



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**CENTRO DE NANOCIENCIAS Y
NANOTENCNOLOGÍA**

**DESARROLLO DE UN SISTEMA ANTIMICROBIANO
NOVEDOSO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

KENDRA RAMIREZ ACOSTA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RUBÉN D. CADENA NAVA
2017**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

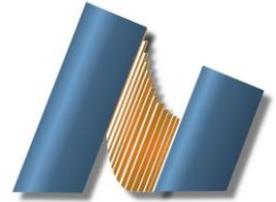
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA
BIONANOTECNOLOGÍA

DESARROLLO DE UN SISTEMA ANTIMICROBIANO NOVEDOSO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
KENDRA RAMIREZ ACOSTA

DIRECTOR DE TESIS
DR. RUBÉN D. CADENA NAVA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA AGOSTO 2017

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Kendra Ramirez Acosta

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la preparación académica que me brindó durante los últimos cuatro años.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología, por su cálida recepción en sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Rubén D. Cadena Nava por su paciencia y dedicación orientándome a lo largo de este proyecto. Gracias por la confianza que depositó en mí.

A la Dra. Katrin Quester por su orientación y apoyo en todo momento en los laboratorios del departamento de bionanotecnología.

Al técnico Francisco Ruíz Medina por su asistencia en la caracterización de las partículas utilizadas en este proyecto.

A los miembros de mi comité de tesis: Dr. Alejandro Huerta Saquero, Dr. José Manuel Romo Herrera, Dr. Eduardo Murillo Bracamontes y Dra. Ana G. Rodríguez.

A los integrantes del departamento de bionanotecnología por sus consejos y aliento.

A mis compañeros de generación, sobre todo Iván y Eduardo, quienes nos embarcamos en esta travesía juntos.

A mi familia y amigos, cuyo apoyo incondicional me motivó siempre a seguir adelante incluso en momentos de angustia.

GRACIAS

Tabla de Contenido

Capítulo 1. Introducción	5
Capítulo 2. Antecedentes	7
2.1 Bacterias resistentes a antibióticos	7
2.2 Péptidos antimicrobianos	11
2.3 El péptido LL-37	13
2.4 Sinergia de LL-37	15
2.5 Nanovehículos virales	17
2.6 El virus BMV	19
Capítulo 3. Hipótesis	21
Capítulo 4. Objetivos	22
4.1 Objetivo General	22
4.2 Objetivos particulares	22
Capítulo 5. Materiales y Método	23
5.1 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana	23
5.2 Funcionalización de BMV con antibióticos	23
5.2.1 Funcionalización directa mediante reacción de carbodiimida	23
5.3 Funcionalización del péptido LL-37 con PEG	24
Capítulo 6. Resultados y Discusión	25
6.1 Funcionalización de BMV con antibióticos	25
6.2 Funcionalización del BMV con antibióticos pegilados	26
6.3 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana	27
6.4 Variación de la concentración de péptido en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana	32
6.5 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana con antibióticos pegilados	35
6.6 Variación de la concentración de péptido en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana con antibióticos pegilados	38
6.7 Ensayo de susceptibilidad con BMV funcionalizado con Kanamicina y Aztreonam	41
6.8 Tratamiento en Escherichia coli	44
6.9 Susceptibilidad antimicrobiana a 0, 6 y 24 horas de tratamiento	46
Capítulo 7. Conclusiones	48
Capítulo 7. Referencias	49

Lista de figuras

Figura 1. Descripción de la adquisición de resistencia hacia antibióticos.

Figura 2. Estructura del péptido LL-37.

Figura 3. Eficacia de muerte celular de una cepa clínica de *S. aureus* para LL-37,4 lactoferricina-B y otros antibióticos convencionales (cefazolina y doxiciclina).

Figura 4. Mortalidad de *S. aureus* para una concentración 100 μ M de cefazolina, clindamicina y LL-37.

Figura 5. Efecto sinérgico de HBDs, LL-37 y lisozimas contra *S. aureus*.

Figura 6. Aplicaciones de péptidos tipo CPP para el envío dirigido de otros péptidos y proteínas.

Figura 7. Micrografía del BMV tomada mediante microscopía de transmisión, TEM.

Figura 8. Funcionalización de BMV con 100, 500 y 1000 moléculas de ampicilina.

Figura 9. Funcionalización del BMV con aztreonam y aztreonam pegilado, micrografía obtenida mediante TEM.

Figura 10. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C.

Figura 11. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C.

Figura 12. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C.

Figura 13. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C.

Figura 14. Conteo de UFC de *S. aureus* para los tratamientos descritos en la Tabla 10.

Figura 15. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C.

Figura 16. Imágenes representativas de crecimiento de *E. coli* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C.

Figura 17. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C.

Lista de tablas

- Tabla 1.** Principales clases, blancos y mecanismos de resistencia de antibióticos.
- Tabla 2.** Lista de la OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos.
- Tabla 3.** Características y situación actual de las partículas tipo virus.
- Tabla 4.** Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.
- Tabla 5.** Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y supervivencia por ensayo.
- Tabla 6.** Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.
- Tabla 7.** Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y supervivencia por ensayo.
- Tabla 8.** Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.
- Tabla 9.** Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y supervivencia por ensayo.
- Tabla 10.** Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.
- Tabla 11.** Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana en *S. aureus* y *E. coli*.
- Tabla 12.** Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y supervivencia por ensayo.
- Tabla 13.** Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y supervivencia por ensayo.
- Tabla 14.** Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

Capítulo 1. Introducción

El desarrollo de antibióticos en las últimas tres décadas, aunado al éxito comercial de la industria farmacéutica ha provocado un sentimiento de seguridad ante la amenaza de las enfermedades infecciosas. La subestimación del potencial que los microorganismos poseen para generar resistencia ante la gama de antibióticos disponibles representa uno de los mayores peligros para la salud ya que incita al uso inadecuado y desinformado de esta clase de fármacos. Se reporta que, de los 960 millones de dólares gastados anualmente en el consumo de antibióticos en México, aproximadamente el 40% son utilizados inadecuadamente, principalmente con la finalidad de prevenir enfermedades infecciosas. Sin embargo, el consumo de antibióticos como profilaxis es una de las principales causas de la generación de resistencia antimicrobiana. [1]

Recientemente, los péptidos antimicrobianos catiónicos, constituidos por cadenas cortas de aminoácidos, han surgido como una posible alternativa para combatir a las enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos resistentes. Éstos son producidos por el sistema inmune innato tanto de vertebrados como de invertebrados como una primera línea de defensa contra las infecciones microbianas.[2] Su mecanismo de acción se diferencia de los antibióticos convencionales ya que usualmente son más efectivos que ellos al interactuar con la membrana celular bacteriana mediante fuerzas electrostáticas, penetrando con facilidad al interior del organismo.

Debido a que los péptidos presentan altos costos de producción, se ha propuesto utilizarlos en conjunto con otros agentes antimicrobianos con el fin de disminuir la dosis mínima inhibitoria y letal, tal que los costos se mantengan similares o menores a los actuales costos de producción de antibióticos.

Los virus son los nanovehículos más eficientes en la naturaleza y a partir de estos podemos construir partículas tipo virus (VLPs) que pueden ser idénticas al virus nativo del cual provienen.

A partir de los puntos anteriores, en el presente trabajo se pretende desarrollar un sistema antimicrobiano a partir de la funcionalización de la superficie de la cápside del bromovirus de planta, BMV, con antibióticos convencionales y el péptido LL-37 tal que el sistema sea capaz de evadir los mecanismos de resistencia de las bacterias resistentes a estos antibióticos.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 *Bacterias resistentes a antibióticos*

La resistencia a antibióticos es un proceso natural. Durante siglos, los microorganismos han enfrentado compuestos de los cuales derivamos los antibióticos que se utilizan actualmente. El conocimiento de la relación entre enfermedad e infecciones llevó al descubrimiento e implementación de las vacunas, uno de los hitos de la ciencia cuya utilidad para el ser humano permanece a lo largo del tiempo. Sin embargo, era claro que el desarrollo de resistencia representaría el fin de su utilidad. [3]

El uso indiscriminado de la penicilina, primer antibiótico descubierto en la historia por Alexander Fleming, conllevó a una pronta observación de la producción de la penicilinas, enzima capaz de inactivar a la penicilina, por estafilococos, microorganismos anteriormente sensibles a este antibiótico. A partir de ello, la industria farmacéutica comenzó a producir paralelamente otros antibióticos para combatir cepas bacterianas resistentes a la penicilinas, útiles para atacar diferentes microorganismos tales como bacterias y hongos. [4] Empero, se dio inicio a una carrera donde la producción de nuevas moléculas antimicrobianas es alcanzada por la diseminación de un mecanismo de resistencia en un periodo de tiempo cada vez más corto.

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos, CDC por sus siglas en inglés, define a la resistencia antimicrobiana como “la capacidad que un microorganismo posee para resistir los efectos de un antibiótico”. [1] Así mismo, los microorganismos resistentes pueden ser clasificados en tres categorías de acuerdo con su resistencia:

1. Microorganismos multirresistentes (MDR): Son aquellos resistentes a más de un agente antimicrobiano.
2. Microorganismos extensivamente resistentes (XDR): Las bacterias de esta categoría son resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos aprobados para su consumo.
3. Microorganismos pan-resistentes (PDR): Se refiere a aquellos organismos resistentes a todos los agentes antimicrobianos de uso comercial.²



Figura 1. Descripción de la adquisición de resistencia hacia antibióticos, imagen tomada de la referencia [2].

Los microorganismos son capaces de adquirir resistencia por un número de mecanismos distintos, entre los cuales resaltan la autoprescripción de fármacos antimicrobianos, el consumo de dosis inadecuadas de antibióticos y el suministro excesivo de antibióticos a los animales de granja. En cada caso, el agente antimicrobiano consumido interactúa con los microorganismos presentes, donde aquellos que son sensibles mueren. Sin embargo, esto incluye a los microorganismos de la flora benéfica que viven simbióticamente en nuestro cuerpo, por lo que las bacterias resistentes son ahora capaces de reproducirse y

transmitir su resistencia a otros microorganismos por lo que, al administrar nuevamente el tratamiento, éste no tendrá efecto (Figura 1).

Tabla 1. Principales clases, blancos y mecanismos de resistencia de antibióticos. [1]

Blanco/Clase estructural	Antibiótico	Resistencia
Pared celular		
β-lactámicos	Penicilina	
	Cefalosporina	β-lactamasas, mutantes de
	Carbapemenes	PBP
	Monobactámico	
Desorganizadores de membrana		
Polipéptidos	Polimixina	Sustitución por D-Ala-D-Lac o
	Vancomicina	D-Ala-D-Ser
Síntesis de proteínas		
Aminoglucósido	Estreptomicina	Modificación del antibiótico
	Kanamicina	
Rifamicina	Rifampicina	
Nitroimidazol	Metronidazol	
Oxazolidinona	Linezolid	Desconocido
Tetraciclina	Tetraciclina	Eflujo
Cloranfenicol	Cloranfenicol	
Macrólidos	Eritromicina	Metilación RNAr/bombas de eflujo
Inhibidores competitivos de la síntesis de ácido fólico		
Sulfonamidas	Cotrimoxazol	Otros
Síntesis de ADN		
Fluoroquinolonas		Mutaciones en la DNA girasa

En la Tabla 1, se muestran distintos grupos de antibióticos de acuerdo a su estructura y algunos de los mecanismos de resistencia conocidos.

En febrero del presente año, la Organización Mundial de la Salud, OMS, publicó una lista (Tabla 2) donde se muestran las 12 familias de bacterias que requieren atención inmediata por su grado de resistencia, buscando promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para combatir las enfermedades infecciosas provocadas por estos microorganismos.

Tabla 2. Lista de la OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos. [3]	
Prioridad 1: Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a los carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente a los carbapenémicos
	Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL.
Prioridad 2: Elevada	<i>Enterococcus faecium</i> , resistente a la vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i> , resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i> , resistente a la claritromicina
	<i>Campylobacter</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas
	<i>Salmonellae</i> , resistentes a las fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas
Prioridad 3: Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , sin sensibilidad a la penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i> , resistente a la ampicilina
	<i>Shigella</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas

Ante el creciente número de bacterias resistentes, la OMS ha ofrecido asistencia a países para la elaboración de planes de acción para evitar una epidemia así como el refuerzo de sistemas de salud y vigilancia, tal que sea

posible prevenir la aparición de más microorganismos resistentes. A pesar de ello, también exhorta al desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos capaces de combatir aquellos organismos resistentes, por lo que el sector científico se ha dedicado al estudio de posibles alternativas como lo son los péptidos antimicrobianos y el desarrollo de nanopartículas antimicrobianas.

2.2 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son una familia de oligopéptidos con una longitud usualmente menor a 200 residuos aminoacídicos. En animales, estos péptidos son usualmente encontrados en tejidos y órganos expuestos a patógenos transmitidos por el aire y se consideran la primera línea de defensa del sistema inmune innato contra virus, bacterias y hongos. [5] La mayoría de los péptidos de esta especie son catiónicos, con una carga entre +2 y +9, con una proporción usualmente mayor al 30% de residuos hidrofóbicos. En este trabajo de investigación se utilizó el péptido LL-37.

Los mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos son múltiples. Pueden interactuar con la membrana celular, inhibir la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos. A continuación, se describen brevemente los mecanismos más comúnmente observados en esta clase de péptidos.

Interacciones con la membrana

Su carga positiva genera atracción electrostática hacia las superficies aniónicas de la membrana plasmática. Posteriormente, generan áreas de inestabilidad en la membrana externa, lo cual permite su translocación. [5]

Mecanismo de barril

Los péptidos se reorientan de forma lateral tal que sus cadenas hidrofóbicas encaran el centro hidrofóbico de la membrana, creando un poro hidrofílico que provoca una pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana. [5]

Mecanismo forma anular

Los péptidos se unen a la membrana tal que los lípidos se doblen formando un canal delimitado por la cabeza de los grupos lipídicos asociados a los péptidos que forman un canal mixto. [5]

Mecanismo de alfombra

Los péptidos permanecen asociados con la cara externa y forman una especie de alfombra capaz de debilitar la membrana y causar un colapso en una configuración del micelio produciendo la muerte celular por pérdida del citoplasma. [5]

Mecanismo de agregado

De manera similar a los detergentes, el péptido se une a la membrana, a una concentración suficiente, se reorienta, lo que permite la formación de estructuras parecidas a los micelios que se extienden en la bicapa en un complejo péptido lipídico. Estos agregados forman un canal por el cual se liberan iones, causando la muerte celular por pérdida del contenido citoplasmático, o pueden desintegrarse espontáneamente, translocándose hacia el citoplasma donde pueden afectar blancos de acción interna. [5]

Interacciones con el ADN y proteínas relacionadas

Algunos péptidos se unen al ADN mediante motivos de unión relacionados con las histonas. Así mismo pueden unirse a enzimas relacionadas como la topoisomerasa I y la ARN polimerasa, inhibiendo el crecimiento bacteriano mediante la interacción con los ácidos nucleicos. [5]

Alteración de la síntesis y plegamiento de proteínas

Otros péptidos son capaces de alterar la síntesis proteica al interrumpir la incorporación de histidinas y alterar las enzimas involucradas en la síntesis proteica. [5]

Funciones inmunomoduladoras

Algunos fragmentos de los péptidos antimicrobianos exhiben mecanismos inmunomoduladores como controlar la expresión de genes en monocitos y células epiteliales, como quimiotáctico sobre las células del sistema inmune, en la inducción de citosinas y diferenciación celular, promoviendo la angiogénesis, curación de heridas y la resolución de infecciones. [5]

2.3 El péptido LL-37

Entre los candidatos potenciales, se ha estudiado al péptido LL-37 (Figura 2), de la familia de las catelicidinas. Éste péptido se encuentra presente en la mayoría de los seres vertebrados, posee una carga neta de +6 y es de carácter anfifílico. Se compone por una secuencia 37 aminoácidos (LLGDF₅ FRKSK₁₀ EKIGK₁₅ EFKRI₂₀ VQRIK₂₅ DFLRN₃₀ LVPRT₃₅ ES), encabezada por dos residuos de leucina.

El péptido LL-37 muestra actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que es potenciada cuando el péptido se encuentra bajo condiciones donde es propenso a formar α -hélices.

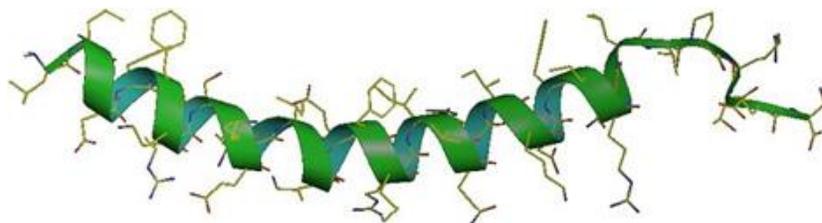


Figura 2. Estructura y secuencia del péptido LL-37, imagen tomada de la referencia [6].

Utiliza su dominio catiónico para enlazarse con la membrana bacteriana y posteriormente utiliza sus residuos hidrofóbicos para facilitar su penetración a través de la bicapa fosfolipídica, facilitando la muerte bacteriana. Ya que la alteración de la composición lipídica de la membrana celular bacteriana podría

alterar su viabilidad, es poco probable que se observen cambios en la membrana plasmática por lo que los péptidos antimicrobianos pueden conservar su efectividad contra las bacterias.

Este péptido es capaz de penetrar la membrana celular bacteriana e interferir en procesos celulares, provocando la muerte del microorganismo. De igual manera, el trabajo de Noore y colaboradores demuestra que dicho péptido requiere de una dosis significativamente menor para obtener un efecto de inhibición similar al de los antibióticos disponibles actualmente. [7]

En la Figura 3 se comparan los porcentajes de muerte celular bacteriana para distintas concentraciones de LL-37, lactoferrina-B, cefazolina y doxiciclina:

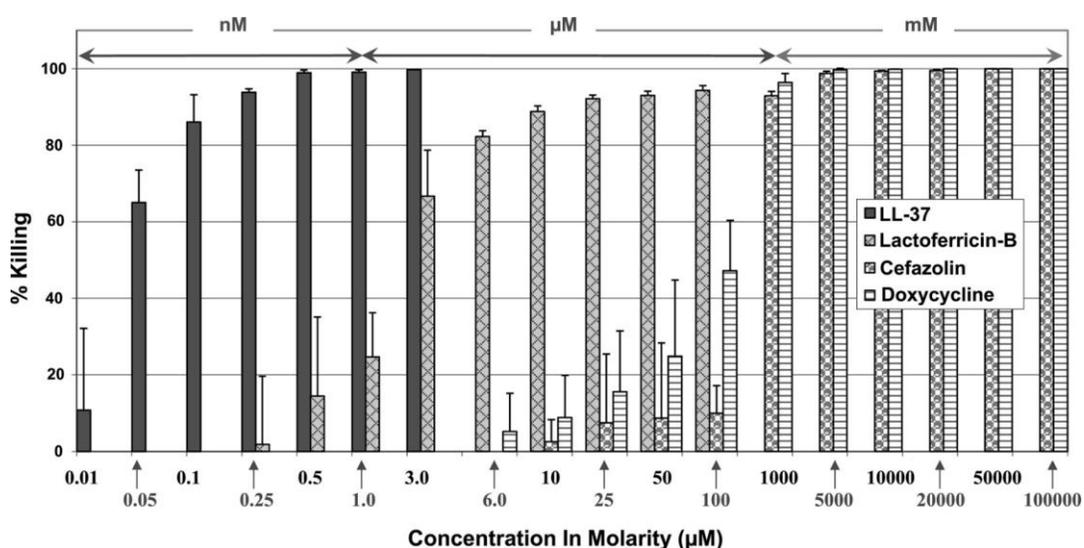


Figura 3. Eficacia de muerte celular de una cepa clínica de *S. aureus* para LL-37, lactoferrina-B y otros antibióticos convencionales (cefazolina y doxiciclina). Imagen tomada de la referencia [7].

Se puede observar que a concentraciones nanomolares de péptido, se obtiene una mortalidad de *S. aureus* superior al 50%, mientras que para lactoferrina-B dicho efecto es observado a concentraciones micromolares y, finalmente, se requieren concentraciones milimolares de antibióticos convencionales para obtener una mortalidad similar. Esto indica claramente que la dosis de péptido puede ser sencillamente disminuida en dos o tres órdenes de magnitud a

comparación de la dosis usualmente administrada para antibióticos convencionales para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Como parte del mismo trabajo, se analizó la mortalidad de *S. aureus* a una concentración idéntica de cefazolina, clindamicina y LL-37, mostrado en la Figura 4.

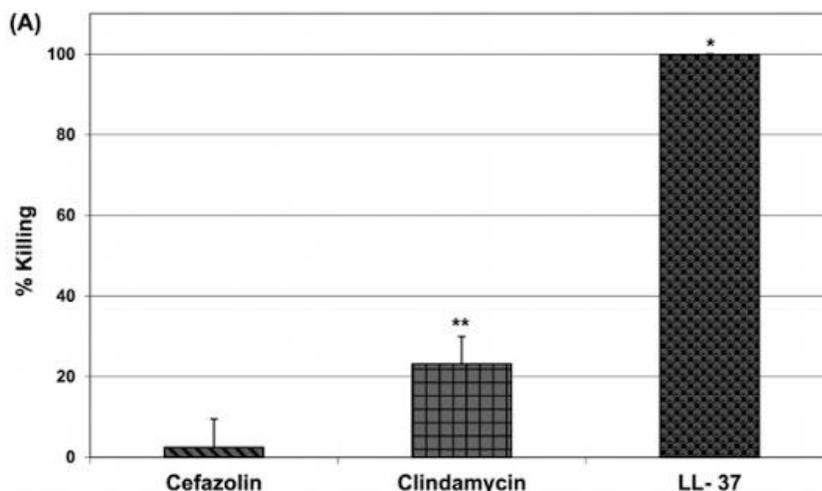


Figura 4. Mortalidad de *S. aureus* para una concentración 100 μ M de cefazolina, clindamicina y LL-37, gráfica tomada de la referencia [7].

Nuevamente, se observa que la eficacia de LL-37 es por lo menos tres veces mayor a la de los antibióticos utilizados, confirmando que es un candidato apto para el tratamiento de enfermedades infecciosas

2.4 Sinergia de LL-37

Dado que se busca utilizar el péptido en conjunto con antibióticos convencionales, es necesario confirmar que éste presente cualidades que le permitan actuar en sinergia con otros agentes antimicrobianos para evitar una inhibición de la actividad antimicrobiana debida a un antagonismo entre moléculas. En 2005, Chen y colaboradores analizaron una serie de péptidos antimicrobianos, incluyendo LL-37, donde observaron su actividad antimicrobiana individual así como en conjunto, con el fin de corroborar la existencia de un efecto sinérgico.

A continuación, la Figura 5 muestra la viabilidad de *S.aureus* incubado con 1 mg/ml de defensinas humanas beta-1 (hBD-1), 0.3 mg/ml hBD-2, 0.3 mg/ml hBD-3, 0.05 mg/ml LL-37 y 1 mg/ml lisozima, así como la combinación de estos agentes antimicrobianos. Se logra apreciar un descenso considerable de la viabilidad celular al combinar dos o más agentes, tal que se obtiene una sinergia entre ellos que incrementa la actividad antimicrobiana.

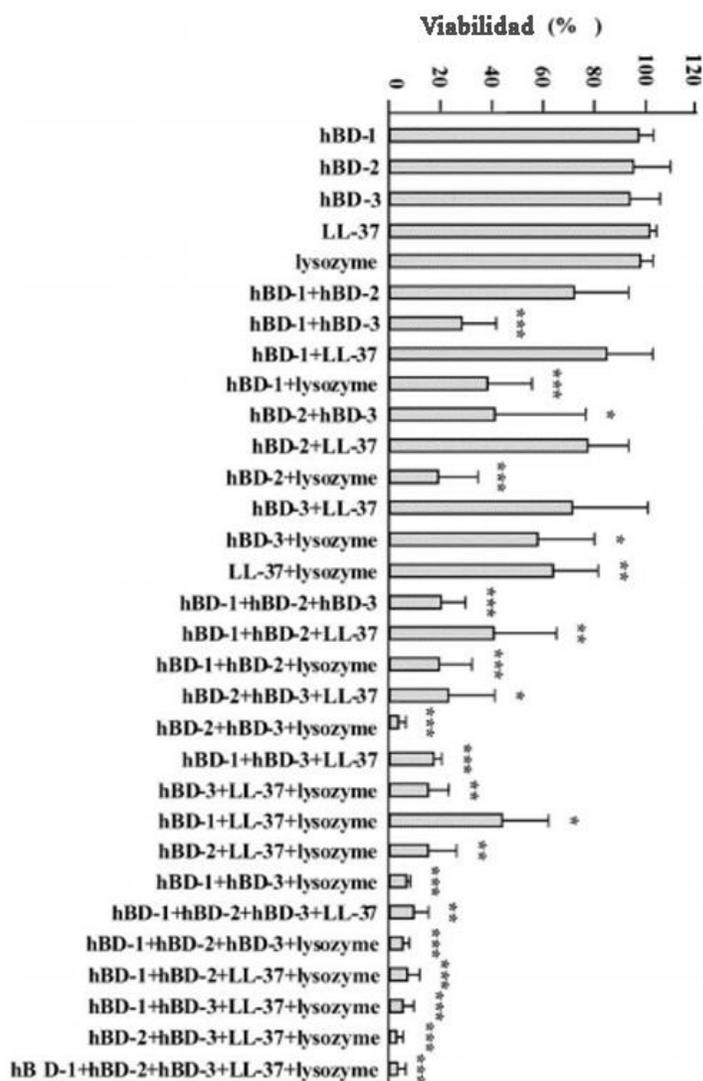


Figura 5. Efecto sinérgico de HBDs, LL-37 y lisozimas contra *S. aureus*, imagen tomada de la referencia [8].

Lo anterior sugiere que LL-37 puede ser utilizado en conjunto con otras moléculas antimicrobianas, como los antibióticos, tal que el efecto incremente

considerablemente a pesar de utilizar concentraciones menores a la dosis estándar.

2.5 *Nanovehículos virales*

Las partículas tipo virus, VLPs, son partículas autoensambladas a partir de proteínas de cápside o de envoltura. A pesar de poseer un tamaño y morfología uniformes, no son de carácter infeccioso debido a que no poseen material genético, por lo que son ideales para atrapar moléculas en su interior o funcionalizar su superficie. Esto los convierte en sistemas potenciales para el transporte de moléculas de interés.

Yoo y colaboradores resaltan que las partículas tipo virus pueden ser utilizadas como nanovehículos de transporte para una amplia gama de moléculas, incluyendo fármacos y péptidos.[9] Así mismo, resaltan la sencillez con la que las partículas pueden ser obtenidas y la posibilidad de escalar su producción.

La Tabla 3 ilustra algunas de las características principales de las partículas tipo virus así como su situación actual.

Tabla 3. Características y situación actual de las partículas tipo virus.			
Atributos	Aplicaciones	Estado actual	Obstáculos
Autoensamble Escalable Antigenicidad preservada Carga de fármacos Tropismo natural Direccionamiento	Entrega de fármacos y ADN	Vacunas aprobadas por la FDA (Gardasil (Merck) and Cervarix (GlaxoSmithKline))	Inmunogenicidad potencial

Para los propósitos de este trabajo, se observa que la partícula puede fungir como un vehículo de un antibiótico de interés que puede ser dirigido por LL-37

para penetrar la membrana celular y liberar fármaco, incrementando la actividad antimicrobiana del sistema.

En 2016, Kristensen sugiere que, efectivamente, los péptidos son capaces de dirigir proteínas a sitios específicos de interés, por lo que pueden ser utilizados como secuencias para dirigir el envío hacia las células diana. La Figura 6 muestra algunas aplicaciones de los péptidos capaces de penetrar la membrana celular para envío dirigido.

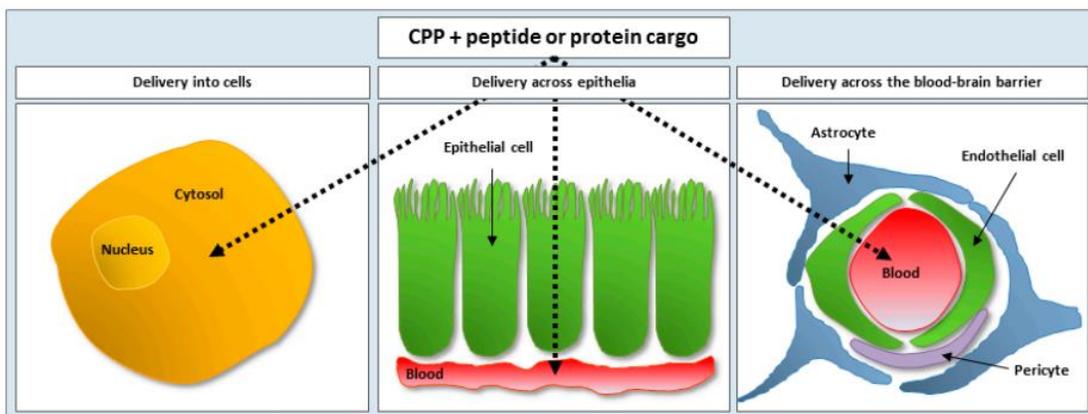


Figura 6. Aplicaciones de péptidos tipo CPP para el envío dirigido de otros péptidos y proteínas, imagen tomada de la referencia [10].

Considerando que el péptido LL-37 posee la cualidad de penetración de membrana celular, es posible suponer que este puede ser capaz de dirigir una partícula tipo virus funcionalizada con un antibiótico de interés, brindando sustento al sistema antimicrobiano propuesto en el presente trabajo. En este caso, los virus que infectan plantas pueden ser considerados como un excelente sistema para la síntesis de nanovehículos de moléculas de interés terapéutico, un ejemplo de estos virus los constituyen los bromovirus.

2.6 El virus BMV

El virus del mosaico del bromo, mostrado en la Figura 7, es un virus de planta de ARN perteneciente a la familia *Bromoviridae*. Su genoma se encuentra dividido en tres ARN mensajeros de cadena sencilla: *arn1*, *arn2* y *arn3*. La cadena de *arn1* codifica la proteína con funciones tipo helicasa para la replicación de ARN. Por otro lado, *arn2* codifica la ARN polimerasa, mientras que *arn3* codifica la proteína de movimiento necesaria para la propagación de célula a célula. Finalmente, una última cadena subgenómica derivada de *arn3*, *arn4*, codifica la proteína de la cápside. [11]

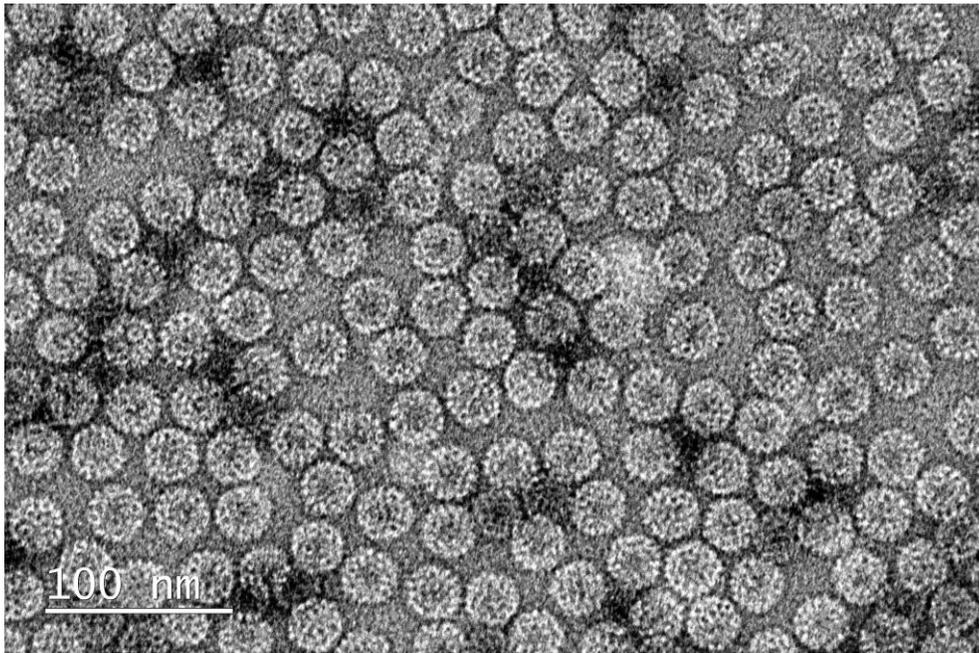


Figura 7. Micrografía del BMV tomada mediante microscopía electrónica de transmisión, TEM.

El virión de BMV posee la forma de un icosaedro truncado, compuesto por 180 subunidades idénticas de una proteína de 19.4 kDa. [12] Cada subunidad cuenta con un brazo N-terminal largo que posee una alta concentración de residuos básicos y un dominio globular que permiten su entrecruzamiento con la cola C-terminal del virión. Esta configuración permite la interacción electrostática entre

polipéptidos cargados positivamente con el ARN de carga negativa necesaria para el ensamble adecuado del virión. También se ha observado que la presencia del brazo N-terminal es indispensable para su actividad infecciosa. [13]

Entre otros virus, el BMV ha sido uno de los primeros virus esféricos en ser reensamblados *in vitro*, donde las partículas reconstituidas son indistinguibles del virus nativo y mantienen su carácter infeccioso. Sin embargo, las cápsides de BMV disociadas *in vitro* pueden reensamblarse alrededor del ARN de otros virus, ARN homopolimérico sintético, y ácidos polianiónicos no nucleicos. [14] Por otro lado, la superficie de cada subunidad que compone al virus expone distintos grupos funcionales a la superficie que pueden ser modificados químicamente. Esto significa que tanto el interior de la cápside del BMV así como su superficie pueden ser utilizadas para el transporte de moléculas terapéuticas, como los antibióticos, mediante encapsidación o funcionalización de la superficie con la molécula de interés.

Este trabajo de investigación está justificado de acuerdo a lo descrito anteriormente, la resistencia a antibióticos que están generando los microbios y la búsqueda de nuevas moléculas antimicrobianas, tales como los péptidos presentan una alternativa. Sin embargo, los altos costos de producción de los péptidos y nuevos agentes antimicrobianos pueden ser un obstáculo para la implementación de nuevas terapias, por lo cual en este trabajo se propone un sistema que permita el uso de péptidos y VLPs funcionalizados con antibióticos, así como antibióticos convencionales modificados con polímeros biocompatibles que le confieran nuevamente su capacidad antimicrobiana.

Capítulo 3. Hipótesis

La cápside del virus BMV puede ser utilizada como un nanovehículo de antibióticos y en conjunto con el uso de un péptido antimicrobiano permiten formar un sistema que presenta un efecto antimicrobiano de amplio espectro, incluso contra bacterias resistentes a estos antibióticos.

Capítulo 4. Objetivos

4.1 Objetivo General

- Diseñar un sistema antimicrobiano de amplio espectro mediante la funcionalización de partículas tipo virus con antibióticos que serán utilizadas en conjunto con un péptido antimicrobiano.

4.2 Objetivos particulares

- Estudiar la sinergia entre los antibióticos ampicilina, kanamicina y aztreonam con el péptido LL37.
- Funcionalizar el exterior de la cápside del virus BMV con diferentes antibióticos (ampicilina, kanamicina y aztreonam).
- Determinar la actividad antimicrobiana de la cápside del virus mosaico del bromo con antibióticos en forma nativa y pegilada.
- Demostrar el posible uso de péptidos antimicrobianos en conjunto con cápsides virales funcionalizadas con antibióticos

Capítulo 5. Materiales y Método

5.1 *Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana*

El presente ensayo pretende evaluar los efectos bactericidas de cada uno de los componentes del sistema antimicrobiano propuesto, así como la molécula final. Para ello se prepararon inóculos frescos de dos cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, a una concentración de 10^8 bacterias/ml a partir del estándar de McFarland ($DO_{600} = 0.1$) [15]. Se prepararon alícuotas, diluyendo en solución amortiguadora (PBS) la concentración bacteriana a 10^4 bacterias/ml, agregando las condiciones a evaluar en cada instancia y se incubaron en agitación constantes a 180 rpm a 37 °C durante 6 horas para determinar susceptibilidad antimicrobiana. Posteriormente se inoculó cada solución en placas de LB agar y se incubaron a 37 °C durante 12-16 horas. Finalmente, se contabilizaron las unidades formadoras de colonia observadas en cada placa para comparar la susceptibilidad a cada condición probada.

5.2 *Funcionalización de BMV con antibióticos*

5.2.1 *Funcionalización directa mediante reacción de carbodiimida*

Para funcionalizar la superficie de la cápside del BMV, es necesario activar los grupos carboxílicos expuestos en la superficie utilizando una concentración excedente de 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimida (EDC) y N-hydroxysuccinimida (NHS). Posteriormente, las VLPs activadas reaccionan con los grupos amino de los antibióticos ampicilina, kanamicina y aztreonam. Se incubaron 100 µg de BMV con 100, 500, 1000 y 2000 moles excedentes de EDC y NHS en PBS 10 mM con pH = 7.4 a temperatura ambiente. Después de una hora, se agregaron 100, 500, 1000, y 2000 moles excedentes de ampicilina, kanamicina

o aztreonam según sea el caso a la mezcla y se incubó por 10-12 horas a 4 °C. Se eliminó el exceso de agentes mediante centrifugación a 8000g por 10 minutos utilizando un filtro de 100 kDa y las partículas concentradas se redispersaron en solución amortiguadora.

5.3 *Funcionalización de antibióticos con PEG*

Se utilizó NHS-PEG₄-Mal, un derivado de PEG heterofuncional, como linker para conjugar antibióticos covalentemente a la superficie del virus. Primero, los antibióticos fueron conjugados selectivamente al succinimídil ester del compuesto. Después, se provocó la reacción del grupo maleimida del conjugado con los grupos aminos expuestos del antibiótico mediante adición de Michael. La solución de antibiótico fue mezclada con NHS-PEG₄-Mal con una razón molar de 1:1 en PBS (10 mM, pH 7.4) a temperatura ambiente. La concentración de antibiótico varió de 100 a 2000 moles excedentes. Después de una hora, la solución fue mezclada con la dispersión de virus (100 µg) en PBS y se incubó por 10-12 horas a 4 °C. Se eliminó el exceso de agentes mediante centrifugación a 8000g por 10 minutos utilizando un filtro de 100 kDa y las partículas concentradas se redispersaron en solución amortiguadora.

Capítulo 6. Resultados y Discusión

6.1 Funcionalización de BMV con antibióticos

La funcionalización de la cápside del virus de BMV se realizó a 3 concentraciones distintas de ampicilina. En la Figura 8 se muestran las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión, TEM, para la funcionalización del virus BMV con 100, 500 y 1000 moléculas del antibiótico por cápside.

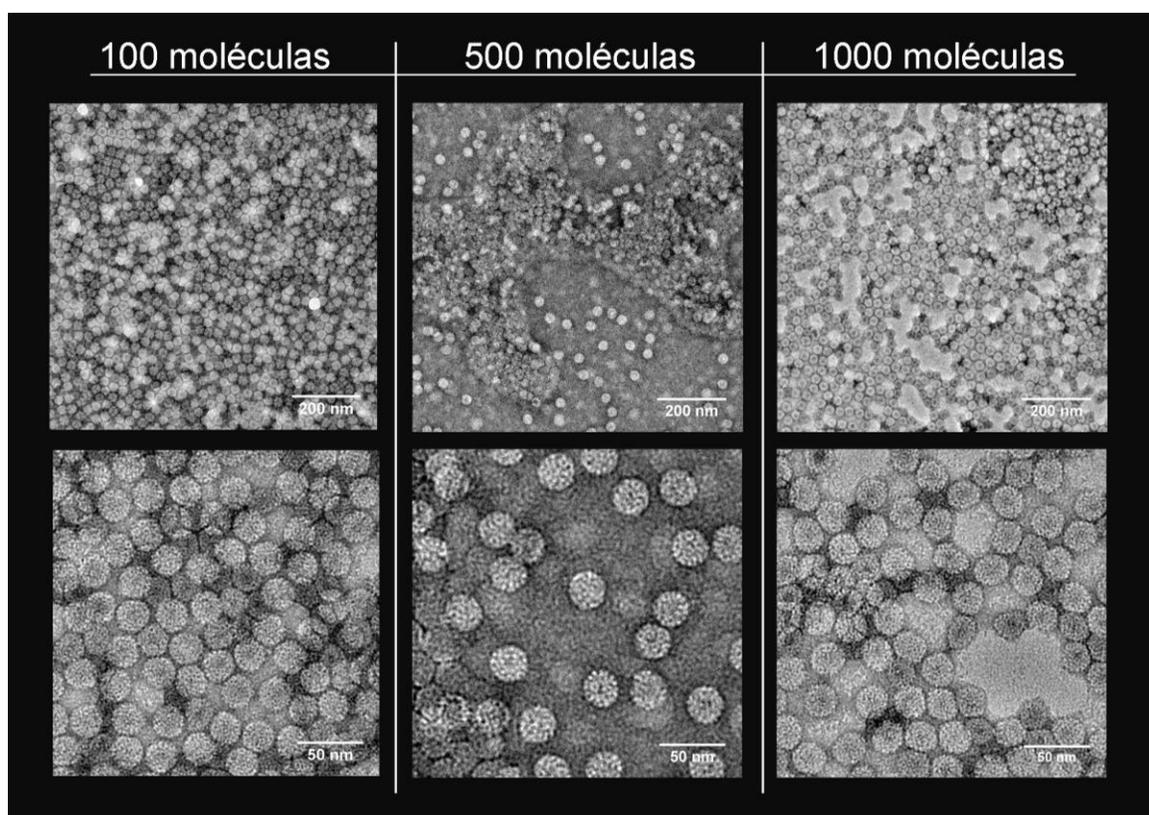


Figura 8. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de la funcionalización de BMV con 100, 500 y 1000 moléculas de ampicilina por partícula viral. Se puede observar que los viriones comienzan a agregarse conforme se incrementa el número de sitios funcionalizados de la cápside viral.

Se puede observar que la dispersión de las partículas disminuye con el incremento de moléculas de ampicilina funcionalizadas en la superficie de la cápside del virus, por lo que en concentraciones de 500 y 1000 moléculas de antibiótico favorecen la agregación de las partículas. Esto se debe al incremento de las concentraciones de reactivos a utilizar para la activación y funcionalización de la superficie de la cápside viral, mismas que afectan la dispersión de partícula, por lo que se observa que es recomendable utilizar menores concentraciones de antibiótico para la funcionalización del virus. La dispersión de las partículas es una característica clave para la eficacia de los fármacos ya que la formación de agregados afecta su difusión y dispersión en el medio y, por consecuencia, su excreción en el caso de ser usados en un organismo receptor.

6.2 Funcionalización del BMV con antibióticos pegilados

Para demostrar el posible uso de la cápside viral como un nano vehículo de antibióticos, se funcionalizó la cápside del BMV con tres antibióticos distintos: kanamicina, ampicilina y aztreonam, donde cada antibiótico fue utilizado tanto en su forma nativa como pegilada. En la Figura 9 se muestran las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión del virus funcionalizado con aztreonam, en este caso 500 moléculas por capsida. En general, se puede observar que, para ambos casos, las VLPs no forman agregados a estas concentraciones de antibiótico.

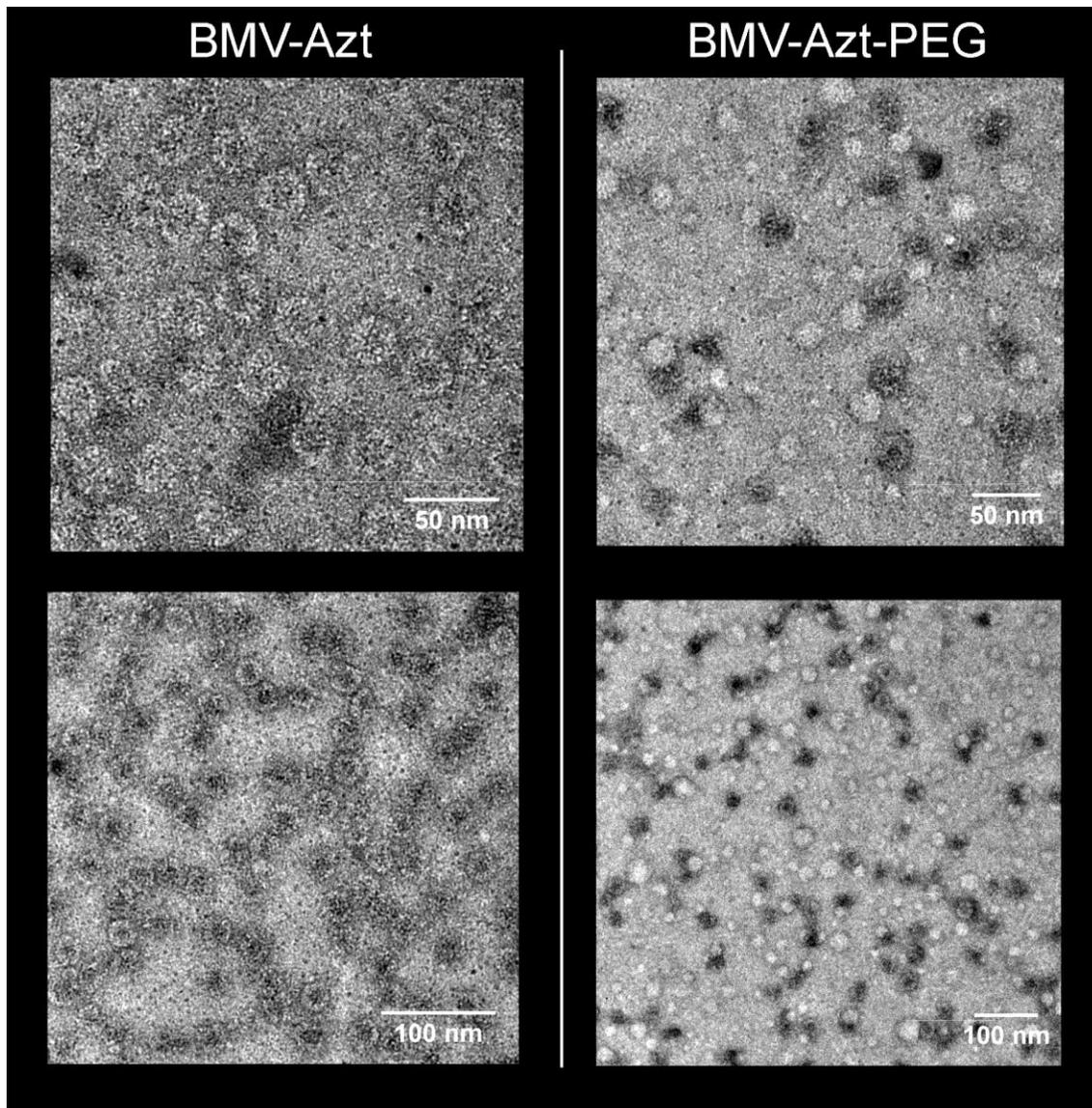


Figura 9. Funcionalización del BMV con aztreonam y aztreonam pegilado, micrografía obtenida mediante TEM.

6.3 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana

El presente ensayo se realizó con la finalidad de evaluar los efectos individuales del péptido LL37 y la kanamicina, así como su actividad en conjunto a diferentes razones de concentración. En la Tabla 4 se muestran las concentraciones utilizadas de péptido y antibiótico para cada una de las condiciones evaluadas. La

concentración de péptido se mantuvo constante mientras que se incrementó la concentración de antibiótico en intervalos de 5 microgramos con el propósito de comparar los efectos obtenidos en cada ensayo e identificar las razones de concentración ideales que brinden el efecto antimicrobiano deseado contra la cepa resistente.

Tabla 4. Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

	Ensayo	Bacterias	LL37 (µg)	Kanamicina (µg)
A	Control PBS	10,000	-	-
B	Control Kanamicina (25 µg)	10,000	-	25
C	Control LL37 (10 µg)	10,000	10	-
D	Relación 1:1	10,000	10	1.11
E	Relación 1:5	10,000	10	5.55
F	Relación 1:10	10,000	10	11.11
G	Relación 1:15	10,000	10	16.66
H	Relación 1:20	10,000	10	22.2

La Figura 10 muestra imágenes representativas del cultivo en placa de cada instancia del ensayo, donde se observa que el crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) varía apreciablemente. Los controles negativos de PBS y kanamicina (Figuras 10A y 10B) muestran el mayor crecimiento bacteriano, mientras que en el control positivo de LL37 (Figura 10C) se puede observar la inhibición casi total del crecimiento de la bacteria. Por otro lado, las siguientes placas (Figuras 10D-10H) muestran inhibición parcial del crecimiento bacteriano.

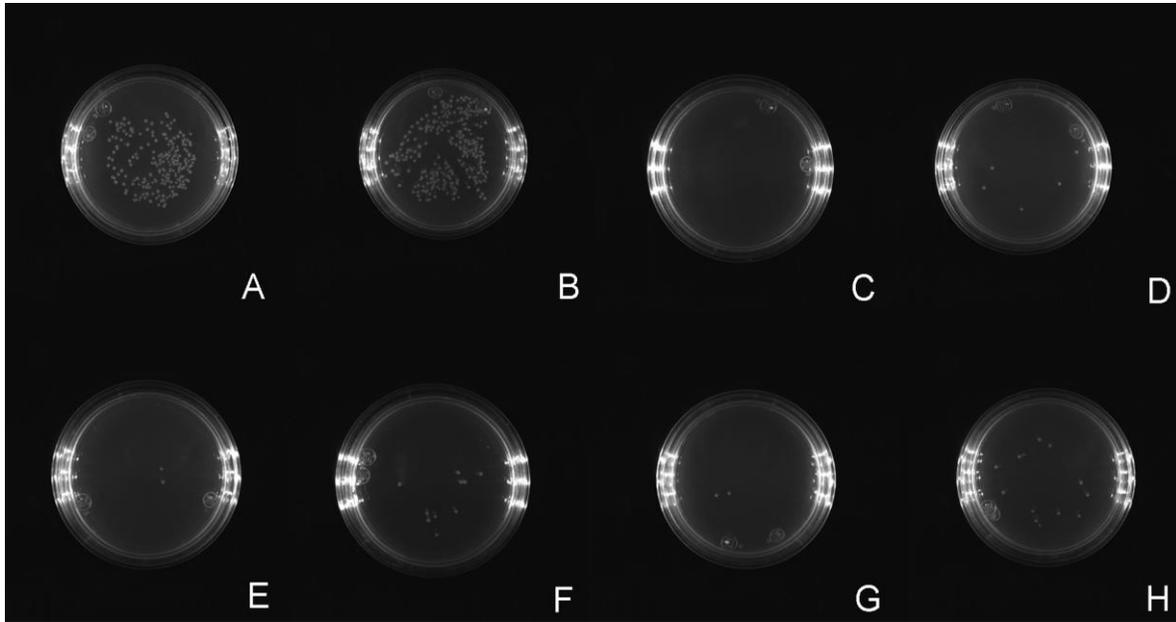


Figura 10. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C. A) Control PBS. B) Control Kanamicina 25 µg. C) Control LL37 10 µg. D) Relación 1:1. E) Relación 1:5. F) Relación 1:10. G) Relación 1:15. H) Relación 1:20.

Se realizó un conteo de UFC con el apoyo del software *OpenCFU* para determinar la supervivencia de *S. aureus* ante el tratamiento. La Tabla 5 muestra el conteo de UFC por placa, donde se promedian los totales entre el número de réplicas realizadas por ensayo. Finalmente, se tomó el conteo obtenido del control negativo de *S. aureus* incubado en PBS como el 100% de supervivencia a partir del cual se determinó el porcentaje de UFCs sobrevivientes en los demás ensayos.

Para el control de PBS, se observa un crecimiento uniforme alrededor de la placa, lo cual es observado igualmente en la placa correspondiente al tratamiento con kanamicina únicamente. Seguido a esto, se observan distintos grados de inhibición, tanto total como parcial a partir del tratamiento con el péptido por sí sólo (Figura 10C) como con distintas concentraciones de kanamicina (Figuras 10D a 10H).

En primer lugar se puede determinar que el uso de kanamicina no produce inhibición del crecimiento bacteriano, lo cual se debe a que la cepa de *S. aureus* utilizada es resistente a este antibiótico. Por otro lado, es posible determinar que el uso de 10 µg de péptido LL37 produce una inhibición casi total del 98.8%, indicando que la concentración mínima inhibitoria es cercana a dicha concentración.

Tabla 5. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y supervivencia por ensayo.

	Ensayo	UFC	Porcentaje de supervivencia
A	Control PBS	209.5 ± 25	100.00%
B	Control Kanamicina (25 µg)	224.5 ± 16	107.16%
C	Control LL37 (10 µg)	2.5 ± 2	1.19%
D	Relación 1:1	9.5 ± 5	4.53%
E	Relación 1:5	7.5 ± 4	3.58%
F	Relación 1:10	22 ± 6	10.50%
G	Relación 1:15	13.5 ± 5	6.44%
H	Relación 1:20	30.5 ± 6	14.56%

El uso combinado del péptido con el antibiótico muestra una inhibición del crecimiento bacteriano superior al 85%. Sin embargo, se aprecia que todas las instancias donde se utilizaron el péptido y el antibiótico en conjunto muestran un descenso de la inhibición contra el control positivo donde se utilizó el péptido

únicamente. Así mismo, se observa una tendencia en la disminución de la inhibición del crecimiento conforme se incrementa la concentración de kanamicina utilizada en conjunto con el péptido hasta llegar a la razón de concentración 1:15 donde nuevamente se muestra un incremento de la inhibición.

El fenómeno observado indica que el antibiótico interfiere con la capacidad antimicrobiana del péptido. Esto sugiere diferentes situaciones posibles, aun cuando el péptido como el antibiótico poseen una carga neta positiva, un escenario posible es que el antibiótico interfiera con la formación de las estructuras tipo barril del péptido, lo cual pueda deberse a interacciones electrostáticas del antibiótico con el péptido. El antibiótico kanamicina tiene cuatro cargas positivas en condiciones fisiológicas [16]. Sin embargo, el LL-37, a pH fisiológico, 16 de sus 37 residuos tienen 11 cargas positivas (6 Lys y 5 Arg) y 5 cargas negativas (3 Glu y 2 Asp), es decir, el péptido LL-37 tiene una carga neta de 6 cargas positivas [17], por lo cual es posible que el péptido interactúe electrostáticamente con el antibiótico, es decir las cargas positivas del antibiótico se unan a las cargas negativas del péptido. Otro posible escenario podría ser que, debido al potencial de membrana plasmática que es de carácter negativo y al incremento de moléculas de kanamicina, podría observarse una afinidad electrostática entre la membrana y el antibiótico tal que se forme una corona del antibiótico en el exterior de la membrana. Esta interacción provocaría la repulsión electrostática del péptido, por lo que no penetraría en la membrana y el envío del antibiótico al interior de la bacteria permanecería incompleto. Ambas situaciones podrían explicar la razón por la cual se incrementa el número de UFC al incrementar la cantidad de antibióticos cuando se mantiene constante la concentración de los péptidos.

6.4 Variación de la concentración de péptido en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana

A partir del ensayo anterior se decidió disminuir la concentración de péptido utilizada para 10,000 bacterias con el fin de evitar observar efectos de inhibición mayoritariamente debidos al péptido por sí solo. La Tabla 6 muestra la variación de concentraciones tanto de péptido LL37 como kanamicina utilizadas en el siguiente ensayo. Para el presente, se variaron las razones de concentración de kanamicina desde 1:1 a 1:20 en intervalos de 5 para dos concentraciones distintas de péptido.

Tabla 6. Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

	Ensayo	Bacterias	LL37 (µg)	Kanamicina (µg)
A	Control PBS	10,000	-	-
B	Control Kanamicina (25 µg)	10,000	-	25
C	Control LL-37 (1 µg)	10,000	1	-
D	Relación 1:1	10,000	1	0.11
E	Relación 1:5	10,000	1	0.55
F	Relación 1:10	10,000	1	1.11
G	Relación 1:15	10,000	1	1.66
H	Relación 1:20	10,000	1	2.2
I	Control LL-37 (5 µg)	10,000	5	-
J	Relación 1:1	10,000	5	0.55
K	Relación 1:5	10,000	5	2.75
L	Relación 1:10	10,000	5	5.5
M	Relación 1:15	10,000	5	8.25
N	Relación 1:20	10,000	5	11

La Figura 11, muestra el crecimiento bacteriano de los ensayos cultivados en placas de LB agar después de su incubación en tubos eppendorf durante 6 horas. Se observa un tamaño de unidad de colonia mayor para las placas donde la

inhibición fue mayor. En cambio, aquellas placas con mayor crecimiento bacteriano muestran colonias de menor tamaño y menor separación entre sí.

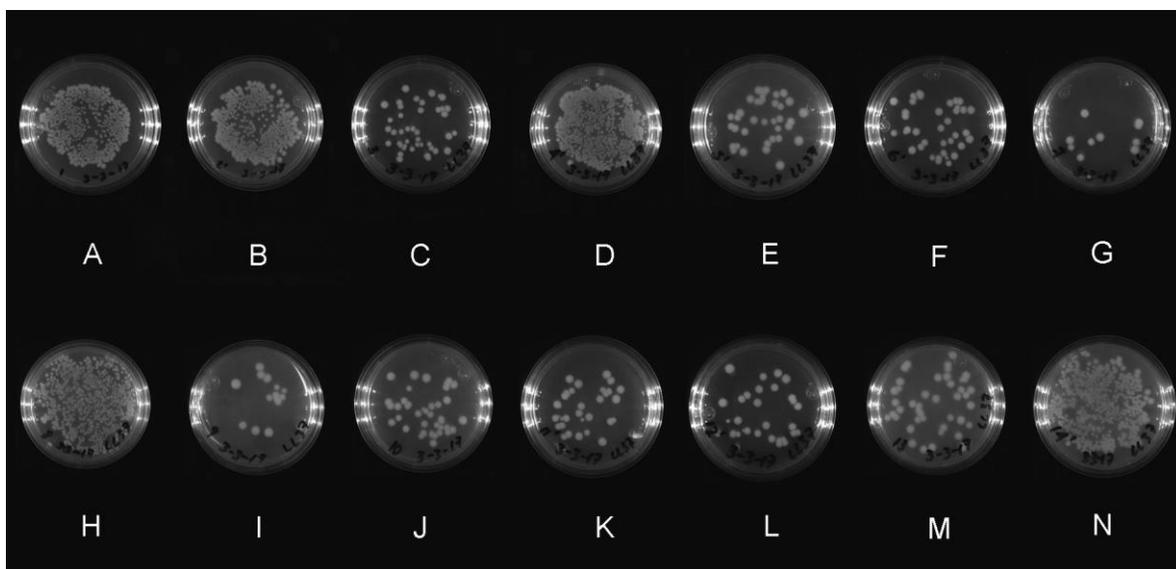


Figura 11. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C. A) Control PBS. B) Control Kanamicina 25 µg. C) Control LL-37 1 µg. D) Relación 1:1. E) Relación 1:5. F) Relación 1:10. G) Relación 1:15. H) Relación 1:20. I) Control LL-37 5 µg. J) Relación 1:1. K) Relación 1:5. L) Relación 1:10. M) Relación 1:15. N) Relación 1:20.

La Tabla 7 muestra el conteo de unidades formadoras de colonias donde se observa mayor inhibición del crecimiento por parte de los tratamientos de antibiótico y péptido a comparación del antagonismo observado en el ensayo anterior. Para la relación 1:15, utilizando 1 µg de péptido, se observa una mortalidad del 90.64% lo cual denota un incremento de la inhibición del 8.22% contra el uso del péptido solo. Sin embargo, para la razón 1:20 se observa la pérdida del efecto inhibitorio y el crecimiento bacteriano es incluso mayor al cultivo sin tratamiento.

Para los ensayos con 5 µg de péptido se observa el mismo efecto para la relación 1:20, mientras que las relaciones menores poseen una inhibición de 6% a 10% menor que el tratamiento con péptido solo. Esto puede indicar que el efecto de repulsión electrostática supuesto anteriormente es observado a partir de una cierta

concentración de antibiótico, donde las moléculas sean capaces de formar una corona alrededor de la membrana plasmática de la bacteria o interfieren con la correcta conformación estructural del péptido. En este caso, el efecto es notable a partir del uso de 2 µg de kanamicina e incrementa conforme la relación de concentración del antibiótico con respecto a la concentración de péptido es aumentada. Esto se exceptúa de la relación 1:15 de péptido con antibiótico, donde se muestra nuevamente un incremento de la mortalidad bacteriana.

Tabla 7. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y supervivencia por ensayo.

	Ensayo	Promedio UFC por ensayo	Porcentaje de supervivencia
A	Control PBS	219 ± 7	100.00%
B	Control Kanamicina (25 µg)	153 ± 27	70.09%
C	Control LL37 (1 µg)	38 ± 2	17.58%
D	Relación 1:1	194 ± 73	88.58%
E	Relación 1:5	37.5 ± 0.7	17.12%
F	Relación 1:10	39 ± 0	17.81%
G	Relación 1:15	20.5 ± 9	9.36%
H	Relación 1:20	276 ± 106	126.26%
I	Control LL37 (5 µg)	17 ± 6	7.99%
J	Relación 1:1	36 ± 5	16.44%
K	Relación 1:5	38.5 ± 0.7	17.58%
L	Relación 1:10	37.5 ± 2	17.12%
M	Relación 1:15	30.5 ± 7	13.93%
N	Relación 1:20	177 ± 28	80.82%

6.5 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana con antibióticos pegilados

A partir de los resultados de los ensayos anteriores que indican un comportamiento antagonista entre el péptido y la kanamicina, se decidió pegar el antibiótico para disminuir o evitar interacciones electrostáticas repulsivas o atractivas con el péptido. De igual manera, se llevó a cabo el mismo procedimiento con ampicilina, de carga neta neutra, para analizar su posible cambio en la actividad antimicrobiana de este antibiótico al ser pegilado. A continuación, la Tabla 8 muestra las concentraciones de péptido y antibiótico utilizadas en el presente ensayo.

Tabla 8. Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

Ensayo	Bacterias	LL37 (µg)	Kanamicina (µg)	Ampicilina (µg)
A Control PBS	10,000	-	-	-
B Control Kanamicina (25 µg)	10,000	-	25	-
C Control LL37 (0.5 µg)	10,000	0.5	-	-
D Control Ampicilina (1 µg)	10,000	0.5	-	1
E Kanamicina-PEG (25 µg)	10,000	0.5	25	-
F Ampicilina-PEG (1 µg)	10,000	0.5	-	1
G LL37 + Kanamicina (1:15)	10,000	0.5	8.25	-
H LL37 + Ampicilina (1:15)	10,000	0.5	-	5.77
I LL37 + Kanamicina-PEG (1:15)	10,000	0.5	8.25	-
J LL37 + Ampicilina-PEG (1:15)	10,000	0.5	-	5.77

En la Figura 12 se muestran las imágenes representativas obtenidas del cultivo en placa de LB-agar para cada una de las condiciones del ensayo, mostrando crecimiento bacteriano. Se observa inhibición apreciable en las placas C, H, I y J, que corresponden al control de LL37, al ensayo realizado con LL37 y ampicilina, y al tratamiento de ambos antibióticos pegilados en conjunto con el péptido.

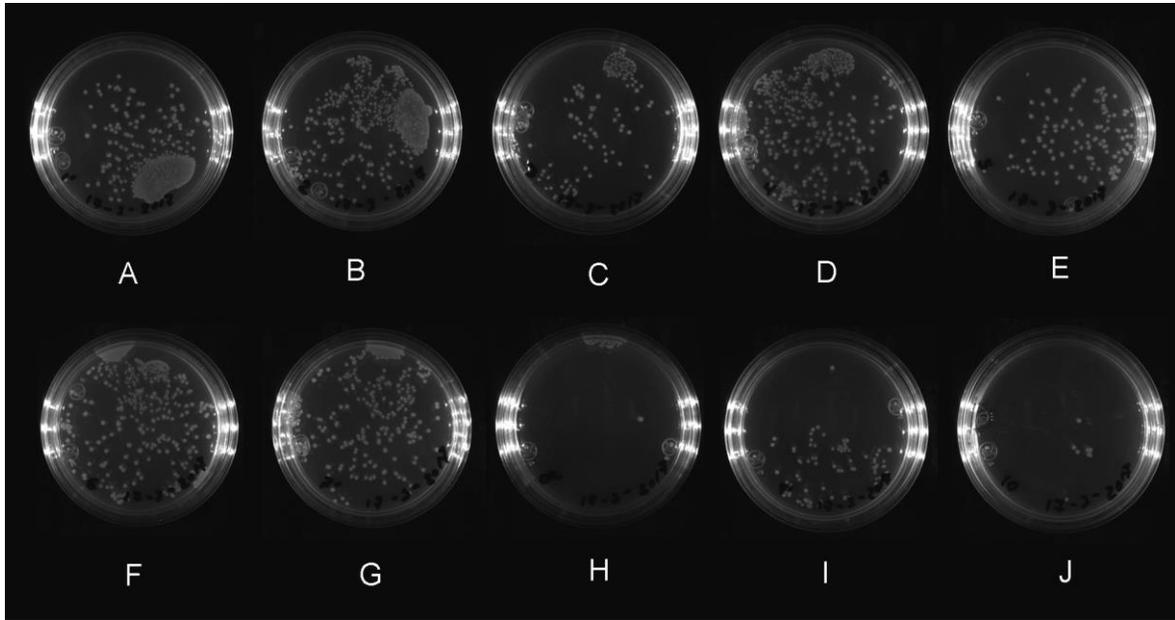


Figura 12. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C. A) Control PBS. B) Control kanamicina. C) Control LL-37. D) Control ampicilina. E) Kanamicina-PEG. F) Ampicilina-PEG. G) LL37 + Kanamicina. H) LL37 + Ampicilina 1:15. I) LL37 + Kanamicina-PEG. J) LL37 + Ampicilina-PEG.

La tabla 9 muestra el conteo de unidades formadoras de colonias por placa. Nuevamente se tomó como 100% de supervivencia el control negativo de bacterias sin tratamiento. Se observa una inhibición del 33% correspondiente al tratamiento con el péptido. Nuevamente, el tratamiento de péptido con kanamicina no muestra inhibición alguna; sin embargo, el tratamiento con péptido y kanamicina pegilada muestra una inhibición del 56% comparada con el crecimiento del control negativo, indicando un incremento de un 7% en la inhibición a comparación del uso del péptido solo.

Los ensayos con ampicilina mostraron inhibición similar entre sí. Se muestra una inhibición del 98% para el tratamiento de *S. aureus* con LL37 y ampicilina, y una inhibición del 89% utilizando ampicilina pegilada en conjunto con el péptido.

Tabla 9. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y supervivencia por ensayo.

	Ensayo	Promedio UFC por ensayo	Porcentaje de supervivencia
A	Control PBS	163 ± 55	100%
B	Control Kanamicina (25 µg)	231 ± 17	142%
C	Control LL37 (5 µg)	110 ± 14	67%
D	Control Ampicilina (1 µg)	176.5 ± 22	108%
E	Kanamicina-PEG (25 µg)	192.5 ± 138	118%
F	Ampicilina-PEG (1 µg)	163.5 ± 95.5	100%
G	LL37 + Kanamicina (1:15)	200 ± 17	123%
H	LL37 + Ampicilina (1:15)	3 ± 4	2%
I	LL37 + Kanamicina-PEG (1:15)	72 ± 4	44%
J	LL37 + Ampicilina-PEG (1:15)	18.5 ± 2.12	11%

Para la kanamicina, la pegilación de este antibiótico mostró un incremento de la actividad del tratamiento al utilizarse en conjunto con el péptido LL37 a diferencia de los ensayos anteriores donde se mostraba un comportamiento antagonista. Esto sugiere que el pegilado del antibiótico neutralizó la carga neta del antibiótico, evitando interacciones electrostáticas de repulsión o atracción entre el antibiótico y el péptido, posiblemente debido a efectos estéricos.

6.6 Variación de la concentración de péptido en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana con antibióticos pegilados

Este ensayo fue realizado con la intención de observar la inhibición del crecimiento de *S. aureus* al ser tratado con la terapia combinada de péptido con kanamicina pegilada, debido a que el experimento anterior demostró que la pegilación de dicho antibiótico evita el comportamiento antagonista entre estas moléculas. Se manejó dos concentraciones constantes de péptido LL37 de 1 µg y 2.5 µg, para las cuales se varió la concentración de kanamicina de 1 a 5 µg. También se realizó dicho experimento utilizando ampicilina, antibiótico al cual la cepa utilizada aun es susceptible para comparar el efecto inhibitorio. La Tabla 10, mostrada a continuación, registra las concentraciones utilizadas en cada instancia del experimento.

Tabla 10. Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

Ensayo	Bacterias	LL37 (µg)	Kanamicina (µg)	Ampicilina (µg)
A Control PBS	10,000	-	-	-
B Control Kanamicina-PEG (5 µg)	10,000	-	5	-
C Control Ampicilina (2.5 µg)	10,000	-	-	2.5
D Control LL37 (1 µg)	10,000	1	-	-
E Control LL37 (10 µg)	10,000	10	-	-
F LL37 + Kanamicina-PEG (1 µg)	10,000	1	1	-
G LL37 + Kanamicina-PEG (2.5 µg)	10,000	1	2.5	-
H LL37 + Kanamicina-PEG (5 µg)	10,000	1	5	-
I LL37 + Ampicilina (1 µg)	10,000	1	-	1
J LL37 + Ampicilina (2.5 µg)	10,000	1	-	2.5
K Control LL37 (2.5 µg)	10,000	2.5	-	-
L LL37 + Kanamicina-PEG (1 µg)	10,000	2.5	1	-
M LL37 + Kanamicina-PEG (2.5 µg)	10,000	2.5	2.5	-
N LL37 + Kanamicina-PEG (5 µg)	10,000	2.5	5	-
O LL37 + Ampicilina (1 µg)	10,000	2.5	-	1
P LL37 + Ampicilina (2.5 µg)	10,000	2.5	-	2.5

Se obtuvieron 32 cultivos en placas de LB agar, correspondientes a las 16 pruebas realizadas en el ensayo y una réplica adicional para cada instancia, de las cuales la Figura 13 muestra una imagen representativa del crecimiento bacteriano observado en cada prueba individual.

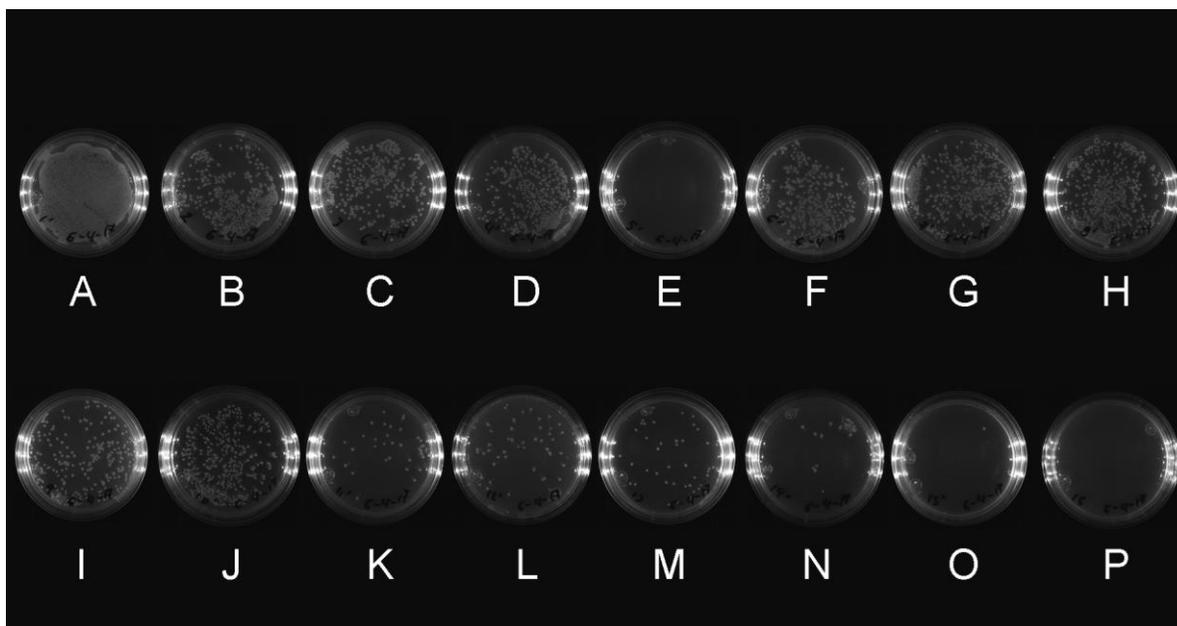


Figura 13. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C. Control PBS. A) Control Kanamicina-PEG (5 µg). B) Control Ampicilina (2.5 µg). C) Control LL37 (1 µg). D) Control LL37 (10 µg). E) LL37 + Kanamicina-PEG (1 µg). F) LL37 + Kanamicina-PEG (2.5 µg). G) LL37 + Kanamicina-PEG (5 µg). H) LL37 + Ampicilina (1 µg). I) LL37 + Ampicilina (2.5 µg). J) Control LL37 (2.5 µg). K) LL37 + Kanamicina-PEG (1 µg). L) LL37 + Kanamicina-PEG (2.5 µg). M) LL37 + Kanamicina-PEG (5 µg). N) LL37 + Ampicilina (1 µg). O) LL37 + Ampicilina (2.5 µg).

Se observa un crecimiento desmedido en el control sin tratamiento (Figura 1A) a comparación del resto de las placas. Por otro lado, se observa un incremento en la inhibición a partir del tratamiento combinado de péptido con antibiótico utilizando una concentración de 2.5 µg de LL37. En la Figura 14 se grafican los conteos de UFC para cada prueba, mostrando la supervivencia de bacterias después del tratamiento aplicado.

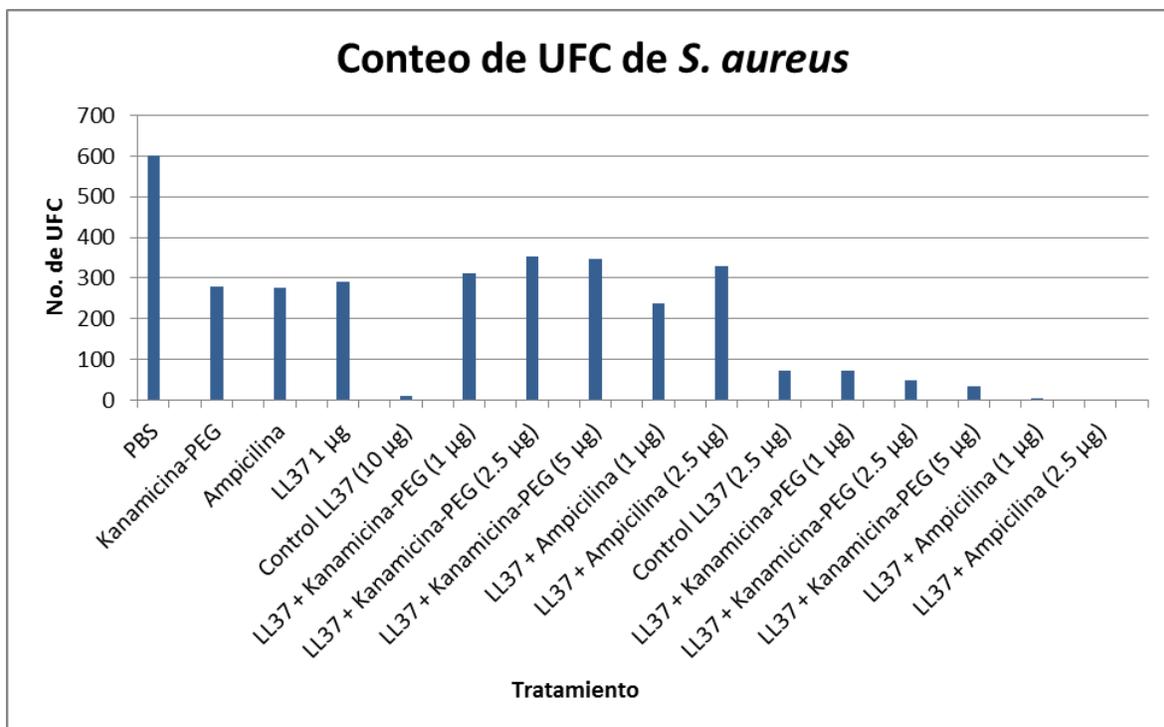


Figura 14. Conteo de UFC de *S. aureus* para los tratamientos descritos en la Tabla 10.

Para los tratamientos con 1 µg de LL37, el uso de kanamicina pegilada no provoca un incremento en la inhibición del crecimiento de *S. aureus*, en cambio, a partir de una concentración de 2.5 µg de péptido, se observa una mortalidad mayor al utilizar el tratamiento combinado con kanamicina. Por otro lado, el tratamiento combinado de LL37 y ampicilina muestra mayor inhibición del crecimiento a comparación del uso de kanamicina, lo cual se atribuye a que la cepa utilizada no presenta resistencia para la ampicilina.

Para el uso de kanamicina, los resultados anteriores indican que la pegilación es un método efectivo para evitar efectos antagonistas debido a interacciones electrostáticas al utilizar este antibiótico en conjunto con el péptido. Así mismo, se ha determinado que la concentración utilizada de péptido debe ser superior a 1 µg para observar un efecto considerable de inhibición. Esto puede deberse a que, entre menor sea la concentración de péptido, se puede translocar un número menor de moléculas de antibiótico al interior de la bacteria, disminuyendo la efectividad del tratamiento.

6.7 Ensayo de susceptibilidad con BMV funcionalizado con Kanamicina y Aztreonam

Con el fin de proveer un vehículo de envío para el antibiótico, se utilizaron cápsides del virus mosaico del bromo, BMV, cuya superficie fue funcionalizada con kanamicina y aztreonam respectivamente. El tratamiento se aplicó tanto a una cepa de *S. aureus* resistente a kanamicina como a una cepa de *E. coli* sin resistencia a los antibióticos utilizados. En la Tabla 11 se muestran las concentraciones utilizadas de cada componente en el presente ensayo.

Tabla 11. Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana en *S. aureus* y *E. coli*.

Ensayo	Bacterias	LL37 (µg)	BMV (µg)	Aztreonam (µg)	Kanamicina (µg)
A Control PBS	10,000	-	-	-	-
B Control LL37 (5 µg)	10,000	5	-	-	-
C Control BMV (100 µg)	10,000	-	100	-	-
D BMV + LL37	10,000	5	100	-	-
E BMV-Aztreonam + LL37	10,000	5	100	5	-
F BMV-Aztreonam-PEG + LL37	10,000	5	100	5	-
G BMV-Kanamicina + LL37	10,000	5	100	-	5
H BMV-Kanamicina-PEG + LL37	10,000	5	100	-	5

Se mantuvo una concentración idéntica de ambos antibióticos y del péptido, esperando un crecimiento acelerado debido a que el BMV puede ser utilizado como fuente de proteína de la bacteria. En las Figuras 15 y 16 se muestra el crecimiento de colonias en placas de LB agar después de recibir el tratamiento.

Tratamiento en *Staphylococcus aureus*

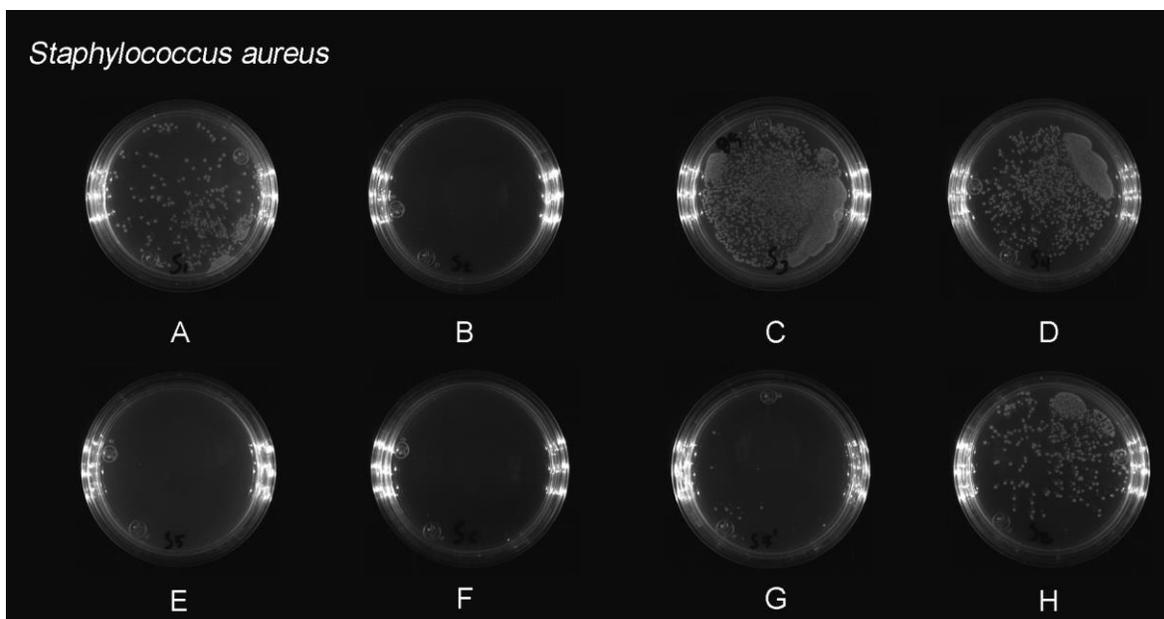


Figura 15. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C. A) Control PBS. B) Control LL37 5 µg. C) Control BMV 10 µg. D) BMV + LL37. E) BMV-Aztreonam + LL37. F) BMV-Aztreonam-PEG + LL37. G) BMV-Kanamicina + LL37. H) BMV-Kanamicina-PEG + LL37.

Se observa crecimiento uniforme en la placa de control con PBS; sin embargo, para este ensayo se observa un mayor crecimiento en el control con BMV debido a que la bacteria utiliza el virus como fuente de proteína, por lo que se tomó el número de unidades formadoras de colonia para esta condición como el 100% para aquellas condiciones donde se utilizó tratamiento de antibiótico funcionalizado en la cápside del virus. Las condiciones con PBS y péptido libre, fueron analizadas independientemente, tomando el control con PBS como 100% de supervivencia bacteriana. Los conteos de UFC por condición se muestran en la Tabla 12.

El tratamiento con péptido libre (Figura 15B) logró inhibir completamente el crecimiento bacteriano; sin embargo, una vez que se incluye una fuente de

proteína como el BMV (Figura 15C), se observa que el efecto antimicrobiano del péptido es insuficiente para inhibir el crecimiento de la bacteria.

Por otro lado, ambos tratamientos que incluyen aztreonam son muy efectivos, obteniendo una inhibición total del crecimiento. Cabe mencionar que la cepa de *S. aureus* utilizada en el ensayo no presenta resistencia contra este antibiótico.

Tabla 12. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y supervivencia por ensayo.

	Ensayo	UFC	Porcentaje de supervivencia
A*	Control PBS	203.5 ± 45	100%
B*	Control LL37 (5 µg)	0	0%
C	Control BMV (10 µg)	386.5 ± 54	100%
D	BMV + LL37	424.5 ± 47	94%
E	BMV-Aztreonam + LL37	0	0%
F	BMV-Aztreonam-PEG + LL37	0	0%
G	BMV-Kanamicina + LL37	25 ± 18	6%
H	BMV-Kanamicina-PEG + LL37	263.5 ± 15	64%

*Condiciones analizadas independientemente, tomando el punto A como 100%.

Finalmente, se observa una inhibición superior al 90% al utilizar el tratamiento con kanamicina funcionalizada en la cápside del virus. Esto indica que la funcionalización del virus con el antibiótico, de manera similar a la pegilación, evita las interacciones electrostáticas de la kanamicina con el LL-37 que pueden interferir con la formación de estructuras tipo barril del péptido, potenciando su

efecto antimicrobiano. En cambio, el tratamiento con kanamicina pegilada funcionalizada en la superficie del virus mostró una inhibición 56% menor, indicando alguna posible interferencia por parte de la proteína de la cápside en conjunto con el PEG, posiblemente debido a efectos estéricos o enmascaramiento de la parte activa de la kanamicina.

6.8 Tratamiento en *Escherichia coli*

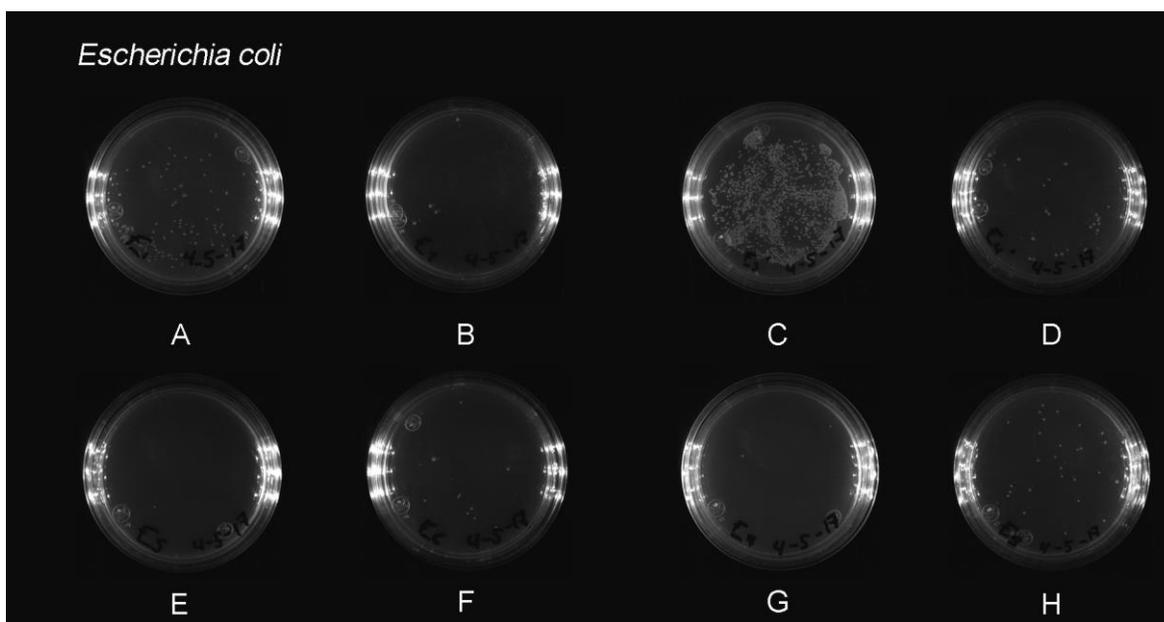


Figura 16. Imágenes representativas de crecimiento de *E. coli* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 6 horas a 37 °C. A) Control PBS. B) Control LL37 5 µg. C) Control BMV 10 µg. D) BMV + LL37. E) BMV-Aztreonam + LL37. F) BMV-Aztreonam-PEG + LL37. G) BMV-Kanamicina + LL37. H) BMV-Kanamicina-PEG + LL37.

De manera similar que en *S. aureus*, se observa que la presencia de una fuente de proteína incrementa la tasa de crecimiento de la bacteria; sin embargo, *E. coli* presenta una susceptibilidad mayor al péptido, ya que se observa una inhibición similar del crecimiento tanto en presencia como ausencia del virus. Por otro lado, todos los tratamientos mostraron una inhibición significativa a pesar de ser similar a la inhibición obtenida por el péptido solo. A continuación, la Tabla 13 muestra los

conteos de UFC por condición probada, así como el porcentaje de supervivencia bacteriana después de la exposición a su respectivo tratamiento.

Tabla 13. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y supervivencia por ensayo.

	Ensayo	UFC	Porcentaje de supervivencia
A*	Control PBS	121.5 ± 18	100%
B*	Control LL37 (5 µg)	4.5 ± 4	3.70%
C	Control BMV (100 µg)	466 ± 18	100%
D	BMV + LL37	21.5 ± 9	4.61%
E	BMV-Aztreonam + LL37	2 ± 1	0.43%
F	BMV-Aztreonam-PEG + LL37	18.5 ± 8	3.97%
G	BMV-Kanamicina + LL37	1.5 ± 0.7	0.32%
H	BMV-Kanamicina-PEG + LL37	31.5 ± 4	6.76%

*Condiciones analizadas independientemente, tomando el punto A como 100%.

Es claro que, tanto para aztreonam como kanamicina, la inhibición disminuye cuando el antibiótico se encuentra pegilado, reafirmando la propuesta de que el PEG puede interferir con la actividad del péptido cuando el antibiótico se encuentra funcionalizado a la cápside del virus.

6.9 Susceptibilidad antimicrobiana a 0, 6 y 24 horas de tratamiento

Con el fin de observar los efectos tanto inmediatos como continuos del tratamiento con una concentración mayor de bacterias, se elaboró un ensayo de susceptibilidad antimicrobiana donde se cultivaron las diferentes condiciones en 3 tiempos: 0, 6 y 24 horas. En la Tabla 14 se muestran las condiciones del experimento.

Tabla 14. Concentraciones utilizadas en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

	Ensayo	Bacterias	LL37 (µg)	Kanamicina (µg)	BMV (µg)
A	Control PBS	1,000,000	-	-	-
B	Control Kanamicina-PEG	1,000,000	-	10	-
C	Control LL37 (20 µg)	1,000,000	20	-	-
D	LL37 + Kanamicina-PEG	1,000,000	20	10	-
E	LL37 + BMV-Kanamicina-PEG	1,000,000	20	10	200

Puede observarse que se incrementó la concentración de péptido y antibiótico utilizado debido al número de bacterias con el que se trabajó en este ensayo. En la Figura 17 pueden observarse los cultivos en placa de LB agar de cada condición en los 3 tiempos distintos. Nótese principalmente la inhibición del crecimiento a 6 y 24 horas para el control con LL-37, el tratamiento con kanamicina pegilada y BMV funcionalizado con este mismo antibiótico.

Para los controles de PBS y kanamicina pegilada se puede observar que el crecimiento bacteriano no fue afectado en ningún momento, indicando que la bacteria mantiene su resistencia al antibiótico. En cambio, al incorporar el péptido LL-37 al tratamiento se observa un incremento drástico de la inhibición a las 6 horas de tratamiento como se ha notado en los experimentos anteriores. Así mismo, el tratamiento por 24 horas mostró un grado de inhibición mayor, lo cual sugiere que el tratamiento mantiene su actividad por un tiempo prolongado.

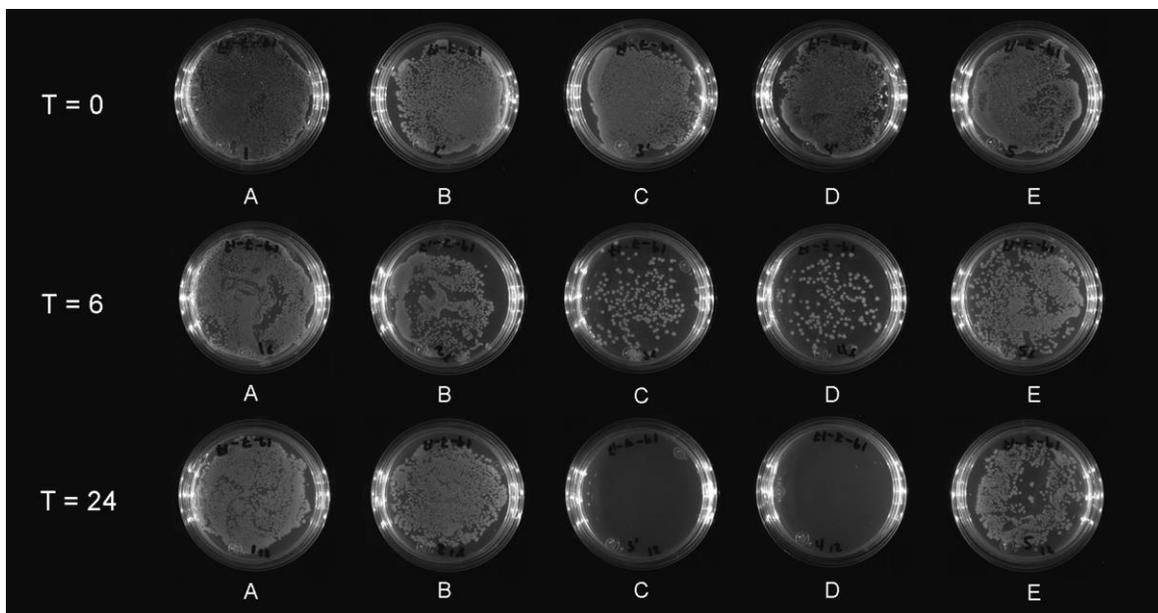


Figura 17. Imágenes representativas de crecimiento de *S. aureus* en placas de LB agar después de incubar en tubos eppendorf con tratamiento por 0, 6 y 24 horas a 37 °C. A) Control PBS. B) Control kanamicina-PEG. C) Control LL-37. D) LL-37 + Kanamicina-PEG. E) LL-37 + BMV-Kanamicina-PEG.

En la Tabla 15 se muestran los conteos de UFC por condición probada, donde se reitera la actividad del tratamiento 24 horas después de su aplicación.

Tabla 15. Susceptibilidad antimicrobiana a 0, 6 y 24 horas de tratamiento.				
	Ensayo	UFC 0 horas	UFC 6 horas	UFC 24 horas
A	Control PBS	Incontable	Incontable	Incontable
B	Control Kanamicina-PEG	Incontable	Incontable	Incontable
C	Control LL37 (20 µg)	Incontable	174 ± 69	0
D	LL37 + Kanamicina-PEG	Incontable	133.5 ± 33	0
E	LL37 + BMV-Kanamicina-PEG	Incontable	377.5 ± 377.36	304.5 ± 19

Capítulo 7. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en los experimentos anteriormente descritos, es posible determinar que la interacción de un péptido antimicrobiano utilizado en conjunto con un antibiótico puede potenciar el efecto antimicrobiano de las moléculas a comparación de su uso por separado. Así mismo, el uso de nanovehículos de envío, tal como el propuesto mediante una partícula viral evita la interferencia de la actividad del péptido y el antibiótico que puede ser dada por interacciones electrostáticas entre las moléculas. De igual manera, la pegilación de antibióticos tiene un efecto similar.

Para caracterizar apropiadamente el sistema, es importante continuar con análisis de susceptibilidad a diferentes tiempos, así como estudios sobre los efectos continuos que el sistema provoca en la membrana plasmática de los microorganismos a tratar. Esto brindará mayor información sobre el sistema propuesto en este trabajo de investigación y que permitirá determinar un futuro uso clínico.

Capítulo 7. Referencias

- [1] Ventola, C. 2015. *The Antibiotic Resistance Crisis*. Pharmacy and Therapeutics. Vol. 4. No. 4. 277-283.
- [2] Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., Harbarth, S., Hindler, J., Kahlmeter, G. 2012. *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clin. Microbiol. Infect.; 18: 268–281.
- [3] Resistencia a los antimicrobianos. 2016. Consultado el 15 de junio de 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- [4] Antimicrobial resistance. 2017. Consultado el 23 de junio de 2017, de <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- [5] Téllez, G., Castaño, J. 2010. Infectio.; 14(1): 55-67
- [6] Schluesener, H. *et. al.* 2012. Antimicrobial peptides in the brain: neuropeptides and amyloid. *Frontiers in Bioscience S4*. pp. 1375-1380.
- [7] Noore, J. *et. al.* 2013. Cationic Antimicrobial Peptide LL-37 Is Effective against both Extra-and Intracellular *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. pp. 1283-1290.
- [8] Chen, X. *et. al.* 2005. Synergistic effect of antibacterial agents human δ -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Dermatological Science*. pp. 123–132.
- [9] Yoo, J. *et. al.* 2011. *Nature Reviews*. Vol. 10. pp. 521-535.
- [10] Kristensen, M. *et. al.* 2016. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 185.
- [11] Ahlquist, P. 1992. *Bromovirus RNA replication and transcription*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 71–76.
- [12] Annamalai, P. and Rao, A.L. 2006. *Packaging of brome mosaic virus subgenomic RNA is functionally coupled to replication-dependent transcription and translation of coat protein*. *J. Virol.* 80, 10 096–10 108.
- [13] Cuillel, M., Jacrot, B. and Zulauf, M. 1981. *A T = 1 capsid formed by protein of brome mosaic virus in the presence of trypsin*. *Virology*, 110, 63–72.
- [14] Bancroft, J.B. and Hiebert, E. 1967. *Formation of an infectious nucleoprotein from protein and nucleic acid isolated from a small spherical virus*. *Virology*, 32, 354–356.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*. M07-A9. Vol. 32 No. 2, 17-18.
- [16] *Nucleic Acids Res.* 2005 ; 33(17): 5677–569
- [17] Dürr, U., Sudheendra, U., Ramamoorthy, A. 2006. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. Volume 1758, Issue 9, 1408–1425.