

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología Marina**

Cápsides del BMV como nanovehículos de antibióticos.

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta

José Martín Castillo Sabori

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por
José Martín Castillo Sabori

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dr. Víctor Ruíz Cortes



Dra. Clara Elizabeth Galindo
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **José Martín Castillo Sabori** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Cápsides del BMV como nanovehículos de antibióticos.

Resumen aprobado por:

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director de tesis

En este trabajo de investigación se estudió la capacidad de las cápsides virales derivadas de virus de plantas como nanovehículos de antibióticos, particularmente usando como modelo el virus del mosaico bromo (BMV). Para llevar a cabo esta investigación, las cápsides del BMV fueron funcionalizadas con los antibióticos β -lactámicos: ampicilina y aztreonam; además del aminoglucósido kanamicina. La funcionalización de la cápside viral con antibióticos fue llevada a cabo por medio de la reacción con carbodiimida para unir los antibióticos a los grupos funcionales carboxilo del BMV. Encontrando que el incremento considerable del reactivo carbodiimida puede generar agregados de partículas virales. Los resultados muestran que este virus de planta no presenta actividad antimicrobiana, observándose un efecto contrario al incrementarse el crecimiento bacteriano a causa de que la cápside viral está constituida por proteínas y constituyen una fuente de carbono; al igual que en el virus moteado amarillo del caupi (CCMV) en las pruebas realizadas el virus no presenta actividad antimicrobiana alguna en las cepas bacterianas *S. aureus* y *E. faecalis*. Para evaluar la capacidad del sistema en conjunto con péptidos antimicrobianos se usó el péptido LL-37. Los ensayos realizados muestran que el péptido LL-37 es más eficiente que la ampicilina. Además, se evaluó la capacidad antimicrobiana cualitativamente del virus BMV funcionalizado con antibióticos, obteniendo que estos pueden potenciar la actividad antimicrobiana. Adicionalmente, se evaluó la sinergia del sistema en conjunto con el péptido antimicrobiano LL-37. Los resultados indican que en la cepa *S. aureus* resistente a la kanamicina presenta inhibición cuando es tratada con el péptido LL-37 y kanamicina en conjunto, en comparación cuando son utilizados de forma individual y finalmente la cepa *E. coli* es más susceptible al péptido LL-37 utilizando el BMV funcionalizado con aztreonam o BMV funcionalizado con kanamicina. Los resultados obtenidos demuestran en principio que las cápsides virales pueden ser excelente nanovehículo y potenciar la capacidad antimicrobiana de antibióticos convencionales, contra bacterias gram positivas y negativas. Además, el efecto sinérgico del péptido LL-37 con las cápsides funcionalizadas con antibióticos, pueden permitir el desarrollo de terapias antimicrobianas para afrontar de manera innovadora la creciente problemática en relación al incremento de patógenos resistentes a antibióticos convencionales y la nueva tendencia a resistencia a péptidos antimicrobianos.

Palabras clave: Cápsides, funcionalización, nanovehículos, actividad antimicrobiana.

Abstract of the thesis presented by **Jose Martin Castillo Sabori** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

BMV capsids as nanocarriers of antibiotics

Abstract approved by:

PhD. Rubén Darío Cadena Nava
Thesis Director

In this work, we investigated the ability of viral capsids as nanocarrier of antibiotics, particularly using brome mosaic virus (BMV) as a model. To carry out this research, BMV capsids were functionalized with β -lactam antibiotics: ampicillin and aztreonam; in addition to the aminoglycoside kanamycin. Functionalization of the viral capsid with antibiotics was performed by the reaction with carbodiimide to bind the antibiotics to the carboxyl functional groups of BMV capsid. We found aggregation of viral particles by increasing the concentration of a carbodiimide reagent in solution. The results show that this plant virus does not present antimicrobial activity, an opposite effect is observed to increase the bacterial growth because the viral capsid is constituted by proteins and it is a carbon source. The Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) in the essays performed, the virus does not present antimicrobial activity in the bacteria strain *S. aureus* and *E. faecalis*. LL-37 peptide was used to assess the ability of the system in conjunction with antimicrobial peptides. Assays performed show that LL-37 peptide is more effective than ampicillin. In addition, we evaluated the qualitative antimicrobial capacity of the BMV virus functionalized with antibiotics, obtaining that they could enhance the antimicrobial activity. In addition, the synergy of the system was evaluated along with the antimicrobial peptide LL-37. The results indicate that in the kanamycin-resistant strain *S. aureus* is inhibited when treated with the LL-37 peptide together with kanamycin, when compared individually and finally the *E. coli* strain is more susceptible to the LL-37 peptide using aztreonam-functionalized BMV or kanamycin-functionalized BMV. The results obtained demonstrate, in principle, that viral capsids can be excellent nanocarriers and enhance the antimicrobial capacity of conventional antibiotics against gram positive and negative bacteria. In addition, the synergistic effect of LL-37 peptide with antibiotic-functional capsids may allow the development of antimicrobial therapies to innovate in the growing problem in relation to the increase of pathogens resistant to conventional antibiotics and the new trend toward resistance to antimicrobial peptides.

Keywords: Capsids, functionalization, nanocarriers, antimicrobial activity.

Dedicatoria

Gracias a mis padres por su apoyo incondicional en todo momento.

Agradecimientos

Dr. Rubén Darío Cadena Nava; por su apoyo en la dirección de este proyecto.

Dra. Patricia Juárez Camacho, por sus excelentes contribuciones al proyecto.

Dr. Víctor Ruiz Cortes, por sus atinadas sugerencias durante el desarrollo de este proyecto.

Dra. Katrin Quester por la facilitación del área técnica de laboratorio.

Dra. Kanchan Chauhan por su apoyo en la parte experimental.

Dr. Javier Pérez Robles por su apoyo en la parte experimental.

M en B. Victoria Sicairos Díaz por su apoyo en el diseño de experimentos, además de su amistad y apoyo en todo momento.

M en C. Alfredo Núñez Rivera por su apoyo y aportaciones en la parte experimental.

M en C. Roberto Vázquez Muñoz por la facilitación de cepas y antibióticos.

M en C. Ricardo de Jesús Ehecatl Gómez Reyes; por su apoyo y amistad en todo momento.

Señor Francisco Ruiz Médica por su apoyo en el análisis de las muestras por medio de TEM.

M.A. Elizabeth Avilés Becerril por su apoyo en la revisión del manuscrito.

A mis compañeros de generación y amigos, profesores, compañeros del laboratorio por hacer esta etapa muy enriquecedora.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por la beca otorgada para la realización de este proyecto de investigación.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE); por ser parte de mi preparación profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); Centro de Nanociencias y Nanotecnología CNyN; por la facilitación de sus laboratorios.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación	7
1.3 Hipótesis y objetivos.....	8
1.3.1 Hipótesis.....	8
1.3.2 Objetivos.....	8
1.3.2.1 Objetivo general.....	8
1.3.2.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Metodología.....	9
2.1 Expresión heteróloga de la CP del CCMV en <i>E. coli</i> BL21DE3.....	9
2.2 Purificación del virus BMV.....	10
2.3 Funcionalización del BMV con antibióticos.....	10
2.4 Funcionalización directa por reacción carbodiimida.....	10
2.5 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	11
2.6 Crecimiento de cepas bacterianas.....	12
2.7 Métodos de bioensayos.....	12
2.7.1 Ensayo por difusión en sensidisco.....	12
2.7.2 Ensayo en pocillo en medio Luria-Bertani (LB) agar 2%.....	13
2.7.3 Ensayo antimicrobiano en Líquido.....	14
Capítulo 3. Resultados y discusión.....	15
3.1 Actividad antimicrobiana del CCMV por el método de sensidisco en la cepa <i>S. aureus</i> y <i>E. faecalis</i>	15

3.2 Actividad antimicrobiana por el método de pozo para <i>E. faecalis</i> utilizando el péptido LL-37.....	16
3.3 Actividad antimicrobiana de ampicilina y LL-37 en <i>Enterococcus faecalis</i> en líquido.....	17
3.4 Actividad antimicrobiana del BMV-ampicilina en <i>Escherichia coli</i>	19
3.4.1 Microscopia Electrónica de Transmisión de las nanobiopartículas del BMV-ampicilina a diferentes razones de funcionalización.....	21
3.5 Sinergia de actividad antimicrobiana entre kanamicina y LL-37.....	23
3.6 Comparativa de la actividad antimicrobiana del BMV funcionalizado con antibióticos del tipo β -lactámicos y aminoglucósidos y su sinergia con LL-37 en <i>Escherichia coli</i>	26
Capítulo 4. Conclusiones.....	29
Capítulo 5. Perspectivas.....	31
Literatura citada.....	32

Lista de figuras

Figura	Página	
1	Diversos mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos.....	5
2	Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos.	6
3	Imágenes de placas de LB-agar incubada por 8 hrs donde se probó la actividad antimicrobiana del i) virus CCMV a concentraciones de 10, 30 y 60 µg/ml, ampicilina(A) como control positivo a 60 µg /ml. Control negativo Buffer de virus. (B) en la cepa <i>S. aureus</i> . ii) Triplicado 10 µg/ml de CCMV, 60 µg/ml de ampicilina (A) y buffer de virus (B).....	15
4	Imagen de una placa de LB-agar incubada por 8 horas donde se probó la actividad antimicrobiana del virus CCMV de la cepa <i>E. faecalis</i> a concentraciones de 10, 30 y 60 µg/ml y ampicilina como control positivo a 60 µg /ml (A). Control negativo buffer de virus (B).....	16
5	En esta fotografía se observa el efecto del péptido LL-37 en la cepa <i>E. faecalis</i> por medio del método de pozo. 1) PBS control negativo, 2) LL-37,10 µg, 3) control positivo ampicilina 10 µg	17
6	Imagen típica de las placas obtenidas del bioensayo en liquido de la cepa <i>E. faecalis</i> (2 000 células/ml). A) 28 horas de incubación en PBS, control negativo; B) ampicilina 0.1 ng/µl incubada durante 28 horas, control positivo. C) Imagen de la placa del cultivo tratado con péptido catiónico LL-37 a una concentración final de 0.1 ng/µl, incubada durante 28 horas. En todos los casos la incubación se realizó a 37 °C.....	19
7	Imagen típica de las placas obtenidas del bioensayo en liquido de la cepa <i>E. coli</i> (10 000 células/ml). A) 12 horas de incubación en PBS, control negativo; B) Ampicilina 20 µg incubada durante 12 horas, control positivo concentración más alta. C) Placa del cultivo tratado con la nanopartícula BMV funcionalizada con el antibiótico ampicilina 100% funcionalizado, incubada durante 12 horas. En todos los casos la incubación se realizó a 37 °C.....	21
8	Imágenes de TEM donde se puede ver la funcionalización de A) 100, B) 500 y C) 1000 moles de ampicilina con el virus BMV	22
9	Imagen típica de las placas obtenidas del bioensayo en liquido de la cepa <i>S. aureus</i> (10 000 células/ml). A) 12 horas de incubación con kanamicina 20 µg, B) LL-37 20 µg incubada durante 12 horas. c) Imagen de la placa de cultivo tratado con péptido catiónico LL-37: kanamicina proporción 20:20 µg, incubada durante 12 horas. Blanco con la cepa <i>E. faecalis</i> no mostrado en imagen con número incontables de bacterias. En todos los casos la incubación se realizó a 37 °C.....	25

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Mecanismo de resistencia en antibióticos convencionales.	4
2	Resultados de la actividad antimicrobiana del péptido LL-37 en <i>Enterococcus faecalis</i> , se usó como control positivo el antibiótico ampicilina 0.10 ng/ μ l y el medio PBS como control negativo.....	18
3	Resultados de la actividad antimicrobiana del BMV funcionalizado con ampicilina al 40 y 100% de sus grupos funcionales y usando como control el antibiótico ampicilina 5 y 20 μ g y el medio PBS con 10 000 bacterias/ml como blanco de este ensayo. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 12 horas.....	20
4	Sinergia de la actividad antimicrobiana del péptido LL-37 en conjunto con kanamicina y actividad antimicrobiana del péptido y antibiótico individualmente.....	24
5	Actividad antimicrobiana del péptido LL-37, del virus BMV, y de la cápside funcionalizada con aztreonam o kanamicina y combinada respectivamente con LL-37. Utilizando el método de dilución en líquido de Schitttek 2001 modificado, la incubación de las placas fue por 12 horas a 37 °C.....	27

Capítulo 1. Introducción

La nanotecnología se define como el estudio y la aplicación de materiales a escala nanométrica. La nanotecnología aplicada al área de la salud se denomina nanomedicina y se define como la comprensión, la prevención y el tratamiento de las enfermedades mediante el uso de nanomateriales y o dispositivos basados en estos (Del Llano, Quecedo, Rao, 2007).

Actualmente, la nanotecnología aplicada a la medicina clínica y la fisiología se encuentran en sus primeras fases de desarrollo y la mayor parte de la investigación es de ámbito básico. En los próximos 10 a 15 años, sin embargo, los avances comenzarán a integrarse en el sector salud. Las primeras aplicaciones se centrarán en los estudios *in vitro*, el seguimiento remoto de los pacientes y la evolución en la funcionalidad de los dispositivos médicos. Futuras aplicaciones ofrecerán una combinación de diagnóstico y terapéutica en tiempo real para atender a las necesidades de prevención de enfermedades graves y crónicas (Llano et al., 2007). Utilizando estas novedosas herramientas, este trabajo está enfocado al área de bionanotecnología para el desarrollo de un sistema antimicrobiano en base a partículas derivadas de virus funcionalizadas con antibióticos en conjunto con péptidos antimicrobianos. Existen trabajos relacionados a esta área donde podemos mencionar a la molécula Pentobra; la cual está constituida por la funcionalización de péptidos antimicrobianos con aminoglucósidos; esto con el objetivo de lograr mayor eficiencia en la actividad antimicrobiana, esto gracias a la utilización de múltiples mecanismos de acción antimicrobiana. (Schmidt et al., 2015)

1.1 Antecedentes

El área emergente de las bionanopartículas la podemos dirigir a diversas aplicaciones biológicas, por ejemplo, las partículas tipo virus que son derivadas de virus. Los virus pueden ser agentes biológicos simples: formados por un ácido nucleico de un solo tipo (ácido ribonucleico [ARN] o ácido desoxirribonucleico [ADN]), alrededor del cual se dispone una estructura proteica llamada cápside (Agut, Deback, & Boutolleau, 2007).

Recientemente, los virus y partículas tipo virus (VLPs) han recibido gran atención en el área de la bionanotecnología y nanomedicina. Las VLPs al igual que los virus están constituidas por proteínas que conforman la cápside y están organizadas formando estructuras simétricamente ordenadas a escala

nanométrica, llamadas cápsides, por lo cual, actualmente han sido de gran interés en nanotecnología y nanomedicina particularmente en el área de nanovehículos (Nava, 2010). Con el desarrollo de la nanotecnología, y los avances en ingeniería de proteínas y nanomateriales será posible revolucionar la medicina. Estos nanovehículos son plataformas innovadoras con gran potencial en el mejoramiento del empaquetamiento, liberación y direccionamiento de fármacos. Estos sistemas presentan diversas ventajas. Por ejemplo: prevención de la prematura degradación del fármaco o la interacción de este con el ambiente biológico, aumenta la absorción en tejidos blanco deseado (tumores) y un control en los perfiles de distribución. Para ejemplificar estos nanovehículos podemos enumerar a los dendrímeros, liposomas, polimersomas, micelas y partículas tipo virus (VLPs) (Ma, Nolte, & Cornelissen, 2012).

Una clase de partículas tipo virus que han causado gran interés actualmente son las derivadas de virus de plantas. Un ejemplo de virus de planta es el virus mosaico del bromo. El virus mosaico del bromo (BMV) es un virus fitopatógeno que puede ser producido en grandes cantidades en plantas y es de fácil manejo. El BMV es un virus de forma icosaedra pequeña de 28 nm de diámetro externo, su cápside está compuesta de 180 proteínas idénticas de 20,000 Daltons. Las proteínas de la cápside están ordenadas en subunidades, formando pentámeros (5 proteínas) y hexámeros (6 proteínas). La cavidad del interior de la cápside es de aproximadamente 21 nanómetros, por lo cual puede ser usada para el almacenaje de diferentes moléculas. Estudios realizados anteriores han demostrado que el BMV puede desensamblarse en buffers con pHs superiores a 7.5 y a una fuerza iónica de 0.5 Molar (Sun et al., 2007). Las proteínas de la cápside del BMV son capaces de autoensamblarse espontáneamente conteniendo a diferentes cargos no virales entre ellos: RNA heterólogos, nanopartículas de oro coloidal cargadas negativamente. (Waterbeemd et al., 2016). Las partículas tipo virus como se mencionó anteriormente, tienen la posibilidad de revolucionar las terapias en medicina. Dentro de los muchos retos que hoy en día enfrenta la medicina es la resistencia que están desarrollando los patógenos a los antibióticos.

En este trabajo de investigación consideramos que las partículas tipo virus podrían ayudar a afrontar este problema de índole mundial. Muchas de las bacterias asociadas a epidemias en enfermedades humanas han evolucionado para convertirse en formas multiresistentes (MDR por sus siglas en inglés) a los antibióticos. Por ejemplo, MDR *M. tuberculosis* es el mayor patógeno encontrado en las naciones en desarrollo e industrializadas y se convirtió en la nueva versión de un patógeno antiguo. Otras infecciones relacionadas con los hospitales son causadas por bacterias que han mutado en cepas resistentes a antibióticos convencionales, por ejemplo: *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Salmonella spp.*, *Serratia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y *Streptococcus pneumoniae*. Conocer el mecanismo de acción y resistencia nos permite buscar alternativas innovadoras de tratamiento como por ejemplo el diseño de nanopartículas para la liberación de antibióticos por diferentes vías de acción. (Davies & Davies, 2010)

Por su parte histórica de uso los antibióticos β -lactámicos, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de antibióticos de acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad. Aun así, la penicilina continua siendo el tratamiento de elección en un gran número de infecciones; las cefalosporinas tienen un gran abanico de indicaciones; los carbapenémicos se usan en infecciones nosocomiales y en infecciones causadas por bacterias multirresistentes, y los inhibidores de las betalactamasas permiten recuperar el espectro de actividad de las penicilinas a las que acompaña cuando la resistencia está causada por la producción de betalactamasas. Por ejemplo el ácido clavulánico (Sua, 2015).

La kanamicina por su parte, pertenece al subgrupo de antibióticos aminoglucósidos el cual está formado por kanamicina A, kanamicina B, trobamicina y dibekacina. Estos compuestos interfieren en la síntesis de proteínas teniendo como blanco el sitio decodificado A del Ribosoma (Salian et al., 2012).

Sabiendo que las opciones de antibióticos son limitadas se deben conocer sus mecanismos de resistencia para encontrar nuevas alternativas de tratamiento antibacteriano. Entre los mecanismos de resistencia a antibióticos convencionales se puede enumerar, la hidrólisis, eflujo, modificaciones en la síntesis de peptidoglucano, modificaciones postraslacionales, formación de enzimas dirigidas al antibiótico y alteración del banco molecular del antibiótico, en la **tabla 1** se muestran algunos mecanismos de resistencia a antibióticos convencionales desarrollados por algunas cepas bacterianas. (Davies & Davies, 2010).

Otra innovadora fuente de moléculas antimicrobianas son los péptidos antimicrobianos (AMP); la relación a los mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos que en base a su naturaleza en la mayoría de los casos anfífilica y su carga catiónica en comparación con los antibióticos convencionales con un solo mecanismo de acción.

Tabla 1. Mecanismo de resistencia en antibióticos convencionales. (Davies & Davies, 2010)

Antibiotic class	Example(s)	Target	Mode(s) of resistance
β -Lactams	Penicillins (ampicillin), cephalosporins (cephamycin), penems (meropenem), monobactams (aztreonam)	Peptidoglycan biosynthesis	Hydrolysis, efflux, altered target
Aminoglycosides	Gentamicin, streptomycin, spectinomycin	Translation	Phosphorylation, acetylation, nucleotidylation, efflux, altered target
Glycopeptides	Vancomycin, teicoplanin	Peptidoglycan biosynthesis	Reprogramming peptidoglycan biosynthesis
Tetracyclines	Minocycline, tigecycline	Translation	Monooxygenation, efflux, altered target
Macrolides	Erythromycin, azithromycin	Translation	Hydrolysis, glycosylation, phosphorylation, efflux, altered target
Lincosamides	Clindamycin	Translation	Nucleotidylation, efflux, altered target
Streptogramins	Synercid	Translation	C-O lyase (type B streptogramins), acetylation (type A streptogramins), efflux, altered target
Oxazolidinones	Linezolid	Translation	Efflux, altered target
Phenolics	Chloramphenicol	Translation	Acetylation, efflux, altered target
Quinolones	Ciprofloxacin	DNA replication	Acetylation, efflux, altered target
Pyrimidines	Trimethoprim	C ₁ metabolism	Efflux, altered target
Sulfonamides	Sulfamethoxazole	C ₁ metabolism	Efflux, altered target
Rifamycins	Rifampin	Transcription	ADP-ribosylation, efflux, altered target
Lipopeptides	Daptomycin	Cell membrane	Altered target
Cationic peptides	Colistin	Cell membrane	Altered target, efflux

El dogma del su mecanismo siempre fue la interacción con las membranas bacterianas aumentando su permeabilidad; hoy en día se conocen mecanismos adicionales tales como: funciones inmunomoduladoras, formadoras de poro en forma de barril, interacciones con el ADN y proteínas relacionadas y mecanismos que alteran la síntesis y plegamiento de proteínas. **(Téllez & Castaño, 2010)**

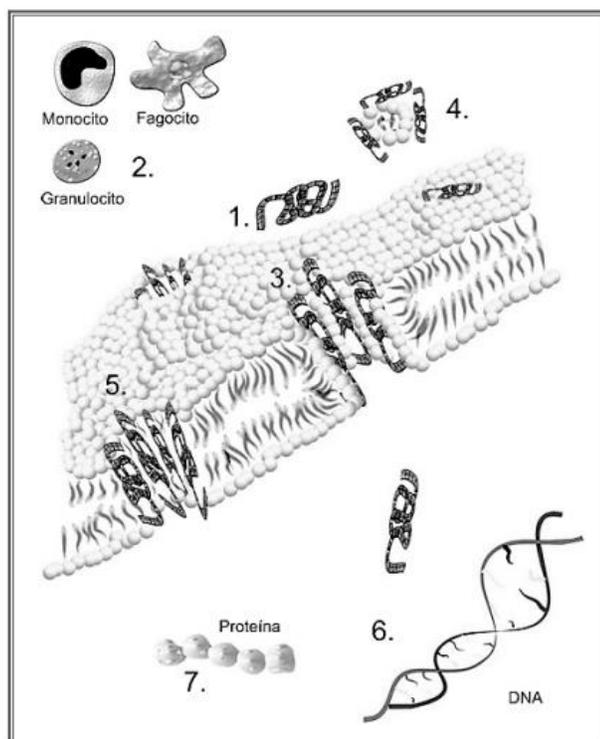


Figura 1. Diversos mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos. 1) Interacciones en la membrana; 2. Funciones Inmunomoduladoras; Formación de poro; 4. Mecanismo de agregados; 5. Formación de poro en forma de barril; 6. Interacciones con el ADN y proteínas relacionadas 7. Mecanismos que alteran la síntesis y plegamiento de proteínas. (Tellez & Castaño, 2010)

Se debe considerar que también las bacterias generan resistencia ante los AMPs, estos mecanismos de supervivencia de las bacterias contra de los péptidos antibióticos son diversos, entre ellos, los que van desde la modificación y alteración de las cargas de las membranas por el mecanismo de cambio de cargas positivas en los fosfolípidos que los constituyen; regularmente las bacteria sus fosfolípidos están cargados negativamente y la mayoría de los péptidos antimicrobianos son cargados positivamente lo que favorece interacción y actividad antimicrobiana. Otros mecanismos relacionados a la resistencia contra AMPs en bacterias son: modificación en la pared celular y algunas alteraciones metabólicas en rutas metabólicas relacionadas con estrés y mutagenicidad. Sin embargo, para antibióticos como ampicilina y kanamicina es mucho más grande la expresión de genes relacionados a mutagenicidad en comparación con los AMPs. (Maria-Neto et al., 2015)

Actualmente, los péptidos antimicrobianos han recibido especial atención debido a su capacidad antimicrobiana por ejemplo, las Catelicidinas son una familia de péptidos antimicrobianos y proteínas que contiene un dominio conservado de aproximadamente 100 aminoácidos (Catelina) en el N- terminal del polipéptido precursor. En la mayoría de las Catelicidinas, el sitio activo es una parte altamente variable del C-terminal del péptido la cual es cortada del precursor durante o después de la secreción. Un ejemplo es el segmento LL-37 de 37 aminoácidos en C-terminal es un péptido libre de cisteínas que rápidamente forma una alfa hélice. Para muchas Catelicidinas bovinas y porcinas la enzima neutrofílica elastasa es su activador, la cual corta en la secuencia conservada para esta función. La Catelicidina humana LL-37 se encuentra en neutrófilos, testículos y piel inflamada.(Ganz & Lehrer, 2001)

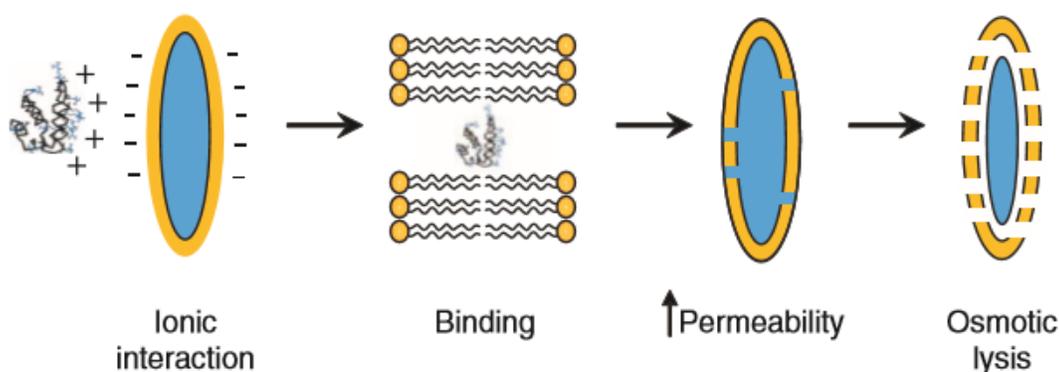


Figura 2. Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos.(Jalian H.R & Kim J.,2008)

Específicamente el péptido LL-37 ha mostrado actividad antibacteriana contra: *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Salmonella thypimurium*, *E. coli*, y *Enterococci resistente a Vancomicina* (VRE por sus siglas en ingles). Este péptido se produce en los gránulos laminares de los keratocitos. Además, tiene propiedades de regeneración y cicatrización de heridas. Las proteasas de serina presentes en el sudor cortan el péptido en tamaños más pequeños que aumentan la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus spp.* y *Cándida spp.* Además de ser un modulador de la respuesta inmune innata. (Jalian H.R. & Kim J; 2008) Aun cuando las propiedades antimicrobianas que pueden

presentar los péptidos antimicrobianos, su uso no se ha explotado debido al costo para su producción química, por lo cual se busca la manera de disminuir las concentraciones de estos en su uso *in-vitro* como terapia antimicrobiana emergente cuando es usado en conjunto con antibióticos o VLPs funcionalizadas con antibióticos.

1.2 Justificación

Las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2013, indican que las enfermedades infecciosas son un problema, ya que son difíciles de tratar y existe el riesgo de que ocurra resistencia a los antibióticos convencionales.

Adicionalmente, con base a los datos del Centro de Control de Enfermedades (CDC) en estados Unidos, al menos 2 millones de personas son infectadas con bacterias que son resistentes a antibióticos y al menos 23,000 perecen cada año a consecuencia directa de dichas infecciones.

Además del ya mencionado problema actual de las terapias ante patógenos y las enfermedades que causan, es la resistencia tanto como a antibióticos convencionales como a péptidos antimicrobianos, por lo cual la búsqueda de diferentes sistemas o moléculas que ayuden a resolver este problema es de gran interés e impacto a nivel mundial.

Considerando lo anterior, en este trabajo se pretende desarrollar un sistema de liberación de moléculas antimicrobianas, basado en cápsides virales funcionalizadas con antibióticos que permita el uso de los péptidos antimicrobianos para potenciar el efecto de cada uno por mediante el fenómeno de sinergia.

1.3 Hipótesis y objetivos

1.3.1 Hipótesis

Es posible diseñar y sintetizar nanobiotículas antibacterianas por medio de funcionalización química de la cápside de un virus con antibióticos, pudiendo tener un efecto sinérgico en conjunto con péptidos antimicrobiano. En este caso las cápsides virales pueden servir como nanovehículo para la liberación controlada de antibióticos. Para llevar a cabo este objetivo se usará la cápside de virus BMV y los antibióticos aztreonam, kanamicina, ampicilina y el péptido antimicrobiano LL-37.

1.3.2 Objetivos

1.3.2.1 Objetivo general

Construir bionanopartículas antimicrobianas por medio de la funcionalización química de la cápside del virus BMV con antibióticos convencionales y estudiar la sinergia con el péptido antimicrobiano LL-37.

1.3.2.2 Objetivos específicos

- Estudiar la actividad antimicrobiana de los virus CCMV y BMV.
- Diseñar un protocolo para la funcionalización química de la cápside del virus de planta BMV con antibióticos.
- Estudiar la actividad antimicrobiana de las cápsides funcionalizadas químicamente con antibióticos (VLPs-antibiótico).
- Estudiar la sinergia de las VLPs-antibiótico y el péptido antimicrobiano LL-37.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Expresión heteróloga de la CP del CCMV en *E. coli* BL21DE3

La expresión heteróloga de la proteína de la cápside (CP) del virus fitopatógeno se llevó a cabo usando el plásmido psB1C3-CCMV CP que contiene la secuencia para la expresión de la CP del virus moteado amarillo del caupí (CCMV) en *E. coli*. Las bacterias que contienen el plásmido para la expresión de la CP del CCMV fueron inducidas en un pre-cultivo de 5 mililitros (ml) de medio LB con una concentración final de 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico cloranfenicol. El cultivo fue incubado a 37 °C, 150 rpm durante toda la noche. Posteriormente este pre-cultivo fue usado para inocular, un litro de medio LB enriquecido con glucosa a una concentración final de 1.25 milimolar (mM), y que contiene una concentración final de 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol. El cultivo se incubó a una temperatura de 30 °C, a 150 rpm durante 50 horas. El cultivo fue inducido con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1.25 mM, cuando la densidad óptica fue de 0.4 medida a una longitud de onda de 600 nanómetros (nm) en espectrofotómetro. Después de 50 horas de incubación el cultivo se centrifuga a 4700 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C, por 20 min. Usando una centrifuga Avanti JXN26 de Beckman. El pellet se resuspende en buffer de desensamble (CaCl₂: 500 mM; Tris-HCl pH 7: 50 mM; EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) pH 8: 1 mM; DTT (Ditiotreitol): 1 mM; PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonil): 0.50 mM) y es sonicado para lisar las células mecánicamente (a 4°C). La solución obtenida es centrifugada a 15000 rpm por 18 minutos a 4°C. El pellet es recuperado y resuspendido en buffer de desensamble con 8 molar (M) de urea (10 ml), esta solución se homogeniza mediante vórtex. Se agregaron 15 ml de buffer de desensamble (sin urea), y se centrifugó a 15000 rpm por 40 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de 50 ml. Posteriormente se concentró el extracto por medio de ultrafiltración usando una membrana de 10,000 Daltons en un Amicom. Después la muestra fue dializada en buffer de desensamble toda la noche a 4°C. Después la muestra fue dializada en buffer de ensamble (NaCl: 1 M; C₂H₃NaO₂: 50 mM, pH 8; EDTA: 1 mM; DTT: 1 mM) por 12 horas. Finalizada la diálisis de la muestra fue ultracentrifugada en un colchón de sacarosa al 20% utilizando un rotor SW 41-Ti y una ultracentrifuga OptimaXPN-100 de Beckman Coulter a 40,000 rpm por 300 minutos a 4°C. Finalmente se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer de virus y fue almacenado a -20°C para su uso.

2.2 Purificación del virus BMV

Se colectaron las hojas de cebada infectadas con BMV y se molieron en un mortero usando el buffer de extracción (0.5 M de NaAc, 0.08 M MgAc, pH 4,5, 1/100 de volumen de β -mercaptoetanol) y usando arena de mar acidificada para facilitar la molienda. Después la solución fue filtrada a través de tela tipo gasa para eliminar los fragmentos de gran tamaño. La solución obtenida se mezcló con un volumen igual de cloroformo en un vaso de precipitados y después de 20 minutos se centrifugó a 10,000 xg durante 15 min a 4 °C, y se recupera la fase de arriba. Posteriormente, la solución es ultracentrifugada en un colchón de 10% de sacarosa usando el rotor SW 32 Ti a 30,000 rpm durante 2 horas a 4 °C, en una ultracentrífuga XPN100 de Beckman. El pellet es resuspendido en buffer de suspensión (buffer de extracción diluido 1:10). Consecutivamente después de resuspender el pellet, el virus fue ultrapurificado a través de un gradiente de sacarosa usando el rotor SW 32 Ti a 30,000 rpm durante 2 horas a 4 °C, al terminar la ultracentrifugación la banda que contiene al virus fue colectada. Finalmente, la sacarosa fue eliminada por medio de ultracentrifugación usando el rotor tipo 50.2 Ti a 40000 rpm durante 3 horas, a 4 °C. El virus fue cuantificado usando la relación $[BMV] = A_{260} / 5.8$, y considerando que el virus es ultrapuro cuando la razón $A_{260}/A_{280} \geq 1.5$. De manera similar se realizó la medición para el virus CCMV.

2.3 Funcionalización del BMV con antibióticos

La funcionalización de la superficie exterior de la cápside del virus BMV. La superficie exterior del BMV fue conjugada químicamente con diferentes antibióticos, incluyendo ampicilina, kanamicina y aztreonam. Los antibióticos fueron conjugados por funcionalización directa a través de la reacción de carbodiimida utilizando el procedimiento que brevemente se describe a continuación:

2.4 Funcionalización directa por reacción carbodiimida

Los grupos de ácido carboxílico expuestos a la superficie se activaron primero en el éster de succinimido utilizando la concentración en exceso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-

hidroxisuccinimida (NHS). Posteriormente, las cápside virales activadas se hicieron reaccionar con antibióticos ampicilina, kanamicina y aztreonam que contenía amina. El virus BMV (100 μ g, 1 mg / ml) se incubó con 100, 500, 1000 y 2000 moléculas de EDC y NHS en buffer de fosfato (PBS, 10 mM, pH 7,4) a temperatura ambiente. Después de una hora, la mezcla anterior se trató posteriormente con 100, 500, 1000 y 2000 mol de solución de ampicilina o kanamicina o aztreonam en PBS (10 mM, pH 7,4) y se incubó durante 12 horas a 4 °C. Las moléculas pequeñas en exceso y que no se adhirieron a la superficie de la cápside se eliminaron por ultrafiltración usando filtros con membrana de corte de 100 kD, de esta manera también las partículas se concentraron y se diluyeron en buffer de suspensión de virus o PBS.

Para la conjugación de los grupos carboxilos (~ 1980), primero se trataron las cápsides virales (100 μ g, 1 mg / ml) con 2000 moles de EDC y NHS a temperatura ambiente durante una hora en PBS (10 mM, pH 7.4). Posteriormente, esta mezcla se trató con la solución de antibiótico que contenía amina (ampicilina o aztreonam, 2000 moles de exceso) en PBS y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. El exceso de reactivo se eliminó por ultracentrifugación con los filtros (corte de 100 kiloDalton (kDa)). Las partículas se resuspendieron en PBS (10 mM, pH 7.4). Los grupos carboxilo de antibiótico (ampicilina o aztreonam, 1100 mol de exceso) se activaron con éster succinimidílico con EDC y NHS (relación molar 1: 1: 1) durante una hora a temperatura ambiente. Esta solución se mezcló con las partículas resuspendidas para el acoplamiento del antibiótico en los sitios amino de BMV, y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. De nuevo, el exceso de reactivos o moléculas se eliminó por centrifugación a través de filtros con membrana de corte de 100 kD. Posteriormente las cápsides modificadas con antibióticos fueron visualizadas por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

2.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras del virus BMV funcionalizadas con el antibiótico β -lactámicos ampicilina en 100, 500 y 1000 sitios disponibles, una vez funcionalizadas las muestras fueron depositadas en una rejilla de Cobre (6 μ L) y fueron teñidas con Acetato de Uranilo al 1%; estas se dejaron secar toda la noche en una cámara sin humedad. Al día siguiente se observó su morfología en Microscopio Electrónico de Transmisión para observar su forma e integridad ante tal funcionalización.

2.6 Crecimiento de cepas bacterianas

La activación de las cepas bacterianas de *S. aureus* (Aislado clínico), *E. faecalis* (ATCC), *E. coli DH5 α* . A partir de un stock de glicerol preservado en criogenia a -80°C y con una densidad óptica de 0.6-0.7 a Absorbancia a 600nm , se tomó una alícuota de un mililitro y se inoculó un volumen de 50ml de medio LB (Luria Bertani) para crecer las bacterias en matraces Erlenmeyer de 250ml., a una temperatura de 37°C y una agitación de 180 rpm usando una incubadora MaxQ6000 de Thermo Scientific. Una vez que el medio de cultivo alcanzó una densidad óptica de $1.0_{600\text{nm}}$, para su conservación se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su uso, los cultivos fueron utilizados antes de las 48 horas de haberse almacenado con la finalidad de evitar la lisis de las bacterias. Además, es importante resaltar que *Enterococcus faecalis* como posee un rango menor de resistencia a bajas temperaturas (4°C) por lo cual se usaron antes de las 24 horas. Todo lo anterior fue llevado a cabo en un ambiente estéril usando una campana de flujo laminar. La absorbancia de los cultivos fue obtenida por medio de un espectrofotómetro UV-vis Multiskan-Go de Thermo Scientific.

2.7 Métodos de bioensayos

2.7.1 Ensayo por difusión en sensidisco

Para realizar el bioensayo en sensidisco se utilizó el medio LB-agar en cajas de Petri. La preparación de las cajas de Petri se realizó en campana de flujo laminar y usando como medio de cultivo Luria Bertani (LB) y Agar 1.5% previamente esterilizado. Las cajas fueron almacenadas a 4°C y utilizadas durante las 2 primeras semanas. Para los bioensayos en sensidiscos, se inoculó cada caja de Petri de 9 cm con $15\ \mu\text{l}$ de la cepa de interés crecida previamente a una absorbancia de 1.0 a una longitud de $600\ \text{nm}$. Los sensidiscos fueron fabricados usando papel filtro Whatman grado 1 y utilizando una perforadora manual para producirlos en forma de discos. Los sensidiscos fueron esterilizados en autoclave.

Se procedió a dejar secar las cajas inoculadas en un ambiente estéril utilizando una campana de flujo laminar con la finalidad de tener una biopelícula, posteriormente se procedió a colocar los sensidisco con la ayuda de pinzas previamente esterilizadas.

Después, se procedió con la aplicación de los péptidos antimicrobianos a probar o antibióticos sobre los sensidisco, este procedimiento debe ser realizado en pequeños volúmenes para evitar el lavado de las células circundantes al sensidisco y para no tener un halo de inhibición falso causado por el lavado de la superficie por el líquido. Una vez colocado las moléculas de interés en el sensidisco, también se dejan secar por completo en esterilidad. Posteriormente se incubaron las cajas por 8 horas a 37 °C en posición no invertida, este procedimiento es diferente a la incubación usual de cajas Petri ya que se tiene el objetivo de evitar que se despegue el sensidisco de la caja. Finalmente se procedió a documentar los resultados de los bioensayos por medio de fotografías digitales para su posterior análisis de inhibición bacteriana. Los cultivos se llevaron a cabo en una incubadora MaxQ6000 de Thermo Scientific. La absorbancia de los cultivos fue obtenida por medio de un espectrofotómetro UV-vis Multiskan-Go de Thermo Scientific.

2.7.2 Ensayo en pocillo en medio Luria-Bertani (LB) agar 2%

Esta técnica de pocillo a diferencia de una caja convencional de medio LB-Agar nos permite tener cajas de Petri con la cantidad de bacterias deseadas embebida en el medio LB-Agar para realizar el bioensayo y no un biofilm. Para los bioensayos en pocillos se utilizó el medio de cultivo Luria Bertani (LB) y Agar al 2% (para aumentar firmeza del medio semi-sólido). La preparación de las cajas Petri se realizó en un medio estéril utilizando una campana de flujo laminar. Para la preparación del medio con la bacteria de interés, se añadió 3.3 ml de bacterias a una densidad óptica 1 medida a una longitud de onda de 600 nm al medio LB agar 2.0 % sin solidificar a temperaturas mayor al punto de gelificación pero menor a la temperatura de muerte de las células bacterianas y evitando con ello que se gelifique el agar para la distribución homogénea de las bacterias en el medio, para ello se debe mezclar gentilmente por inversión varias veces y evitar la formación de burbujas. Una vez gelificado el medio LB-Agar en las cajas Petri a temperatura ambiente y en un ambiente estéril, se procede a hacer los pozos con la ayuda de un sacabocados o la cabeza de una pipeta Pasteur estéril, esta perforación nos permite tener pozo de forma cilíndrica y nos permitirá cargar la muestra líquida que contiene las moléculas antimicrobianas. Después de perfora el medio LB-Agar solidificado se debe retirar el bocado remanente con un palillo estéril, el cual dará espacio al pozo cilíndrico. Para realizar los bioensayos correspondientes se aplicó un volumen de 100 µl de las soluciones de péptidos antimicrobianos y los controles a evaluar en cada uno de los pozos. Se dejaron las cajas en posición no invertida por lo menos 3 horas en refrigeración a 4°C para la difusión de las muestras a evaluar, una vez que trascurrió el tiempo de difusión en el agar se procedió a incubar por 8 horas a 37°C en posición no invertida. Finalmente se procedió a documentar los resultados de los bioensayos por medio de fotografías digitales para su posterior análisis de inhibición bacteriana. Los cultivos se llevaron a cabo

en una incubadora MaxQ6000 de Thermo Scientific. La absorbancia de los cultivos fue obtenida por medio de un espectrofotómetro UV-vis Multiskan-Go de Thermo Scientific.

Una de las principales ventajas de este método es que se tiene un crecimiento bacteriano homogéneo y de igual concentración para cada una de las cajas Petri. Además, los halos de inhibición son muy nítidas y vistosas pero su principal desventaja el limitante del espacio del pozo creado que en general es de 100 μ l.

2.7.3 Ensayo antimicrobiano en líquido

Para realizar los bioensayos en medio líquido se usó el procedimiento llevado a cabo por Schittek y colaboradores (Schittek et al., 2001). Las cepas bacterianas previamente activadas se crecieron en medio líquido LB hasta una densidad óptica con absorbancia en el rango de 0.4-0.6 medida a 600 nm de longitud de onda. Se tomaron 25 ml de la cepa y se centrifugó en un tubo falcón de 50 ml a 3500 rpm por 10 min a 4 °C usando una centrifuga Sorvall Legent RT, se obtuvo un pellet y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se lavó el pellet bacteriano dos veces con 10 ml de PBS. Después el pellet bacteriano fue resuspendido gentilmente con PBS y se llevó hasta un volumen de 5 ml. Nuevamente se midió la absorbancia para determinar la concentración de bacterias en la solución. Se debe tomar en cuenta la cantidad de células por mililitro reportada para cada cepa en cuestión a una densidad óptica de 1.0 medida a 600 nm., para el caso de *E. coli*: 8.2×10^9 , *S. aureus*: 1.9×10^{10} , *E. faecalis* 9×10^9 células/ml. Posteriormente se ajustó la solución de para cada una de las bacterias a una concentración de 2×10^6 células/ml. Finalmente, se realizó la dilución 1 : 200 para tener una concentración de 10,000 células/ml inicialmente para cada bioensayo y de esta manera poder realizar fácilmente el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) en las placas.

Las cepas pueden ser mantenidas en un periodo de 2 a 5 días en refrigerador a 4°C, cuando se tiene una densidad óptica de 1.0 medida a una longitud de onda a 600 nm. Los cultivos se llevaron a cabo en una incubadora MaxQ6000 de Thermo Scientific. La absorbancia de los cultivos fue obtenida por medio de un espectrofotómetro UV-vis Multiskan-Go de Thermo Scientific.

Para llevara a cabo el bioensayo en medio líquido se tomó un mililitro (10,000 células) para cada uno de los diferentes tratamientos, así como de sus controles, y se incubaron a 37 °C por 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo del tratamiento se toma una alícuota para inocular un medio LB-Agar contenido en una caja Petri mediante estría múltiple. Se tomó una alícuota de 25 μ l para inocular en cajas Petri de 6.0 cm con LB-Agar 1.5 % y 50 μ l para cajas Petri de 9 cm. Finalmente, se incubaron las cajas Petri a 37 °C de

8 a 12 horas y se documentaron los resultados de los bioensayos por medio de fotografías digitales para su posterior análisis de inhibición bacteriana, para determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC).

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Actividad antimicrobiana del CCMV por el método de sensidisco en la cepa *S. aureus* y *E. faecalis*.

Para determinar la actividad antimicrobiana por el método de sensidisco se realizaron diluciones del virus CCMV de 10, 30 y 60 $\mu\text{g/ml}$ para saber si su secuencia o estructura puede causar inhibición antimicrobiana sin ningún antibiótico como se muestra en la **figura 3**. Tanto en el caso de *S. aureus* y *E. faecalis* no se tuvieron ningún resultado positivo en relación a inhibición bacteriana. Solo se obtuvo inhibición en el antibiótico ampicilina 60 $\mu\text{g/ml}$ con un halo mayor a 2cm. Este método fue descartado de la parte experimental para probar las partículas funcionalizadas ya que presenta muchas desventajas como lo es la capacidad de retención del sensidisco que en general es alrededor de 15 μl cantidad muy pequeña para este tipo de ensayo. Otra desventaja es la homogeneidad en el biofilm producido con el estriado de la muestra bacteriana en la caja de agar LB. Otro método utilizado contra esta cepa bacteriana, fue el método de pocillo el cual es muy eficiente en relación a homogeneidad de las bacterias en el medio, en el cual no se obtuvieron resultados positivos con el péptido LL-37 contra *E. faecalis*.

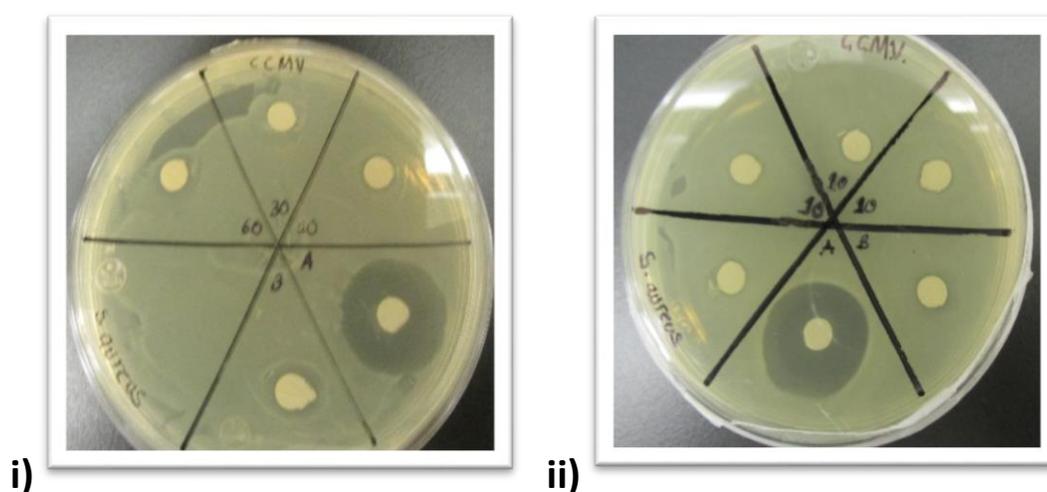


Figura 3. Imágenes de placas de LB agar incubada por 8 horas, donde se probó la actividad antimicrobiana del i) virus CCMV a concentraciones de 10, 30 y 60 $\mu\text{l/ml}$, ampicilina(A) como control positivo a 60 $\mu\text{g/ml}$. Control negativo Buffer de virus. (B) en la cepa *S. aureus*. ii) Triplicado 10 $\mu\text{g/ml}$ de CCMV, 60 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina (A) y Buffer de virus (B).

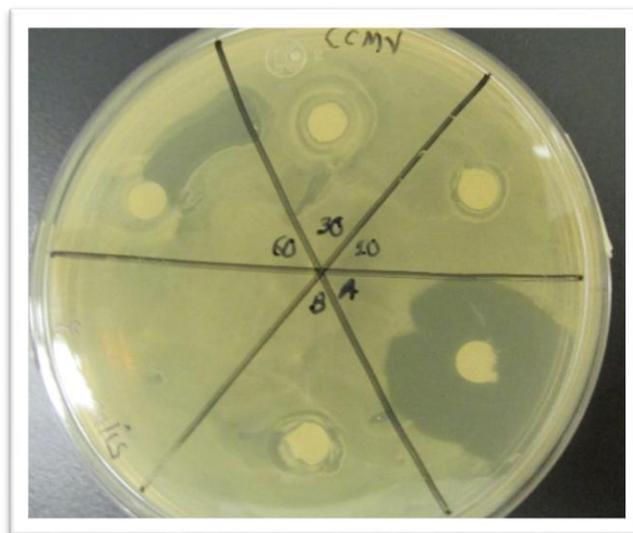


Figura 4. Imagen de una placa de LB agar incubada por 8 horas donde se probó la actividad antimicrobiana del virus CCMV de la cepa *E. faecalis* a concentraciones de 10, 30 y 60 μ l /ml y ampicilina como control positivo a 60 μ g /ml (A). Control negativo buffer de virus (B).

3.2 Actividad antimicrobiana por el método de pozo para *E. faecalis* utilizando el péptido LL-37.

No se pudo determinar actividad antimicrobiana por este método ya el péptido LL-37 no presentaba actividad antimicrobiana a causa de su degradación por mal manejo en el transporte de los reactivo péptidos, tanto los controles positivos como negativos los resultados fueron los esperados. El control de ampicilina tuvo inhibición menor a 2 cm. Para el control negativo no hubo inhibición en el medio PBS. Para contrarrestar este inconveniente se utilizó otra compañía y proveedor del péptido para probar su actividad. El método que se utilizará para determinar actividad antimicrobiana será el método de líquido de Schittek y colaboradores, el cual está probado es eficiente contra las cepas utilizadas.

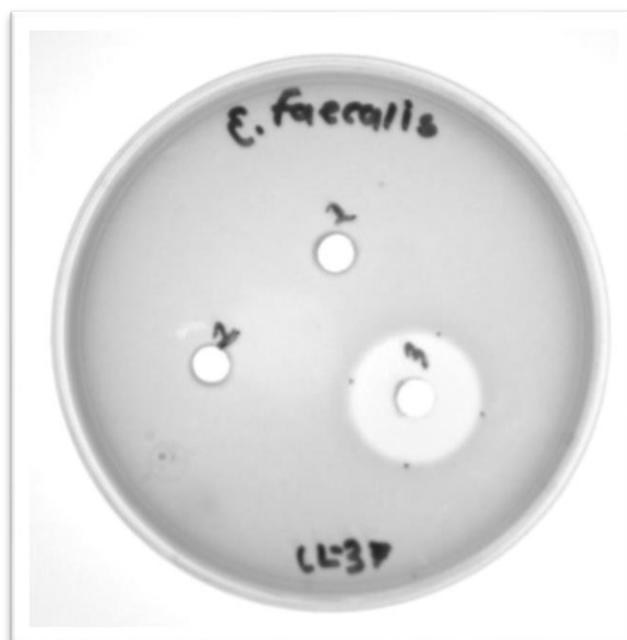


Figura 5. En esta fotografía se observa el efecto del péptido LL-37 en la cepa *E. faecalis* por medio del método de pozo. 1) PBS control negativo, 2) LL-37, 10 μ g, 3) control positivo ampicilina 10 μ g.

3.3 Actividad antimicrobiana de ampicilina y LL-37 en *Enterococcus faecalis* en líquido

Las bacterias *Enterococcus faecalis* fueron crecidas mediante el procedimiento descrito en la metodología, para esto se llevó el cultivo hasta una densidad óptica (O.D.) de 0.7728 medida a una longitud de onda de 600 nm, y fue mantenida por 32 horas en refrigeración a 4 ° C en medio LB.

El bioensayo fue realizado mediante el método de líquido de Schittek (Schittek et al., 2001) modificado y usando específicamente como control positivo 2,000 células/ml en PBS a pH 7.4, esta concentración fue alcanzada realizando una dilución 1:500. Se tomó una alícuota de esta dilución y se paqueo usando 25 microlitros del cultivo diluido. Como control positivo se utilizó ampicilina (0.10 nanogramos (ng)/ μ l). Para el ensayo de actividad antimicrobiana del péptido LL-37 se usaron (0.10 ng/ μ l). En la **tabla 2** se muestran los resultados obtenidos. El control positivo y la muestra que contenía el péptido fueron realizados por duplicado.

Tabla 2. Resultados de la actividad antimicrobiana del péptido LL-37 en *Enterococcus faecalis*, se usó como control positivo el antibiótico ampicilina 0.10 ng/μl y el medio PBS como control negativo.

Bioensayo	Concentración ng/μl	UFC /13hrs	UFC/28 hrs*	% Actividad Bactericida*
Control PBS	N/A	135	169	0
Ampicilina	0.1	5 ± 5	16 ± 6	5.3
LL-37	0.1	0	0	100

En este bioensayo en el control negativo se obtuvo 135 unidades formadoras de colonia (UFC) con la dilución de 2,000 células/ml en el medio PBS, en las primeras 13 horas de incubación a 37 ° C . A 28 horas de la incubación el número de colonias aumento hasta 169 UFC. El ensayo se realizó hasta las 28 horas de incubación debido a que a las 13 horas las colonias en *E. faecalis* fueron muy pequeñas, dificultando su conteo. Se debe considerar que el porcentaje de actividad bactericida basada en el número de unidades formadoras de unidades para el caso de LL-37 fue del 100% utilizando 0.1 ng/μl y 5.3% para Ampicilina misma concentración a las 28 horas (hrs) a 4 ° C.

En el control positivo de este ensayo utilizando ampicilina se optó por una concentración de 0.1 ng/μl que ya había sido probada en bioensayos previos. Como es de esperar, se observó una disminución significativa de más de un orden de magnitud en el número de colonias en comparación con el control negativo a los dos tiempos analizados.

Finalmente, la concentración del péptido antimicrobiano LL-37 se mantuvo en 0.1 ng/μl en comparación con la ampicilina, en ensayos previos se habían utilizado hasta 0.06 ng/μl sin ningún resultado positivo; esto causado por la degradación de los péptidos. Los resultados de una inhibición total con el péptido LL-37 fueron muy satisfactorios, ya con el nuevo lote de la compañía BACHEM no presento el problema de la degradación comparado con los péptidos de la compañía Peptide 2.0.

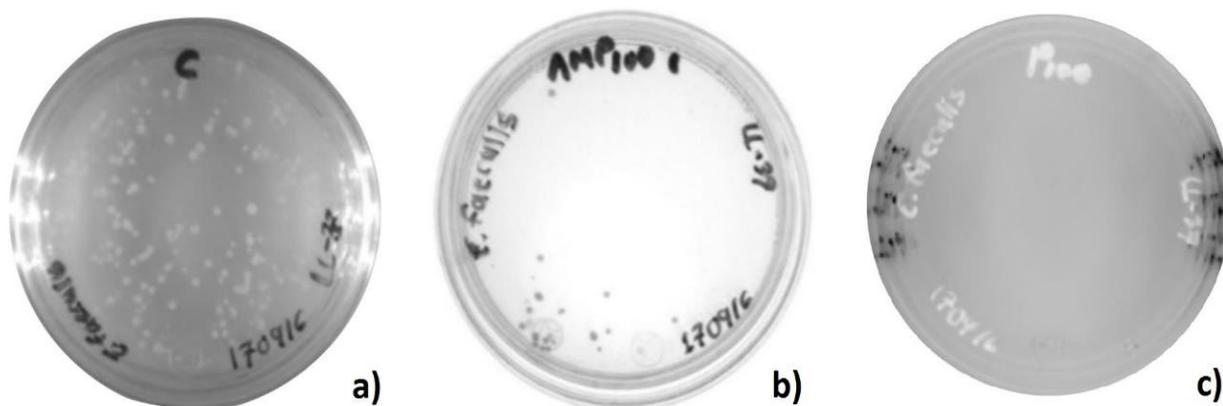


Figura 6. Imagen típica de las placas obtenidas del bioensayo en líquido de la cepa *E. faecalis* (2,000 células/ml). A) 28 horas de incubación en PBS, control negativo; B) ampicilina 0.1 ng/μl incubada durante 28 horas, control positivo. C) Imagen de la placa del cultivo tratado con péptido catiónico LL-37 a una concentración final de 0.1 ng/μl, incubada durante 28 horas. En todos los casos la incubación se realizó a 37 °C.

En el caso de la inhibición con ampicilina contra la cepa bacteriana *E. faecalis* es menor en comparación con el péptido LL-37, esto es posiblemente debido a que actúa a nivel de síntesis de péptidoglicano. Esto nos indica el potencial antimicrobiano del péptido LL-37 en comparación con la ampicilina es mayor para utilizarse como antimicrobiano a causa de su mecanismo de acción en la membrana bacteriana. Y se puede considerar que es más rápido que el mecanismo lento de ampicilina que actúa a nivel de síntesis de péptidoglicanos.

3.4 Actividad antimicrobiana del BMV-ampicilina en *Escherichia coli*.

Se presentan los resultados de la actividad antimicrobiana de las partículas tipo virus (VLP-ampicilina) obtenidas al modificar la superficie de la cápside del virus BMV mediante el método de clic químico en una proporción de 40% y 100% de los grupos funcionales libres de la cápside con el antibiótico ampicilina. La funcionalización de la cápside con el antibiótico fue observada por medio de microscopía electrónica de transmisión ya que al incrementar la carbodiimida reactivo de esta funcionalización que tiene la función de activar más grupos funcionales y así incrementar el número de antibióticos en la cápside ocurriendo que las partículas virales se unen entre sí covalentemente. La **tabla 3** muestra en resumen los resultados de la actividad antimicrobiana de la VLP-ampicilina. En el ensayo el control positivo y la muestra que contenía las partículas funcionalizadas fueron realizados a concentraciones de 5 y 20 μg, considerando el

hecho de que la ampicilina usada para cubrir el 40 y 100 % de los grupos carboxilo y amino de la superficie del BMV respectivamente.

Tabla 3. Resultados de la actividad antimicrobiana del BMV funcionalizado con ampicilina al 40 y 100% de sus grupos funcionales y usando como control el antibiótico ampicilina 5 y 20 μg , y el medio PBS con 10,000 bacterias/ml como blanco de este ensayo. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 12 horas.

Bioensayo	Masa	UFC/ 12 horas	% Actividad bactericida
<i>Control PBS</i>	N/A	567+/-26	0
<i>Ampicilina</i>	5 μg	552+/-33	2.6
<i>Ampicilina</i>	20 μg	168+/-4	70.4
<i>BMV-AMP</i>	40% Funcionalizado	486+/-6	14.3
<i>BMV-AMP</i>	100% Funcionalizado	211+/-2	62.8

En este bioensayo, en el control negativo se obtuvieron 567 unidades formadoras de colonia (UFC) con la dilución de 10,000 células/ml en el medio PBS, en las 12 horas de incubación a 37 grados centígrados. En el control positivo de este ensayo, utilizando ampicilina a una concentración de 5 ng/ μl se obtuvieron 552 UFC y cuando se incrementa hasta 20 ng / μl las colonias disminuyeron a 168 UFC de la bacteria *E. coli* en placa LB. Para el bioensayo de funcionalización del virus BMV con el antibiótico β -lactámico ampicilina, para una funcionalización de 40% de los grupos funcionales libres del virus BMV con el antibiótico ampicilina se obtuvieron 486 unidades formadoras de colonias y para la funcionalización del 100% de los grupos funcionales se obtuvieron 211 UFC.

Los resultados muestran que al incrementa la cantidad de la ampicilina en la superficie de la cápside la capacidad antimicrobiana es más efectiva para combatir *E. coli*. Esto es debido que se tiene más cantidad de ampicilina. Es posible llegar a una inhibición total antimicrobiana al incrementar la cantidad de partículas virales funcionalizadas con el antibiótico de tal manera que se tenga la cantidad adecuada de antibiótico, sin embargo, se tendrían que usar cantidad considerables de estas partículas haciendo ineficiente el sistema, por lo cual una posibilidad es usar un antibiótico que tenga un mecanismo de acción diferente a ampicilina como lo es el aztreonam, o en conjunto con péptidos antimicrobianos, dándonos la directriz para el potencial uso del virus BMV como una bionanopartícula con muchas posibilidades para su

uso en terapias en antimicrobianas al ser usado como un nanovehículo para antibióticos. Se debe considerar que el porcentaje de actividad bactericida es muy cercano pudiéndonos ser posible que la eficiencia total de la ampicilina no funcionalizada y funcionalizada se vea protegida por el sistema de funcionalización de cápsides.

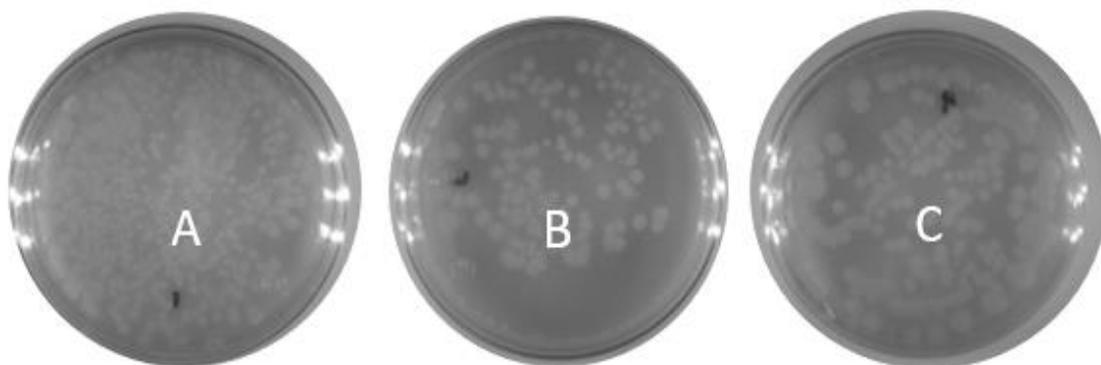


Figura 7. Imagen típica de las placas obtenidas del bioensayo en líquido de la cepa *E. coli* (10 000 células/ml). A) 12 horas de incubación en PBS, control negativo; B) Ampicilina 20 μg incubada durante 12 horas, control positivo concentración más alta. C) Placa del cultivo tratado con la nanopartícula BMV funcionalizada con el antibiótico ampicilina 100% funcionalizado, incubada durante 12 horas. En todos los casos la incubación se realizó a 37 °C.

3.4.1 Microscopía Electrónica de Transmisión de las nanobiopartículas del BMV-ampicilina a diferentes razones de funcionalización

Se funcionalizó el virus BMV con ampicilina en diferentes razones en relación a los grupos funcionales desde 100, 500 y 1000 moles (Gillitzer, Willits, & Douglas, 2002). Siendo 100 y 500 los ideales para la funcionalización ya que los 1000 moles se presentan agregación en los virus a causa de la activación de los grupos funcionales con la reacción carbodiimida lo cual causa unión covalente entre los virus; este fenómeno es desfavorable ya que se pretende tener un efecto de distribución uniforme para una efectiva actividad antimicrobiana.

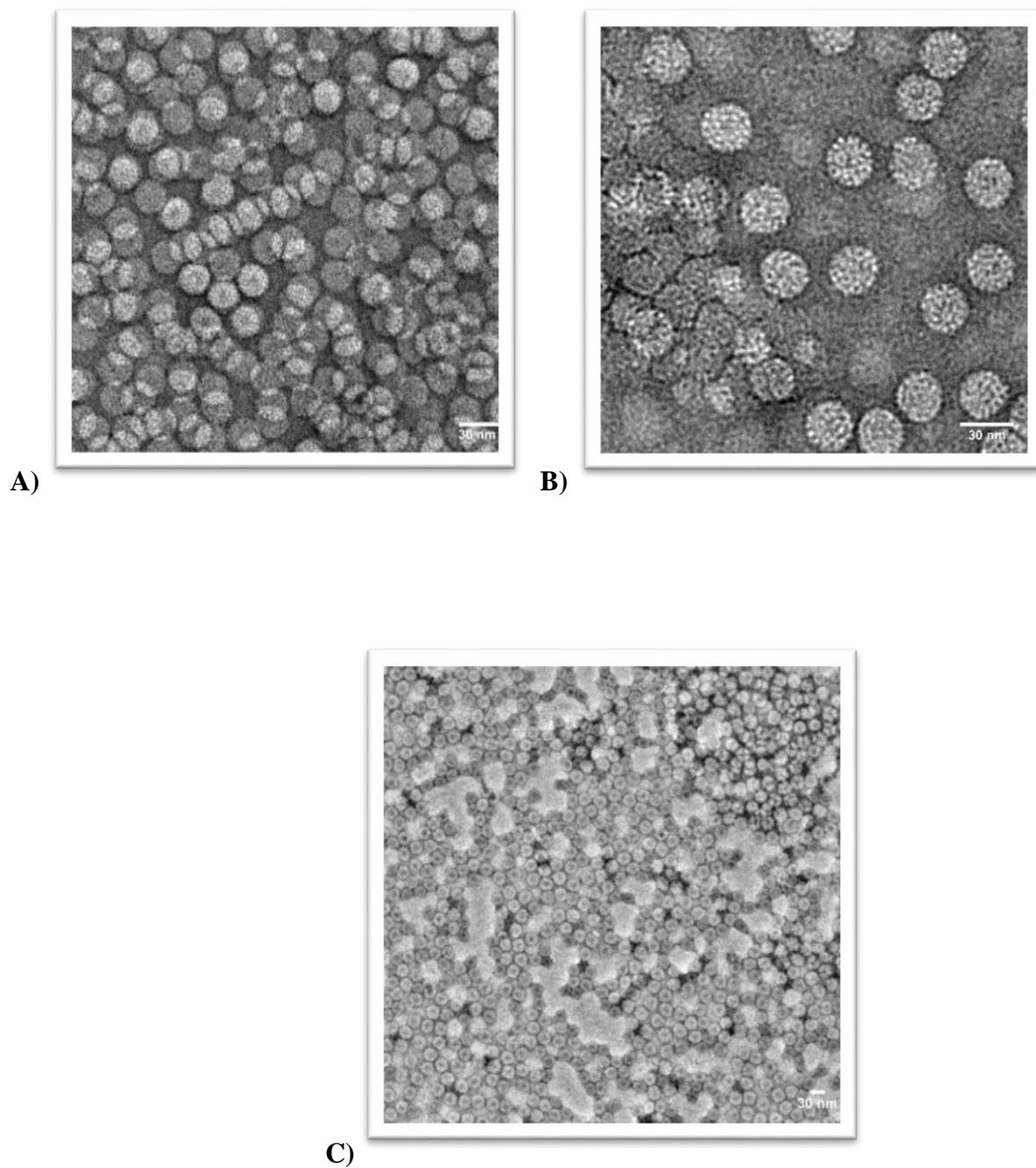


Figura 8. Imágenes de TEM donde se puede observar la funcionalización de A) 100, B) 500 y C) 1000 moles de ampicilina con el virus BMV.

3.5 Sinergia de la actividad antimicrobiana entre Kanamicina y LL-37

Como se mencionó en la sección de métodos, las bacterias *S. aureus* fueron crecidas mediante el procedimiento de crecimiento en placa LB-agar, se aisló una de la colonia y se realizó una dilución en Buffer PBS pH 7.4, hasta tener una concentración de células de 10,000 bacterias / ml. De acuerdo a lo descrito en la sección anterior en este ensayo se busca determinar si existe sinergia entre los antibióticos y el péptido. Para este ensayo se realizaron proporciones del péptido antimicrobiano y kanamicina para estudiar su posible sinergia y buscar cual sería la proporción ideal de uso contra *S. aureus* resistente a kanamicina. Las proporciones en concentraciones finales en el bioensayo usadas de péptido antimicrobiano: antibiótico fueron 5:5 µg, 5:10 µg, 5:20 µg y finalmente 20:20 µg. Se utilizó un blanco de *S. aureus* a una concentración de 10,000 células/ml en todos los casos. Cada ensayo se incubó a 37 grados centígrados por 48 horas. En la **tabla 4** se presentan los resultados obtenidos para cada una de las pruebas realizadas.

En este estudio se obtuvieron resultados en relación a las proporciones y en cuanto a sinergia entre antibióticos y péptidos antimicrobianos, cabe destacar que las condiciones de incubación fueron modificadas del método de 24 a 48 horas para observar máxima eficiencia de estos antimicrobianos y sus diferentes proporciones de prueba.

Como consecuencia de los cambios en la incubación no se pudo hacer un conteo eficiente en el control y se reportaron números incontables de unidades formadoras de colonias, mismo caso para la kanamicina la cual también se reportó en el mismo criterio de números incontables de UFC, con la diferencia de la visiblemente disminuida la densidad de las colonias.

En el péptido antimicrobiano LL-37 (20 µg) se observó una disminución significativa para la cepa *S. aureus* teniendo como resultado 52 +/-1 colonias, pero al disminuir la cantidad de péptido a 5 µg se observó un aumento hasta 264+/- 45 UFC.

Para estudiar el comportamiento de los péptidos y su interacción antimicrobiana con la cepa de *S. aureus* realizaron las proporciones LL-37: kanamicina. (Proporciones 1:1, 1:2,1:4 y 1:1 en masa).

Como uno de los resultado se pueden observar que en relación masa 1:1(5:5 µg) para el primer ensayo de sinergia antimicrobiana. Se observó que en comparación con el LL-37 por sí solo a 5µg la actividad se ve

aumentada por lo que observamos una disminución en el conteo de colonias. De 264+/-45 UFC con LL-37 el conteo disminuyó a 150+/-54 UFC con la adición de kanamicina.

Para las proporciones de 1:2 y 1:4 no se observó diferencia significativa en relación al péptido (5µg) solo, este es un resultado no esperado ya que las cantidades de kanamicina aumentaron de 5 en el primer ensayo de sinergia a 10 y 20 µg respectivamente para el antibiótico β-lactámicos contra *S. aureus*, esto hipotetizado en relación a las cargas del antibiótico y las cargas del péptido en por fuerzas electrostáticas se observa este fenómeno de inhibición parcial. Se obtuvo un resultado de 216+/-56 UFC para la proporción 1:2. Se obtuvieron 278 +/- 30 UFC en la proporción 1:4 de prueba de sinergia de AMPs-antibióticos.

Se aumentar la cantidad en masa del péptido LL-37 de 5 µg a 20 µg y una proporción en masa idéntica de kanamicina logrando la inhibición casi total de la cepa *S. aureus*. Obteniendo una cuenta de una UFC. Este resultado comparado con el Péptido solo LL-37 (20 µg) si se observó una disminución al añadirle los 20 µg de kanamicina de 52+/-1 UFC.

Tabla 4. Sinergia de la actividad antimicrobiana del péptido LL-37 en conjunto con kanamicina y actividad antimicrobiana del péptido y antibiótico individualmente.

Bioensayo	Masa (µg)	UFC / 12 horas
Control PBS	N/A	Incontables
Kanamicina	20	Incontables
LL-37	20	52 ± 1
LL-37	5	264 ± 45
LL-37: Kanamicina, 1:1	5:5	150 ± 54
LL-37: Kanamicina, 1:2	5:10	216 ± 56
LL-37: Kanamicina, 1:4	5:20	278 ± 30
LL-37: Kanamicina, 1:1	20:20	1



Figura 9. Imagen típica de las placas obtenidas del bioensayo en liquido de la cepa *S. aureus* (10,000 células/ml). A) 12 horas de incubación con kanamicina 20 μg , B) LL-37 20 μg incubada durante 12 horas. c) Imagen de la placa de cultivo tratado con péptido catiónico LL-37: kanamicina proporción 20:20 μg , incubada durante 12 horas. Blanco con la cepa *E. faecalis* no mostrado en imagen con número incontables de bacterias. En todos los casos la incubación se realizó a 37°C.

De los resultados obtenidos se corrobora que existe una sinergia del péptido LL-37 y el antibiótico kanamicina. Ya que tanto kanamicina y LL-37 no logran inhibir a *E. faecalis* *separadamente*. La concentración óptima de inhibición del *S. aureus* se obtiene a una concentración donde se obtiene a una razón en masa 20:20 μg en masa, sin embargo para una razón 5:5 μg se obtienen una inhibición considerable en comparación con el antibiótico a altas concentraciones, y en el caso del LL-37 a altas concentraciones también se tiene una inhibición considerable. Sin embargo, a razones de 5:20 μg se incrementa hasta en un 200% el número de colonias, esto indica que el antibiótico interfiere con la capacidad antimicrobiana del péptido. Esto puede sugerir dos posibles situaciones, un escenario es que el antibiótico evita la formación de las estructuras tipo barril del péptido posiblemente a interacciones electrostáticas del antibiótico con el péptido. El antibiótico kanamicina tiene cuatro cargas positivas en condiciones fisiológicas. Sin embargo, el LL-37 a pH fisiológico, 16 de sus 37 residuos tienen 11 cargas positivas (6 Lys y 5 Arg) y 5 cargas negativas (3 Glu y 2 Asp), es decir el péptido LL-37 tiene una carga neta de 6 cargas positivas (Duplantier & Hoek 2013). Otro escenario posible es que la kanamicina interaccione con la membrana de la bacteria e impida que los péptidos se inserten en esta. Ambas situaciones

podrían explicar la razón por la cual se incrementa el número de UFC al incrementar la cantidad de antibióticos cuando se mantiene constante la concentración de los péptidos.

3.6 Comparativa de la actividad antimicrobiana del BMV funcionalizado con antibióticos del tipo β -lactámicos y aminoglucósidos y su sinergia con péptido LL-37 en *Escherichia coli*.

Los resultados anteriores permitieron el diseño del siguiente bioensayo para demostrar el principio de la sinergia de las VLPs-antibióticos con péptidos antimicrobianos. Las bacterias *Escherichia coli* fueron crecidas mediante el procedimiento de crecimiento en placa de Agar LB, se aisló una de la colonia mediante y se realizó una dilución en Buffer PBS, hasta tener una concentración de 10,000 células / ml. Después de realizar la funcionalización de la superficie de la cápside del virus BMV mediante clic químico y mediante el método de carbodiimida en una proporción para funcionalizar el 40% de los grupos amino libres, que en caso del antibiótico kanamicina y aztreonam se utilizaron 5 μ g, además se adiciono 5 μ g del péptido antimicrobiano LL-37 para estudiar la sinergia entre las VLPs funcionalizadas con antibióticos. Esto con el objetivo de estudiar el potencial con otro tipo de antimicrobiano en base a su mecanismo de acción y naturaleza, en el caso particular de la naturaleza proteica del LL-37 y química para los antibióticos aztreonam y kanamicina. Como se describió en la sección de métodos el bioensayo fue realizado mediante el método de líquido de Schittek (Schittek et al., 2001) modificado y usando específicamente como control positivo 10,000 células/ml en PBS a pH 7.4. Se tomó una alícuota de esta dilución y se paqueo usando 30 μ l del cultivo. Las placas se incubaron por 12 horas a 37 grados. En la **tabla 5** se muestran los resultados obtenidos para este bioensayo.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana del péptido LL-37, del virus BMV, y de la cápside funcionalizada con aztreonam o kanamicina y combinada respectivamente con LL-37. Utilizando el método de dilución en líquido de Schittek (Schittek et al., 2001) modificado, la incubación de las placas fue por 12 horas a 37 °C.

Bioensayo	Masa(μg)	UFU/ 12 hrs
Control PBS	-	100 \pm 22
BMV	100	1300 \pm 100
LL-37	5	3 \pm 1
BMV-LL37	100-5	628 \pm 2
BMV-AZTREONAM	107-5	Incontables
BMV-AZTREONAM +LL-37	107-5 +5	0
BMV-KANAMICINA	95-5	Incontables
BMV-KANAMICINA +LL-37	95-5 +5	31 \pm 12

En este bioensayo se consideró como control negativo 10,000 bacterias/ml en PBS, sin embargo, a esta concentración los resultados mostraron que el virus BMV incremento el número unidades formadoras de colonias de bacterias, obteniendo 100 \pm 22 UFC para el control en PBS y 1300 UFC cuando el virus BMV fue adicionado al cultivo, después de 12 horas de incubación a 37 grados centígrados. En el control positivo de este ensayo utilizando LL-37 se optó por una concentración de 5 μg ; con la cual se obtuvo 3 \pm 1 UFC de la bacterias *E. coli* en LB agar. En el caso del cultivo al cual se le adiciono el virus BMV y el péptido LL-37 se obtuvo 628 \pm 2 UFC. Para el bioensayo con LL-37 y el BMV funcionalizado con kanamicina el crecimiento bacteriano disminuyo obteniendo 31 \pm 12 UFC de la bacterias *E. coli* en LB agar. Finalmente, para el bioensayo con LL-37 y el virus BMV funcionalizado con el antibiótico aztreonam, se inhibió completamente el crecimiento de *E. coli*. Considerando el potencial que tiene el aztreonam este resultado resulta congruente con la capacidad de inhibición en comparación con la ampicilina. Para las nanopartículas de BMV-kanamicina y BMV-astreonam no se pudo realizar el conteo de UFC ya que fueron incontables las colonias.

El bioensayo de la combinación del BMV con el LL-37 (~ 628 UFC) disminuye aproximadamente a la mitad el crecimiento bacteriano en comparación con lo obtenido en el ensayo con BMV (~ 1300 UFC). Los resultados muestran que el virus no inhibe la proliferación de *E.coli* y esto es debido a que la cápside es una fuente de aminoácidos y carbono para las bacterias, y que en los bioensayos ayudo a suplementar el medio mínimo PBS. Esto también fue reforzado con los resultados obtenidos cuando se combinan el virus

BMV y el péptido, a diferencia de la excelente capacidad bactericida que se obtienen cuando solo se utiliza el péptido LL-37.

La combinación más efectiva de capacidad bactericida es la cápside del virus BMV modificada químicamente con aztreonam y suplementadas con el péptido LL-37, teniendo total inhibición de la bacteria *E. coli*. Como segundo sistema antimicrobiano es la combinación del péptido LL-37 y el virus BMV funcionalizado con kanamicina. La diferencia del potencial de acción del BMV-kanamicina y BMV-aztreonam es debida a la diferente capacidad de inhibición de cada uno de los antibióticos, en el caso del aztreonam es un antibiótico de nueva generación y con menos resistencia que kanamicina en la cepa *E. coli*. Además se debe considerar que la nanopartícula sin el AMP LL-37 no presenta actividad antimicrobiana aparente a causa de un número de colonias incontables en 10,000 células de *E. coli*.

Estos resultados demuestran que es posible incrementar el efecto de los antibióticos cuando estos son unidos a la superficie de la cápside viral (VLPs-antibióticos) y/o de los péptidos cuando estos son mezclados a una proporción adecuada de cada uno de estos, y que el uso exclusivamente de uno de estos no permitiría la inhibición bacteriano, en este caso de *E. coli*.

Capítulo 4. Conclusiones

1. Los estudios realizados *in-vitro* en este trabajo de investigación los Bromovirus BMV y CCMV no poseen actividad antimicrobiana *per se*. Las cápsides virales sin funcionalizar incrementan aparentemente la proliferación bacteriana debido a que son una fuente de carbono.
2. Se logró funcionalizar el exterior de la cápside del virus BMV con los antibióticos convencionales ampicilina, kanamicina y aztreonam por el método carbodiimida mediante la activación química de los grupos carboxilos.
3. Se estableció la capacidad bactericida del péptido LL-37 contra la cepa *E. faecalis* en comparación con el antibiótico β -lactámico ampicilina en altas concentraciones.
4. La actividad antimicrobiana de las cápsides funcionalizadas químicamente con antibióticos (BMV-ampicilina) contra la cepa bacteriana *Escherichia coli*. Se incrementa la actividad antimicrobiana al aumentar el número de sitios funcionalizados en la cápside obteniendo un efecto similar a las concentraciones altas del antibiótico libre.
5. Para las cepas *S. aureus* resistente a kanamicina, se encontró que ésta puede ser inhibida considerablemente por el péptido LL-37. Adicionalmente cuando la kanamicina, es utilizada en conjunto con el péptido LL-37 se tiene una inhibición cercana a la total al incrementar la cantidad del péptido y kanamicina, obteniendo un efecto sinérgico aparente.
6. Se comparó la actividad antimicrobiana de las bionanopartículas BMV-kanamicina y BMV-aztreonam no perdieron su actividad antimicrobiana; además se observó la sinergia aparente de las bionanopartículas antimicrobianas con el péptido LL-37.
7. Los resultados indican que en la cepa *S. aureus* resistente a la kanamicina presenta inhibición cuando es tratada con el péptido LL-37 y kanamicina en conjunto, que cuando son utilizados de forma individual. Y finalmente la cepa *E. coli* es más susceptible al péptido LL-37 utilizando el BMV funcionalizado con aztreonam o BMV funcionalizado con kanamicina.
8. Los resultados obtenidos muestran en principio que las cápsides virales pueden ser excelentes nanovehículos y potenciar la capacidad antimicrobiana de antibióticos convencionales, contra

bacterias gram positivas y negativas. Además, el efecto sinérgico del péptido LL-37 y las cápsidas funcionalizadas con antibióticos, pueden permitir el desarrollo de terapias antimicrobianas para afrontar de manera innovadora la creciente problemática en relación al incremento de patógenos resistentes a antibióticos convencionales.

Capítulo 5. Perspectivas

Entre las principales perspectivas a futuro para este proyecto es la utilización de esta bionanotecnología para eficientizar la utilización racional de antibióticos, que hoy en día se ha convertido en un problema de salud pública mundial, ya que el uso irracional de antibióticos ha generado resistencia a casi todos los antibióticos aislados y conocidos además de cepas multirresistentes o “superbugs” que requieren de terapias combinadas como las que se estudian y presentan en este trabajo de investigación.

Una de las aplicaciones futuras en este proyecto serán dirigir las nanovehículos derivados de BMV funcionalizados con antibióticos además de la concomitancia con otros péptidos antimicrobianos contra otras cepas y diferente modalidad del encapsidado del péptido o expresión heteróloga de la proteína de la cápside de BMV ya con la proteína LL-37 integrada a su secuencia, las cuales se pueden probar en bacterias difíciles de tratar como los son las bacterias intracelulares: *M. tuberculosis* y *Salmonella spp.*

Literatura citada

- Agut, H., Deback, C., & Boutolleau, D. (2007). Aporte del laboratorio de virología en las enfermedades infecciosas. *EMC - Tratado de Medicina*, 11(3), 1–5. [http://doi.org/10.1016/S1636-5410\(07\)70629-3](http://doi.org/10.1016/S1636-5410(07)70629-3)
- Cadena Nava, R. D. Partículas tipo virus y su potencial aplicación en bionanotecnología. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 7(13).
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417-433.
- Del Llano, J., Quecedo, L., Rao, A., & Oteo, A. (2007). Presente y futuro de las aplicaciones médicas de las nanotecnologías. *Patología del aparato locomotor*, 5(2), 110-115.
- Duplantier, A. J., & van Hoek, M. L. (2013). The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Frontiers in immunology*, 4.
- Ganz, T., & Lehrer, R. I. (2001). Antimicrobial Proteins and Peptides. *FEBS Letters*, 1–5. <http://doi.org/10.1038/npg.els.0001212>
- Gillitzer, E., Willits, D., Young, M., & Douglas, T. (2002). Chemical modification of a viral cage for multivalent presentation. *Chemical Communications*, (20), 2390-2391
- Jalian, H. R., & Kim, J. (2008). Antimicrobial peptides. *Clinical and Basic Immunodermatology*, 131-145.
- Ma, Y., Nolte, R. J. M., & Cornelissen, J. J. L. M. (2012). Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(9), 811–825. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.005>
- Maria-Neto, S., de Almeida, K. C., Macedo, M. L. R., & Franco, O. L. (2015). Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(11), 3078-3088.
- Nava, C. (2010). Partículas tipo virus y su potencial aplicación en bionanotecnología, 2010, 48–55.
- Salian, S., Matt, T., Akbergenov, R., Harish, S., Meyer, M., Duscha, S., ... & Böttger, E. C. (2012). Structure-activity relationships among the kanamycin aminoglycosides: Role of ring I hydroxyl and amino groups. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(12), 6104-6108.
- Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., ... & Rassner, G. (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature immunology*, 2(12), 1133.
- Schmidt, N. W., Agak, G. W., Deshayes, S., Yu, Y., Blacker, A., Champer, J., ... & Wong, G. C. (2015). Pentobra: a potent antibiotic with multiple layers of selective antimicrobial mechanisms against propionibacterium acnes. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(6), 1581-1589.

- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(2), 116-129.
- Sun, J., DuFort, C., Daniel, M. C., Murali, A., Chen, C., Gopinath, K., ... & Kao, C. C. (2007). Core-controlled polymorphism in virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4), 1354-1359.
- Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55-6
- Waterbeemd, M. Van De, Snijder, J., Tsvetkova, I. B., Dragnea, B. G., Cornelissen, J. J., & Heck, A. J. R. (2016). Examining the Heterogeneous Genome Content of Multipartite Viruses BMV and CCMV by Native Mass. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 1000–1009. <http://doi.org/10.1007/s13361-016-1348-6>