

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Encapsulación de Dermcidin en partículas tipo virus con
potencial actividad antimicrobiana**

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

Presenta:

Luis Manuel Bravo Tamayo

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Luis Manuel Bravo Tamayo

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director de tesis

Dr. Oscar González Davis

Dr. Víctor Ruiz Cortés



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Luis Manuel Bravo Tamayo** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Encapsulación de Dermcidin en Partículas tipo virus con Potencial Actividad Antimicrobiana

Resumen aprobado por:

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director de tesis

La resistencia a los antibióticos representa una de las principales amenazas para la salud, con estimaciones que indican más de 10 millones de muertes anuales para 2050 debido a infecciones causadas por bacterias con resistencia a antibióticos. La rápida aparición de cepas con resistencia supera la velocidad de desarrollo de nuevos antibióticos, lo que hace urgente la búsqueda de alternativas terapéuticas. Los péptidos antimicrobianos (AMP) son pequeñas proteínas del sistema inmune con actividad antimicrobiana. En particular, los péptidos derivados de Dermcidin: DCD-1 y DCD-1L presentan estabilidad en un amplio rango de pH al encontrarse en el sudor humano. Sin embargo, su uso terapéutico puede verse limitado por la degradación enzimática o celular. En este estudio, se evaluó el uso de partículas tipo virus (VLP) derivadas del virus del mosaico del bromo (BMV) para la encapsulación de estos péptidos, aprovechando la capacidad de estas estructuras para encapsular moléculas aniónicas. Se emplearon distintas relaciones de masa entre los péptidos y la proteína de cápside de BMV, así como dos metodologías de síntesis, con el objetivo de obtener partículas estables y optimizar su producción. La caracterización mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) confirmó la formación de partículas esféricas con diámetros de 22 a 32 nm, las cuales se mantuvieron estables hasta por 14 días a 4 °C. La actividad bactericida del péptido DCD-1L libre y encapsulado en las VLP se evaluó mediante unidades formadoras de colonias, observándose una reducción de la supervivencia bacteriana del 80 % en *E. coli* y del 22 % en *S. aureus*. Adicionalmente, se reportó por primera vez la actividad bactericida de la proteína de cápside de BMV, que redujo la supervivencia en un 39 % y 76 % respectivamente. Estos hallazgos sugieren que la encapsulación en VLP puede mejorar la estabilidad y eficacia de los péptidos antimicrobianos, abriendo nuevas posibilidades para su aplicación en el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes.

Palabras clave: Partículas tipo-virus (VLP), péptidos antimicrobianos, DCD-1, DCD-1L, virus del mosaico del Bromo (BMV), Dermcidin.

Abstract of the thesis presented by **Luis Manuel Bravo Tamayo** as a partial requirement to obtain the Master of science degree in Nanoscience's.

Encapsulation of Dermcidin in virus-like particles with potential antimicrobial activity.

Abstract approved by:

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Thesis Director

Antibiotic resistance represents one of the main threats to public health, with estimates indicating more than 10 million deaths per year by 2050 due to infections caused by antibiotic-resistant bacteria. The rapid emergence of strains with resistance outpaces the speed of development of new antibiotics, making the search for novel therapeutic alternatives urgent. Antimicrobial peptides (AMPs) are small immune system proteins with antimicrobial activity. In particular, the Dermcidin-derived peptides DCD-1 and DCD-1L are stable over a wide pH range when found in human sweat. However, their therapeutic use may be limited by enzymatic or cellular degradation. In this study, the use of virus-like particles (VLP) derived from brome mosaic virus (BMV) was evaluated for the encapsidation of these peptides, taking advantage of the ability of these structures to encapsulate anionic molecules. Different mass ratios between the peptides and the BMV capsid protein, as well as two synthesis methodologies, were employed to obtain stable particles and optimize their production. Characterization by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM) confirmed the formation of spherical particles with diameters ranging from 22 to 32 nm, which were stable for up to 14 days at 4 °C. The bactericidal activity of the free and encapsulated DCD-1L peptide in the VLPs was evaluated by colony forming units, showing a reduction of bacterial survival of 80 % in *E. coli* and 22 % in *S. aureus*. Additionally, the bactericidal activity of BMV capsid protein was reported for the first time, reducing survival by 39 % and 76 %, respectively. These findings suggest that VLP encapsulation may improve the stability and efficacy of antimicrobial peptides, opening new possibilities for their application in the treatment of resistant bacterial infections.

Keywords: Virus-like particles (VLP), antimicrobial peptides, DCD-1, DCD-1L, Brome mosaic virus (BMV), Dermcidin

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres, quienes, durante toda mi vida, me han brindado las herramientas para impulsarme a alcanzar mis metas.

A mi familia, quienes siempre me han inspirado a superarme.

Agradecimientos

Al **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A los proyectos PAPIIT: IV100124 y IT101822

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE)**.

Al **Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM**.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**.

Al **Departamento de Bionanotecnología** por hacer uso de las instalaciones, los equipos y reactivos.

A mi director, **Dr. Rubén D. Cadena Nava**, por su dirección y apoyo durante el proyecto.

A mis sinodales, **Dr. Oscar González Davis** y **Dr. Víctor Ruiz Cortés**, por todos sus comentarios, consejos y apoyo.

Al **Dr. Oscar González Davis** y a la **M.C Itandehui Betanzo**, por su apoyo técnico.

A la **Dra. Gabriela Guzmán Navarro** y al **Dr. Alejandro Fajardo Peralta**, del LNMA-CICESE, por su apoyo técnico en el TEM.

A la **Dra. María Teresa Viana Castrillón**, del IIO-UABC, por su apoyo.

A mis hermanitos académicos, **Milton** y **Oscar**, por su amistad y consejos.

A mis compañeros de grupo, **Mariana, Elizabeth, Carlos, Kendra, Cecilia, Mauricio y Beto**.

A mis compañeros de laboratorio.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antibióticos	2
1.2 Péptidos antimicrobianos	4
1.3 Péptidos derivados de Dermcidin: DCD-1 y DCD-1L	4
1.4 Partículas tipo-virus.....	5
1.5 Virus del mosaico del bromo como Nano vehículo.....	6
1.6 Antecedentes	6
1.7 Hipótesis.....	7
1.8 Objetivos	7
1.8.1 Objetivo general.....	7
1.8.2 Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2. Metodología.....	9
2.1 Producción y purificación de BMV	9
2.1.1 Cultivo e Infección de cebada con BMV.....	9
2.1.2 Purificación del virus del mosaico del bromo (BMV)	9
2.1.3 Caracterización del virus nativo	10
2.1.3.1 Espectrofotometría UV-Vis.....	10
2.1.3.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)	10

2.1.3.3	Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	11
2.2	Purificación de la proteína de cápside de BMV	11
2.2.1	Desensamble de la proteína de cápside de BMV	11
2.2.2	Caracterización de la proteína de cápside	12
2.2.3	Cuantificación de la proteína de cápside	12
2.3	Caracterización de los péptidos DCD-1 y DCD-1L.....	12
2.3.1	Diámetro hidrodinámico	12
2.3.2	Potencial-Z.....	12
2.4	Encapsidación de los péptidos DCD-1 y DCD-1L	13
2.4.1	Encapsidación por micro diálisis	13
2.4.2	Encapsidación rápida.....	13
2.4.3	Caracterización de las VLPs	14
2.4.3.1	Dispersión dinámica de luz (DLS)	14
2.4.3.2	Espectrofotometría UV-Vis.....	14
2.4.3.3	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	15
2.5	Ensayos de actividad antimicrobiana.....	15
2.5.1	Determinación de actividad bactericida por unidades formadoras de colonias (UFC)	15
Capítulo 3.	Resultados	17
3.1	Producción y purificación de BMV	17
3.1.1	Dispersión dinámica de luz (DLS)	18
3.2	Purificación de la proteína de cápside de BMV	18
3.2.1	Desensamble de la proteína de cápside de BMV	18
3.3	Caracterización de los péptidos DCD-1 y DCD-1L.....	19
3.3.1	Caracterización del péptido DCD-1	19
3.3.1.1	Diámetro hidrodinámico	19
3.3.1.2	Potencial-Z.....	20
3.3.2	Caracterización del péptido DCD-1L.....	20

3.3.2.1	Diámetro hidrodinámico	20
3.4	Encapsidación de los péptidos DCD-1 y DCD-1L	22
3.4.1	Encapsidación del péptido DCD-1	22
3.4.1.1	Dispersión dinámica de Luz (DLS).....	22
3.4.1.2	Microscopia electrónica de transmisión	26
3.4.1.3	Comparación de la estabilidad de las partículas	27
3.4.2	Encapsidación del péptido DCD-1L.....	27
3.4.2.1	Dispersión dinámica de luz (DLS)	27
3.4.2.2	Microscopia Electronica de Transmisión.....	31
3.4.2.3	Evolución del diámetro hidrodinámico de las VLPs	34
3.5	Ensayos de actividad antimicrobiana	34
3.5.1	Actividad del péptido DCD-1	34
3.5.2	Actividad del péptido DCD-1L	34
3.5.3	Actividad de la VLP	35
Capítulo 4.	Discusión.....	36
4.1	Producción y purificación de BMV	36
4.2	Desensamble de la proteína de cápside (CP)	37
4.3	Caracterización de los péptidos antimicrobianos DCD-1 y DCD-1L	37
4.4	Encapsidación de los péptidos DCD-1 y DCD-1L	38
4.4.1	Relación teórica de moléculas de proteína de cápside y péptidos DCD-1 y DCD-1L	38
4.4.2	Encapsidación del péptido DCD-1	39
4.4.3	Encapsidación del péptido DCD-1L.....	42
4.5	Relación teórica de moléculas de proteína de cápside y péptidos DCD-1 y DCD-1L	43
4.6	Ensayos de actividad antimicrobiana	44
4.6.1	Actividad bactericida del péptido DCD-1	44
4.6.2	Actividad bactericida del péptido DCD-1L.....	44
4.6.3	Actividad de la VLP	44

Capítulo 5. Conclusiones	46
Literatura citada	47
Anexos	51

Lista de figuras

Figura	Página
1. Mortalidad prevista por resistencia a los antimicrobianos para 2050 en comparación con las causas comunes de las muertes actuales traducido de PNUMA (2023).....	2
2. Proceso de desensamble, cuantificación y obtención de la proteína de cápside (CP) de BMV. ..	11
3. Proceso de encapsidación por micro diálisis.	13
4. Metodología de encapsidación por ensamble rápido.	14
5. Metodología utilizada para los ensayos de actividad antimicrobiana por unidades formadoras de colonias (UFC), recuperada de Schittek et al. (2001).....	16
6. Cultivos de cebada realizados en huerto (A), cultivo de cebada crecido en cámara de climatización artificial (B) y síntomas de clorosis en hoja de cebada (C).....	17
7. Distribución de tamaños del virus nativo extraído.	18
8. Distribución del diámetro hidrodinámico de la proteína de la cápside del BMV, obtenido mediante DLS.....	19
9. Distribución del diámetro hidrodinámico del péptido DCD-1 obtenido mediante DLS.	19
10. Distribución del diámetro hidrodinámico del péptido DCD-1L obtenido mediante DLS.....	20
11. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1, usando una relación másica 1:3 (DCD-1:CP).....	23
12. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1, usando una relación másica 1:6 (DCD-1:CP).....	24
13. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1, usando una relación másica 1:9 (DCD-1:CP).....	24
14. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1, usando una relación másica 1:12 (DCD-1:CP).	25
15. Comparación del diámetro hidrodinámico de partícula obtenido a distintas relaciones másicas (DCD-1:CP) para las muestras sintetizadas a mediante metodología por micro diálisis y por ensamble rápido.	25
16. Micrografías de TEM obtenidas de las VLPs sintetizadas a una relación másica 1:3 (DCD-1:CP) mediante ensamble rápido. Magnificaciones a 100,000 aumentos (A) y 70,000 aumentos (B). Distribución de tamaño de partícula obtenido (C).	26
17. Evolución del diámetro de partícula durante 14 días, partículas sintetizadas por micro diálisis (A) y por ensamble rápido (B).....	27

18. Distribución del diámetro hidrodinámico por intensidad de las muestras sintetizadas por micro diálisis antes (A) y después (B) de centrifugar, así como las muestras preparadas por ensamble rápido antes (C) y después de centrifugar (D) a 14,000 rpm por 3 horas..... 28
19. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1L, usando una relación másica 1:3 (DCD-1L:CP). 29
20. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1L, usando una relación másica 1:6 (DCD-1L:CP). 29
21. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1L, usando una relación másica 1:9 (DCD-1L:CP). 30
22. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1L, usando una relación másica 1:12 (DCD-1L:CP). .. 30
23. Comparación del diámetro hidrodinámico de las partículas a distintas relaciones másicas sintetizadas mediante micro diálisis y por ensamble rápido..... 31
24. Micrografías de TEM obtenidas de las VLPs sintetizadas a una relación másica 1:3 (DCD-1L:CP) mediante ensamble rápido. Magnificaciones a 50,000 aumentos (A) y 25,000 aumentos (B). Distribución de tamaño de partícula obtenido (C). 32
25. Micrografías de TEM obtenidas de las VLPs sintetizadas a una relación másica 1:6 (DCD-1L:CP) mediante ensamble rápido. Magnificación de 70,000 aumentos (A), y escala a 100 nm. Distribución de tamaño de partícula (B). 32
26. Micrografías de TEM obtenidas de las VLPs sintetizadas a una relación másica 1:9 (DCD-1L:CP) mediante ensamble rápido. Magnificación de 70,000 aumentos (A), y escala a 100 nm. Distribución de tamaño de partícula (B). 33
27. Micrografías de TEM obtenidas de las VLPs sintetizadas a una relación másica 1:12 (DCD-1L:CP) mediante ensamble rápido. Magnificación de 25,000 aumentos (A), y escala a 200 nm. Zoom de la micrografía (B). Distribución de tamaño de partícula (C). 33
28. Evolución del diámetro de partícula durante 14 días, partículas sintetizadas mediante micro diálisis (A) y ensamble rápido (B). 34
29. Supervivencia del péptido DCD-1L a distintas concentraciones contra *E. coli* (rojo) y *S. aureus* (azul)..... 35
30. Supervivencia de *E. coli* (rojo) y *S. aureus* (azul) con los tratamientos de péptido libre, CP desensamblada y la VLP. 35
31. Evolución de las partículas obtenidas mediante microdialisis con el péptido DCD-1, así como el porcentaje en volumen que representan las VLPs a distintas relaciones másicas 1:3 (A), 1:6 (B), 1:9 (C) y 1:12 (D)..... 51
32. Evolución de las partículas obtenidas mediante ensamble rápido con el péptido DCD-1, así como el porcentaje en volumen que representan las VLPs a distintas relaciones másicas 1:3 (A), 1:6 (B), 1:9 (C) y 1:12 (D)..... 52

33. Evolución de las partículas obtenidas mediante microdialisis con el péptido DCD-1L, así como el porcentaje en volumen que representan las VLPs a distintas relaciones másicas 1:3 (A), 1:6 (B), 1:9 (C) y 1:12 (D)..... 53
34. Evolución de las partículas obtenidas mediante ensamble rápido con el péptido DCD-1, así como el porcentaje en volumen que representan las VLPs a distintas relaciones másicas 1:3 (A), 1:6 (B), 1:9 (C) y 1:12 (D)..... 54

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Enfermedades infecciosas provocadas por bacterias	1
2. Año de introducción de antibióticos para su uso en medicina y el año en que se reportó la aparición de una cepa con resistencia Patrick (2007) y Ventola (2015).	3
3. Secuencia de Dermcidin y los péptidos DCD-1L y DCD-1. Rieg et al., 2005 y Schittek et al., 2001.....	4
4. Condiciones usadas para los ensayos de actividad antimicrobiana de VLPs (DCD-1L).....	15
5. Estructuras del péptido DCD-1L en solución (Jung et al., 2010).	21
6. Comparación de tamaño entre péptidos derivados de Dermcidin.....	21
7. Relaciones másicas de péptido y proteína de cápside.....	22

Capítulo 1. Introducción

Las bacterias son microorganismos abundantes en la naturaleza, por lo que nos encontramos en contacto constante con estas. Mientras que por un lado muchas de estas no representan riesgo alguno para nuestra salud e inclusive juegan un papel importante en nuestro ecosistema y en nuestro organismo (Flint et al., 2012; Valdés et al., 2018), las infecciones por bacterias son un gran problema de salud pública, ya que estas también pueden liberar toxinas, provocando la destrucción de nuestros tejidos, lo cual puede llevar a desarrollar una respuesta inmune abrumadora e inclusive la muerte. Estos efectos se ven agravados ya que una vez que una bacteria ha ingresado a nuestro cuerpo, esta puede migrar de una zona a otra mediante el torrente sanguíneo (Deusenbery et al., 2021; Doron & Gorbach, 2008; Henkel et al., 2010). Algunas de las enfermedades más comunes provocadas por bacterias se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Enfermedades infecciosas provocadas por bacterias

Enfermedad	Bacterias Causantes	Fuentes
Sepsis	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Escherichia coli</i>	Ramachandran, 2013; Universidad de Queensland, 2025
Pneumonia	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, 2024; Sattar et al., 2024; Universidad de Queensland, 2025
Infecciones en vías urinarias	<i>Escherichia coli</i> Klebsiella pneumoniae Proteus mirabilis Enterococcus faecalis Staphylococcus saprophyticus	Flores-Mireles et al., 2015; Universidad de Queensland, 2025
Meningitis	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>	Organización Mundial de la Salud, 2023
Infecciones en heridas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	(Bowler et al., 2001; Puca et al., 2021)
Tuberculosis	<i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, 2025; Universidad de Queensland, 2025)

La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) ha declarado la resistencia a antimicrobianos como una de las 10 principales amenazas a la salud global (Organización Mundial de la Salud, 2020). Un estudio publicado en 2022 menciona que en 2019 se registraron 1,270,000 muertes causadas por infecciones de agentes multirresistentes a antibióticos, y si sumamos las muertes relacionadas de manera indirecta, la cifra aumenta a más de 5 millones (Murray et al., 2022). De igual manera se estima que la resistencia a antimicrobianos cause 10 millones de muertes para el 2050 (Figura 1). Esta crisis creciente causada por la ineficiencia de los antibióticos actuales, sumado al lento desarrollo de nuevos antibióticos, ha ocasionado una urgencia global para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan controlar enfermedades infecciosas bacterianas (Ventola, 2015).

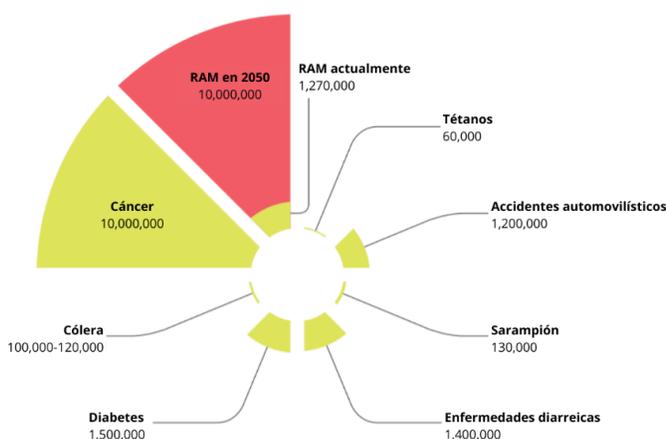


Figura 1. Mortalidad prevista por resistencia a los antimicrobianos para 2050 en comparación con las causas comunes de las muertes actuales traducido de PNUMA (2023).

1.1 Antibióticos

Los antibióticos son moléculas que pueden matar las bacterias (agentes bactericidas) o inhibir su crecimiento (agentes bacteriostáticos). La mayoría de los antibióticos actúan principalmente sobre la pared o membrana celular mediante la formación de poros o la inhibición de la síntesis de la pared celular; otros tienen su acción interfiriendo en la síntesis de ácidos nucleicos o proteínas y mediante la interferencia de distintas rutas metabólicas (Deusenbery et al., 2021; Doron & Gorbach, 2008; Patrick, 2007). Algunos antibióticos dañan únicamente a células bacterianas, en otros casos estos también pueden actuar sobre células humanas (Patrick, 2007).

Los antibióticos desempeñan un papel crucial en la medicina moderna ya que nos permiten tratar una amplia gama de enfermedades infecciosas causadas por bacterias (Felman, 2023). Sin embargo, su uso

excesivo e inadecuado ha causado que disminuya su eficiencia o capacidad debido al surgimiento de bacterias resistentes e incluso, multirresistentes. La resistencia a los antibióticos está propiciando una crisis sanitaria mundial que plantea un importante reto en el campo de las enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias. Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), la resistencia a los antibióticos se refiere a la capacidad de las bacterias para sobrevivir y crecer en presencia de antibióticos que en su día fueron eficaces contra estas (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2024). Actualmente existen múltiples bacterias las cuales han desarrollado resistencia a una gran cantidad de antibióticos, siendo algunas de las más alarmantes *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Acinetobacter baumannii* resistente a los carbapenémicos, *Salmonella Typhi* resistente a las fluoroquinolonas, *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina, etc. (Organización Mundial de la Salud, 2024).

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos mediante alteración de su sitio de acción, la alteración del acceso al sitio de acción (ya sea por la baja permeabilidad o el bombear fuera al antibiótico) o mediante la producción de enzimas que inactivan al antibiótico (Doron & Gorbach, 2008).

En 1945, Alexander Fleming advirtió sobre el peligro del uso excesivo de los antibióticos y la amenaza inevitable de la resistencia bacteriana (Howard et al., 2013). Si bien este proceso ocurre de manera natural a través de la transferencia horizontal de genes, el uso indiscriminado de antibióticos en las últimas décadas, tanto en medicina como en sectores como los son la agricultura y la ganadería, ha acelerado significativamente su aparición (Chokshi et al., 2019; Van Boeckel et al., 2015). Además, la investigación en el desarrollo de nuevos antibióticos ha disminuido debido a la limitada rentabilidad de estos, ya que su uso suele restringirse para retrasar la aparición de cepas resistentes, lo que reduce el incentivo económico para su producción (Ventola, 2015). En la Tabla 2 se presenta una comparación entre el año de introducción de diversos antibióticos y el año en que se documentó la aparición de resistencia a ellos.

Tabla 2. Año de introducción de antibióticos para su uso en medicina y el año en que se reportó la aparición de una cepa con resistencia Patrick (2007) y Ventola (2015).

Antibiótico	Introducido	Resistencia reportada
Penicilina	1943	1946
Vancomicina	1956	1988
Meticilina	1960	1961
Amoxicilina	1972	1975
Aztreonam	1984	1984
Linezolid	2000	2002
Ceftarolina	2010	2011

1.2 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés) son una clase de pequeños péptidos catiónicos anfipáticos con menos de 100 aminoácidos que presentan una actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos como bacterias, hongos y virus (Wang et al., 2019). Estos péptidos desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunitaria de plantas, animales y seres humanos (Zhang & Gallo, 2016). La mayoría de los AMP son moléculas catiónicas las cuales ejercen sus efectos antimicrobianos contra bacterias dirigiéndose a la pared celular (aniónica) mediante interacciones electrostáticas e interactuando con estas, lo que provoca la permeabilización de la membrana, la fuga del contenido celular y, en última instancia, la muerte bacteriana (Izadpanah & Gallo, 2005). En los últimos años se han generado mecanismos de resistencia frente a los AMP catiónicos, como lo pueden ser alteración de la carga de la membrana bacteriana, desechar los péptidos mediante bombas o la degradación de los péptidos mediante proteasas (LaRock & Nizet, 2015). Por otra parte, los AMP aniónicos son capaces de eludir estos mecanismos de resistencia (Becucci et al., 2014).

1.3 Péptidos derivados de Dermcidin: DCD-1L y DCD-1

Los péptidos antimicrobianos DCD-1L (48 aminoácidos) y DCD-1 (47 aminoácidos) son péptidos antimicrobianos aniónicos (carga neta de 2⁻) derivados del procesamiento proteolítico de una proteína de 110 aminoácidos (Dermcidin) que forma parte del sistema inmune innato de los humanos. Sus secuencias se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de Dermcidin y los péptidos DCD-1L y DCD-1. Rieg et al., 2005 y Schitteck et al., 2001

Péptido	Secuencia
Dermcidin (110 aa)	MRFMTLLFLTALAGALVCAYDPEAASAPGSGNPCHEASAAQKENAGEDPGLARQAPKPRKQR <u>SSLLE</u> <u>KGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGAHVHDVKDVLDSVL</u>
DCD-1L (48 aa)	SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGAHVHDVKDVLDSVL
DCD-1 (47 aa)	SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGAHVHDVKDVLDSV

Estos péptidos son anfifílicos, es decir, cuentan con una región N-terminal catiónica y una parte C-terminal aniónica. La interacción con la membrana celular se debe a la unión de la región catiónica N-terminal del péptido con la superficie bacteriana y a los fosfolípidos presentes cargados negativamente (Paulmann et

al., 2012). En presencia de una membrana aniónica, estos adoptan una estructura de α -hélice, de manera que se fusiona con esta y forma un canal hexamérico compuesto por varias hélices estabilizadas por iones divalentes como el Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y iones monovalentes como el Na^+ , los cuales también se ha visto que potencian el efecto antimicrobiano del péptido (Becucci et al., 2014; Paulmann et al., 2012). La formación de canales iónicos en la membrana bacteriana altera el potencial de la membrana y provoca la muerte de las células bacterianas. A pesar de su potente actividad bactericida, la aplicación terapéutica de los péptidos antimicrobianos se ha visto restringida por su limitada biodisponibilidad, baja permeabilidad y reducida estabilidad. Además, son altamente susceptibles a la degradación proteolítica y debido a ambiente extracelular, lo que dificulta aún más su uso como agentes terapéuticos (Mahlapuu et al., 2020; Mookherjee et al., 2020).

1.4 Partículas tipo-virus

Las partículas tipo virus son estructuras auto ensambladas que mantienen la morfología y arquitectura de los virus, pero carecen de material genético viral, lo que inhibe su capacidad de replicación y, por ende, no son infecciosas y no representan una amenaza para la salud (Cadena-Nava, 2014). Las VLPs se han convertido en herramientas valiosas en investigación biomédica y aplicaciones terapéuticas. Estas pueden ser utilizadas como sistemas de entrega de distintas moléculas con enfoque terapéutico, como fármacos, ácidos nucleicos o péptidos, ya que pueden ser modificadas para liberar específicamente la carga terapéutica en células o tejidos específicos.

Dentro del catálogo actual de virus que pueden ser utilizados como sistemas de entrega, se encuentran 110 especies dentro de 35 familias distintas, los cuales incluyen virus de tanto animales, como plantas, bacterias, insectos, etc. (Zeltins, 2012). Algunos ejemplos de virus utilizados son el virus del mosaico del caupí (CPMV), virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), bacteriófago MS2, virus del mosaico del tabaco (TMV), bacteriófago M13 (Ma et al., 2012). Los virus de plantas y sus VLPs ofrecen ventajas significativas como sistemas de entrega. Los virus de plantas no pueden infectar mamíferos, lo que los convierte en una opción segura para su uso en aplicaciones biotecnológicas. Muchos virus de plantas se ensamblan a partir de un solo tipo de proteína de cápside (CP), lo que permite realizar diversas manipulaciones como desensamble y reensamblaje, así como modificaciones químicas en su cápside (Balke & Zeltins, 2020).

1.5 Virus del mosaico del bromo como Nano vehículo

El virus del mosaico del bromo (BMV, por sus siglas en inglés) es un virus que infecta plantas y contiene ARN de cadena sencilla (ssARN) positivo. Pertenecen a la familia Bromoviridae (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, 2024) y tienen un diámetro de aproximadamente 28 nm. Tanto el BMV como el CCMV tienen una morfología similar a un icosaedro truncado y están compuestos por 180 subunidades idénticas de una proteína de alrededor de 20.4 kDa (ViralZone, 2023). El desensamblaje y ensamblaje de las proteínas de cápside puede ser inducido mediante un cambio en el pH y cambios en la fuerza iónica (Zlotnick & Stray, 2003), de manera que estas pueden ser ensambladas alrededor de moléculas aniónicas como ARN de otros virus o péptidos, mediante la interacción electrostática de estas con el extremo N-terminal de la CP que está cargada positivamente (Cadena-Nava et al., 2012). Como parte de la búsqueda de alternativas a los antibióticos, en este proyecto se busca encapsular los péptidos antimicrobianos DCD-1 y DCD-1L dentro de las partículas virales del virus de planta BMV, de manera que funjan como nano vehículos para transportar al péptido, y utilizar este sistema contra bacterias resistentes a antibióticos.

1.6 Antecedentes

Schittek y colaboradores (2001) probaron la eficiencia antimicrobiana de DCD-1 (47 aminoácidos) y DCD-1L (48 aminoácidos). En este trabajo, se purificó el péptido DCD-1 a partir de sudor humano, mientras que el DCD-1L fue sintetizado. Se probó la actividad antimicrobiana de ambos péptidos contra *E. coli*, *E. faecalis* y *S. aureus*, encontrando que estos tienen actividad bactericida en un rango amplio de pH (5.5 a 7.4), así como en distintas concentraciones de iones de NaCl (10 a 25 mM).

Paulmann y colaboradores (2012) estudiaron el efecto que tienen la presencia de iones monovalentes y divalentes como NaCl, CaCl₂, MgCl₂ y ZnCl₂ (10 μM) en la actividad bactericida del péptido DCD-1L (50 μg/mL) contra *S. aureus* 113. En su estudio encontraron que la capacidad bactericida es potenciada en presencia de estos iones, mientras que al añadir un agente quelante como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) la actividad bactericida decae. También propusieron un modelo en el cual los iones como Zn²⁺ inducen el auto ensamblaje de DCD-1L al interactuar con la membrana bacteriana, pasando de una estructura de random coil, a una α-hélice activa, por lo que la presencia tanto de iones como la de una membrana aniónica (membrana bacteriana) es necesaria para la formación de canales iónicos.

Las VLPs han mostrado ser sistemas de entrega versátil para una amplia gama de moléculas, por ejemplo, para usarlas como medio de transporte de moléculas tal como como ARNs de interferencia (siARN), ARNs mensajeros, proteínas, moléculas bioactivas, fármacos y péptidos (Rohovie et al., 2017).

En un estudio publicado por Lomonossoff y Evans (2011), se destaca la posibilidad de obtener VLPs del CCMV de manera *in vitro*. Estas partículas se forman mediante el ensamblaje de las proteínas de la cápside en ausencia del ARN viral. El artículo también resalta las ventajas de utilizar CCMV como sistema de encapsulación para moléculas de interés, así como la capacidad de controlar su encapsulación y liberación mediante cambios en el pH, lo que provoca cambios estructurales en la cápside.

Núñez y colaboradores (2020) utilizaron VLPs derivadas de BMV y CCMV para encapsidar un siARN aprovechando las propiedades de autoensamblaje de las proteínas de cápside de estos virus. En su estudio demostraron la capacidad de internalización de estas partículas, así como la liberación del cargo dentro de las células, probando que estas nanopartículas son biocompatibles y prometedoras como nano vehículos.

1.7 Hipótesis

Los péptidos antimicrobianos DCD-1L y DCD-1 pueden ser encapsidados con proteínas de la cápside del virus del mosaico del bromo (BMV), formando partículas estables que protejan al péptido y mantengan su funcionalidad bactericida.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Generar un sistema antimicrobiano basado en VLPs de BMV cargadas con el péptido DCD-1L.

1.8.2 Objetivos específicos

- Producir y purificar el virus BMV.

- Purificar la proteína de cápside de BMV.
- Sintetizar VLPs a partir de BMV cargadas con el péptido DCD-1 y DCD-1L
- Analizar la estabilidad de las VLPs formadas por la cápside del virus del mosaico del bromo (BMV) y los péptidos antimicrobianos.
- Determinar la actividad bactericida de las VLPs sintetizadas, comparando la eficacia del péptido libre y encapsidado.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Producción y purificación de BMV

2.1.1 Cultivo e Infección de cebada con BMV

La metodología descrita para la producción y purificación del virus BMV se basa en el trabajo publicado por Núñez-Rivera y colaboradores (2020). Para la producción de BMV, se realizaron cultivos de cebada colocando 10 semillas de cebada por maceta y dejándolas en una cámara de climatización artificial (RTOP-1000Y) durante 2 semanas o hasta su germinación. Para esto se configuro la cámara de climatización con ciclos de día y noche, los cuales variaban condiciones de temperatura, humedad, e intensidad de luz. El ciclo de día consistió en 8 horas a una temperatura de 22°C con humedad del 30% y nivel de intensidad de luz de 8, por su parte el ciclo de noche consto de 16 horas a una temperatura de 14°C, humedad del 55% y nivel de intensidad de luz de 0. Una vez se logró el cultivo de cebada, se realizó un ligero daño sobre la superficie de las hojas con ayuda de una fibra metálica superfina de grado 0000. Para la infección con BMV se preparó una solución con buffer de inoculación (10 mM fosfato de sodio, 10 mM cloruro de magnesio a pH 6, y 0.1 µg/µL de virus nativo). Se colocaron 20 µL de buffer de inoculación sobre la hoja previamente lacerada, aplicando un ligero masaje para esparcir la solución. Pasadas 2-4 semanas o una vez que las hojas de cebada presentaron síntomas de infección por BMV (clorosis) se procedió a recolectar las hojas y almacenarlas a -20°C.

2.1.2 Purificación del virus del mosaico del bromo (BMV)

Se trituraron 250 gramos de hojas de cebada infectadas en una licuadora junto con 500 mL de buffer de extracción (0.5M acetato de sodio y 80 mM acetato de magnesio, pH 4.5) y 70 µL de β-mercaptoetanol. Durante este proceso se fueron incorporando poco a poco tanto las hojas de cebada y el buffer de extracción (manteniéndolo a 4° C) de manera que las hojas se fueron licuando por periodos de 30 segundos de molienda y 1 minuto de descanso, repitiendo hasta haber molido la totalidad de las hojas de cebada. La mezcla resultante se filtró a través de una gasa para posteriormente añadir 200 mL de cloroformo y mantener la solución en agitación durante 10 minutos a 4° C. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 9,000 rpm durante 25 minutos a 4° C. El sobrenadante fue recuperado y colocado en un vaso de precipitado con

hielo. La solución fue centrifugada de nuevo a 9,000 rpm durante 19 minutos a 4° C, y transcurrido este periodo se recuperó el sobrenadante, se añadió NaCl a una concentración final de 20 mM, así como PEG-6000 al 15%. La solución se dejó en agitación durante la noche a 4° C.

2.1.3 Caracterización del virus nativo

2.1.3.1 Espectrofotometría UV-Vis

La concentración y pureza del virus nativo fue determinada con un espectrofotómetro UV-Vis modelo Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) realizando una dilución 1:400 del virus en buffer SAMA (50 mM acetato de sodio, 8 mM acetato de magnesio, pH 4.5). La concentración del virus se determinó mediante la ecuación 1, en donde A_{260} es la absorbancia a 260 nm

$$C_{BMV} = \left(\frac{A_{260}}{l[cm] * \epsilon[M^{-1} * cm^{-1}]} \right) (PM[\frac{g}{mol}]) = \frac{A_{260}}{5.15} [\frac{mg}{mL}] \quad (1)$$

Para determinar la pureza del virus se usó la razón $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ (Ecuación 2), la cual debe de estar en el rango entre 1.5 y 1.7 para que el virus pueda ser considerado como puro y ser utilizado, en caso de no cumplirse, se deberá agregar un paso para lograr purificar el virus.

$$P_{BMV} = \frac{A_{260}}{A_{280}} \quad (1)$$

2.1.3.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El diámetro hidrodinámico de los viriones se determinó tomando 100 μ L de muestra y colocándolos en celdas ZEN0040 haciendo uso del equipo Zetasizer NanoZS (Malvern Panalytical). Las muestras se midieron 5 veces.

2.1.3.3 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Se hizo uso del microscopio electrónico de transmisión (TEM) Hitachi modelo HF-3300 de la Unidad de Microscopia Avanzada del Centro de Investigación y Educación Superior de Ensenada (LNMA-CICESE). Se colocaron 8 μL de virus purificado a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sobre una rejilla de cobre de 400 grids (Fisher Scientific). La muestra se mantuvo durante 5 minutos al término de los cuales se retiró el exceso de líquido mediante absorción con papel filtro Whatman No. 2. Posteriormente se colocaron 8 μL de acetato de uranilo al 2% previamente centrifugado a 12,000 rpm durante 10 minutos. El acetato de uranilo se dejó 1 minuto sobre la rejilla de cobre y se retiró el exceso con papel filtro. La muestra fue almacenada en un desecador hasta ser analizada por TEM. Las micrografías obtenidas fueron analizadas con el software ImageJ y las gráficas de distribución de tamaño mediante el software OriginPro.

2.2 Purificación de la proteína de cápside de BMV

2.2.1 Desensamble de la proteína de cápside de BMV

Se colocaron 2 mg de virus nativo en diálisis por 24 horas a 4° C con buffer de desensamble (500 mM CaCl_2 , Tris-HCl pH 7.4). Pasado este tiempo, se recuperó la muestra y se centrifugó en un rotor 90Ti durante 2 horas a 42,000 rpm en una ultracentrífuga Optima XPN-100 (Beckman Coulter). La muestra fue recuperada sin perturbar el pellet formado y se dializó en buffer de proteína o buffer TKM (1 M KCl, 10 mM Tris-Base, 5 mM MgCl_2 , pH 7.4) durante por lo menos 4 horas a 4° C. Finalmente, la muestra se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado y cuantificado por espectrofotometría UV-Vis Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

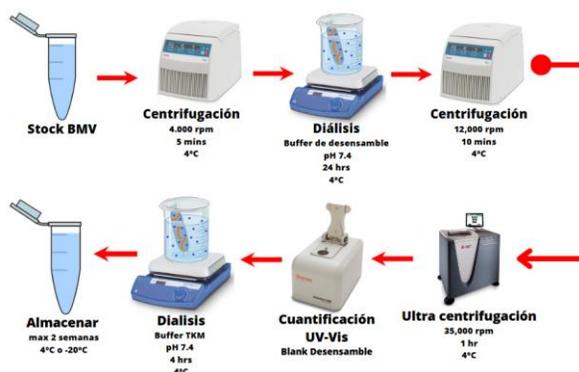


Figura 2. Proceso de desensamble, cuantificación y obtención de la proteína de cápside (CP) de BMV.

2.2.2 Caracterización de la proteína de cápside

2.2.3 Cuantificación de la proteína de cápside

La cuantificación de la CP se realizó mediante espectrofotometría UV-Vis Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). La A_{280} fue utilizada para determinar la concentración de proteína en la muestra, mediante la ecuación de Beer-Lambert (Ecuación 3). También se consideró la relación $\frac{A_{280}}{A_{260}}$ (Ecuación 4) y con esta se determinó si la muestra es pura, es decir, si la relación de ácidos nucleico y proteína eran óptimas para la encapsidación, siendo que este valor debe rondar entre 1.3 y 1.5.

$$C_{CP} = \frac{A_{280}}{i[cm] * \epsilon[M^{-1} cm^{-1}]} * PM [g/mol] = \frac{A_{280}}{0.82} [mg/mL] \quad (3)$$

$$P_{CP} = \frac{A_{280}}{A_{260}} \quad (4)$$

2.3 Caracterización de los péptidos DCD-1 y DCD-1L

2.3.1 Diámetro hidrodinámico

El diámetro hidrodinámico de los péptidos DCD-1 y DCD-1L se determinó tomando 100 μ L de muestra a una concentración de 0.1 μ g/ μ L en agua desionizada estéril. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C previo a su análisis y se utilizó una celda ZEN0040 haciendo uso del equipo Zetasizer NanoZS (Malvern Panalytical). Las muestras se midieron 5. Finalmente, los datos fueron graficados utilizando el software OriginPro.

2.3.2 Potencial-Z

Se midió el potencial-z de los péptidos DCD-1 y DCD-1L diluyendo el péptido a una concentración de 0.1 μ g/ μ L en un volumen final de 2 mL de buffer: SAMA (pH 4.5 y 6.0) y buffer TKM (pH 7.4).

2.4 Encapsidación de los péptidos DCD-1 y DCD-1L

2.4.1 Encapsidación por micro diálisis

Se utilizaron distintas razones de masa (Péptido: CP) de los péptidos y la proteína de cápside de BMV, (1:3, 1:6, 1:9 y 1:12). Previo a la encapsidación, el péptido fue tratado con 1 mM EDTA durante 30-60 minutos. Para la encapsidación se añadió la CP al péptido y se aforó a 150 μ L con buffer TKM. Esta solución se transfirió a tubos de micro diálisis y se dializó contra buffer TNKM (50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) durante 8 horas a 4° C. Posteriormente, se realizó una segunda diálisis contra buffer SAMA (50 mM NaOAc, 8 mM Mg(OAc)₂, pH 6) durante 4 horas a 4° C, para luego dializar nuevamente contra buffer TNKM durante 4 horas, a 4° C. Por último, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 3 horas y se recuperó el sobrenadante.

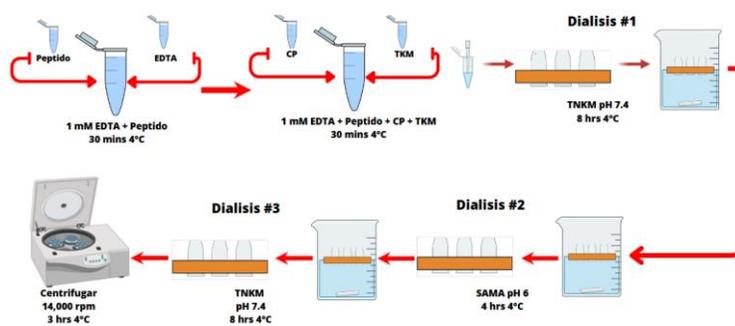


Figura 3. Proceso de encapsidación por micro diálisis.

2.4.2 Encapsidación rápida

Se utilizaron distintas razones de masa (Péptido: CP) de los péptidos y la proteína de cápside de BMV, (1:3, 1:6, 1:9 y 1:12). De igual manera se comienza monomerizando el péptido incubándolo con 1 mM EDTA durante 30-60 minutos a 4° C. Posteriormente se agregó CP, así como un volumen de buffer TNKM, se agitó la solución ligeramente mediante pipeteo y se dejó incubar durante 1 hora a 4° C. Transcurrido el tiempo, se acidificó el medio agregando 1% en volumen de ácido acético glacial al 10% e incubando durante 30 minutos a 4° C. A continuación, se agregó ½ volumen de buffer T2NKM (100 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM TrisB, pH 7.4) a la reacción y se resuspendió mediante pipeteo constante durante 5 minutos. Finalmente, se agregó un volumen de buffer T2NKM y se resuspendió nuevamente durante 5

minutos. Las VLPs fueron recuperadas mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 10 minutos; recuperado el sobrenadante.

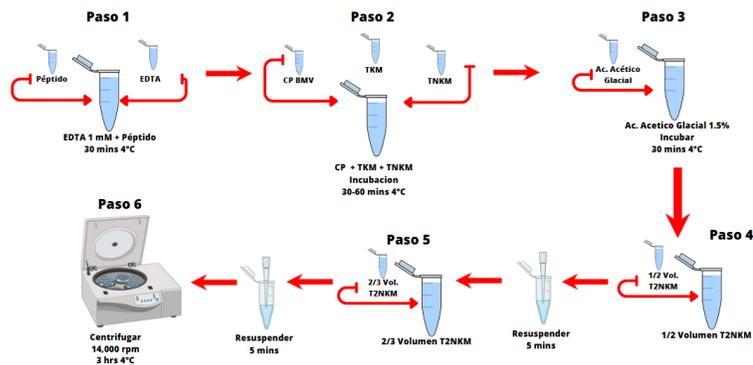


Figura 4. Metodología de encapsidación por ensamble rápido.

2.4.3 Caracterización de las VLPs

2.4.3.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El diámetro hidrodinámico de las VLPs se determinó tomando 100 μL de muestra a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C previo a su análisis y se utilizó una celda ZEN0040 haciendo uso del equipo Zetasizer NanoZS (Malvern Panalytical). Para estudiar la estabilidad de las VLPs, las muestras se mantuvieron a 4°C durante 14 días, realizando 5 mediciones del diámetro hidrodinámico en los días 1, 5, 7, 12 y 14. Las muestras se midieron 5 veces. Los datos obtenidos fueron graficados utilizando el software OriginPro.

2.4.3.2 Espectrofotometría UV-Vis

Se analizaron las VLPs mediante espectrofotometría UV-Vis con el objetivo de determinar la absorbancia a 280 nm, con la cual, mediante la ecuación de Beer-Lambert podemos cuantificar la concentración de proteína (ecuación 3).

2.4.3.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La caracterización por TEM se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 2.1.3.3.

2.5 Ensayos de actividad antimicrobiana

Se utilizó la metodología descrita por Schitteck (2001). Para esto, se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana en los cuales se determinó la actividad del péptido DCD-1L libre a distintas concentraciones (10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con la finalidad de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *E. coli* y *S. aureus*. Por otra parte, se analizó la actividad del péptido encapsidado en las VLPs, así como una concentración igual de péptido y CP a la que se encuentra en la VLP, considerando que en cada ensamble de VLPs se contaba con una concentración de CP y DCD-1L de 0.1 y 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente. Los ensayos de actividad se realizaron en un volumen final de 180 μL , de los cuales 60 μL correspondían al tratamiento, por lo que al agregar 60 μL de VLPs se obtenía una concentración de CP y de DCD-1L de 33.33 y 8.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Por lo anterior, para poder realizar una mejor comparación de la actividad de la VLP se comparó con sus componentes individuales (CP y DCD-1L). Se realizaron ensayos por triplicado de 33.33 de CP y 8.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DCD-1L, ya que esta fue la concentración a la que se encuentran en los ensayos con la VLP.

Tabla 4. Condiciones usadas para los ensayos de actividad antimicrobiana de VLPs (DCD-1L).

Tratamiento		Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		DCD-1L	CP	VLP
<i>E. coli</i>	DCD-1L	8.3	-	8.3
	CP	-	33.33	33.33
	VLP	-	-	0.05
<i>S. aureus</i>	DCD-1L	8.3	-	8.3
	CP	-	33.33	33.33
	VLP	-	-	0.05

2.5.1 Determinación de actividad bactericida por unidades formadoras de colonias (UFC)

Se preparó un precultivo el cual se incubó a 37° C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0.4

y 0.7 (fase media-exponencial de crecimiento). Posteriormente se realizaron 3 lavados mediante centrifugación a 4,000 g durante 5 minutos y se lavó con buffer de fosfato sódico 1.5X (15 mM cloruro de sodio, 121.5 mM fosfato de sodio dibásico y 27 mM fosfato de sodio monobásico, pH 7.4). Después se midió nuevamente la densidad óptica para determinar la concentración de bacterias en solución. Para cada cepa específica, se utilizó el número de células por mililitro considerando que a una absorbancia de 1 a 600 nm se encuentran aproximadamente 8.2×10^9 células/mL para *E. coli* y 1.9×10^{10} células/mL para *S. aureus* (Schitteck et al., 2001). A continuación, se colocaron 120 μ L de bacteria, de manera que cada muestra tuviera una concentración de 2×10^6 células/mL. A su vez, se colocaron 60 μ L del tratamiento (Péptido, VLP o CP) de manera que se asegurara la concentración deseada de este. Los ensayos se realizaron incubando la bacteria, así como la concentración de péptido en una placa de 96 pozos durante 4 horas, pasado este tiempo, se procedió a hacer una dilución 1:50 en buffer de fosfato sódico (10 mM NaCl, 81 mM fosfato de sodio dibásico, 18 mM fosfato de sodio monobásico, pH 7.4) y se plaquearon 30 μ L en placas de agar LB, las cuales se incubaron entre 18 y 24 horas a temperatura ambiente para por último realizar el conteo de colonias mediante ImageJ. Finalmente se realizó una comparación de cada tratamiento con su respectivo control por triplicado.

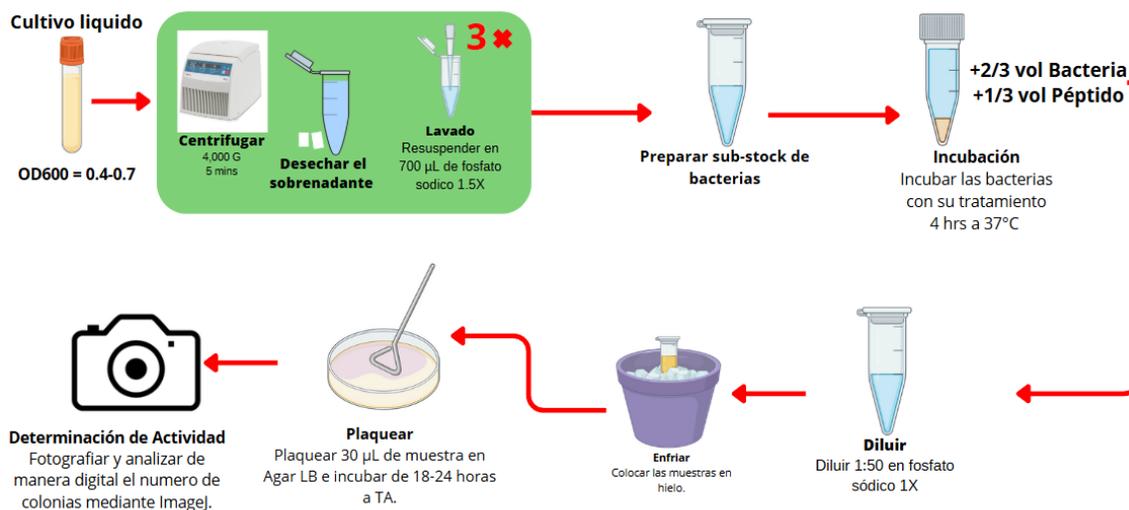


Figura 5. Metodología utilizada para los ensayos de actividad antimicrobiana por unidades formadoras de colonias (UFC), recuperada de Schitteck et al. (2001).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Producción y purificación de BMV

Se crecieron cultivos de cebada en el huerto del CNYN-UNAM (Figura 6A). Esta cebada fue infectada con virus nativo mediante un buffer de inoculación (concentración de BMV: $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). También se logró crecer exitosamente cebada en una cámara de climatización artificial (RTOP-1000Y), e igualmente se infectó con BMV (Figura 6B y 6C).



Figura 6. Cultivos de cebada realizados en huerto (A), cultivo de cebada crecido en cámara de climatización artificial (B) y síntomas de clorosis en hoja de cebada (C).

Pasados los 14 días después de realizar la infección de cebada con el virus nativo de BMV, las hojas infectadas fueron recolectadas, pesadas y almacenadas a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en bolsas individuales de aproximadamente 200 gramos, para la posterior extracción del virus nativo. Durante la extracción de virus, se prepararon alícuotas de $400 \mu\text{L}$ a una concentración de $5 \text{ mg}/\text{mL}$. Se obtuvo un rendimiento de 1.9 mg de BMV/g de hoja infectada.

3.1.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Se caracterizó el diámetro hidrodinámico de los viriones purificados (Figura 7). Estos presentaron una distribución mono-dispersa con un diámetro hidrodinámico de partícula de 28.03 ± 3.48 nm, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura para el virus nativo.

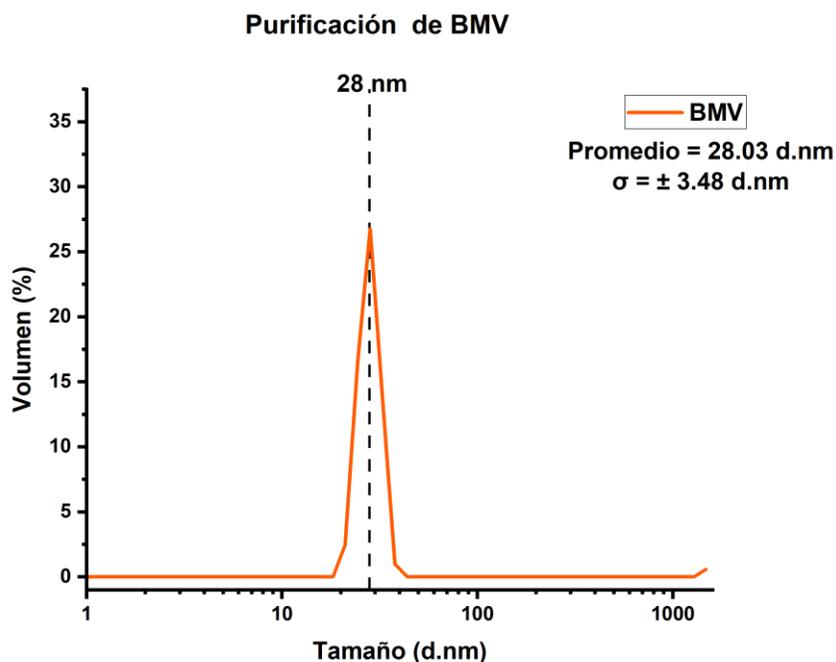


Figura 7. Distribución de tamaños del virus nativo extraído.

3.2 Purificación de la proteína de cápside de BMV

La purificación de la proteína de cápside de BMV se realizó a partir de 1 mg de virus nativo, del cual se obtuvo 0.65 mg de proteína purificada. La pureza de la proteína para la síntesis de las VLPs de BMV siempre fue igual o mayor a 1.5 de acuerdo a la ecuación (2).

3.2.1 Desensamble de la proteína de cápside de BMV

El desensamble de la proteína de cápside del BMV se confirmó mediante DLS. La proteína desensamblada muestra una distribución de tamaño con un único pico a aproximadamente 8 nm (Figura 8), lo cual corresponde a la proteína de cápside en forma de dímeros.

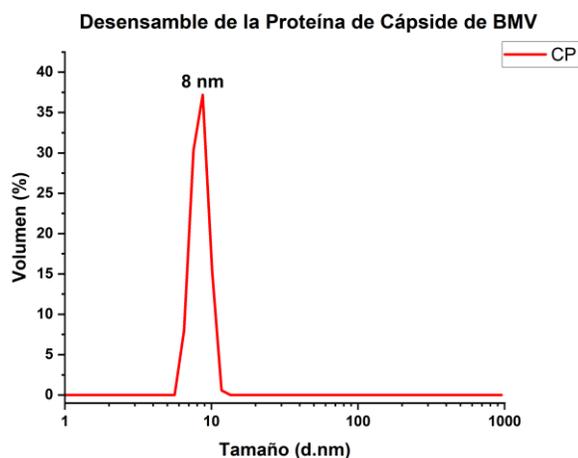


Figura 8. Distribución del diámetro hidrodinámico de la proteína de la cápside del BMV, obtenido mediante DLS.

3.3 Caracterización de los péptidos DCD-1 y DCD-1L

3.3.1 Caracterización del péptido DCD-1

3.3.1.1 Diámetro hidrodinámico

Se determinó experimentalmente el diámetro hidrodinámico del péptido mediante DLS (Figura 9). La distribución de tamaño por volumen muestra una única población de partículas, es decir, una distribución monomodal, con un diámetro de 3.4 ± 0.7 nm.

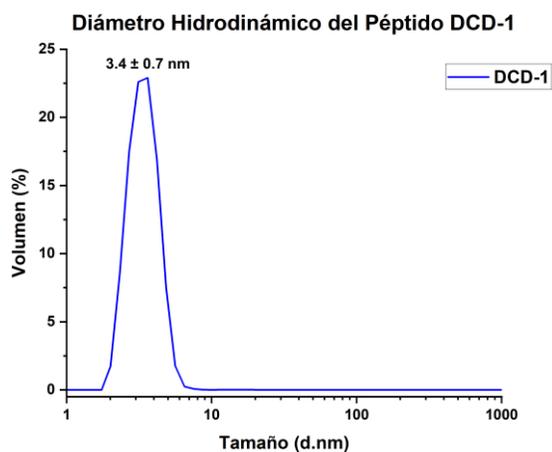


Figura 9. Distribución del diámetro hidrodinámico del péptido DCD-1 obtenido mediante DLS.

3.3.1.2 Potencial-Z

Se obtuvo el potencial z del péptido DCD-1, para esto se prepararon dos soluciones de buffer SAMA (50 mM acetato de sodio, 8 mM acetato de magnesio) a distintos pH (4.5 y 6). Los resultados mostraron una distribución de cargas de -1.64 y -1.73 mV en los medios a pH 4.5 y pH 6 respectivamente, los cuales son valores bastante cercanos para la carga que esta reportada para el péptido (-2).

Una vez habiendo corroborado características fisicoquímicas del péptido para su encapsidación, como lo son el tamaño y el potencial-Z, se procedió a realizar los ensambles a diferentes razones en masa con el objetivo de determinar las condiciones idóneas para encapsidar el péptido DCD-1.

3.3.2 Caracterización del péptido DCD-1L

3.3.2.1 Diámetro hidrodinámico

Se obtuvo el diámetro hidrodinámico del péptido DCD-1L mediante DLS, de manera que la distribución de tamaños por volumen presentó una distribución bimodal, con dos poblaciones de partículas con diámetros de 2.24 ± 0.3 nm (19%) y otra población de partículas con un diámetro de 6.64 ± 2.7 nm (81%), lo cual nos pudiera indicar que el péptido se encuentra en múltiples conformaciones estructurales (Figura 10).

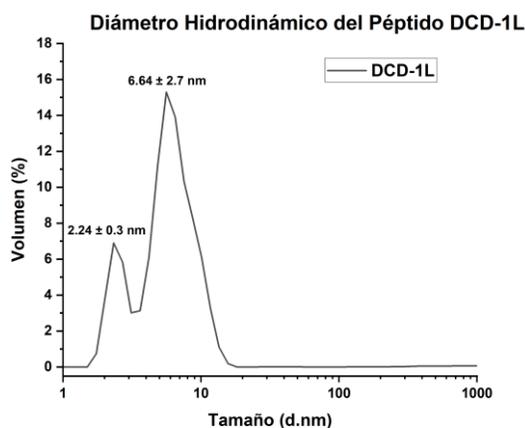


Figura 10. Distribución del diámetro hidrodinámico del péptido DCD-1L obtenido mediante DLS.

Para realizar una mejor comparación, se tomó la estructura del péptido DCD-1L (ID PDB:2KSG) reportada en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) y se analizaron las 14 estructuras que puede tomar este péptido en solución. Los valores del tamaño del péptido en sus 14 posibles posiciones se encuentran resumidos en la tabla 5.

Tabla 5. Estructuras del péptido DCD-1L en solución (Jung et al., 2010).

Posición	Tamaño (nm)	Tamaño Promedio (nm)
1	2.82	4.17 ± 1.06
2	3.00	
3	3.00	
4	3.28	
5	4.69	
6	4.63	
7	3.00	
8	4.18	
9	5.09	
10	3.98	
11	3.69	
12	4.54	
13	3.64	
14	5.09	
15	6.83	
16	3.02	
17	3.80	

En la tabla 6 se realiza una comparación de los diámetros obtenidos para los péptidos DCD-1 y DCD-1L de manera experimental por DLS, así como de la estructura del péptido DCD-1L reportada.

Tabla 6. Comparación de tamaño entre péptidos derivados de Dermcidin.

Péptido	Diámetro hidrodinámico (nm)	Desviación estándar (nm)
DCD-1 Experimental	3.4	± 0.7
DCD-1L Experimental	6.64	± 2.7
DCD-1L Teórico	4.06	± 1.02

3.4 Encapsidación de los péptidos DCD-1 y DCD-1L

Se realizaron ensambles con los péptidos DCD-1 y DCD-1L, en las cuales se analizaron distintas razones de masa de péptido y proteína de cápside (CP). También se probaron dos metodologías distintas para la encapsidación: primero se realizó una encapsidación mediante micro diálisis y posteriormente se cambió a una metodología de ensamble rápido, en la cual se logró disminuir en gran medida los tiempos de encapsidación así como los reactivos utilizados ya que se pasó de un proceso el cual requiere grandes volúmenes de buffers, así como tiempos prolongados para lograr la encapsidación, a una metodología en la cual se utilizan volúmenes muy pequeños y que se puede realizar una encapsidación apenas en un par de horas, lo cual presenta un gran beneficio para la escalabilidad del proyecto.

Se prepararon muestras con cuatro distintas razones de masa de péptido: CP según la tabla 7. Posteriormente se analizó el diámetro hidrodinámico de las VLPs mediante dispersión dinámica de luz, así como la morfología de las partículas obtenidas mediante TEM.

Tabla 7. Relaciones másicas de péptido y proteína de cápside.

Relación Másica	Masa de péptido (μg)	Masa de proteína de Cápside (μg)
1:3	15	45
1:6	7.5	
1:9	5	
1:12	3.75	

3.4.1 Encapsidación del péptido DCD-1

3.4.1.1 Dispersión dinámica de Luz (DLS)

Se realizó una comparación del diámetro de partícula obtenida para cada razón de masa (DCD-1:CP) por cada metodología de encapsidación mediante DLS.

3.4.1.1.1 Razón de masa 1:3

De manera general se encontró la presencia de partículas con un diámetro en el rango de 20 a 30 nm (rango de interés) para las muestras preparadas utilizando una razón de masa 1:3 mediante micro diálisis, así como por ensamble rápido. La distribución de tamaño por volumen para la muestra preparada por micro diálisis presentó una distribución de partículas con un diámetro de 7.46 ± 0.9 nm (17.9%), 28 ± 2.73 nm (74.3%). El porcentaje restante se presentó en forma de agregados (partículas con diámetros mayores a 1,000 nm) (Figura 11A). Por su parte, la muestra preparada mediante ensamble rápido presentó una distribución de partículas con un diámetro de 23.49 ± 0.63 (96.2%). El porcentaje restante de igual manera pertenece a agregados (Figura 11B).

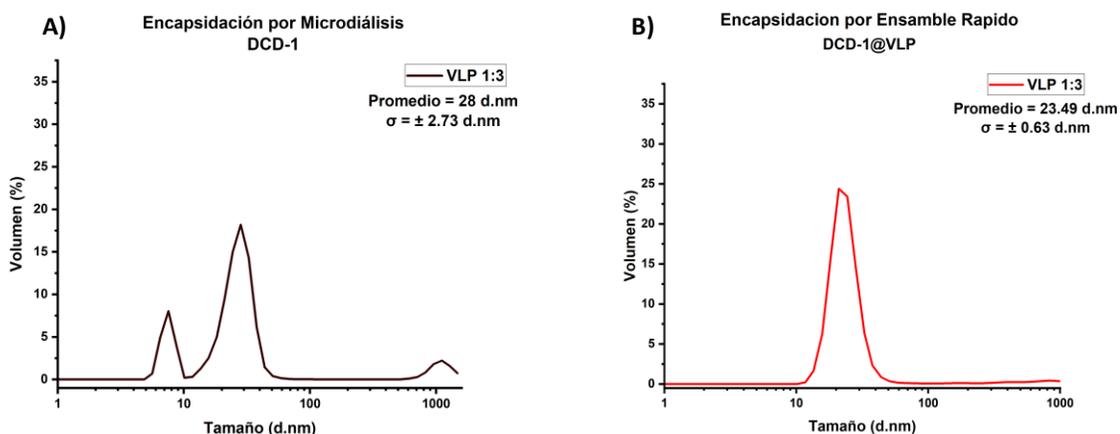


Figura 11. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1, usando una relación másica 1:3 (DCD-1:CP).

3.4.1.1.2 Razón de masa 1:6

Para las muestras preparadas utilizando una razón de masa 1:6 se presentaron partículas dentro de nuestro rango de interés, así como algunos agregados. La muestra preparada por micro diálisis presentó una distribución de diámetro por volumen con partículas de 12.49 ± 2.46 (15%), 30.38 ± 1.35 nm (80%), así como agregados (5%) (Figura 12A). Las partículas sintetizadas mediante ensamble rápido mostraron una distribución de diámetros similares, con partículas con diámetros de 11.72 ± 1.51 nm (11%), 25.90 ± 1.34 nm (86%), así como agregados (Figura 12B).

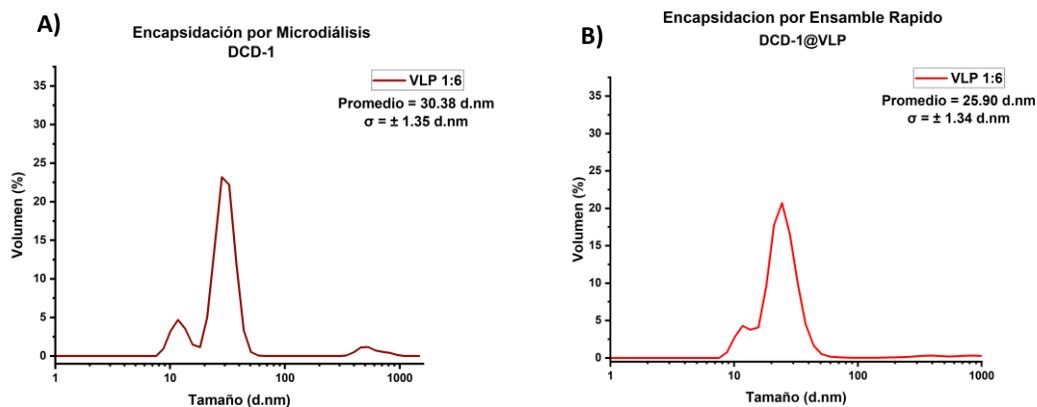


Figura 12. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1, usando una relación másica 1:6 (DCD-1:CP).

3.4.1.1.3 Razón de masa 1:9

Las partículas obtenidas mediante la razón de masa 1:9 presentaron diámetros en nuestro rango de interés (28-30 nm), similar a los casos observados anteriormente para esta metodología de ensamble por microdialisis, siendo que se obtuvo una distribución de diámetro por volumen (Figura 13A) con partículas de 32.43 ± 2.52 nm (53%) y el porcentaje restante (43%) en forma de agregados (partículas con diámetro mayor a los 100 nm). Por el contrario, la síntesis de VLPs realizada por ensamble rápido presentó una única población, con partículas con un diámetro de 26.58 ± 1.57 nm (97%), sin la presencia de agregados ni proteína o péptido libre (Figura 13B).

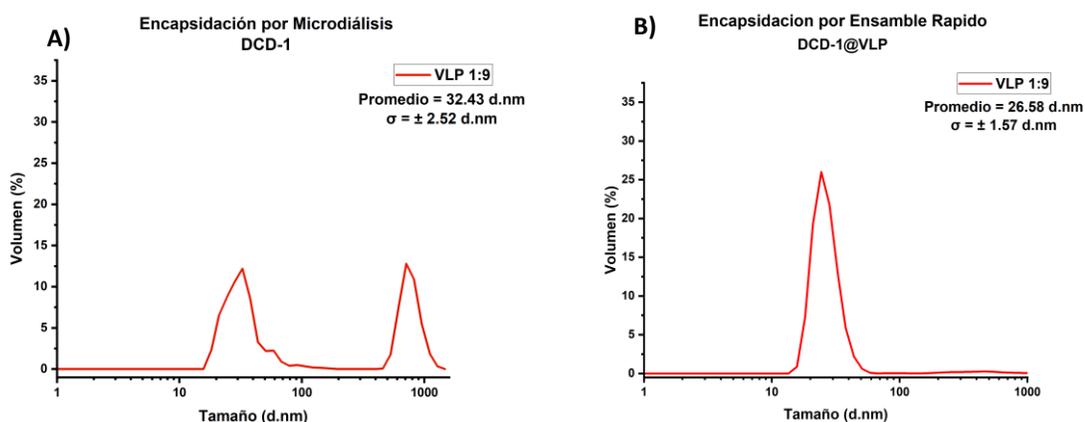


Figura 13. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1, usando una relación másica 1:9 (DCD-1:CP).

3.4.1.1.4 Relación de masa 1:12

Las muestras preparadas utilizando una razón de masa 1:12 presentaron distribuciones de diámetro por volumen muy parecidas a los tres casos anteriores. La muestra preparada por micro diálisis tuvo una distribución con partículas de diámetro de 29.18 ± 1.89 nm (91%), así como la presencia de agregados (Figura 14A). Las muestras preparadas por ensamble rápido tuvieron una distribución con partículas de diámetros de 28.13 ± 3 nm (96%), e igualmente se presentaron algunos agregados (Figura 14B).

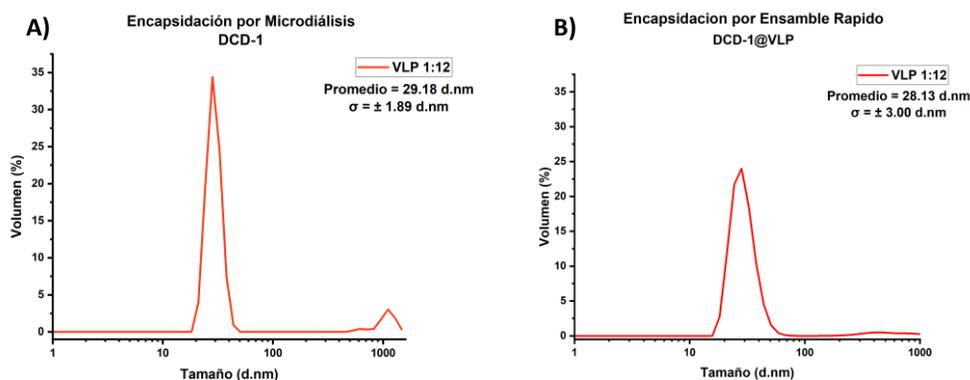


Figura 14. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1, usando una relación másica 1:12 (DCD-1:CP).

Se realizó una comparación del diámetro obtenido para las distintas razones de masa por ambas metodologías de encapsidación. Las partículas obtenidas presentan diámetros bastante similares entre sí. Las partículas obtenidas mediante micro diálisis tienen diámetros que se encuentran en el rango de 28 a 32 nm; por su parte, las partículas que fueron preparadas mediante ensamble rápido presentan diámetros entre los 23 y 28 nm (Figura 15).

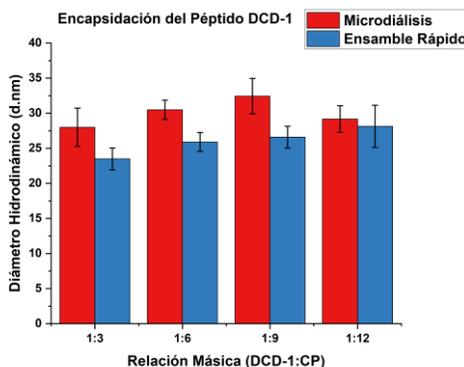


Figura 15. Comparación del diámetro hidrodinámico de partícula obtenido a distintas relaciones másicas (DCD-1:CP) para las muestras sintetizadas a metodología por micro diálisis y por ensamble rápido.

3.4.1.2 Microscopía electrónica de transmisión

3.4.1.2.1 Razón masa 1:3

La muestra a una razón masa 1:3 producida mediante ensamble rápido fue analizada por TEM (Figura 16A-B), de manera que se pudo analizar el tamaño y morfología de las partículas. Las VLPs presentaron tamaños dentro de un rango de 15-35 nm, con un tamaño promedio de partícula de 21.55 ± 4.41 nm (Figura 16C), lo cual es muy parecido a lo obtenido por DLS. Las VLPs presentaron una morfología esférica, con algunas malformaciones, e incluso se logran apreciar algunos agregados o partículas formadas por dos cápsides (Figura 16B).

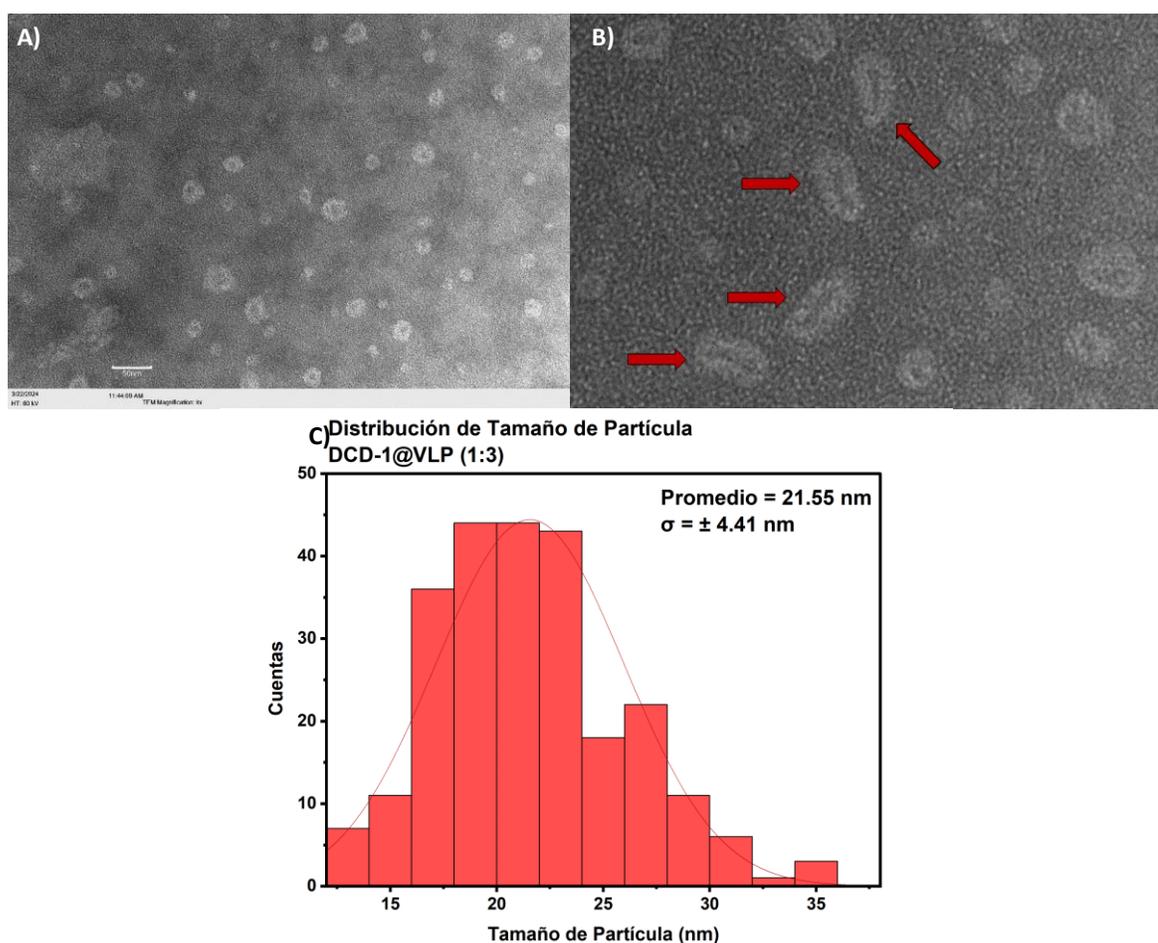


Figura 16. Micrografías de TEM obtenidas de las VLPs sintetizadas a una relación másica 1:3 (DCD-1:CP) mediante ensamble rápido. Magnificaciones a 100,000 aumentos (A) y 70,000 aumentos (B). Distribución de tamaño de partícula obtenido (C).

3.4.1.3 Comparación de la estabilidad de las partículas

Los diámetros de las VLPs obtenidas por microdialisis se hayan en un rango muy similar (25 – 35 nm); pero no todas tuvieron la misma estabilidad, siendo que la relación masa 1:3 y 1:12 mantuvieron un diámetro estable durante 14 días, lo cual indicaría que estas son estables. Las VLPs con relaciones másicas 1:6 y 1:9 mostraron una disminución en el diámetro (Figura 17A), lo que nos indicaría que hubo un cambio en la morfología de la partícula, generada por una inestabilidad en la estructura de la misma. Las partículas obtenidas mediante ensamble rápido, únicamente la relación masa 1:3 mantuvo un diámetro constante durante los 14 días. Las demás relaciones de masa presentaron una amplia variabilidad en los diámetros de partículas obtenidas, donde para las relaciones de masa 1:9 y 1:12, no se observaron partículas en nuestros rangos de tamaños de interés (15- 40 nm), lo cual estaría indicando que las partículas no son estables y se desensamblaron. La relación másica 1:6 presentó una amplia distribución de tamaños, lo cual nos indica un cambio significativo en la estructura de la cápside (Figura 17B).

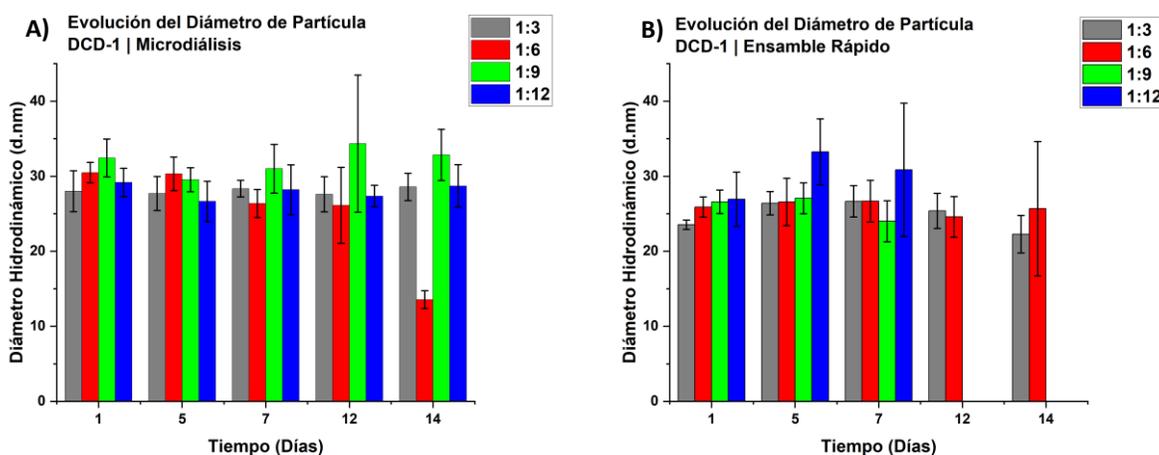


Figura 17. Evolución del diámetro de partícula durante 14 días, partículas sintetizadas por micro diálisis (A) y por ensamble rápido (B).

3.4.2 Encapsidación del péptido DCD-1L

3.4.2.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Inicialmente, las muestras eran recuperadas y analizadas mediante DLS sin llevar un tratamiento previo, pero dado que se notó la presencia de agregados, por lo que se añadió una centrifugación a 14,000 rpm por 3 horas a 4°C, para posteriormente recuperar el sobrenadante. En la figura 18 se presenta la

comparación de las muestras antes y después de centrifugar. Se puede apreciar que las muestras antes de ser centrifugadas presentan aglomerados (partículas >100 nm), lo cual indicaría la presencia de agregados de proteínas y péptido que no lograron formar cápsides (Figura 18A y 18C). Después de centrifugar las muestras se aprecia una reducción de los agregados y que las partículas con diámetros en el rango de 20-40 nm aumentaron en porcentaje de intensidad, lo que nos indicaría que la contribución respectiva de los aglomerados ha disminuido en gran medida, esto se podría traducir a que nuestras VLPs se encuentran libres de aglomerados (Figura 18B y 18D).

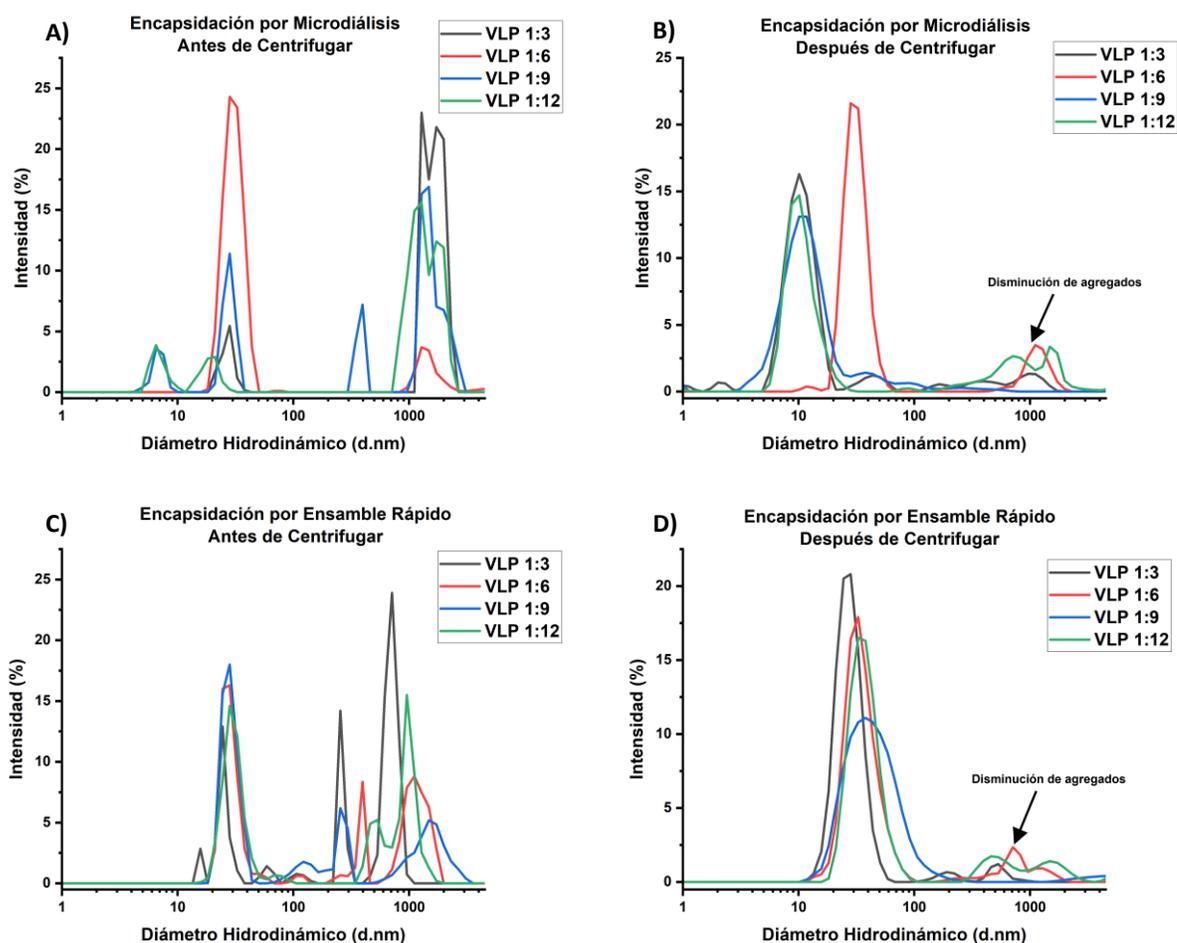


Figura 18. Distribución del diámetro hidrodinámico por intensidad de las muestras sintetizadas por micro diálisis antes (A) y después (B) de centrifugar, así como las muestras preparadas por ensamble rápido antes (C) y después de centrifugar (D) a 14,000 rpm por 3 horas.

3.4.2.1.1 Relación Másica 1:3

La síntesis por microdialisis únicamente presento partículas con un diámetro de 8.6 ± 0.74 nm, lo cual se asemeja más al diámetro obtenido para la CP libre (Figura 19A). Por su parte la metodología de

encapsidación rápida presento partículas con diámetro de 23.33 ± 1.37 nm, el cual es un lo que nos estaría indicando la posible formación de VLPs (Figura 19B).

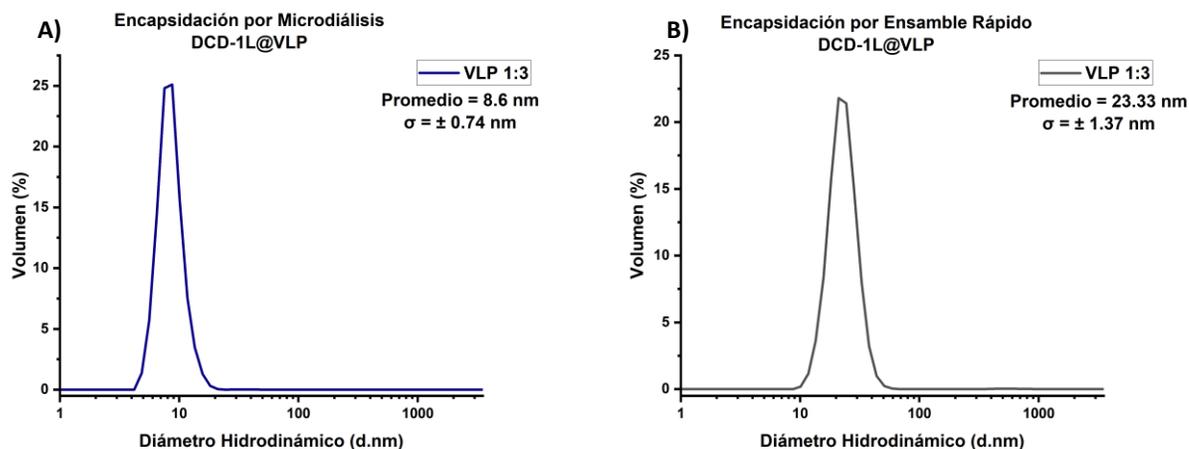


Figura 19. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1L, usando una relación másica 1:3 (DCD-1L:CP).

3.4.2.1.2 Relación Másica 1:6

La metodología de microdialisis mostro una distribución de tamaños bimodal, con partículas con un diámetro de 28.03 ± 1.61 nm, así como partículas con un diámetro de ~ 11 nm (Figura 20A). Las partículas obtenidas por ensamble rápido presentan un diámetro de 30.12 ± 3.27 nm (Figura 20B).

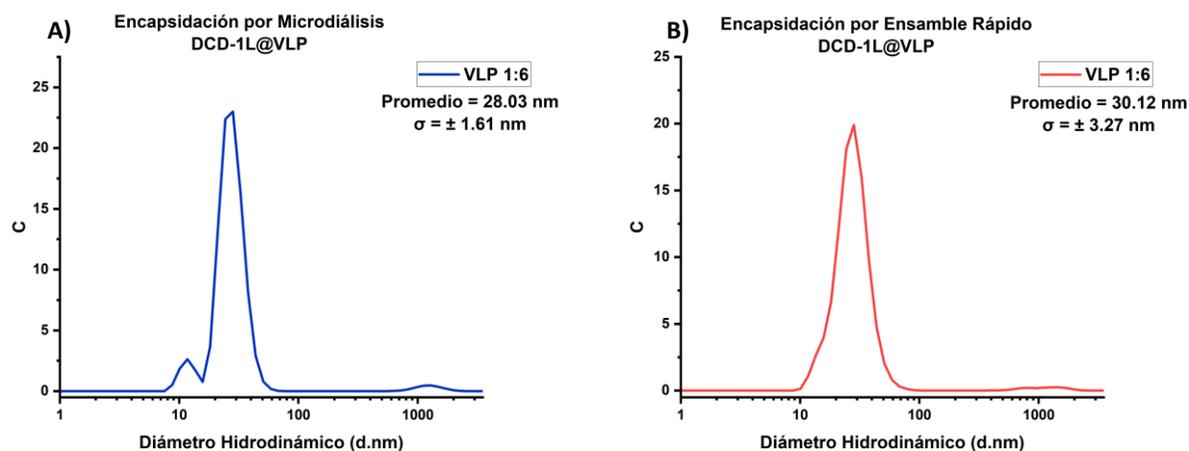


Figura 20. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1L, usando una relación másica 1:6 (DCD-1L:CP).

3.4.2.1.3 Relación Másica 1:9

La síntesis por microdiálisis presenta partículas con diámetros de 7.7 ± 1.89 nm, por lo que no hubo autoensamble de la cápside proteica (Figura 21A). Las partículas sintetizadas por ensamble rápido presentaron un diámetro de 31.55 ± 5.7 nm (Figura 21B).

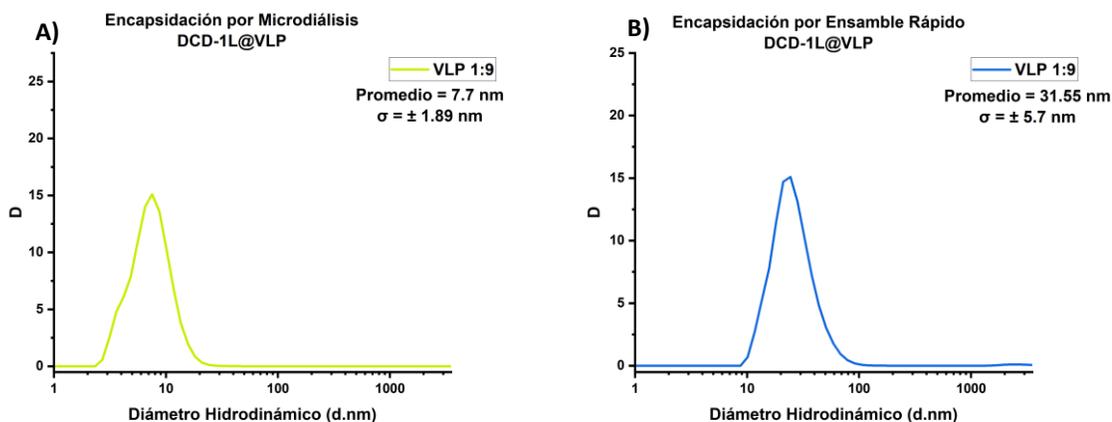


Figura 21. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1L, usando una relación másica 1:9 (DCD-1L:CP).

3.4.2.1.4 Relación Másica 1:12

La síntesis por microdiálisis presenta un diámetro de partícula de 8.91 ± 0.27 nm, lo que nos estaría (Figura 22A). La síntesis por ensamble rápido muestra un diámetro de partícula de 31.73 ± 4.03 nm lo que nos pudiera indicar la formación de VLPs (Figura 22B).

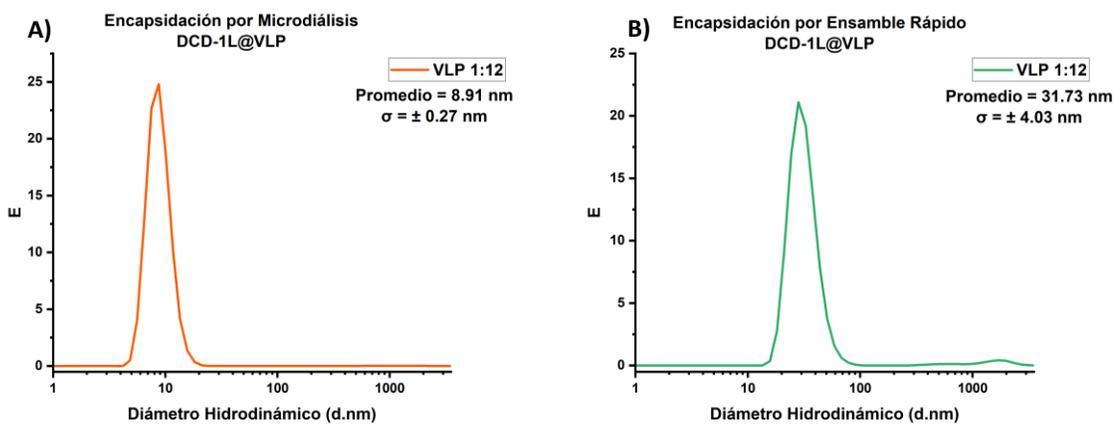


Figura 22. Distribución de tamaño por volumen de las VLPs ensambladas por A) micro diálisis y mediante B) encapsidación rápida, con el péptido DCD-1L, usando una relación másica 1:12 (DCD-1L:CP).

Si realizamos la comparación de los diámetros obtenidos en cada muestra a distintas relaciones másicas y sintetizadas por ambas metodologías: Micro diálisis y ensamble rápido podemos notar que las muestra que fueron preparadas usando la metodología de ensamble rápido, independientemente de la relación másica usada, presentan diámetros de partícula más homogéneos, y que se asemejan al diámetro del virus nativo (28 d.nm), mientras que las muestras que preparadas por micro diálisis, únicamente para la relación másica 1:6 podemos apreciar diámetros de partícula que se encuentran en el rango de tamaño para que podamos considerarlas como VLPs, o similar al del virus nativo y para las demás relaciones másicas (1:3, 1:9 y 1:12), únicamente tenemos partículas con diámetros de entre los 7-9, lo cual pudiéramos deberse a que la CP quedo libre al no lograr interactuar con el péptido y formar cápsides con estructuras similares a la del virus nativo (Figura 23).

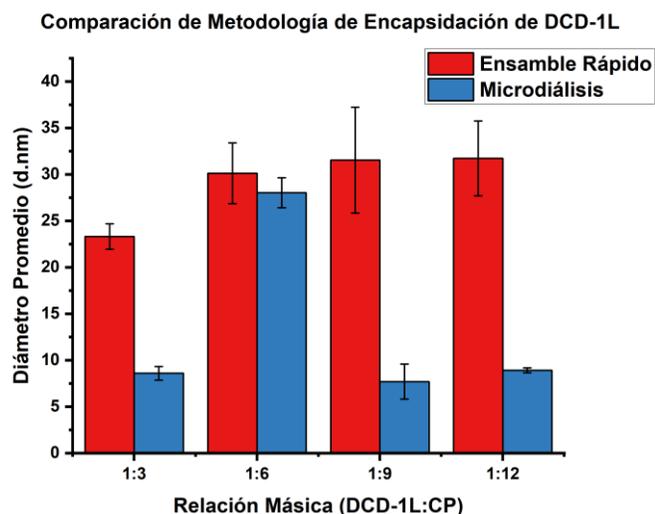


Figura 23. Comparación del diámetro hidrodinámico de las partículas a distintas relaciones másicas sintetizadas mediante micro diálisis y por ensamble rápido.

3.4.2.2 Microscopia Electronica de Transmisión

3.4.2.2.1 Relación Másica 1:3

Las partículas analizadas mediante TEM presentaron un tamaño promedio de 31.71 ± 6.85 nm (Figura 24B). Estas partículas poseen una morfología esférica homogénea, similar a la del virus nativo (Figura 24A).

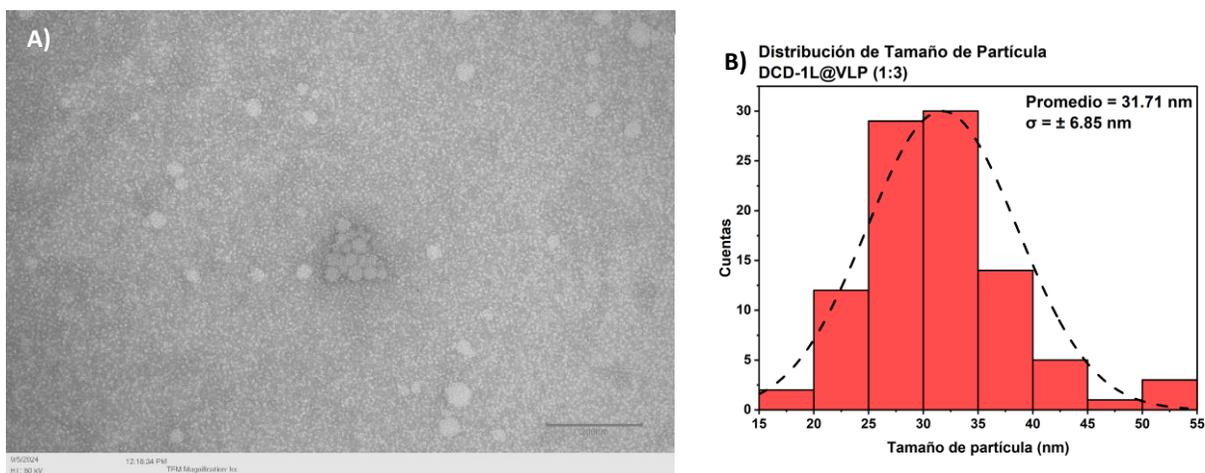


Figura 24. Micrografías de TEM obtenidas de las VLPs sintetizadas a una relación másica 1:3 (DCD-1L:CP) mediante ensamble rápido. Magnificaciones a 50,000 aumentos (A) y 25,000 aumentos (B). Distribución de tamaño de partícula obtenido (C).

3.4.2.2.2 Relación Másica 1:6

Se observaron partículas con un tamaño promedio de 41.35 ± 9.05 nm (Figura 25B). Las partículas sintetizadas presentaron una morfología esférica, similar a la del virus nativo, con una amplia distribución de tamaños, ya que se observó la presencia de partículas en un rango de tamaños entre los 20 a 60 nm de diámetro. Se logro apreciar las partículas dispersas de manera homogénea, sin la presencia de agregados o aglomerados. A su vez, estas VLPs lograron encapsidar al péptido DCD-1L y formar partículas bien formadas (Figura 25A).

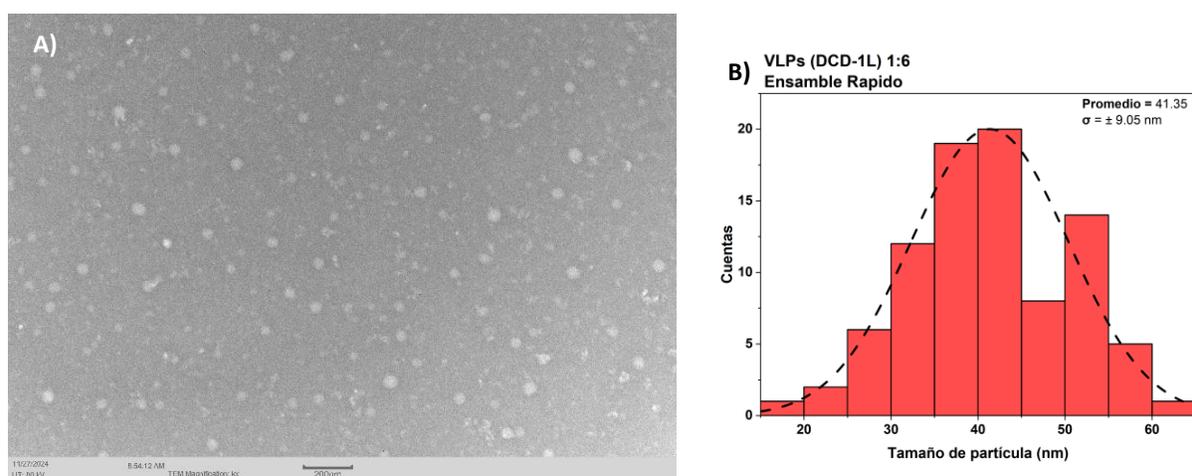


Figura 25. Micrografías de TEM obtenidas de las VLPs sintetizadas a una relación másica 1:6 (DCD-1L:CP) mediante ensamble rápido. Magnificación de 70,000 aumentos (A), y escala a 100 nm. Distribución de tamaño de partícula (B).

3.4.2.2.3 Relación Másica 1:9

La figura 26A muestra las partículas obtenidas, las cuales presentan una morfología esférica con rangos de tamaños entre los 25 a los 55 nm lo cual nos indica una amplia distribución de tamaños y un tamaño promedio de 38.01 ± 6.65 nm (Figura 26B).

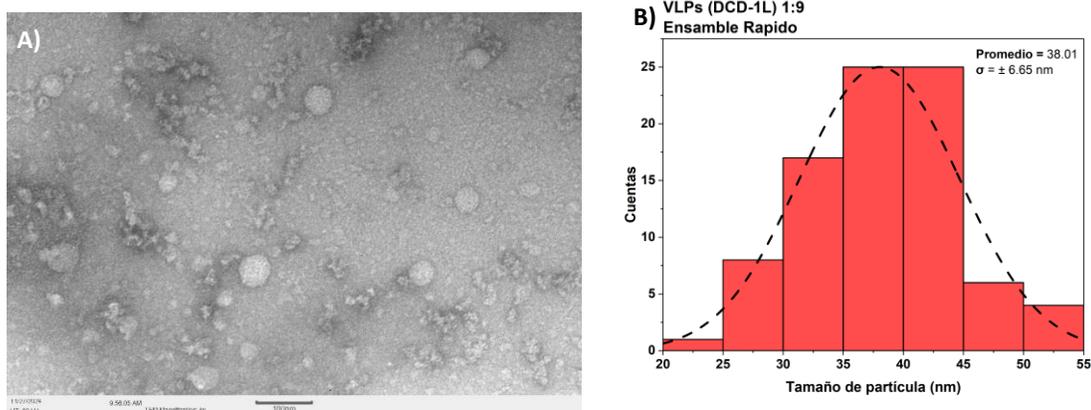


Figura 26. Micrografías de TEM obtenidas de las VLPs sintetizadas a una relación másica 1:9 (DCD-1L:CP) mediante ensamble rápido. Magnificación de 70,000 aumentos (A), y escala a 100 nm. Distribución de tamaño de partícula (B).

3.4.2.2.4 Relación Másica 1:12

Las partículas obtenidas presentan una morfología esférica similar a la del virus nativo (Figura 27A), con tamaños entre los 15 a los 40 nm, y un promedio de tamaño de 26.06 ± 5.77 nm (Figura 27B).

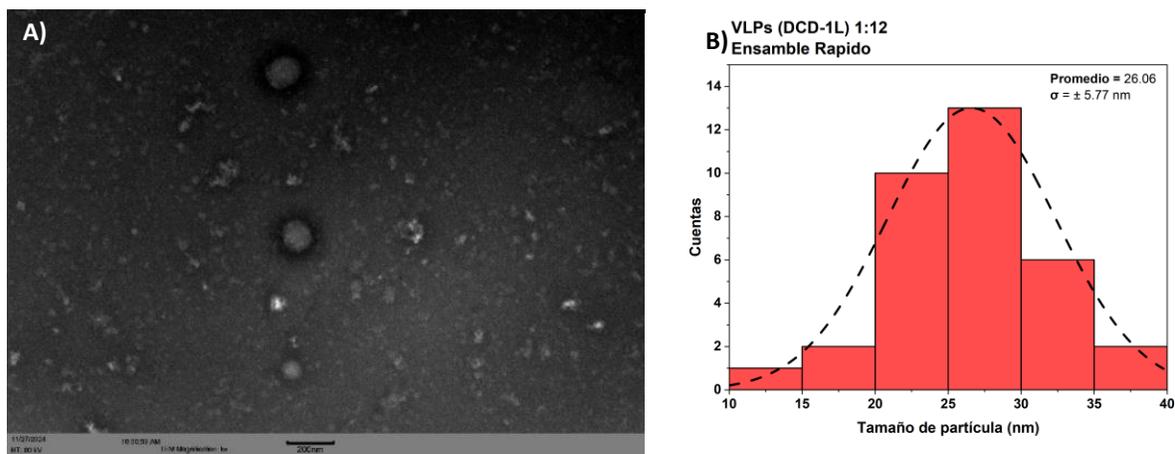


Figura 27. Micrografías de TEM obtenidas de las VLPs sintetizadas a una relación másica 1:12 (DCD-1L:CP) mediante ensamble rápido. Magnificación de 25,000 aumentos (A) y distribución de tamaño de partícula (B).

3.4.2.3 Evolución del diámetro hidrodinámico de las VLPs

Las partículas sintetizadas por microdialisis a relaciones másicas de 1:3, 1:9 y 1:12 presentaron un bajo porcentaje en volumen de VLPs, y las pocas partículas que se pudieron haber formado se desensamblaron tras varios días de incubación. La relación másica 1:6 fue la única que pudo formar VLPs, las cuales se mantuvieron durante los 14 días (Figura 28A). Las VLPs obtenidas por ensamble rápido mostraron una evolución en donde el diámetro de partícula fue aumentando para las cuatro relaciones másicas, en donde para el día 12 y 14 los diámetros presentaron amplias distribuciones (Figura 28B).

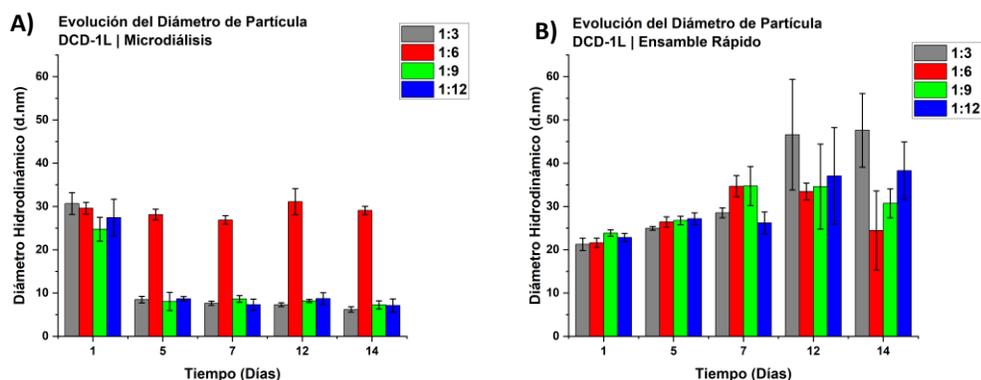


Figura 28. Evolución del diámetro de partícula durante 14 días, partículas sintetizadas mediante micro dialisis (A) y ensamble rápido (B).

3.5 Ensayos de actividad antimicrobiana

3.5.1 Actividad del péptido DCD-1

La actividad bactericida del péptido DCD-1 no pudo ser evaluada de manera precisa, ya que se disolvió en una solución compuesta por 2% $\text{NH}_3\cdot\text{OH}$, 18% ACN y 80% H_2O , la cual inhibió el crecimiento bacteriano.

3.5.2 Actividad del péptido DCD-1L

Se probó la actividad bactericida del péptido DCD-1L solo, sin embargo, se encontró que este tuvo un efecto contrario a lo reportado en la literatura (Paulmann et al., 2012; Schittek et al., 2001). Con respecto al control, se encontró un mayor número de colonias para los tratamientos con concentraciones de 10, 50

y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Específicamente, para *E. coli*, los tratamientos con concentraciones de 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentaron un 149%, 227% y 265% de colonias respectivamente, mientras que para *S. aureus* se encontraron 126%, 144% y 151% respectivamente (Figura 29).

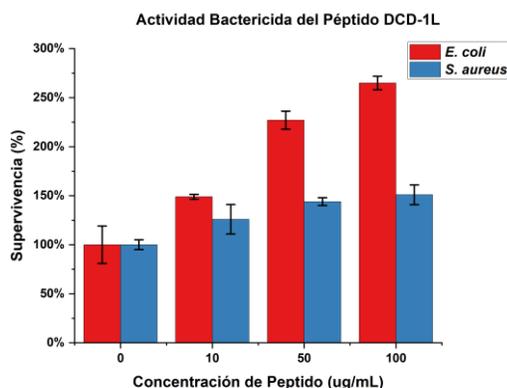


Figura 29. Supervivencia del péptido DCD-1L a distintas concentraciones contra *E. coli* (rojo) y *S. aureus* (azul).

3.5.3 Actividad de la VLP

Al realizar las pruebas con el péptido encapsidado, se utilizaron como comparación los componentes individuales de la VLP, es decir, péptido libre y CP. Similar a lo observado anteriormente, el péptido libre no redujo la supervivencia de las bacterias, si no que llevo a un sobrecrecimiento de estas. La proteína de BMV desensamblada mostró actividad bactericida, reduciendo la supervivencia de *E. coli* a un 61% y la de *S. aureus* a un 24%, con una concentración de CP del 33.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De forma similar, la VLP demostró un efecto antimicrobiano, con *E. coli* reduciendo la supervivencia a un 20%, mientras que para *S. aureus* la supervivencia se redujo a un 78% (Figura 30).

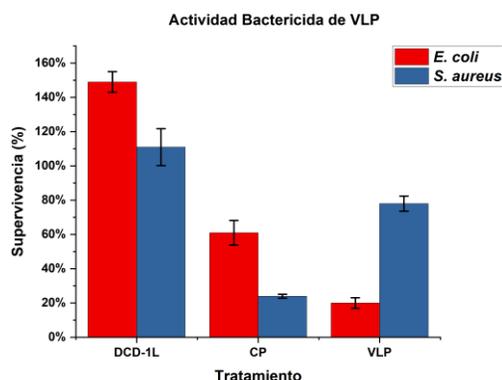


Figura 30. Supervivencia de *E. coli* (rojo) y *S. aureus* (azul) con los tratamientos de péptido libre, CP desensamblada y la VLP.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Producción y purificación de BMV

Con el fin de tener una producción constante de virus nativo, el cultivo de cebada se realizó durante todo el año, aun cuando las condiciones climáticas no eran las adecuadas para su cultivo. Durante épocas con climas fríos, que es cuando las condiciones , se realizó el cultivo en un huerto al aire libre. Por otra parte, en tiempos con temperaturas más cálidas, los cultivos se realizaron en la cámara de climatización artificial, manteniendo ciclos de “día-noche” que simularon las condiciones climatológicas más idóneas para el cultivo e infección de la cebada. El virus obtenido fue analizado mediante espectrometría UV-Vis. ambos métodos de cultivo nos permitieron tener una producción constante de virus, con rendimientos de hasta 2 mg de virus por gramo de hoja infectada. Los viriones fueron analizados mediante DLS, encontrando un diámetro hidrodinámico de 28.03 ± 3.48 nm, lo cual concuerda con lo reportado para BMV (Mieloch et al., 2018a; Nikolai et al., 2015).

El virus obtenido del cultivo e infección de la cebada fue analizado mediante espectrometría UV-Vis. Los valores de absorbancia a 260 y 280 nm, se asocian a la absorbancia del material genético del virus y de la proteína de cápside respectivamente. Mediante la ecuación de Lambert-Beer (Ecuación 1) se obtiene la concentración del virus en la muestra, en donde A_{260} es la absorbancia a 260 nm determinada por el espectrofotómetro, l es el camino óptico ($l=1$ cm), ϵ es el coeficiente de extinción molar asociado al virus nativo ($\epsilon = 23.69 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y PM el peso molecular del virión ($PM = 4.6 \times 10^6 \text{ g/mol}$).

$$C_{BMV} = \left(\frac{A_{260}}{l[\text{cm}] * \epsilon[\text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1}]} \right) (PM[\frac{\text{g}}{\text{mol}}]) = \frac{A_{260}}{5.15} [\frac{\text{mg}}{\text{mL}}] \quad (1)$$

Para determinar la pureza del virus se usó la razón $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ (Ecuación 2). La razón $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ debe de estar en el rango entre 1.5 y 1.7 para que el virus pueda ser considerado como puro y ser utilizado, en caso de no cumplirse, se deberá de purificar el virus.

$$P_{BMV} = \frac{A_{260}}{A_{280}} \quad (2)$$

El rendimiento obtenido durante la extracción de BMV fue de 2 mg de BMV por cada gramo de hoja infectada. Los viriones fueron analizados mediante DLS para analizar el diámetro hidrodinámico de estos, el cual fue de 28.03 ± 3.48 nm, lo cual concuerda con lo reportado para BMV (Mieloch et al., 2018a; Nikolai et al., 2015).

4.2 Desensamble de la proteína de cápside (CP)

El desensamble de la CP de BMV se realizó con éxito mediante la metodología descrita. Esto fue comprobado mediante DLS encontrando un diámetro hidrodinámico de 8 nm, lo cual indica la presencia de CP en forma su forma de dímeros (Strugała et al., 2021). Adicionalmente se logró cuantificar la concentración y pureza de la CP mediante espectrofotometría UV-Vis, obteniendo un rendimiento de 0.65 mg de CP por cada miligramo de virus nativo, así como una pureza de 1.5, indicando una pureza óptima para que se dé la interacción CP-Péptido y llevando a la formación de VLPs.

4.3 Caracterización de los péptidos antimicrobianos DCD-1 y DCD-1L

El péptido DCD-1 presentó un diámetro hidrodinámico de 3.4 ± 0.7 nm en solución. Los tamaños reportados están enfocados al péptido DCD-1L (48 aminoácidos) en su estructura de α -hélice completamente elongada, la cual adopta en presencia de membranas aniónicas (Nguyen et al., 2017; Song et al., 2013). Dado que el medio en el que se midió el diámetro hidrodinámico del péptido no hay presencia de estas membranas, se infiere que el péptido se encuentra en una estructura de random coil la cual es ligeramente más pequeña. Al analizar el potencial z del péptido en los medios utilizados para la encapsidación (buffer SAMA, pH 4.5 y 6), se corroboró que este mantiene una carga negativa (~ -1.7 mV) en este rango de pH. Estos valores son muy similares a los encontrados por (Burian & Schitteck, 2015) quienes reportaron una carga neta de -2 mV.

No fue posible obtener el potencial z del péptido DCD-1L ya que el reactivo adquirido fue limitado y se optó por utilizarlos para otros experimentos, sin embargo, basándonos en lo reportado en la literatura y la similitud en la secuencia de aminoácidos con respecto al péptido DCD-1, se asumió que la carga es similar al mismo. El diámetro encontrado mediante DLS muestra dos poblaciones con tamaños de 6.64 ± 2.27 nm y 2.24 ± 0.3 nm, lo cual nos indica que el péptido tomó estructuras random coil con distintas conformaciones. Esto se comprende mejor al analizar la estructura del péptido DCD-1L en solución

reportada en PDB (ID: 2KSG), en donde se presentaron 20 posibles conformaciones con tamaños desde 2.8 nm hasta 6.8 nm, lo cual pudiera explicar la variedad de tamaños obtenidas en el DLS (Jung et al., 2010).

4.4 Encapsidación de los péptidos DCD-1 y DCD-1L

4.4.1 Relación teórica de moléculas de proteína de cápside y péptidos DCD-1 y DCD-1L

Considerando una VLP con un número de triangulación $T=3$, es decir, la VLP está formada por 180 copias de la CP, formando con un diámetro de 28 nm, y un diámetro interno de 21 nm, podemos calcular el volumen disponible dentro de la cápside con la ecuación 5:

$$V_{VLP} = \frac{4}{3} \pi r_{VLP}^3 = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{21}{2}\right)^3 = 4,849.04 \text{ nm}^3 \quad (5)$$

Considerando los diámetros obtenidos mediante DLS para los péptidos DCD-1 y DCD-1L, podemos calcular el volumen que ocupa una molécula de cada péptido mediante la ecuación 6 y ecuación 7 respectivamente:

$$V_{DCD-1} = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d_{DCD-1}}{2}\right)^3 \quad (6)$$

$$V_{DCD-1L} = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d_{DCD-1L}}{2}\right)^3 \quad (7)$$

Para el péptido DCD-1 se tomará un diámetro de 3.4 nm (ecuación 8), el cual fue obtenido mediante DLS, mientras que para el péptido DCD-1L se tomará un promedio con base a la distribución de tamaños obtenidas por DLS, siendo esta de 4.44 nm (ecuación 9), por lo que las ecuaciones nos quedan de la siguiente manera:

$$V_{DCD-1} = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{3.4}{2}\right)^3 = 20.58 \text{ nm}^3 \quad (8)$$

$$V_{DCD-1L} = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{4.44}{2}\right)^3 = 45.83 \text{ nm}^3 \quad (9)$$

Considerando un modelo de esfera dura, de manera que solo se puede ocupar el 75% del volumen dentro de la cápside y que no hay interacciones entre las moléculas, podemos calcular el número de moléculas por cápside (ecuaciones 10 y 11):

$$N_{DCD-1} = \frac{\left(\frac{3}{4}\right)(V_{VLP})}{V_{DCD-1}} = 177 \text{ moléculas DCD} - 1 \quad (10)$$

$$N_{DCD-1L} = \frac{\left(\frac{3}{4}\right)(V_{VLP})}{V_{DCD-1L}} = 79 \text{ moléculas DCD} - 1L \quad (11)$$

Donde N_{DCD-1} es el número de moléculas del péptido DCD-1 que se encapsidan dentro de la VLP, y N_{DCD-1L} el número de moléculas del péptido DCD-1L que logran ser encapsidadas. De esta manera se puede apreciar que las VLPs con un diámetro de ~ 28 nm y una $T=3$, son capaces de encapsidar 177 moléculas del péptido DCD-1, mientras que para el péptido DCD-1L, esta partícula es capaz de encapsidar 79 moléculas.

Estos cálculos nos permitieron tener una idea sobre el número de moléculas que se encuentran disponibles para interactuar mediante interacciones electroestáticas con el extremo N-terminal de la proteína de cápside. Conforme se incrementa la razón de masa en orden ascendente (1:3, 1:6, 1:9 y 1:12), disminuyen el número de moléculas de péptido disponibles en el medio, lo cual disminuye la posibilidad de interacción entre la CP y el péptido. También se calculó el número de moléculas que caben dentro de una VLP con un considerando un diámetro de 28 nm y un número de triangulación $T=3$, siendo que para el caso del péptido DCD-1 la partícula puede alojar hasta 177 moléculas del péptido, y para el caso del péptido DCD-1L este número se reduce un poco más de la mitad, con la capacidad de encapsular 79 moléculas de péptido por partícula.

4.4.2 Encapsidación del péptido DCD-1

En este proyecto se trabajaron dos metodologías de encapsidación distintas: micro diálisis y ensamble rápido. El ensamble rápido presentó un par de ventajas frente a la micro diálisis ya que representa una disminución de hasta un 80% en el tiempo que tarda el proceso de encapsidación, así como una reducción de hasta un 98% en el volumen de buffers necesario.

Al trabajar con el péptido DCD-1 no se contaba con mucha información sobre sus características fisicoquímicas, ya que la mayor parte de la información encontrada en la literatura esta más enfocada al péptido DCD-1L. Incluso, es común encontrar casos en los que se habla de estos como si sus características y propiedades fueran iguales. Dada la poca información encontrada sobre este péptido y siendo que estos son casi idénticos en secuencia, no se tenía certeza de que pudiera ser encapsidado, sin embargo, al caracterizarlo por DLS se encontró que cumplía con los requisitos en cuanto a tamaño y carga superficial para poder interactuar con la proteína de cápside y formar una cápside con una estructura similar a la del virus nativo.

Al trabajar con las distintas relaciones de masa (1:3, 1:6, 1:9 y 1:12), observamos que mediante ambas metodologías se logró obtener partículas con diámetros de 22 a 32 nm, el cual es un tamaño muy similar al del virus nativo. No se observaron diferencias significativas en cuanto a los diámetros de partícula al variar tanto las relaciones de masa, ni entre las diferentes metodologías de encapsidación.

Los análisis de estabilidad temporal de las VLPs ensambladas por micro diálisis mostraron que las partículas ensambladas a una relación 1:3 presentaron un diámetro alrededor de los 28 nm durante los 14 días de incubación (Figura 31A, anexo A), lo cual nos indica que estas partículas mantienen su estructura estable sin la aparición de agregados los cuales opaquen la presencia de las VLPs. La relación 1:6 mantuvo un diámetro de partícula estable, de alrededor de 28nm, hasta el día 12 de su análisis (Figura 31B, anexo A), sin embargo, las mediciones realizadas para el día 14 mostraron un diámetro de partícula de ~7nm lo que sugiere que las VLPs se desensamblaron. La relación 1:9 presentó un diámetro de partícula de ~32 nm, no obstante, para los días 12 y 14 de su análisis aumentó en gran medida la distribución de tamaños de partícula (Figura 31C, anexo A). Finalmente, la relación 1:12 mantuvo un diámetro de partícula de ~28 nm durante los 14 días de su análisis, sin embargo, el porcentaje en volumen que representan estas partículas disminuyó hasta en un 50% (Figura 31D, anexo A).

Los resultados antes descritos muestran que las VLPs ensambladas utilizando las relaciones 1:6, 1:9 y 1:12 no son estables, por lo que tienden a desensamblarse con el tiempo. Esto lo vemos con la disminución de porcentaje en volumen que representan las VLPs y la aparición de agregados. Las partículas a una relación másica 1:3 fueron las que mantuvieron un diámetro estable durante los días que fueron analizadas, por lo que esta relación mostró ser la que logró formar partículas que con una mayor estabilidad.

Las partículas sintetizadas mediante ensamble rápido a relaciones másicas 1:3, 1:6, 1:9 y 1:12 presentaron diámetros en el rango de los 22 a 27 nm, los cuales son valores ligeramente más pequeños que las VLPs

obtenidas mediante micro diálisis, así como los del virus nativo, sin embargo, de igual manera se encuentran en un rango aceptable para VLPs. Las partículas tipo virus obtenidas mediante ensamble rápido a una relación másica 1:3 presentaron un diámetro de ~ 25 nm el cual se mantuvo constante durante los 14 días de su incubación. Así mismo, estas partículas representaron más del 80% del porcentaje en volumen (Figura 32A, anexo A), por lo que podemos interpretar como que estas partículas se mantuvieron estables durante este tiempo. Las partículas a una relación másica 1:6 presentaron un diámetro de ~ 28 nm hasta el día 12 de su análisis; esto se vio acompañado con un descenso del porcentaje en volumen que representan las partículas, desde un máximo de un 98% para el día 7, hasta un mínimo del 25% para el día 14 (Figura 32B). Estos resultados indican que la partícula formada a esta relación másica, no es estable después de 14 días. Para la razón de masa 1:9 y 1:12 se pudieron apreciar partículas con diámetros de 25 y 28 nm respectivamente. Estos valores se pudieron apreciar hasta el día 7 de incubación, así mismo, estas partículas presentaron un elevado porcentaje en volumen de más del 80% en ambos casos (Figura 32C y 32D, anexo A). Para los días posteriores, no se observaron partículas en el rango de interés; únicamente se apreciaron aglomerados (>100 nm), por lo que las partículas formadas a esta razón de masa se desestabilizaron después del día 7 de incubación y las VLPs se desensamblaron por completo, quedando únicamente agregados de los componentes proteicos.

Con la información obtenida se determinó la relación 1:3 como ideal para encapsidar el péptido DCD-1, ya que estas VLPs fueron las que se mantuvieron estables durante un mayor periodo y en donde no hubo cambios significativos en cuanto al diámetro de las partículas independientemente del método de síntesis. Se optó por continuar trabajando con la metodología de encapsidación por ensamble rápido dadas las ventajas que representa frente a la metodología de micro diálisis.

Una problemática recurrente en este proyecto fue el obtener micrografías de TEM de las partículas, por lo que únicamente se logró obtener micrografías de buena calidad para las VLPs sintetizadas a una relación másica 1:3 mediante ensamble rápido. En este respecto, fue posible corroborar la formación de las VLPs las cuales presentaron una morfología esférica similar a la del virus nativo (Figura 16A). No obstante, estas partículas presentaron una amplia distribución de tamaños que varió entre los 15 y 35 nm (Figura 16C). Algunas de estas partículas parecen formar cápside elongadas o con una forma similar a un ovalo (Figura 16B), sin embargo, con las imágenes obtenidas no fue posible determinar si estas son simples agregados de VLPs o si fue posible la formación de una VLP con dos cápsides incompletas, por lo que se necesita de un análisis más exhaustivo para determinar la veracidad de estas formaciones ovoides.

4.4.3 Encapsidación del péptido DCD-1L

Se logró la encapsidación del péptido DCD-1L en VLPs a partir de la proteína de cápside de BMV. Esto se observó para las 4 razones de masa evaluadas por las dos metodologías. Para las partículas ensambladas mediante micro diálisis únicamente se observó la presencia de VLPs a la relación molar 1:6; para las relaciones 1:3, 1:9 y 1:12 únicamente se presenciaron partículas con un diámetro de ~7 nm lo cual pudiera indicar que la formación de las partículas no se logró, o que estas se desensamblaron tras la purificación (Figura 33A, 33C y 33D, anexo B). Una explicación sobre el por qué no se dio la formación de VLPs por micro diálisis para las relaciones 1:3, 1:9 y 1:12, es que el péptido DCD-1L tiene un peso molecular de 4.8 kDa (según especificaciones del fabricante) y las membranas utilizadas para las diálisis fueron de 14 kDa, por lo que el péptido se pudo salir de la membrana antes de interactuar con la proteína de cápside. Por su parte, la relación 1:6 si logró formar VLPs dado que esta relación puede ser la ideal para que se dé la interacción entre el péptido y la CP. Otra problemática que surgió en este proyecto fue la incapacidad de concentrar y filtrar las VLPs por lo que se propuso el uso de centrifugación con filtros Amicon con membrana de 100 kDa (Sigma Aldrich). Desafortunadamente al realizar este procedimiento no se observaron partículas mediante DLS, por lo que se propusieron algunas teorías sobre lo que pasa con las partículas durante el proceso de filtración. Con base a lo anterior, se propuso el precipitar los agregados proteicos y de péptido que quedaron libres durante la encapsidación mediante una centrifugación a 14,000 rpm durante 3 horas. Al analizar el porcentaje en volumen de las partículas antes y después de la centrifugación notamos una gran disminución de la presencia de agregados, lo cual nos indica que estos fueron eliminados de manera exitosa, por lo que únicamente quedan VLPs en el medio y alguna proteína o péptido libre.

Dado que las partículas ensambladas por micro diálisis a las relaciones 1:3, 1:9 y 1:12 no presentaron partículas con diámetros similares al del virus nativo tras su purificación mediante centrifugación, sus análisis de estabilidad temporal únicamente mostraron partículas con un diámetro de ~7 nm, es decir, únicamente quedó la CP libre que no logró interactuar con el péptido. La relación 1:6 presentó un diámetro de partícula de 26 a 32 nm, manteniendo un porcentaje en volumen de más del 70% (Figura 33B, anexo B), lo cual nos indica que estas partículas se mantuvieron estables durante el tiempo que fueron analizadas y su ritmo de desensamble fue bastante lento.

Las partículas sintetizadas mediante ensamble rápido para las distintas relaciones molares mostraron un diámetro de entre 20 y 34 nm por DLS, lo cual nos pudiera indicar la presencia de VLPs. Para los días 12 y 14 de su análisis de estabilidad temporal, se observó un aumento en la distribución del diámetro de las

partículas (Figura 34). Las distintas razones de masa presentaron una evolución de las VLPs formadas, apreciándose con un ligero incremento en el diámetro de partícula. Las VLPs a una relación másica 1:3 tuvieron un rango de diámetro de partícula de 21 – 28 nm; la relación másica 1:6 un rango de 21 – 34 nm y la relación másica 1:9 un rango de 23-34 nm. Asimismo, estas partículas mantuvieron un porcentaje en volumen elevado (Figura 34A, 34B y 34C, anexo B), lo cual nos indicaría que estas partículas mantuvieron una morfología estable durante el tiempo que fueron analizadas. La relación másica 1:12 también presentó una evolución en el diámetro de partícula con diámetros de 22-28 nm, pero con un porcentaje en volumen menor que para los tres casos mencionados anteriormente (Figura 34D, anexo B), lo cual pudiéramos entender como que estas partículas no fueron tan estables como los casos anteriores.

Las partículas fueron analizadas mediante TEM en las cuales se pudo observar que estas se encontraban llenas y con una morfología y tamaños muy similares a las del virus nativo. Para las cuatro relaciones de masa que fueron evaluadas mediante ensamble rápido se obtuvieron partículas con rangos entre los 15 y los 60 nm de diámetro y un tamaño promedio de 31.71 ± 6.85 nm, 41.35 ± 9.05 , 38.01 ± 6.65 y 26.06 ± 5.77 nm para las relaciones de masa 1:3, 1:6, 1:9 y 1:12 respectivamente, por lo que se pudo corroborar la síntesis exitosa de estas VLPs utilizando distintas relaciones de masa.

De las partículas encapsuladas por micro diálisis, únicamente la relación másica 1:6 logró formar una VLP estable la cual se mantuviera estable durante el proceso de purificación y que se mantuviera durante días posteriores. Para el caso de los ensambles rápidos, las partículas se formaron en las cuatro razones de masa usadas, también se percibió una evolución de las partículas mediante un cambio en su diámetro. Para los últimos días de su análisis de estabilidad temporal, estas presentaron una amplia distribución de tamaños.

4.5 Relación teórica de moléculas de proteína de cápside y péptidos DCD-1 y DCD-1L

El cálculo de las moléculas de CP y de péptidos por ensamble para cada relación másica nos permitió tener una idea sobre el número de moléculas que se encuentran disponibles para interactuar mediante interacciones electroestáticas con el extremo N-terminal de la proteína de cápside. Conforme se incrementa la relación másica en orden 1:3, 1:6, 1:9 y 1:12, disminuyen el número de moléculas de péptido en el medio, lo cual a su vez pudiera disminuir la probabilidad de que se den estas interacciones entre la CP y el péptido. También se calculó el número de moléculas que caben dentro de una VLP con un diámetro

de 28 nm (T=3), siendo que para el caso del péptido DCD-1 la partícula puede alojar hasta 177 moléculas del péptido, y para el caso del péptido DCD-1L este número se reduce un poco más de la mitad, con la capacidad de encapsular 79 moléculas de péptido por partícula.

4.6 Ensayos de actividad antimicrobiana

4.6.1 Actividad bactericida del péptido DCD-1

La imposibilidad de evaluar con la actividad bactericida del péptido DCD-1 se debió a la interferencia de la solución utilizada para su disolución (2% $\text{NH}_3 \cdot \text{OH}$, 18% ACN, 80% H_2O), la cual presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano. Este resultado sugiere que los componentes de la solución podrían afectar la viabilidad microbiana, ya sea alterando la integridad de la membrana celular o modificando las condiciones del medio de cultivo. Para futuras evaluaciones de la actividad antimicrobiana del péptido DCD-1, sería recomendable explorar solventes alternativos o estrategias de dilución que minimicen la interferencia en los ensayos biológicos.

4.6.2 Actividad bactericida del péptido DCD-1L

Se probaron distintas concentraciones del péptido DCD-1L contra *E. coli* y *S. aureus* con la finalidad de determinar la CMI, sin embargo, el péptido no presentó actividad bactericida, por el contrario, ocasionó un aumento en el número de colonias bacterianas. Adicionalmente se observó que conforme aumenta la concentración de péptido también aumenta el número de colonias bacterianas, siendo este efecto más evidente para *S. aureus* que para *E. coli*. Esto contrasta con lo reportado en la literatura, donde se menciona una mortalidad del 100% (Schitteck et al., 2001).

4.6.3 Actividad de la VLP

Los ensayos de actividad de la VLP mostraron una reducción en la supervivencia, cosa que también se observó con la CP desensamblada en *E. coli* y *S. aureus*. La actividad de la CP o del BMV no se ha reportado previamente, por lo que este trabajo presenta el primer reporte de la actividad bactericida de la CP. Esta actividad se puede explicar debido a la naturaleza anfipática de la CP, ya que similar al péptido DCD-1L, la

CP cuenta con una región aniónica y otra catiónica (Mieloch et al., 2018b), esta última le pudiera permitir interactuar con la membrana bacteriana mediante interacciones electroestáticas.

En *E. coli* se observa que, si bien la CP por sí sola logró disminuir la supervivencia, la VLP aumento este efecto, lo cual pudiera indicar un posible efecto de sinergia entre la CP y el péptido. Por su parte, para *S. aureus* la CP fue la que tuvo una mayor reducción en la supervivencia, ya que se observa que esta se redujo cuando se probó la VLP. Esta reducción en la actividad de la VLP se pudiera deber a las diferencias estructurales que poseen *S. aureus* contra *E. coli*, siendo que *S. aureus* presenta una pared celular con mayor grosor, de manera que esto pudiera influir en una menor formación de poros en la membrana celular.

Capítulo 5. Conclusiones

Se logró la purificación del virus nativo del BMV a partir del cultivo e infección de cebada (*Hordeum vulgare*), logrando una eficiencia de producción de 2 mg de virus nativo por cada gramo de hoja infectada.

La caracterización de los péptidos antimicrobianos DCD-1 y DCD-1L nos permitió conocer sus propiedades como diámetro hidrodinámico y potencial z, lo que nos permitió proponerlos como candidatos para su encapsidación en VLPs utilizando la proteína de cápside de BMV.

Ambos péptidos antimicrobianos pueden ser encapsulados en VLPs mediante las metodologías de micro diálisis y ensamble rápido. La formación de las VLPs se logró confirmar mediante DLS y TEM. Las VLPs obtenidas mostraron un diámetro similar al del virus nativo, en el cual la relación másica 1:3 mostró la formación de partículas con una mayor estabilidad frente a la demás razón de masa. Por otra parte, la relación 1:6 fue la que mostró la formación de partículas con mayor estabilidad para la encapsidación del péptido DCD-1L.

No se encontró actividad bactericida con el péptido DCD-1L. De acuerdo con lo reportado en la literatura, la concentración mínima inhibitoria es de 1 µg/mL (CMI) para *E. coli* y *S. aureus*, sin embargo, para las concentraciones que se evaluaron (1 a 100 µg/mL), no se observó una disminución en el número de colonias en comparación con su control, si no que para los distintos tratamientos se observó un mayor crecimiento proporcional a la concentración de péptido.

El péptido DCD-1L no presentó actividad antimicrobiana por sí solo; al ser encapsulado en las VLPs se observó una disminución en la supervivencia de ambas bacterias (*E. coli* y *S. aureus*).

La CP presentó un efecto bactericida el cual no ha sido reportado previamente. Este efecto fue mayor contra *S. aureus*, pero de igual manera tuvo una actividad bactericida contra ambas bacterias.

Literatura citada

- Balke, I., & Zeltins, A. (2020). Recent Advances in the Use of Plant Virus-Like Particles as Vaccines. *Viruses*, 12(3), 270. <https://doi.org/10.3390/V12030270>
- Becucci, L., Valensin, D., Innocenti, M., & Guidelli, R. (2014). Dermcidin, an anionic antimicrobial peptide: Influence of lipid charge, pH and Zn²⁺ on its interaction with a biomimetic membrane. *Soft Matter*, 10(4), 616–626. <https://doi.org/10.1039/c3sm52400k>
- Bowler, P. G., Duerden, B. I., & Armstrong, D. G. (2001). Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 244. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.244-269.2001>
- Burian, M., & Schittek, B. (2015). The secrets of dermcidin action. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(2), 283–286. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2014.12.012>
- Cadena-Nava, R. D., (2014). Partículas tipo virus y su potencial aplicación en bionanotecnología. *Mundo nano*. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología, 7(13), 48-55. Epub 11 de junio de 2021. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-56912014000200048&lng=es&tlng=e
- Cadena-Nava, R. D., Comas-García, M., Garmann, R. F., Rao, A. L. N., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2012). Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio. *Journal of Virology*, 86(6), 3318–3326. <https://doi.org/10.1128/jvi.06566-11>
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2024). *About Antimicrobial Resistance*. Antimicrobial Resistance. Recuperado 7 de enero de 2025, de https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/about/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html
- Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. (2024). *About Pneumococcal Disease*. Pneumococcal Disease. Recuperado 7 de enero de 2025, de <https://www.cdc.gov/pneumococcal/about/index.html>
- Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. (2025). *Tuberculosis (TB)*. Recuperado 9 de enero de 2025, de <https://www.cdc.gov/tb/causes/index.html>
- Comité Internacional de Taxonomía de Virus. (2023). *Master Species Lists (MSL)*. Recuperado 7 de marzo de 2023, de <https://ictv.global/msl>
- Deusenbery, C., Wang, Y., & Shukla, A. (2021). Recent Innovations in Bacterial Infection Detection and Treatment. *ACS Infectious Diseases*, 7(4), 695–720 <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.0c00890>
- Doron, S., & Gorbach, S. L. (2008). Bacterial Infections: Overview. *International Encyclopedia of Public Health*, 273–282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012373960-5.00596-7>
- Felman, A. (2023, diciembre 18). *What to know about antibiotics?* Recuperado 4 de febrero de 2024, de <https://www.medicalnewstoday.com/articles/10278>

- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9(10), 577–589. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews. Microbiology*, 13(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO3432>
- Henkel, J. S., Baldwin, M. R., & Barbieri, J. T. (2010). Toxins from Bacteria. *EXS*, 100, 1–29. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8338-1_1
- Izadpanah, A., & Gallo, R. L. (2005). Antimicrobial peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(3), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.08.026>
- Jung, H., Yang, S., & Kim, J. (2010). *Solution structure of dermcidin-1L, a human antibiotic peptide*. <https://doi.org/10.2210/PDB2KSG/PDB>
- LaRock, C. N., & Nizet, V. (2015). Cationic Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Streptococcal Pathogens. *Biochimica et biophysica acta*, 1848(11), 3047–3054. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2015.02.010>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2012.01.005>
- Mahlapuu, M., Björn, C., & Ekblom, J. (2020). Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(7), 978–992. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1796576>
- Mieloch, A. A., Kręćisz, M., Rybka, J. D., Strugała, A., Krupiński, M., Urbanowicz, A., Kozak, M., Skalski, B., Figlerowicz, M., & Giersig, M. (2018a). The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core. *AIP Advances*, 8(3), 35005. <https://doi.org/10.1063/1.5011138>
- Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2020). Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(5), 311–332. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nguyen, V. S., Tan, K. W., Ramesh, K., Chew, F. T., & Mok, Y. K. (2017). Structural basis for the bacterial membrane insertion of dermcidin peptide, DCD-1L. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13600-z>
- Nikolai, N., Ekaterina, T., Evgeniy, E., Mikhail, K., Joseph, A., & Olga, K. (2015). Comparative Study of Non-Enveloped Icosahedral Viruses Size. *PLOS ONE*, 10(11), e0142415. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0142415>

- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Antimicrobial resistance*. Recuperado 17 de noviembre de 2023, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Organización Mundial de la Salud. (2023). *Meningitis*. Recuperado 4 de octubre de 2024, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/meningitis>
- Organización Mundial de la Salud. (2024). *WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024*. Recuperado 4 de octubre de 2024, de <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
- Guilfoile, P., & Alcamo, I. E. (2007b). *Antibiotic-resistant bacteria*. Chelsea House Pub.
- Paulmann, M., Arnold, T., Linke, D., Özdirekcan, S., Kopp, A., Gutschmann, T., Kalbacher, H., Wanke, I., Schuenemann, V. J., Habeck, M., Bürck, J., Ulrich, A. S., & Schitteck, B. (2012). Structure-activity analysis of the dermcidin-derived peptide DCD-1L, an anionic antimicrobial peptide present in human sweat. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8434–8443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.332270>
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. (2023). *Bracing for superbugs: strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance*. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Recuperado 3 de febrero de 2025, de <https://www.unep.org/resources/superbugs/environmental-action>
- Puca, V., Marulli, R. Z., Grande, R., Vitale, I., Niro, A., Molinaro, G., Prezioso, S., Muraro, R., & Di Giovanni, P. (2021). Microbial species isolated from infected wounds and antimicrobial resistance analysis: Data emerging from a three-years retrospective study. *Antibiotics*, 10(10), 1162. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101162>
- Ramachandran, G. (2013). Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: A brief review. *Virulence*, 5(1), 213. <https://doi.org/10.4161/viru.27024>
- Rieg, S., Steffen, H., Seeber, S., Humeny, A., Kalbacher, H., Dietz, K., Garbe, C., & Schitteck, B. (2005). Deficiency of Dermcidin-Derived Antimicrobial Peptides in Sweat of Patients with Atopic Dermatitis Correlates with an Impaired Innate Defense of Human Skin In Vivo. *The Journal of Immunology*, 174(12), 8003–8010. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.174.12.8003>
- Rohovie, M. J., Nagasawa, M., Swartz, J. R., & James Swartz, C. R. (2017). Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. *Bioengineering & Translational Medicine*, 2(1), 43–57. <https://doi.org/10.1002/BTM2.10049>
- Sattar, S. B. A., Nguyen, A. D., & Sharma, S. (2024). Bacterial Pneumonia. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 7(8), 942–945. https://doi.org/10.5005/jp/books/10485_24
- Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., & Garbe, C. (2001). Dermcidin: A novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology*, 2(12), 1133–1137. <https://doi.org/10.1038/ni732>
- Song, C., Weichbrodt, C., Salnikov, E. S., Dynowski, M., Forsberg, B. O., Bechinger, B., Steinem, C., De Groot, B. L., Zachariae, U., & Zeth, K. (2013). Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), 4586–4591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214739110>

- Strugała, A., Jagielski, J., Kamel, K., Nowaczyk, G., Radom, M., Figlerowicz, M., & Urbanowicz, A. (2021). Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22(6), 3098. <https://doi.org/10.3390/IJMS22063098>
- Universidad de Queensland. (2025). *Institute For Molecular Bioscience - University Of Queensland*. Recuperado 6 de enero de 2025, de <https://imb.uq.edu.au/common-bacterial-diseases>
- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*, 361, 36–44. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277–283. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4378521/>
- Viralzone. (2023). Bromoviridae ~ ViralZone. Recuperado 3 de febrero de 2023, de <https://viralzone.expasy.org/31>
- Wang, G., Narayana, J. L., Mishra, B., Zhang, Y., Wang, F., Wang, C., Zarena, D., Lushnikova, T., & Wang, X. (2019). Design of antimicrobial peptides: Progress made with human cathelicidin LL-37. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1117, 215–240. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_12
- Zeltins, A. (2012). Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Molecular Biotechnology*, 53(1), 92–107. <https://doi.org/10.1007/S12033-012-9598-4>
- Zhang, L. J., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>

Anexos

Anexo A

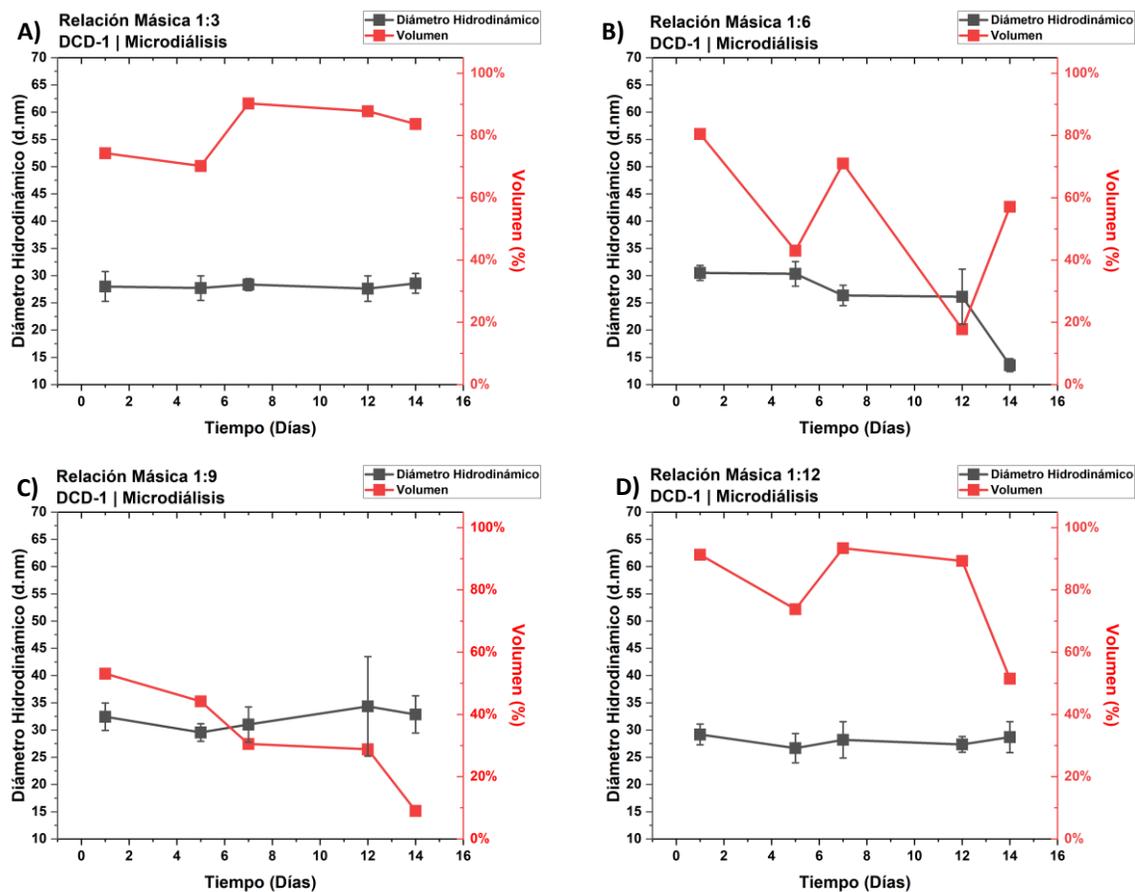


Figura 31. Evolución de las partículas obtenidas mediante microdiálisis con el péptido DCD-1, así como el porcentaje en volumen que representan las VLPs a distintas relaciones másicas 1:3 (A), 1:6 (B), 1:9 (C) y 1:12 (D).

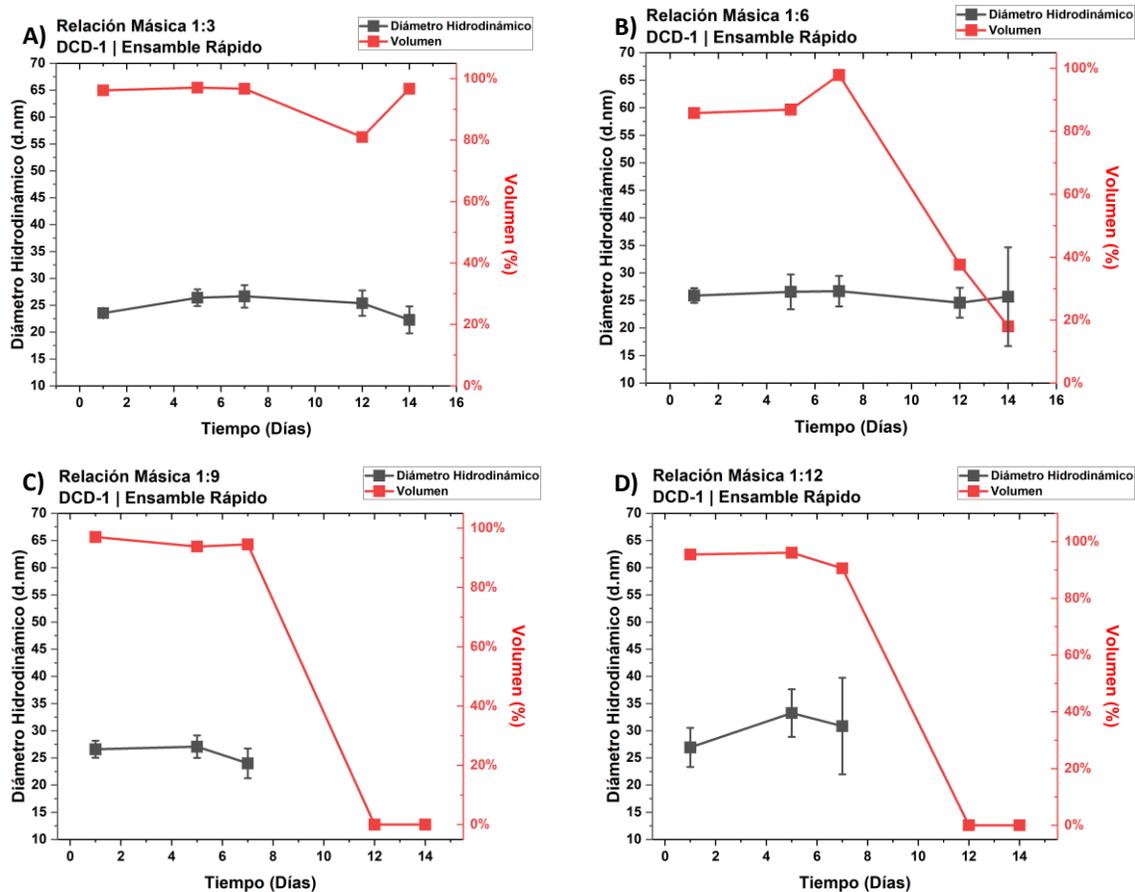


Figura 32. Evolución de las partículas obtenidas mediante ensamble rápido con el péptido DCD-1, así como el porcentaje en volumen que representan las VLPs a distintas relaciones másicas 1:3 (A), 1:6 (B), 1:9 (C) y 1:12 (D).

Anexo B

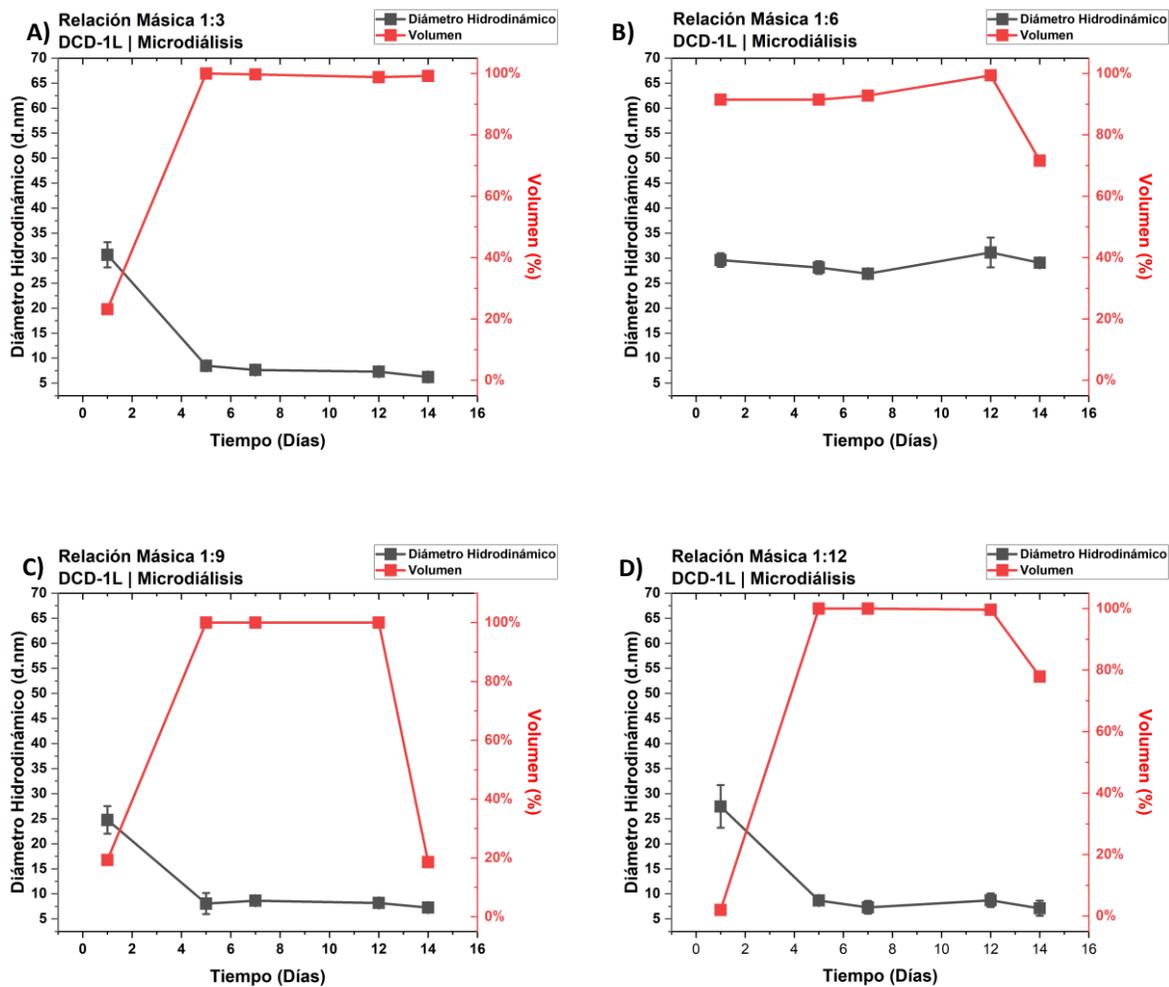


Figura 33. Evolución de las partículas obtenidas mediante microdiálisis con el péptido DCD-1L, así como el porcentaje en volumen que representan las VLPs a distintas relaciones másicas 1:3 (A), 1:6 (B), 1:9 (C) y 1:12 (D).

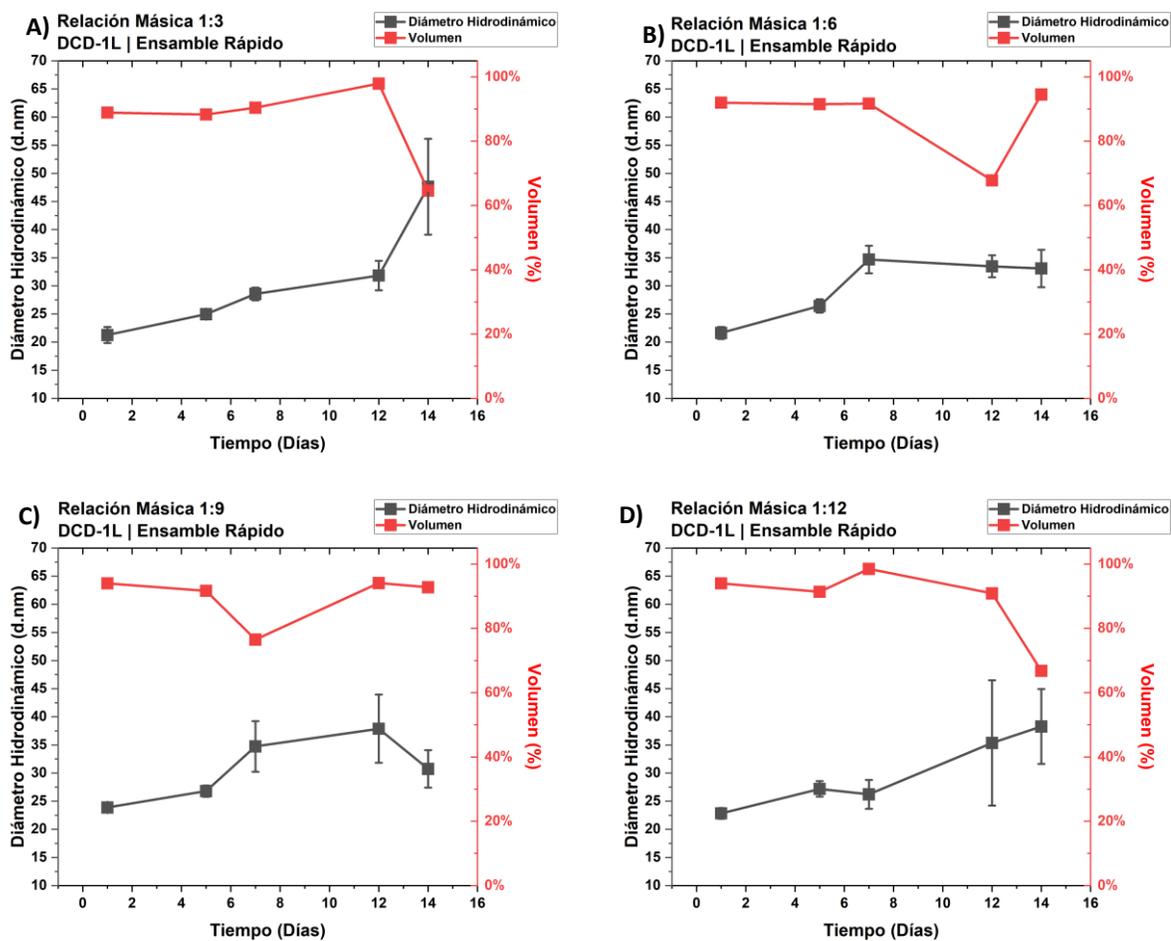


Figura 34. Evolución de las partículas obtenidas mediante ensamble rápido con el péptido DCD-1, así como el porcentaje en volumen que representan las VLPs a distintas relaciones másicas 1:3 (A), 1:6 (B), 1:9 (C) y 1:12 (D).