (2018). Molecular Identification, Antifungal Susceptibility, and Geographic Origin of Clinical Strains of *Sporothrix schenckii* Complex in Mexico. *Journal of Fungi*.
- Sellon, D., & Long, M. (2013). *Equine Infectious Diseases: Second Edition*. Elsevier.
- Sigma-Aldrich. (2002).
- Silva, P. M., Goncalves, S., & Santos, N. C. (2014). Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Frontier in microbiology*.
- Tsai, P.-W., Yang, C.-Y., Chang, H.-T., & Lan, C.-Y. (2011). Human Antimicrobial Peptide LL-37 Inhibits Adhesion of *Candida albicans* by Interacting with Yeast Cell-Wall Carbohydrates. *PLoS ONE*.
- Vylkova, S., Nayyar, N., Li, W., & Edgerton, M. (2007). Human Beta-Defensins Kill *Candida albicans* in an Energy-Dependent and Salt-Sensitive Manner without Causing Membrane Disruption. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 154-161.
- Zhang, L.-j., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology Magazine*, 14-19.