



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS GENÉTICAMENTE CODIFICADAS CON  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA SELECTIVA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:  
DANIEL MARTÍNEZ FLORES**

**TUTOR PRINCIPAL  
DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ (IFC, UNAM)**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE (IIB, UNAM)  
DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN (IIB, UNAM)**

**Ciudad de México. agosto, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

CGEP/PMDCB/756/2020  
Asunto: jurado de examen

**Martínez Flores Daniel**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 20 de abril del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Desarrollo de nanopartículas genéticamente codificadas con actividad biológica selectiva**", dirigida por el/la Dr(a). **Vaca Domínguez Luis Alfonso**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Fernández Velasco Daniel Alejandro
VOCAL	Bustos Jaimes Ismael
VOCAL	Hernández García Armando
VOCAL	Gevorgyan Markosian Gohar
SECRETARIO	Palomares Aguilera Laura Alicia

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de abril de 2020



**Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez**  
**COORDINADORA**

contacto: mdcbq@posgrado.unam.mx Tel.: 5623 7006

## **Agradecimientos**

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y al Instituto de Fisiología Celular, por brindarme la oportunidad de pertenecer a la máxima casa de estudios de México, así como a una de las mejores facultades e institutos de México y el mundo.

Al Dr. Luis A. Vaca Domínguez, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación. Además, por todo el tiempo, apoyo y motivación que ha dedicado en formar un profesional con grandes metas y aspiraciones.

A los doctores, Dr. Daniel A. Fernández, Dr. Ismael Bustos, Dr. Armando Hernández, Dra. Gohar Gevorgyan y la Dra. Laura A. Palomares, por sus valiosos comentarios y correcciones que ayudaron para mejorar esta tesis.

A todos los miembros del laboratorio 126-Nte, por brindarme su apoyo en el laboratorio, a mejorar este trabajo de investigación y por su amistad. A la Dra. Alicia Sampieri, de quién obtuve muchos de los conocimientos teórico-prácticos para realizar esta tesis. A Jesús Zepeda, Adolfo Cruz, Margarita Rosendo y Efraín, por sus valiosos consejos, que sin duda ayudaron a mejorar este trabajo de investigación. A la Sra. Salustia, por su amistad y por brindarme el material de laboratorio necesario y en perfectas condiciones para poder realizar los experimentos de esta tesis.

A todo el personal del Instituto de Fisiología Celular, quienes son muestra de que la ciencia requiere de un esfuerzo colectivo de todos sus miembros.

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas y su personal administrativo, por brindarme todas las facilidades y atención cuando más se requería.

Al Consejo Nacional de Ciencia Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó para la realización de mis estudios de maestría y el desarrollo de este proyecto.

## **Dedicatoria**

---

A mis padres:

Teresa Flores Sánchez y

Jerónimo Martínez Juárez.

A mi hermana Jessica Martínez Flores.

Por su amor y apoyo incondicional.

## Abreviaturas

---

**AcMNPV:** *Autographa californica múltiple Nucleopolyhedrovirus*

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**BmNPV:** Virus de la poliedrosis nuclear múltiple *Bombyx mori*

**BV:** Virus de gemación (budded virus)

**CF:** Contraste de fases

**CO:** Cuerpos de oclusión

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EGFP:** Proteína verde fluorescente mejorada (enhanced green fluorescent protein)

**GVs:** Granulovirus

**HA:** Hemaglutinina

**kDa:** KiloDalton

**lef-8 (9):** Factor de expresión tardía (late expression factor)

**MNPV:** Multiplenucleopoliedrovirus

**MOI:** Multiplicidad de infección

**NA:** Neuraminidasa

**NP:** Nanopartículas

**NPVs:** Nucleopoliedrovirus

**ODV:** Virus derivado de oclusión (occlusión-derived virus)

**OpMNPV:** Virus de la poliedrosis nuclear múltiple *Orgyia pseudotsugata*

**ORF:** Marco de lectura abierto (open reading frame)

**p10:** Promotor del gen p10 de baculovirus

**PCL:** Policaprolactona

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)

**PCV2:** Circovirus porcino tipo 2 (porcine circovirus 2)

**PDB:** Banco de datos de proteínas (Protein data bank)

**PEI:** Polietilamina

**PH(# - #):** región de la proteína poliedrina (#: aminoácido)

**pH:** Potencial de hidrógeno

**PLA:** Ácido poliláctico

**PLGA:** Ácido poli (láctico-co-glicólico)

**P<sub>PH</sub>:** Promotor de poliedrina

**PHWT:** poliedrina wild type

**SAP:** Péptido autoagregable (self-aggregating peptide)

**SNPVs:** Individual nucleopoliedrovirus (single nucleopoliedrovirus)

**SVEB:** Sistema vector de expresión de baculovirus

**TCID:** Dosis media infectiva en cultivo celular

**TCLD:** Dosis media letal en cultivo celular

**Tn7L:** Transposon 7 izquierdo (left)

**Tn7R:** Transposon 7 derecho (right)

**ufp/cel:** Unidades formadoras de placa por célula.

**VLP:** Partículas tipo virus (virus-like particles)

**WT:** Tipo salvaje (wild type)

**6- $\beta$ -16 $\alpha$**  : Estructura básica de autoagregación formada por 6 aminoácidos hidrofóbicos en una hebra- $\beta$  seguida por 16 aminoácidos de una hélice- $\alpha$ .

---

# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1.1 Nanopartículas .....	<b>8</b>
1.1.1 Nanopartículas de proteínas autoagregables .....	<b>10</b>
1.1.2 Péptidos autoagregables (SAPs). .....	<b>11</b>
1.2 Baculovirus .....	<b>13</b>
1.2.1 Clasificación.....	<b>13</b>
1.2.2 Fenotipos y ciclo de infección de baculovirus.....	<b>15</b>
1.2.3 Sistema vector de expresión de baculovirus .....	<b>16</b>
1.3 Cuerpos de oclusión y poliedrina .....	<b>17</b>
1.3.1 Otros cuerpos de oclusión.....	<b>18</b>
1.3.2 Poliedrina.....	<b>19</b>
1.3.3 Aplicaciones biotecnológicas .....	<b>21</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>24</b>
2.1 Regiones de autoagregación de poliedrina y vacunas particuladas subunitarias. ...	<b>24</b>
2.2 Unidad mínima de autoagregación de poliedrina: PH(81-110) .....	<b>25</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>29</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>30</b>
5.1 Objetivos particulares.....	<b>30</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
6.1 Diseño de péptidos con base en el motivo estructural $6\beta$ - $16\alpha$ de PH(81-110). .....	<b>31</b>
6.2 Predicción de estructura secundaria de péptidos .....	<b>32</b>
6.3 Construcción de baculovirus recombinantes .....	<b>32</b>
6.4 Amplificación y purificación de plásmidos de clonación y transferencia .....	<b>34</b>
6.5 Líneas celulares de insecto y baculovirus .....	<b>35</b>
6.6 Transfección y amplificación de baculovirus recombinantes .....	<b>35</b>
6.7 Titulación de stocks de baculovirus.....	<b>36</b>
6.8 Expresión de proteínas recombinantes en células de insecto Sf-9.....	<b>36</b>
6.9 Visualización de células Sf-9 mediante microscopia confocal .....	<b>37</b>
6.10 Reconstrucción 3D de partículas.....	<b>37</b>
6.11 Análisis estadístico.....	<b>37</b>
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>

7.1 Péptidos con estructura 6 $\beta$ -16 $\alpha$ .....	38
7.2 Péptido 1 con estructura 6 $\beta$ -16 $\alpha$ tiene capacidades de autoagregación para formar partículas .....	39
7.3 El perfil hidrofóbico de la estructura hélice- $\alpha$ difiere entre el péptido autoagregable y los péptidos no autoagregables .....	41
7.4 Alterar el perfil hidrofóbico de la hélice- $\alpha$ de los péptidos modifica su capacidad de autoagregación.....	43
7.5 Tamaño de las partículas de péptidos 1, 4.1 (27A $\Delta$ K) y péptidos de poliedrina .....	45
7.6 El péptido 1 y 4.1 (27A $\Delta$ K) forman partículas en al menos 90% de las células .....	46
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>9. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>54</b>

## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Clasificación de baculovirus con base en el número de cápsides virales por envoltura en CO.....	<b>14</b>
<b>Figura 2.</b> Representación gráfica y TEM de fenotipos bifásicos de baculovirus AcMNPV.....	<b>15</b>
<b>Figura 3.</b> Ciclo de infección de baculovirus.....	<b>16</b>
<b>Figura 4.</b> Método resumido para la elaboración de baculovirus recombinantes.....	<b>17</b>
<b>Figura 5.</b> Poliedrinas de cypovirus.....	<b>19</b>
<b>Figura 6.</b> Estructura de la proteína poliedrina y modo de autoensamblaje	<b>20</b>
<b>Figura 7.</b> Identificación de los fragmentos mínimos de autoagregación de la proteína poliedrina de AcMNPV.....	<b>24</b>
<b>Figura 8.</b> Unidad mínima de autoagregación PH <sub>(81-110)</sub> .....	<b>26</b>
<b>Figura 9.</b> Propiedades estructurales de PH <sub>(81-110)</sub> .....	<b>27</b>
<b>Figura 10.</b> Diseño de péptidos.....	<b>31</b>
<b>Figura 11.</b> Estrategia de clonación para péptidos basados en la unidad mínima de autoagregación Ph <sub>(81-110)</sub> .....	<b>34</b>
<b>Figura 12.</b> Péptidos diseñados con base en la estructura secundaria 6β-16α de PH <sub>(81-110)</sub> .....	<b>38</b>
<b>Figura 13.</b> Evaluación de autoagregación de péptidos.....	<b>40</b>
<b>Figura 14.</b> Propiedades hidrofóbicas difieren entre péptidos autoagregables y no autoagregables.....	<b>42</b>
<b>Figura 15.</b> Una mutación de aminoácido que altere el perfil hidrofóbico de la hélice-α de los péptidos modifica su capacidad de autoagregación.	<b>44</b>
<b>Figura 16.</b> Evaluación de autoagregación de péptidos.....	<b>46</b>
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de células con partículas formadas por cada uno de los péptidos-EGFP.....	<b>47</b>

---

## Índice de tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Aplicaciones de poliedrina como proteína de fusión en proteínas recombinantes.....	<b>22</b>
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de a.a. y oligonucleótidos de péptidos.....	<b>33</b>

## RESUMEN

El desarrollo e investigación de nuevas tecnologías basadas en materiales autoagregables de tamaño nanométrico, es un área en expansión que ha ganado protagonismo por sus aplicaciones en áreas como la medicina. Los biomateriales como péptidos y proteínas autoagregables han tenido gran aceptación, por ejemplo, para ser empleados como acarreadores de antígenos en vacunas, sistemas de entrega de fármacos o sistemas de andamiaje en ingeniería de tejidos. Existen diversas estrategias para su diseño y desarrollo, algunas consisten en emplear proteínas y péptidos autoagregables (SAPs) de origen natural o inspirarse en ellos para realizar nuevos diseños.

Nuestro grupo ha estudiado la proteína poliedrina de baculovirus, capaz de autoagregarse para formar estructuras conocidas como cuerpos de oclusión (CO) o poliedras, en las que viriones de baculovirus se ocluyen y se mantienen en estado infeccioso durante un tiempo indefinido. En el grupo de investigación se identificó que los primeros 110 aminoácidos de la proteína poliedrina, nombrados como PH<sub>(1-110)</sub>, mantienen su capacidad para autoagregarse y formar estructuras tipo poliedra, visibles mediante microscopia confocal de fluorescencia cuando se fusiona PH<sub>(1-110)</sub> a la proteína verde fluorescente (GFP). La proteína de fusión GFP no impide la agregación de PH<sub>(1-110)</sub>, las partículas PH<sub>(1-110)</sub>-GFP son fácilmente purificables por centrifugación y al almacenarse a temperatura ambiente, mantienen la estabilidad de la GFP fusionada, además incrementan notablemente la inmunogenicidad de GFP cuando se inmunizan en ratones.

Recientemente, identificamos una unidad mínima de autoagregación de poliedrina que comprende la región del aminoácido 81 a 110, a la que llamamos péptido PH<sub>(81-110)</sub>. La capacidad de PH<sub>(81-110)</sub> para autoagregarse nos motivó a explorar los determinantes de su autoagregación y contribuir al diseño de nuevos SAPs. En esta investigación exploramos la posibilidad de que la estructura secundaria fuese la principal determinante de la autoagregación de PH<sub>(81-110)</sub>. El análisis *in silico* de la estructura secundaria sugiere que PH<sub>(81-110)</sub> se compone de una hebra- $\beta$  de 6 aminoácidos, seguida por una hélice- $\alpha$  de 16 aminoácidos, estructura a la que

llamamos motivo  $6\beta$ - $16\alpha$ . Como método experimental diseñamos una serie de péptidos que conservaran la estructura secundaria  $6\beta$ - $16\alpha$ , pero con secuencias de aminoácidos no relacionadas a poliedrina. Dichos péptidos fueron expresados y visualizados en células de insecto Sf-9 como una proteína de fusión a GFP y con ello poder evaluar su capacidad de autoagregación mediante la formación de partículas visibles.

Como resultado, realizamos el diseño y construcción recombinante de 4 péptidos  $6\beta$ - $16\alpha$  fusionados a GFP. El péptido 1 fue capaz de formar agregados visibles tipo partícula, lo cual no se observó para los péptidos 2, 3 y 4. Exploramos si la hidrofobicidad de las estructuras secundarias era un factor diferencial de la autoagregación de los péptidos  $6\beta$ - $16\alpha$ . Mediante una mutación de aminoácido alteramos el perfil hidrofóbico de la hélice- $\alpha$  del péptido 1, ocasionando la pérdida de su capacidad para formar partículas. Por el contrario, modificar el perfil hidrofóbico de la hélice- $\alpha$  del péptido 4, por un perfil similar al del péptido 1, ocasionó que adquiriera la capacidad para formar partículas. Realizamos la reconstrucción 3D de las partículas del péptido 1 y hallamos que estas tenían una distribución polidispersa respecto a su tamaño, semejante a lo observado con PH<sub>(81-110)</sub>, así como con otros fragmentos de poliedrina ya reportados. Por otra parte, el péptido 4 mutado formaba partículas visualmente monodispersas de pequeño tamaño, respecto a los demás péptidos.

Como conclusión de mi trabajo de Maestría, hallamos que no todos los péptidos con predicción de estructura  $6\beta$ - $16\alpha$  son capaces de autoagregarse para formar partículas, sin embargo, sugerimos que el perfil hidrofóbico de las estructuras secundarias es una propiedad diferencial entre los péptidos  $6\beta$ - $16\alpha$ , autoagregables y no autoagregables. Este perfil hidrofóbico podría caracterizarse por la alternancia de grupos pares o triplete de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en la estructura hélice- $\alpha$ , sin embargo, será necesario investigar más acerca de su organización y participación en la autoagregación de los péptidos  $6\beta$ - $16\alpha$ . Esperamos que en un futuro podamos realizar el diseño y desarrollo de SAPs con propiedades semejantes a las observadas en los fragmentos autoagregables de poliedrina.

## ABSTRACT

The development and research of new technologies based on nano-sized self-aggregating materials is an area in constant expansion that has gained prominence due to its applications in areas such as medicine. Biomaterials such as self-aggregating peptides and proteins have been widely accepted, for example, to be used as antigen carriers in vaccines, drug delivery systems, or scaffold systems in tissue engineering. There are various strategies for its design and development, some consist of using proteins and self-aggregating peptides (SAPs) of natural origin or being inspired by them to carry out new designs.

Our group has studied the baculovirus polyhedrin protein, capable of self-aggregating to form structures known as occlusion bodies, or polyhedra, in which baculovirus virions are occluded and remain in an infectious state for an indefinite time. In the research group, it was identified that the first 110 amino acids of the polyhedrin protein, named as PH(1-110), maintain their ability to self-aggregate and form polyhedra-like structures, visible by confocal fluorescence microscopy when PH(1-110) is fused to green fluorescent protein (GFP). The GFP fusion protein does not prevent the aggregation of PH(1-110), the PH(1-110)-GFP particles are easily purifiable by centrifugation and when stored at room temperature they maintain the stability of the fused GFP, and they also notably increase the GFP immunogenicity when immunized in mice.

Subsequently, we identify a minimal polyhedrin self-aggregating unit comprising the region from amino acid 81 to 110, which we call peptide PH(81-110). The ability of PH(81-110) to self-aggregate motivated us to explore the determinants of its self-aggregation and contribute to the design of new SAPs. In this research we explored the possibility that the secondary structure was the main determinant of the self-aggregation of PH(81-110). The *in silico* analysis of the secondary structure suggests that PH(81-110) is composed of a 6 amino acid  $\beta$ -strand, followed by a 16 amino acid  $\alpha$ -helix, which we call the 6 $\beta$ -16 $\alpha$  motif. As an experimental method, we designed a series of peptides that conserved the 6 $\beta$ -16 $\alpha$  secondary structure, but with amino acid sequences not related to polyhedrin. Said peptides were expressed and visualized in Sf-9 insect cells as a

GFP fusion protein, to evaluate their capacity for self-aggregation through the formation of visible particles.

As a result, we carried out the design and recombinant construction of 4 peptides 6 $\beta$ -16 $\alpha$ , fused to GFP. Peptide 1 was able to form visible particle-like aggregates, which was not observed for peptides 2, 3 and 4. We explored whether the hydrophobicity of the secondary structures was a differential factor of the self-aggregation of peptides 6 $\beta$ -16 $\alpha$ . Through an amino acid mutation, we altered the hydrophobic profile of the  $\alpha$ -helix of peptide 1, causing the loss of its ability to form particles. On the contrary, modifying the hydrophobic profile of the  $\alpha$ -helix of peptide 4, by a profile similar to that of peptide 1, caused it to acquire the ability to form particles. When performing the 3D reconstruction of the peptide 1 particles, we found that they had a polydisperse distribution with respect to their size, similar to that observed with PH(81-110), as well as with other previously reported polyhedrin fragments. On the other hand, the mutated peptide 4 formed visually monodisperse particles of small size with respect to the other peptides.

As a conclusion of my Master's work, we found that not all peptides with predicted 6 $\beta$ -16 $\alpha$  structure are capable of self-aggregating to form particles, however, we suggest that the hydrophobic profile of secondary structures is a differential property between the 6 $\beta$ -16 $\alpha$  peptides, self-aggregating and not self-aggregating. This hydrophobic profile could be characterized by the alternation of pairs or triplets of hydrophobic and hydrophilic amino acids in the  $\alpha$ -hélix structure, however, it will be necessary to investigate more about their participation in the self-aggregation of peptides 6 $\beta$ -16 $\alpha$ . We hope that in the future we will be able to carry out the design and development of SAPs, with properties similar to those observed in self-aggregating polyhedrin fragments.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

La nanotecnología representa una área de investigación en expansión, que involucra estructuras, dispositivos y sistemas con propiedades y funciones novedosas al observar, medir, manipular, ensamblar, controlar y fabricar materia a escala nanométrica, es decir, con un rango de tamaño entre 1 y 1000 nm (Bayda et al., 2019). El desarrollo de estas nuevas tecnologías basadas en materiales de tamaño nanométrico ha tomado gran relevancia como una área activa de investigación y un sector tecnológico en constante expansión con múltiples áreas de aplicación.

Los nanomateriales han ganado protagonismo en avances tecnológicos debido a que sus propiedades físicas, químicas y biológicas son ajustables y predecibles, permitiendo modificar su tamaño, forma y propiedades de interacción, lo cual resulta fundamental cuando se busca controlar su actividad. Los nanomateriales han demostrado aplicaciones potenciales en áreas como la industria alimenticia, agricultura y ciencias ambientales (Khalid et al., 2020), sin embargo, su aplicación en medicina ha destacado como uno de los principales campos, al ser efectivos cuando se emplean en el desarrollo de plataformas acarreadoras de antígenos en vacunas (Deng & Wang, 2018; Zhao et al., 2014), sistemas de liberación de fármacos que mejoren su biodisponibilidad y menor toxicidad (Bhatia, 2016), así como plataformas en ingeniería de tejidos (Shi et al., 2010).

Los nanomateriales pueden ser clasificados con base en su composición, por ejemplo, nanomateriales inorgánicos con base en polímeros sintéticos y metales, o bien, biomateriales como ácidos nucleicos (ADN y ARN), lípidos, carbohidratos y proteínas o péptidos. También se pueden clasificar con base en su dimensión, como nanofibras, nanotubos y nanopartículas (NP), entre otros (Deng & Wang, 2018; Jeevanandam et al., 2018).

## 1.1 Nanopartículas

Las nanopartículas han sido ampliamente estudiadas y empleadas en desarrollos tecnológicos en nanomedicina. Sus propiedades estructurales resultan ideales para el desarrollo de sistemas acarreadores de fármacos encapsulados o conjugados en su superficie, o bien, para el desarrollo de sistemas de encapsulación y fusión de antígenos de interés para el desarrollo de vacunas particuladas de tipo subunitario. La formación de NP puede depender de diversos factores, dentro los que destacan los bloques de construcción empleados para su desarrollo (Lee et al., 2019).

### *Nanopartículas de polímeros*

Las NP basadas en polímeros son generalmente partículas coloidales de tamaño entre 10 a 500 nm, basados en materiales sintetizados químicamente como ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL) y materiales poliméricos naturales, como quitosano, celulosa, almidón y alginato. Han demostrado tener múltiples aplicaciones biomédicas, ya que pueden ser usadas para el transporte de agentes terapéuticos encapsulados en la matriz polimérica, o bien conjugados en la superficie. (Han et al., 2018; Mahapatro & Singh, 2011; Su & Kang, 2020).

Las NP de polímeros tienen múltiples ventajas, como liberación controlada de las moléculas bioactivas, son modificables por acción química, propiedades de superficie y tamaño controlables, no son inmunogénicas y los derivados de su degradación son biocompatibles. Sin embargo, presentan desventajas como inestabilidad, fragilidad incrementada, múltiples etapas de procesamiento y una baja eficiencia de encapsulación, que se traduce en una baja capacidad de carga (Su & Kang, 2020). Estas desventajas resultan en una industrialización limitada que requiere de altos costos de producción y proceso de manufactura no escalable en ocasiones.

### *Nanopartículas de metales*

Las NP de metales son estructuras rígidas, pobremente biodegradables, y generalmente tóxicas, sin embargo, su forma y tamaño pueden ser controlados mediante el ajuste de la tasa de difusión y deposición en superficie (Deng & Wang, 2018). Las NP de oro han demostrado ser uno de los nanomateriales más prometedores, ya que sus ventajas como no toxicidad, biocompatibilidad, fácil fabricación, así como la posibilidad de realizar modificaciones de superficie, han demostrado ser útiles en el desarrollo de sistemas acarreadores de antígenos en vacunas. Por ejemplo, nanopartículas de oro conjugadas en su superficie con los antígenos hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) del virus de la influenza. Sin embargo, su costo de producción resulta muy elevado, un factor limitante para su ingreso en la industria (Wang et al., 2017, 2018).

### *Nanopartículas: Partículas tipo virus (VLPs)*

Las partículas tipo virus (VLPs por sus siglas en inglés de Virus Like Particles), representan una tecnología ampliamente aceptada por su seguridad, eficacia y rentabilidad. Las VLPs son nanopartículas proteicas naturales que imitan la estructura de cápsides virales sin contener el genoma viral, por lo que no son patogénicas o infecciosas, además resultan en estructuras de auto ensamblaje con una estructura perfectamente definida, estable, biocompatible, homogénea y de baja toxicidad (Ding et al., 2018).

Las VLP han demostrado ser útiles como sistemas de entrega de fármacos (Hill et al., 2017; Zdanowicz & Chroboczek, 2016), pero su aplicación más destacada consiste en el desarrollo de sistemas acarreadores de antígenos para el desarrollo de nuevas y mejores vacunas con una alta efectividad (Donaldson et al., 2018; Gerety, 1983; Qian et al., 2020). A pesar de la efectividad del uso de VLPs en aplicaciones médicas, enfrentan desafíos significativos en su traducción de modelos de laboratorio a la administración clínica de rutina, ya que algunos sistemas VLP suelen encontrarse protegidos intelectualmente por instituciones públicas o privadas (Donaldson et al., 2018).

### **1.1.1 Nanopartículas de proteínas autoagregables**

Las proteínas son posiblemente los bloques de construcción más versátiles de la naturaleza, responsables de la complejidad estructural y funcional de la vida, con una gran variedad de mecanismos de autoagregación y ensamblaje en arquitecturas de múltiples niveles. Entre las diferentes arquitecturas, los microtúbulos (Roostalu, 2017), capas superficiales bacterianas, cápsidas virales (Qian et al., 2020) o cuerpos de oclusión (Ji et al., 2010), son tan solo algunos ejemplos.

La construcción de arquitecturas supramoleculares con base en proteínas, ha tenido mayores dificultades, en comparación con aquellos nanomateriales basados en ADN, ARN, polímeros sintéticos, polímeros naturales y metales, esto se debe a la heterogeneidad química, el gran tamaño molecular y la complejidad de las interacciones proteína-proteína. Sin embargo, el incremento constante en la comprensión de los mecanismos que guían el plegamiento de proteínas, ha permitido avanzar de forma significativa en el desarrollo de nuevos péptidos y proteínas con capacidades predefinidas como la autoagregación, así como en sus aplicaciones biomédicas (Rad-Malekshahi et al., 2016).

El diseño de nuevas proteínas con propiedades de autoagregación predefinidas puede ser una tarea compleja, tomando en cuenta la necesidad predecir la formación de motivos de autoagregación a nivel de estructura secundaria, su plegamiento para la formación de una estructura terciaria y las interacciones de subunidades proteicas para formar una estructura cuaternaria autoagregable y funcional. Como solución, muchas proteínas con capacidades de autoagregación pueden servir como fuente de inspiración para la química supramolecular de NP, proporcionando plantillas de diseño para la construcción de nuevos o mejorados nanomateriales (Yang et al., 2016). Por tanto, la búsqueda de secuencias cortas de aminoácidos presentes en proteínas naturales con capacidad de autoagregarse, resulta una alternativa atractiva para el diseño de nuevos péptidos autoagregables, con amplias ventajas sobre el diseño de grandes proteínas autoagregables.

### 1.1.2 Péptidos autoagregables (SAPs).

Es común que en la literatura el término SAP haga referencia a péptidos autoensamblables (Self-assembling peptides) y muy pocas veces a péptidos autoagregables (Self-aggregating peptides). Según la IUPAC (2013), en su publicación “Terminology for aggregation and self-assembly in polymer science”, define al autoensamblaje como la “organización espontánea y reversible de entidades moleculares por interacciones no covalentes” e incluye que en el autoensamblaje “se adopta una estructura más organizada a través de interacciones entre los propios componentes”. Por otra parte, define la agregación como “el proceso mediante el cual, moléculas o partículas discretas forman agregados” definiendo a los agregados como “grupos irregulares de moléculas o partículas que de otro modo serían individuales” (Jones et al., 2012).

Entenderemos por péptidos autoagregables (SAPs), a aquellas secuencias cortas de aminoácidos, capaces de organizarse de forma espontánea y reversible hacia estructuras supramoleculares (Habibi et al., 2016). Su capacidad de autoagregación es guiada mediante interacciones no covalentes intra e intermoleculares, tales como: formación de puentes de hidrogeno, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y apilamiento  $\pi$ - $\pi$  (Lakshmanan et al., 2012; Rad-Malekshahi et al., 2016).

Los SAPs han demostrado potencial en el desarrollo de biomateriales y su uso biomédico como sistemas acarreadores de antígenos, administración de fármacos e ingeniería de tejidos. Entre sus ventajas destaca su biocompatibilidad, estructura simple, relativa estabilidad química y física, diversidad en secuencias y formas, así como la factibilidad de sintetizarlos químicamente o a través de sistemas de expresión de proteínas de fusión (Jacob et al., 2015; Rad-Malekshahi et al., 2016).

Diferentes tipos y diseños de SAPs han sido reportados en la literatura, por ejemplo, muchos SAPs derivan de  $\beta$ -amieloides asociados a enfermedades neurodegenerativas, caracterizados por presentarse como agregados de fibras anormales (Ross & Poirier, 2004). Los SAPs  $\beta$ -amieloides se componen de una proteína

con estructura lámina- $\beta$  (Hauser et al., 2011; Ross & Poirier, 2004), capaces de formar fibrillas amiloides a partir de polipéptidos de 30 a 40 aa. Ejemplos de SAPs amiloides son la proteína amiloide Pmel17, responsable de la pigmentación de la piel en mamíferos (Maji et al., 2009), la hormona del crecimiento (Jacob et al., 2016), o también, péptidos derivados del procesamiento de la trombina en humanos (Petrlova et al., 2017). Han sido caracterizados SAPs basados en péptidos anfifílicos con estructuras hebra- $\beta$ , los cuales se caracterizan por tener una cola hidrofóbica, una región hidrofílica y un epítipo funcional (Edwards-Gayle & Hamley, 2017), un ejemplo es el SAP Ac-A<sub>6</sub>K, que forma nanotubos mediante el autoensamblaje de hebras- $\beta$  anfipáticas antiparalelas (Mandal et al., 2014). También es posible hallar SAPs basados en estructuras hélice- $\alpha$ , por ejemplo, Zhou y colaboradores, diseñaron péptidos de 15 aa que fueron capaces de formar nanofibras y micelas a partir de estructuras hélice- $\alpha$  (Zhou et al., 2017), o por ejemplo, péptidos de 6 aa desarrollados por Mishra y colaboradores que son capaces de formar hidrogeles (Mishra et al., 2011).

Una de las estrategias más exitosas, es tomar inspiración de la naturaleza, donde destacan los virus por sus capacidades para formar estructuras ordenadas, necesarias para su replicación o sobrevivencia frente a condiciones naturales (Perlmutter & Hagan, 2015). Grupos de investigación como el del Dr. David Baker, han tenido gran éxito en el diseño y desarrollo de proteínas autoensamblables sintéticas, inspirándose en formas y funciones de proteínas de origen natural como lo son las capsides de virus (Bale et al., 2016; Butterfield et al., 2017; King et al., 2014). El grupo de investigación del Dr. David Baker ha sabido aprovechar las herramientas computacionales como el software Rossetta, desarrollado por su mismo grupo de investigación. Particularmente, nosotros hemos tomado inspiración de un grupo de virus conocido como baculovirus, los cuales han desarrollado estructuras conocidas como cuerpos de oclusión (CO), compuestos en su mayoría por una proteína autoagregable conocida como poliedrina.

## 1.2 Baculovirus

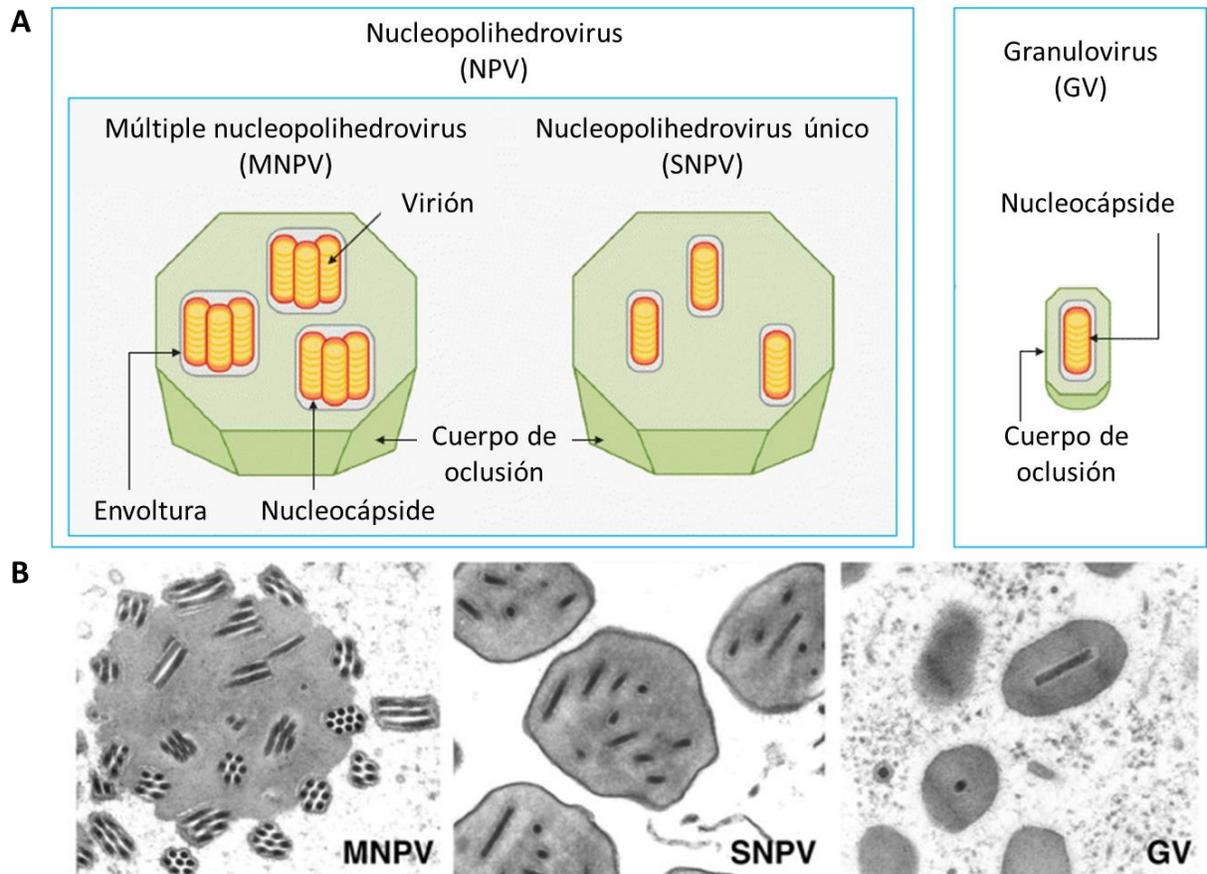
Los baculovirus, pertenecientes a la familia *Baculoviridae*, son virus patógenos de insectos. Su nombre deriva del latín *baculum* que se refiere a las nucleocápsides en forma de bastón características de estos virus (50 x 300 nm) (Blissard & Theilmann, 2018). Poseen un genoma circular de doble cadena en un rango de 80 a 180 Kpb y 90 a 180 marcos de lectura abiertos dependiendo de la especie (“Baculoviridae”, 2012; Herniou & Jehle, 2007; Rohrmann, 2013). Además de tener a insectos como hospederos específicos, los baculovirus son capaces de formar cuerpos de oclusión (CO), dos características a las que deben su amplia investigación y aplicaciones biotecnológicas en biocontrol, vectores de expresión de proteínas, agentes para terapia génica y particularmente en la producción de vacunas (Airenne et al., 2013; Cox, 2012; Felberbaum, 2015; Smith et al., 1983).

### 1.2.1 Clasificación

En la literatura se han descrito más de 600 baculovirus distintos y gracias a la disponibilidad de secuencias completas de genomas (~70) y su análisis filogenético, se reconocen cuatro grandes grupos: Alphabaculovirus (Nucleopoliedrovirus, NPVs) y Betabaculovirus (Granulovirus, GVs) que infectan lepidópteros, y Gammabaculovirus y Deltabaculovirus, los cuales infectan himenópteros y dípteros, respectivamente (Herniou & Jehle, 2007).

Su clasificación se basa principalmente en la comparación de las secuencias de los genes más conservados de los baculovirus, el de la poliedrina y el de la granulina (Rohrmann, 2013), así como de *lef-8* y *lef-9* (factores de expresión tardía) (Jehle et al., 2006). Otra característica importante para la clasificación de baculovirus es la formación y número de nucleocápsides dentro de los CO, ya sea en agregados únicos o de múltiples nucleocápsides dentro de una sola envoltura. Debido a que esta característica es tan distintiva, fue incorporada a la nomenclatura, de modo que NPVs se clasificaron como *Multinucleopoliedrovirus (MNPV)* o *individual nucleopoliedrovirus (SNPVs)* por sus siglas en inglés de *singly Nucleopoliedrovirus* para múltiples cápsides en una envoltura o una sola cápside en una envoltura, respectivamente

(“Baculoviridae”, 2012; Herniou & Jehle, 2007; Valderrama & Villamizar, 2013) (**Figura 1**).

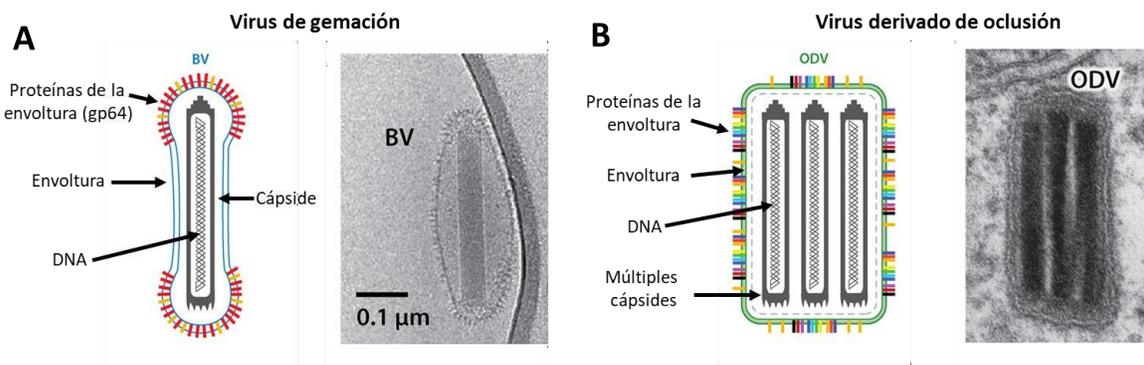


**Figura 1. Clasificación de baculovirus con base en el número de cápsides virales por envoltura en OB. (A)** Representación gráfica de Nucleopoliedrovirus (NPV) y Granulovirus (GV). NPV pueden estar presentes ocluidos en forma de múltiples nucleocápsides (MNPV) o como nucleocápsides únicas (SNPV). GV solo contienen una nucleocápside. **(B)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de MNPV y SNPV ocluidos, así como GV. (Modificado de Lee, Jung, Riu, & Ryu, 2017).

Varios baculovirus del género *Alphabaculovirus* han sido estudiados más intensamente, incluyendo *Autographa californica múltiple nucleopolihedrovirus* (AcMNPV), *Bombyx mori nucleopolihedrovirus* (BmNPV) y *Orgyia pseudotsugata múltiple nucleopolihedrovirus* (OpMNPV).

## 1.2.2 Fenotipos y ciclo de infección de baculovirus

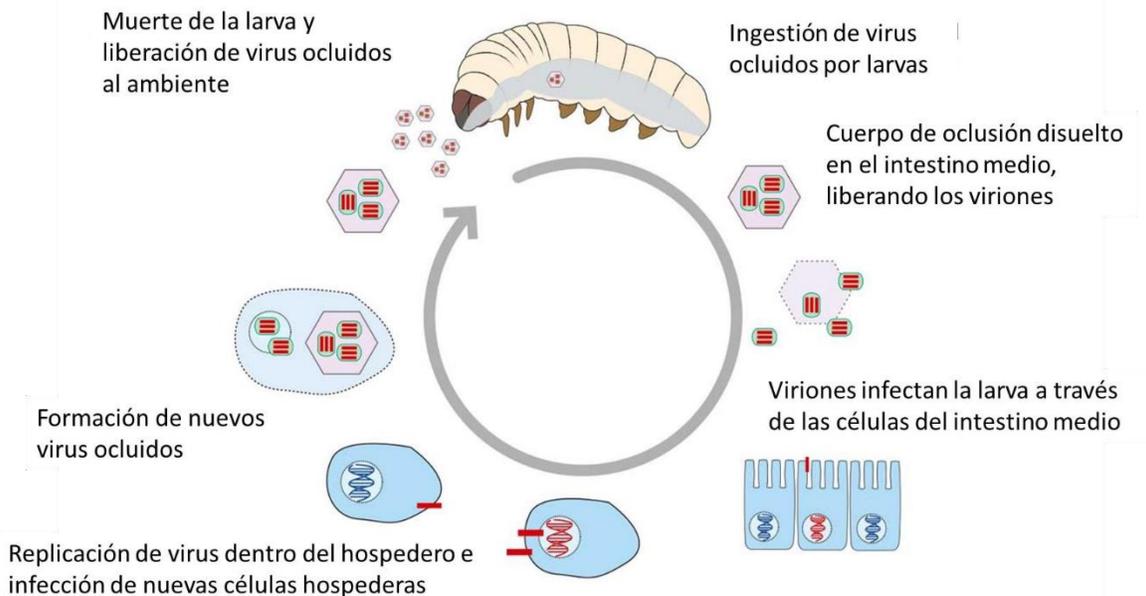
Durante la infección los baculovirus pueden estar presentes como uno de dos fenotipos diferentes. Los dos fenotipos de virión tienen un genoma idéntico, pero se diferencian de su localización en la célula infectada, las proteínas de las envolturas membranales y proteicas, así como el papel que desempeñan dentro del ciclo de infección. Un fenotipo de virión se conoce como virus derivado de oclusión (ODV de oclusión-derived virus) y el segundo fenotipo se conoce como virus gemados (BV de budded virus) (**Figura 2**), nombres asignados de acuerdo a como han sido producidos (Blissard & Theilmann, 2018).



**Figura 2. Representación gráfica y TEM de fenotipos bifásicos de baculovirus AcMNPV. (A)** Virus de gemación donde se muestra una envoltura conteniendo una sola nucleocápside y **(B)** virus derivados de oclusión donde se muestran tres nucleocápsides contenidas en una envoltura (modificado de Blissard & Theilmann, 2018).

La infección primaria del ciclo de infección comienza cuando las larvas de insectos se alimentan de hojas de plantas que contienen en su superficie CO con ODV, los CO migran hasta el intestino medio donde son disueltos por la acción combinada del entorno alcalino (pH 9 a 11) y algunas enzimas proteasas que permiten la liberación de los ODV y posterior infección de las células epiteliales del intestino medio. Después de la infección y replicación de viriones en las células del intestino medio, ocurre la liberación de BV, los cuales brotan de las superficies celulares dirigiéndose hacia el hemocele (el sistema circulatorio abierto del insecto), desencadenando una infección secundaria a nivel sistémico (epitelio traqueal, hemocitos, epidermis, músculo, cuerpo graso, etc.), posteriormente ocurre la producción adicional de viriones que serán

retenidos en el núcleo, envueltos en una membrana nuclear y ocluidos en los CO. El ciclo termina con la licuefacción de la larva mediante la síntesis de quitinasas y catepsina por parte del virus, descomponiendo el exoesqueleto del insecto y liberando los CO (**Figura 3**) (Blissard & Theilmann, 2018).



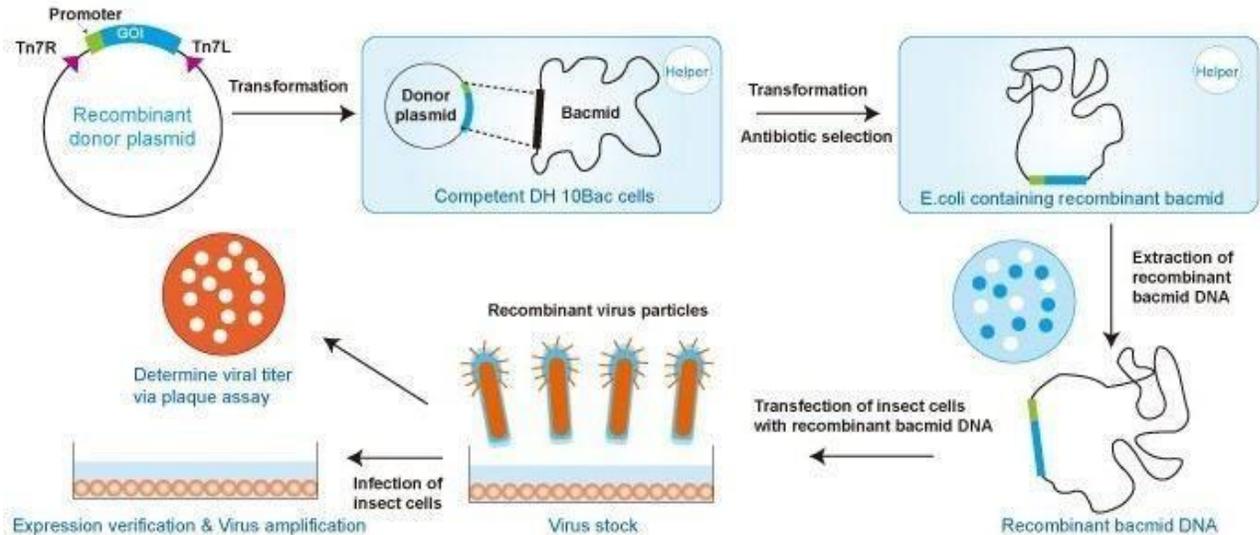
**Figura 3. Ciclo de infección de baculovirus.** Cuerpos de oclusión conteniendo viriones son ingeridos por larvas de insectos. Los cuerpos de oclusión viajan a través del sistema digestivo hasta llegar al intestino medio donde son desensamblados, permitiendo la liberación de los viriones, quienes infectan las células epiteliales del intestino medio. Posteriormente ocurre la replicación de los viriones y ocasionan una infección sistémica. Es en la última etapa del ciclo en la que ocurre un aumento en la expresión de la proteína poliedrina, que se autoagrega para formar los CO y los viriones dentro de estos.

### 1.2.3 Sistema vector de expresión de baculovirus

Los baculovirus han sido ampliamente utilizados para la expresión heteróloga de genes en larvas de insecto o células cultivadas *in vitro*. Hasta el momento se han aislado más de 500 especies diferentes de baculovirus, sin embargo, AcMNPV y BmNPV (Invitrogen, EUA), son los más utilizados.

Las principales ventajas para el uso del sistema vector de expresión de baculovirus, consisten en la facilidad de construir baculovirus recombinantes (**Figura 4**), los altos niveles de expresión de proteínas, así como la capacidad de las células de insecto

para realizar modificaciones postraduccionales de forma similar a como lo harían células de mamífero, por ejemplo, la glicosilación (Palomares et al., 2015).



**Figura 4. Método resumido para el desarrollo de baculovirus recombinantes.** El método consiste en el uso de un vector de transferencia con dos sitios de transposición Tn7R y Tn7L y un promotor de alta expresión (generalmente promotor de poliedrina P<sub>PH</sub>) bajo el cual se clonará el gen de interés, posteriormente la construcción se transpone en un cromosoma artificial bacteriano que contiene el genoma del baculovirus (Bácrido). Por último el bácrido recombinante es purificado y transfectado en células de insecto (p.e. Sf-9), para la generación de baculovirus recombinantes, verificando la expresión de proteína y amplificando los viriones.

### 1.3 Cuerpos de oclusión y poliedrina

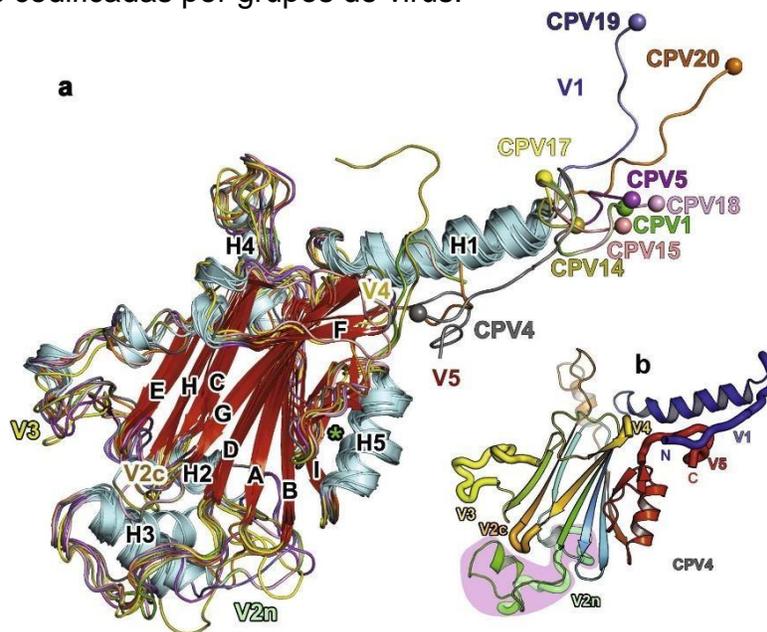
Los baculovirus son virus altamente especializados en la infección de las células intestinales del insecto, superando importantes barreras biológicas, pero también las del medio ambiente. Para ello los CO tienen un papel fundamental en lograr la sobrevivencia de las partículas virales. Los CO son cristales compuestos de proteínas de tipo fibroso, que representan un sistema evolutivamente utilizado por un gran número de virus de insectos. Los viriones se ocluyen en los CO y tienen el objetivo de proteger a los viriones durante largos periodos de exposición ambiental, permitiéndoles mantenerse en estado infeccioso de manera indefinida (Ji et al., 2010).

Estas estructuras cristalinas son altamente estables y resistentes a la solubilización, cumpliendo la función de proteger los ODV de las condiciones ambientales normales. La estabilidad de los ODV en el medio ambiente dependerá de forma crítica si se encuentran o no en los CO (Blissard & Theilmann, 2018; Rohrmann, 2013).

### 1.3.1 Otros cuerpos de oclusión

En contraste con los baculovirus, los cipoovirus de la familia Reoviridae, son un grupo de virus de forma icosaédrica, con genomas segmentados de ARN de doble cadena. Son reconocidos por la formación de OB, conocidos como poliedras, conformados en su mayoría por una proteína también conocida como poliedrina, aparentemente poco emparentada con poliedrina y granulina de baculovirus (Chiu, Coulibaly, & Metcalf, 2012). Sin embargo, las poliedrinas de baculovirus y cipoovirus comparten características destacables a nivel de estructura terciaria y cuaternaria.

Resulta interesante mencionar y de gran aporte para el presente trabajo, que varias proteínas poliedrina de diferentes especies de cipoovirus comparten una estructura secundaria, terciaria y cuaternaria casi idéntica (**Figura 5**). Sin embargo, su secuencia de aminoácidos es diferente en gran medida, lo cual nos hace pensar en la importancia de la estructura secundaria y terciaria en la funcionalidad de las proteínas autoagregables codificadas por grupos de virus.

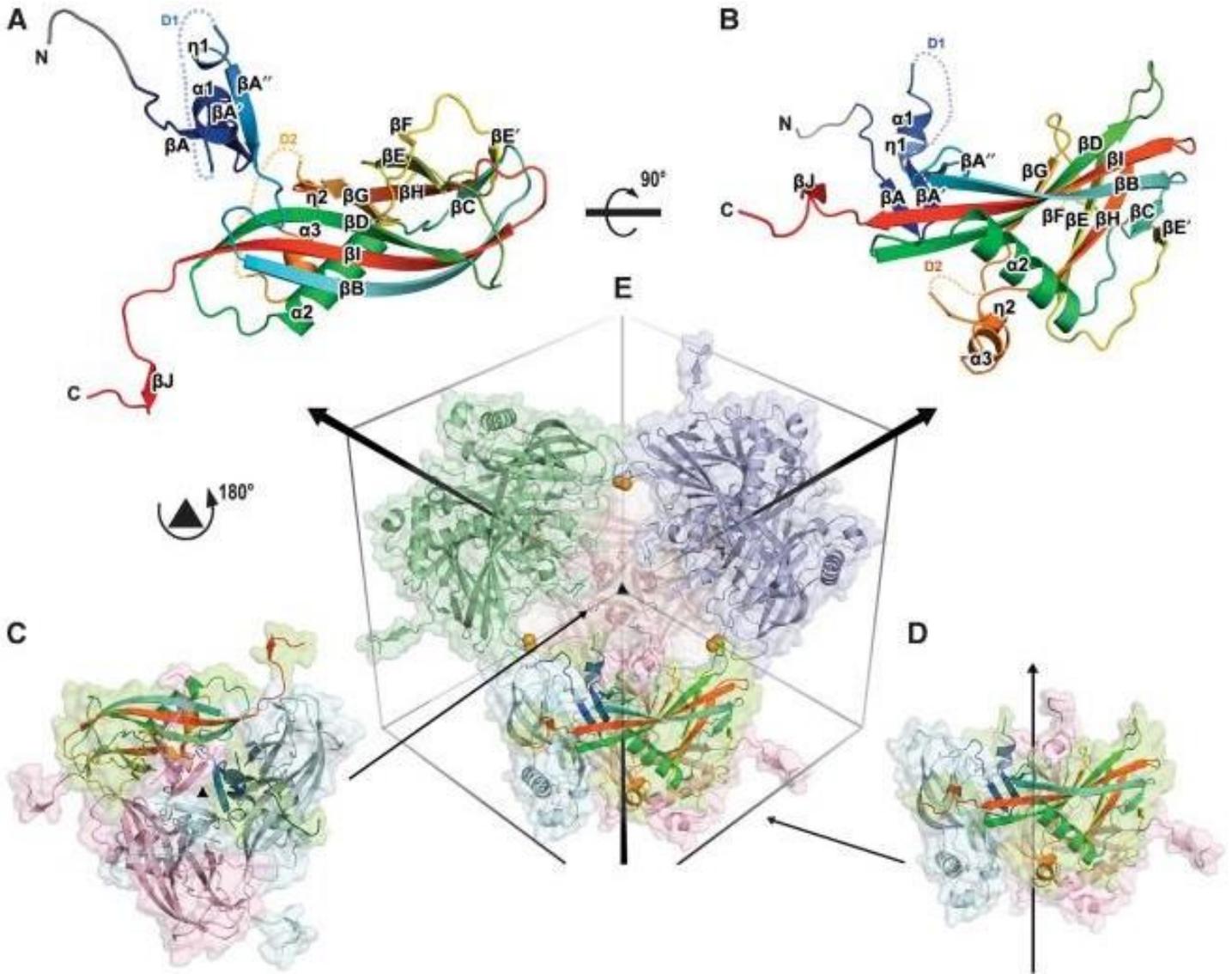


**Figura 5. Poliedrinas de cypovirus.** Alineamiento estructural de 9 proteínas poliedrinas que coinciden en su estructura secundaria y terciaria, con una identidad de secuencia de aminoácidos de tan solo el 12% (Ji et al., 2015).

### 1.3.2 Poliedrina

En la etapa tardía del ciclo de infección de baculovirus, las proteínas conocidas como poliedrina de *Alfabaculovirus* (NPVs) y granulina de *Betabaculovirus* (GVs) se vuelven protagonistas al aumentar drásticamente su nivel de expresión y dar origen a los CO, también conocidos como poliedras (Rohrmann, 2013).

En AcMNPV, uno de los *Alfabaculovirus* más ampliamente estudiados, la proteína silvestre poliedrina es el principal componente de los CO. La poliedrina tiene un tamaño de 245 a.a. y un peso de ~29kDa (PDB: 2WUY) (Jehle et al., 2006; Ji et al., 2010). Se ha determinado que la poliedrina tiene un mecanismo de autoagregación, que consiste en la formación de homotrímeros, coordinados por la región N-terminal, la cual promueve interacciones hidrofóbicas, puentes salinos y enlaces de hidrógeno, capaces de coordinar las tres subunidades. Además, mediante uniones covalentes a través de puentes disulfuro (C132), así como por interacciones electrostáticas de Glu (E216, E218), Arg (R128, R131) y Asn (N130), es capaz de coordinar la unión de cuatro trímeros, reconocida como la estructura supramolecular básica para la construcción de los cuerpos de oclusión de poliedrina WT (Ji et al., 2010) (**Figura 6**).



**Figura 6. Estructura de la proteína poliedrina y modo de autoensamblaje.** A, B. Representación gráfica de una subunidad de la proteína poliedrina de AcMNPV. C, D. Representación de la formación de homotrímeros mediante subunidades de la proteína poliedrina. E. Autoensamblaje de la proteína poliedrina mediante la unión de 4 trímeros unidos por puentes disulfuro (esferas amarillas). El ensamblado mostrado representa el bloque de construcción fundamental para la formación de estructuras tipo poliedra (Ji et al., 2010).

### 1.3.3 Aplicaciones biotecnológicas

Las propiedades intrínsecas de autoagregación de la proteína poliedrina, su alta producción bajo un promotor de alta expresión (P<sub>PH</sub>), su incorporación en el sistema vector de expresión de baculovirus (SVEB) (Jarvis, 2009), la protección a los componentes que se encuentran ocluidos en su matriz, así como su fácil purificación, han hecho de la poliedrina un recurso con amplias aplicaciones biotecnológicas (López et al., 2018).

En un principio los CO (conteniendo viriones) fueron empleados para el control de plagas de insectos en cultivos de hortalizas, con ventajas como la inocuidad a humanos y otros vertebrados, así como su efecto duradero sobre los insectos, demostraron el potencial biotecnológico de los CO (Inceoglu et al., 2001; Moscardi, 1999). Sin embargo, aplicaciones aún más prometedoras acopladas a herramientas de biología molecular, como el desarrollo de proteínas recombinantes, dieron un nuevo giro en el uso biotecnológico de los CO. En 1989, Fraser y colegas (US4870023A), así como McLinden y colaboradores (1992) fueron pioneros en la fusión de proteínas a los CO. Un epítipo de HA de influenza fue fusionado a la proteína poliedrina en diferentes posiciones, destacando la simplicidad del aislamiento de los cuerpos de oclusión recombinantes HA, así como altas concentraciones y pureza de las proteínas de fusión.

En la actualidad existen tres estrategias para la incorporación de proteínas a los CO. 1) Complementación en cis mediante dos unidades de transcripción independientes para la expresión de un gen de fusión a poliedrina bajo el promotor P<sub>ph</sub> y una poliedrina WT bajo el promotor p<sub>10</sub> (Je et al., 2003). 2) Complementación trans mediante la producción al infectar células con dos virus diferentes, uno con la construcción del gen de fusión a poliedrina y el segundo virus con *polwt* (Sampieri, Luz-Madrigal, Zepeda, & Vaca, 2015) y 3) mediante la expresión de fragmentos de poliedrina, por una parte los primeros 150 a.a. de polh y los 95 a.a. restantes fusionados a la proteína de interés, obteniendo poliedras estables (Yang et al., 2017). Con base en esas estrategias, se han propuesto múltiples aplicaciones, p.e. producción y purificación de proteínas, desarrollo de vacunas o sistemas de

diagnóstico (Tabla 1).

**Tabla 1. Aplicaciones de poliedrina como proteína de fusión en proteínas recombinantes.**

Cristales amorfos (AC), Cuerpos de oclusión (OB) (Obtenida y modificada de López et al., 2018).

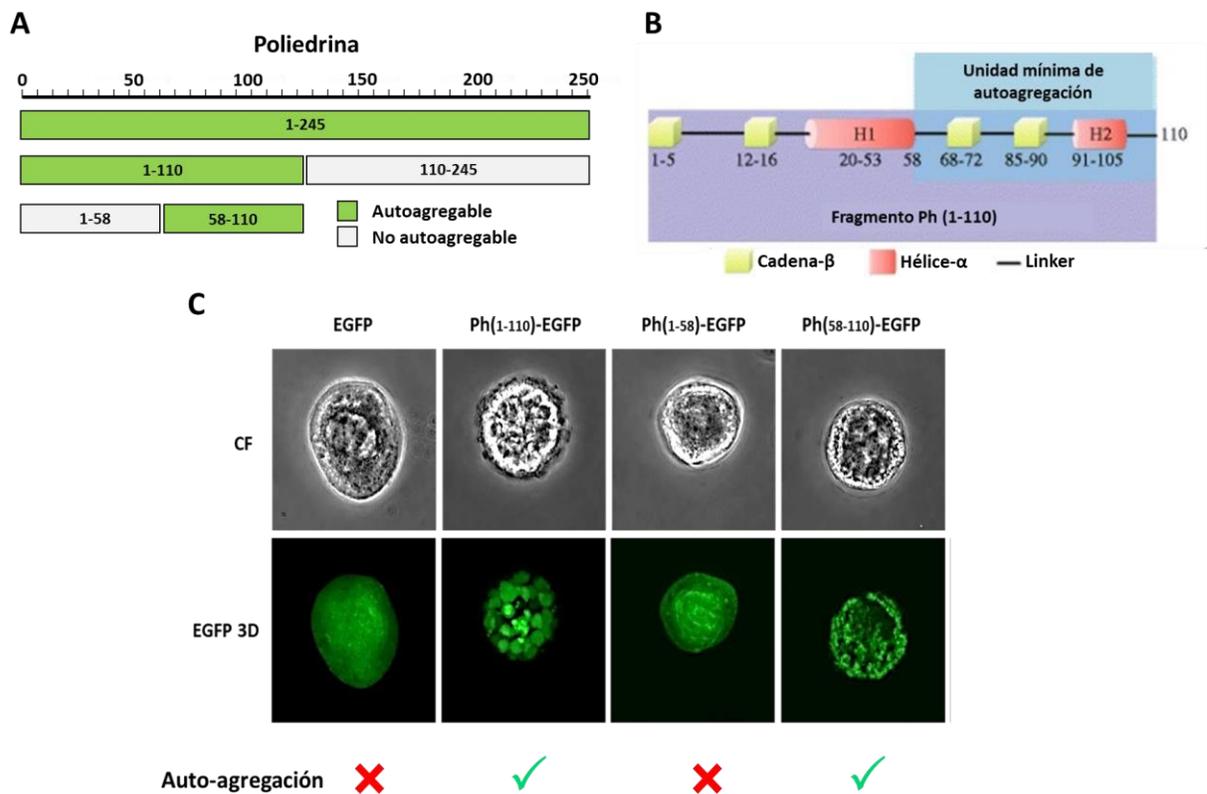
Solicitud	Construcción de proteínas recombinantes			Formación de OB o AC	Anfitrión	Referencia
	Gen de interés	Fusión	Complementación			
Portador de epítomos extranjeros.	$\Delta$ HA of Influenza	Epítomo HA en POLH en diferentes posiciones	No	OB / AC	AcMNPV	McLinden et al. 1992
Producción de proteínas	egfp	POLH-GFP-POLH	No	OB	AcMNPV	Je y col. 2000
Producción de proteínas	egfp	POLH-GFP	POLH en cis y trans	OB	AcMNPV	Je y col. 2003
Producción de proteínas	hrGFP	POLH-hrGFP	No	OB	AcMNPV	Lee et al. 2005
Vacuna contra la enfermedad de pies, manos y bocal	vp1 de FMDV	POLH-VP1	No	OB	AcMNPV	Lee et al. 2005
Producción y purificación de proteínas.	egfp	POLH-GFP	No	AC	AcMNPV	Roh et al. 2010
Producción de proteínas	egfp	$\Delta$ POLH-GFP	No	AC / OB	AcMNPV	Bae et al. 2013
Vacuna contra la peste porcina clásica	E2 de CSFV	$\Delta$ POLH-E2 $\Delta$ TMR	No	No data	AcMNPV	Bae et al. 2013
Diagnóstico del virus del mosaico del ajo.	cp de GarMbFV	Polh-CP	No	AC	AcMNPV	Ardisson-Araujo et al. 2013
Producción de proteínas	egfp	$\Delta$ POLH-GFP y POLH-GFP	en trans / sin complementación	AC / OB	AcMNPV	Sampieri et al. 2015
Diagnóstico de babesiosis bovina	Péptidos de Babesia bovis	POLH-BbAp	POLH en cis / POLH E44G en trans	OB	AcMNPV	Lopez et al. 2018
Producción de proteínas	IGF2	Polh-1-112-IGF2	No	AC	BmNPV	Marumoto y col. 1987
Producción de antígeno de la enfermedad de	gB de PRV	POLH-gB	POLH en cis	OB	BmNPV	Kim et al. 2012

Aujeszky						
Producción de antígeno de la enfermedad de Aujeszky	gC de PRV	POLH-gC	POLH en cis	OB	BmNPV	Kim et al. 2012
Vacuna contra la peste porcina clásica	E2 de CSFV	POLH1-111-E2ΔC	POLH en cis	OB	BmNPV	Lee et al. 2012
Producción de proteínas	egfp	ΔPOLH-GFP y POLH-GFP	POLH en cis	OB	BmNPV	Chen y col. 2013
Vacuna contra PCV2 porcino	ORF2 (PCV2)	POLH-ORF2	POLH en cis	AC	AcMNPV	Zepeda et al. 2019

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Regiones de autoagregación de poliedrina y vacunas particuladas subunitarias.

El grupo de investigación del Dr. Luis Vaca, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, ha investigado la capacidad de autoagregación de la proteína poliedrina de AcMNPV. Empleando tecnología de ADN recombinante y el sistema vector de expresión de baculovirus, fragmentaron la proteína poliedrina (PH) en diversas regiones y cada fragmento fue fusionado a la proteína reportera verde fluorescente (EGFP). Los fragmentos de PH-EGFP fueron expresados en células de insecto Sf-9 mediante baculovirus recombinantes y finalmente la capacidad de autoagregación de cada PHEGFP fue evaluada mediante microscopia confocal de fluorescencia. Reportaron que el fragmento que comprende el aminoácido 1 a 110, nombrado como PH(1-110) y el fragmento PH(58-110), conservaban sus capacidades de autoagregación para formar partículas. Además se identificó al fragmento PH(58-110) como la unidad mínima de autoagregación de poliedrina (Sampieri et al., 2015) (**Figura 7**).



**Figura 7. Identificación de fragmentos de poliedrina que mantienen su capacidad de autoagregación.** (A) Representación esquemática de la proteína poliedrina y los fragmentos evaluados. (B) Representación gráfica de la estructura secundaria del fragmento autoagregable PH(1-110) y la unidad de autoagregación PH(58-110). (C) Evaluación de autoagregación de los fragmentos PH-EGFP visualizados mediante microscopia confocal de fluorescencia.

En el grupo de investigación se ha estudiado si la incorporación de antígenos a fragmentos de poliedrina puede conferir termoestabilidad al antígeno, así como una mejora de su inmunogenicidad. Se demostró que partículas PH(1-110)-EGFP eran capaces de mejorar la inmunogenicidad de la proteína EGFP y de mantener su estabilidad durante al menos un año a temperatura ambiente, induciendo altos títulos de anticuerpos específicos contra EGFP cuando las partículas se inmunizaban en ratones (Cruz-Reséndiz et al., 2020). Esto es reforzado al demostrar que partículas PH(1-110) acarreando la proteína de la cápside del circovirus porcino tipo 2 (PCV2), eran capaces de inducir altos títulos de anticuerpos neutralizantes cuando se inmunizaban en cerdos (Zepeda-Cervantes et al., 2019).

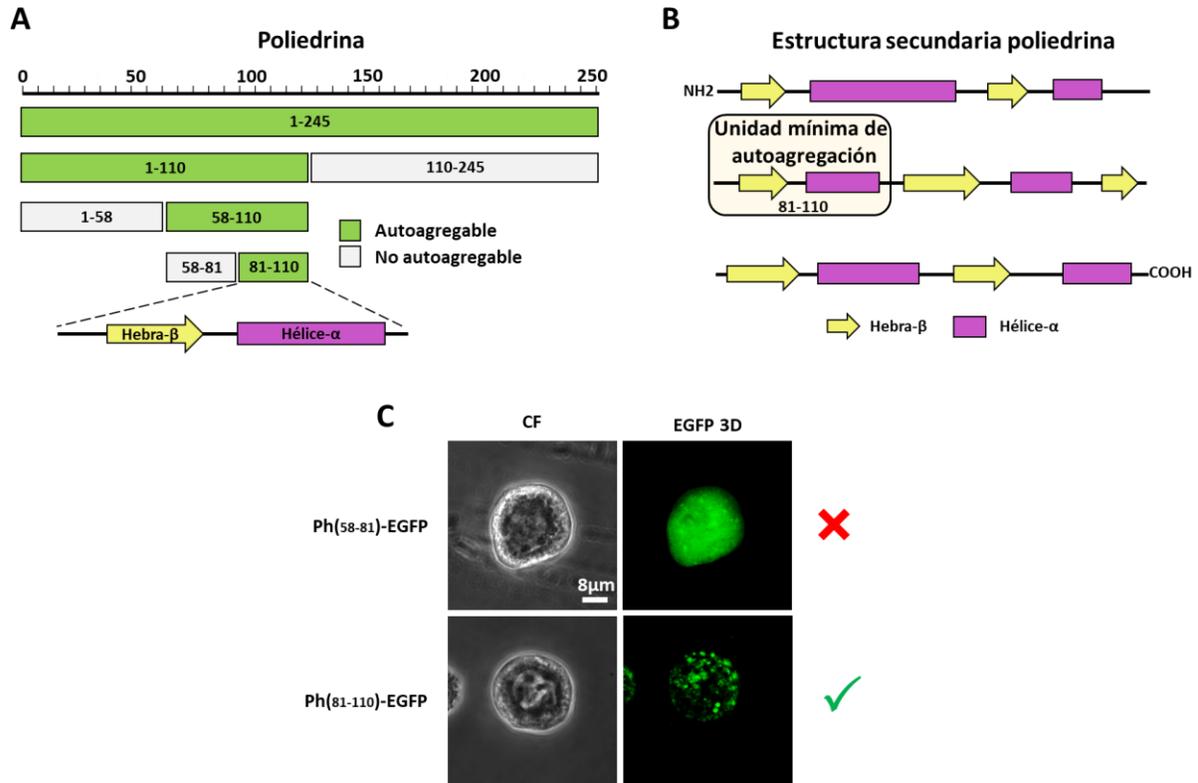
Mejorar la inmunogenicidad y mantener la termoestabilidad del antígeno en vacunas es de suma importancia, ya que de acuerdo con varios estudios, la cadena fría constituye hasta el 80% del precio de una vacuna comercial, por lo que el uso de acarreadores de antígenos que mejoren su estabilidad, puede contribuir de forma significativa en el desarrollo de vacunas particuladas de tipo subunitario (Cruz-Reséndiz et al., 2020; Lloyd & Cheyne, 2017)

## **2.2 Unidad mínima de autoagregación de poliedrina: PH(81-110)**

Una vez demostrado el potencial de los SAPs como acarreadores de antígenos, para el desarrollo de vacunas particuladas de tipo subunitario, se investigó si poliedrina poseía una unidad mínima de autoagregación de menor tamaño que PH(58-110). Lo cual resulta de gran interés cuando se busca disminuir la desviación de la respuesta inmune ocasionada por acarreadores de gran tamaño.

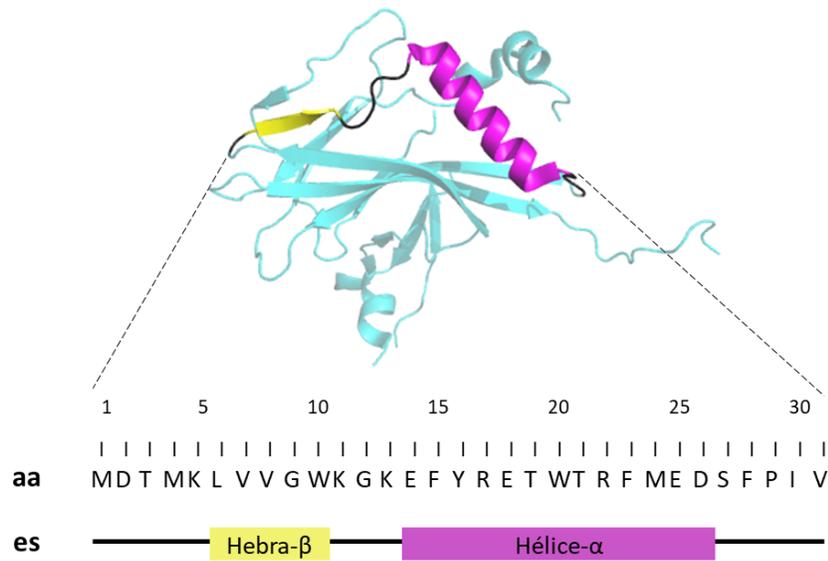
La región PH(58-110) fue fragmentada en dos regiones, fragmento PH(58-81) y fragmento PH(81-110). Se demostró que solamente el fragmento PH(81-110)-EGFP

mantenía sus capacidades de autoagregación, considerándolo la unidad mínima de autoagregación de la proteína poliedrina (**Figura 8**).



**Figura 8. Unidad mínima de autoagregación PH(81-110).** (A) Representación de los fragmentos de la proteína poliedrina que conservan sus capacidades de autoagregación y estructura secundaria del fragmento PH(81-110). (B) Esquema de la estructura secundaria de poliedrina y la localización de PH(81-110) como unidad mínima de autoagregación. (C) Evaluación de la capacidad de autoagregación de la unidad mínima de autoagregación PH(81-110).

El fragmento PH(81-110) es un péptido de 31 aminoácidos que a nivel de estructura secundaria se compone de una hebra- $\beta$  de 6 aminoácidos ligada a una hélice- $\alpha$  de 16 aa en dirección amino a carboxilo terminal, motivo estructural que hemos llamado 6 $\beta$ -16 $\alpha$  (**Figura 9**).



**Figura 9. Propiedades estructurales de PH(81-110).** Región de la proteína poliedrina que comprende el fragmento PH(81-110). Estructura primaria (secuencia de aminoácidos, aa) y estructura secundaria (es), motivo  $6\beta$ - $16\alpha$

Hasta el momento, el fragmento PH(81-110) solamente había sido reportado por su papel estructural, pero no por sus capacidades intrínsecas de autoagregación. Su tamaño, así como su estructura  $6\beta$ - $16\alpha$ , lo hace una fuente de inspiración ideal para el diseño de nuevos SAPs, por lo que comprender las propiedades que definen su capacidad de autoagregación resulta fundamental.

El objetivo tecnológico de nuestras investigaciones, es el diseño de nuevos acarreadores para vacunas subunitarias que confieran estabilidad al antígeno a temperatura ambiente, permitiendo la vacunación en áreas donde no existe la posibilidad de mantener vacunas en refrigeración. Así mismo, la generación de nuevos péptidos basados en la estructura  $6\beta$ - $16\alpha$  que confieran mayor inmunogenicidad a vacunas subunitarias permitiría generar mejores vacunas y con menores efectos secundarios.

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

El diseño y desarrollo de nuevos péptidos con propiedades como la autoagregación, es un área de investigación en constante crecimiento por sus aplicaciones biomédicas. A pesar de que los mecanismos de autoagregación de péptidos han sido ampliamente estudiados y caracterizados, su diseño sigue siendo un reto. Sin embargo, nuevos SAPs han sido diseñados con base en sus características estructurales, considerando las interacciones de tipo no covalente que guían su asociación y plegamiento, o bien, tomando inspiración a partir de proteínas y péptidos autoagregables presentes en la naturaleza.

La poliedrina es una proteína autoagregable que posee regiones capaces de mantener sus propiedades de autoagregación. Dichas regiones de autoagregación, han demostrado ser lo suficientemente funcionales para contribuir en el desarrollo de nuevos acarreadores de antígenos, en los que se mejora su estabilidad e inmunogenicidad. Contribuyendo al desarrollo de candidatos de vacunas particuladas subunitarias que no requieran de una “cadena de frío”, la cual representa aproximadamente el 80% del costo final de una vacuna. Recientemente hemos identificado el potencial de la unidad mínima de autoagregación PH<sub>(81-110)</sub> como una fuente de inspiración para el diseño de nuevos péptidos autoagregables, considerando sus propiedades estructurales secundarias.

Con el fin de determinar si la estructura  $6\beta$ - $16\alpha$  del fragmento de PH<sub>(81-110)</sub> es un factor determinante de su capacidad de autoagregación, diseñar péptidos que mimeticen su estructura secundaria nos permitiría tratar de comprender parte de los mecanismos que permiten la autoagregación de este fragmento de poliedrina, lo cual en un futuro podría contribuir en el desarrollo de una plataforma de péptidos autoagregables que nos permita diseñar y desarrollar sistemas de autoagregación como acarreadores de antígenos en el desarrollo de nuevas vacunas particuladas de tipo subunitario.

#### 4. HIPÓTESIS

---

Péptidos diseñados con base en la estructura  $6\beta$ - $16\alpha$  de PH(81-110) son capaces de agregarse de forma similar al péptido natural PH(81-110).

## 5. OBJETIVO GENERAL

---

Desarrollar y evaluar la capacidad de autoagregación de péptidos diseñados con base en las propiedades estructurales secundarias  $6\beta$ - $16\alpha$  de PH(81-110).

### 5.1 Objetivos particulares

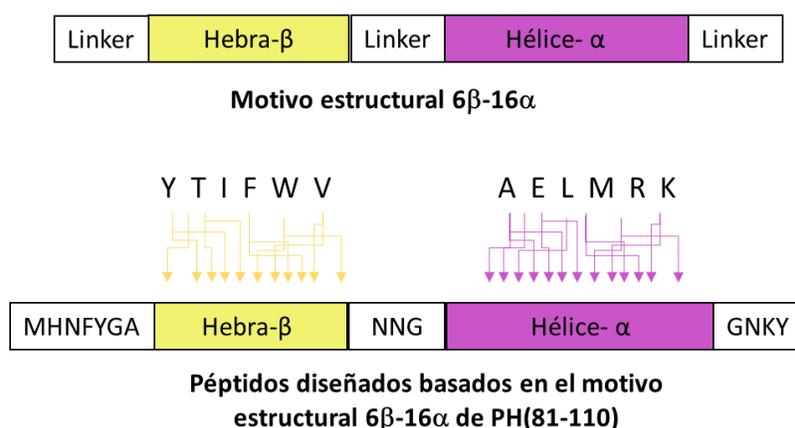
1. Diseñar péptidos con base en la estructura  $6\beta$ - $16\alpha$  de PH(81-110).
2. Desarrollar baculovirus recombinantes en el SVEB que contengan la secuencia codificante de los péptidos diseñados fusionados a la proteína EGFP bajo el promotor de alta expresión de poliedrina.
3. Evaluar la capacidad de autoagregación de los péptidos fusionados a EGFP expresados en células de insecto Sf-9 observadas mediante microscopia confocal de fluorescencia
4. Caracterizar la forma, tamaño y número de partículas formadas por los péptidos fusionados a EGFP cuando se expresan en células de insecto Sf-9.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Diseño de péptidos con base en el motivo estructural 6 $\beta$ -16 $\alpha$ de PH(81-110).

Realizamos el diseño *in silico* de nuevos péptidos que imitaran las propiedades estructurales 6 $\beta$ -16 $\alpha$  de PH(81-110), pero todos ellos con una secuencia de aminoácidos sin relación a PH(81-110). La estrategia consistió en la selección de aminoácidos que se reportan en la literatura por tener propensión a estar presentes en regiones linker, hebras- $\beta$  y/o hélice- $\alpha$  (Mathews, 2013). Para las estructuras tipo linker se emplearon los aminoácidos metionina (M), histidina (H), asparagina (N), fenilalanina (F), tirosina (Y), glicina (G), alanina (A) y lisina (K). Para la hebra- $\beta$  se emplearon los aminoácidos tirosina (Y), treonina (T), isoleucina (I), fenilalanina (F), 31riptófano (W) y valina (V). Por otra parte, en la hélice- $\alpha$  se emplearon los aminoácidos alanina (A), ácido glutámico (E), leucina (L), metionina (M), arginina (R) y lisina (K).

Los péptidos fueron diseñados con la siguiente estructura y secuencias conservadas para las regiones linker: (Linker; MHNFYGA)–(hebra- $\beta$  6 aa)–(linker; ANNG)–(hélice- $\alpha$  16 aa)–(linker; GNKY). La secuencia de aminoácidos para hebras- $\beta$  y hélice- $\alpha$  se construyó mediante la selección y posicionamiento aleatorio de los aminoácidos con propensión por las estructuras, como se mencionó anteriormente (**Figura 10**).



**Figura 10. Diseño de péptidos.** Todos los péptidos diseñados se basaron en el motivo 6 $\beta$ -16 $\alpha$  del péptido PH(81-110).

## 6.2 Predicción de estructura secundaria de péptidos

Al menos 20 péptidos diferentes fueron diseñados, de los cuales se realizó la predicción de estructura secundaria para cada uno de ellos mediante el uso del servidor JPRED v.4 ([http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/index\\_up.html](http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/index_up.html)). Las secuencias de aminoácidos fueron introducidas al servidor para el análisis de secuencia simple en formato Fasta. JPRED v.4 hace uso de un método de asignación de estructura secundaria mediante un algoritmo de red neuronal múltiple de perfiles PSI-BLAST. Se eligió JPRED v.4, ya que ha demostrado tener una precisión del 82% (Drozdetskiy et al., 2015) y por tener una interfaz gráfica de fácil interpretación, además de proveer información relevante, como secuencias de referencia para el alineamiento y confianza de predicción.

De los 20 péptidos diseñados, cuatro de ellos cumplieron con la estructura secundaria propuesta cuando se analizaron mediante el software JPRED, por lo que fueron seleccionados como los péptidos que evaluaríamos respecto a sus capacidades de autoagregación.

## 6.3 Construcción de baculovirus recombinantes

Construimos baculovirus recombinantes que expresaran los péptidos fusionados a la proteína EGFP. Los péptidos codificantes fueron obtenidos mediante PCR punto final, empleando oligonucleótidos “forward” y “reverse” complementarios que contenían la secuencia codificante (**Tabla 2**). Los péptidos fueron solicitados para su síntesis química a la compañía IDT® (Integrated DNA Technologies, EUA). En el extremo correspondiente al carboxilo del péptido codificante se incluyó un sitio de restricción *NcoI* (5'CCATGG3') para todos los péptidos. Las secuencias codificantes fueron clonadas en el vector pGEM®-T Easy Vector (Promega Corporation, EUA), posteriormente realizamos su subclonación en el plásmido pFastBac™1 (Invitrogen, USA) mediante doble digestión, empleando las enzimas de restricción *EcoRI* (5'GAATTC3') y *NcoI* (5'CCATGG3'). El vector pFastBac™1 ya contenía la secuencia codificante para la proteína EGFP con un sitio *NcoI*, correspondiente al extremo amino

de la proteína codificante EGFP (Clontech, EUA). Todas las secuencias codificantes de los péptidos fueron subclonadas en marco de lectura con la proteína GFP. Las construcciones péptido-EGFP se transpusieron en un báculo, el cual contenía el genoma codificante para los baculovirus recombinantes del sistema Bac-to-Bac (Invitrogen, EUA) (**Figura 4 y 11**).

Todas las secuencias codificantes de las construcciones péptido-EGFP fueron corroboradas mediante secuenciación cuando se encontraban en el plásmido pFastBac™1.

**Tabla 2. Secuencia de aminoácidos y oligonucleótidos de péptidos.**

<b>Péptido 1</b>	
<b>Secuencia de a.a.</b>	MHNFYGATIFWVANNGAELMRKAMRKLAEELMRKGNKY
<b>Forward (5'→3')</b>	ATGCACAACCTTCTACGGCGCCACCATCTTCTGGGTGGCCAACAACGGCGCCGAGCTGATGAGGAAGG
<b>Reverse (5'→3')</b>	CCATGGCGTACTTGTTGCCCTTCTCATCAGCTCGGCCAGCTTCTCATGGCCTTCTCATCA GCTC
<b>Péptido 2</b>	
<b>Secuencia de a.a.</b>	MHNFYGATVWFIANNGKRMLEARMAALKMLEKRGNKY
<b>Forward (5'→3')</b>	ATGCACAACCTTTTATGGTGCAACTGTCTGGTTTATCGCTAATAATGGTAAACGAATGCTCGAAGCCAG
<b>Reverse (5'→3')</b>	CCATGGCGTACTTGTTGCCCTCTTTTCTCTAACATTTTTAGGGCCGCCATTCTGGCTTCGAGCA TTCGT
<b>Péptido 3</b>	
<b>Secuencia de a.a.</b>	MHNFYGAWVFTIANNGLEAKRMMAKRALLERKKGNKY
<b>Forward (5'→3')</b>	ATGCATAACTTTTACGGCGCGTGGGTCTTTACGATCGCAAATAACGGTCTGGAAGCCAAACG GATG
<b>Reverse (5'→3')</b>	CCATGGCGTACTTATTGCCCTTCTTCCGTTCTAATAGTGCTCGCTTGCCATCATCCGTTTGG CTCCAG
<b>Péptido 4</b>	
<b>Secuencia de a.a.</b>	MHNFYGAFWIVTANNGKMLEKRARMAALEARKMGNKY
<b>Forward (5'→3')</b>	ATGCACAATTTCTACGGCGCTTTTTGGATCGTCACAGCAAATAATGGTAAAATGTTGGAAAAG CGGGC
<b>Reverse (5'→3')</b>	CCATGGCGTATTTATTGCCCATCTTCTTGCCTCAAGAGCAGCCATCCGAGCCCGCTTTTCCA ACATT
<b>Péptido 4.1 (27AΔK)</b>	
<b>Secuencia de a.a.</b>	MHNFYGAFWIVTANNGKMLEKRARMKALEARKMGNKY

<b>Forward (5'→3')</b>	ATGCACAATTTCTACGGCGCTTTTTGGATCGTCACAGCAAATAATGGTAAAATGTTGGAAAAGCGGGC
<b>Reverse (5'→3')</b>	CCATGGATATTTGTTGCCCATTTTGC GCGCTTCCAGCGCTTTCATGCGTGCCCGCTTTTCCAA CAT
<b>Péptido 1.1 (29EAL).</b>	
<b>Secuencia de a.a.</b>	MHNFYGATIFWVANNGAELMRKAMRKLALLMRKGNKYPW
<b>Forward (5'→3')</b>	ATGCACAATTCTACGGCGCCACCATCTTCTGGGTGGCCAACAACGGCGCCGAGCTGATGAGGAAGG
<b>Reverse (5'→3')</b>	CCATGGGTACTTGTGGCCCTTCTCATCAGAAGGGCCAGCTTCTCATGGCCTTCTCATCAGCTC

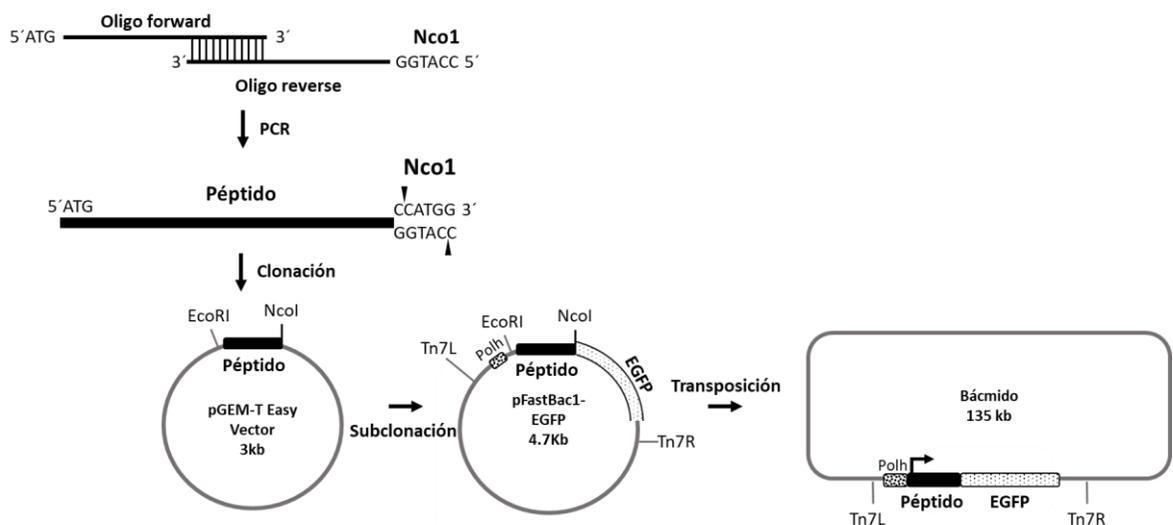


Figura 11. Estrategia de clonación para péptidos basados en la unidad mínima de autoagregación Ph(81-110).

#### 6.4 Amplificación y purificación de plásmidos de clonación y transferencia

Los vectores PGEM®-T Easy Vector y pFastBac™1 que contenían las secuencias codificantes de los péptidos o los péptidos fusionados a EGFP, respectivamente, fueron amplificados mediante la transformación de bacterias competentes *E. coli* TOP10. Bacterias TOP10 competentes mantenidas a -70 °C fueron descongeladas en un baño de hielo, se colocaron 50 µL de bacterias dentro de un tubo que ya contenía 4 µL de la reacción de ligación del vector PGEM®-T Easy Vector o pFastBac™1. Posteriormente se colocaron en hielo durante 20 min y se realizó un choque térmico por 45 seg en un baño de agua a 42 °C. Inmediatamente los tubos fueron regresados al hielo por 2 min. Posteriormente se adicionaron 950 µL de medio LB para la incubación de las bacterias

por 1.5 h con agitación constante (~150 rpm). A continuación las bacterias fueron centrifugadas para recuperarlas a partir del botón y resuspenderlo en 100 µL de medio LB, el cual fue plaqueado en cajas de LB/ampicilina/IPTG/X-Gal para el vector PGEM®-T Easy Vector y cajas LB/ampicilina para el vector pFastBac™. Los vectores de clonación y transferencia fueron purificados mediante Minipreps caseras, como se detalla en Sambrook y Russell (2001).

Los bácmidos que contenían las construcciones péptido-EGFP fueron purificados mediante columnas Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, EUA), siguiendo el protocolo del fabricante.

### **6.5 Líneas celulares de insecto y baculovirus**

La línea celular Sf-9 de origen ovárico de *Spodoptera frugiperda* fue usada para la producción y amplificación de baculovirus mediante el SVEB (Invitrogen, EUA). Las células fueron cultivadas como reporta Sampieri *et. al.*, (2016): cultivo en suspensión de células Sf-9 en medio Grace´s (Invitrogen, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (30 min a 56°C) (Wisent, Inc. Canadá), 1X yeastolate (Invitrogen, EUA), 1X de lactalbúmina (SIGMA, EUA) y 1X antibiótico-antimicótico (Invitrogen, EUA). El cultivo en suspensión se mantuvo a 27 °C y 100 rpm conforme a métodos estandarizados. Para evitar el daño de las células por fricción durante la agitación, el cultivo en suspensión fue adicionado con surfactante Plurónico® F-68 (Thermo Fisher Scientific, EUA) a una concentración final de 0.1%.

### **6.6 Transfección y amplificación de baculovirus recombinantes**

Para la generación de los baculovirus recombinantes se realizó la transfección de células Sf-9 en fase logarítmica ( $1.5 \times 10^6$  cel/ml) con el bácmido conteniendo la construcción recombinante péptido-EGFP. Las células Sf-9 fueron cultivadas en cajas Petri de cultivo de 35 mm mantenidas en medio Grace´s sin suero ni antibiótico. Se diluyeron 2 µg de bácmido en 100uL de medio de cultivo y 3 µL de polietilenimina, los cuales se mezclaron e incubaron durante 20 min. Durante la incubación, se realizaron 2 lavados de las células con 2 mL de medio Grace´s sin antibióticos y sin suero.

Posteriormente se agregó a las células el complejo bácmido-PEI y se mantuvieron incubadas durante 4 h, finalmente las células fueron adicionadas con 1 mL de medio Grace's completo y se incubaron durante 72 h.

La obtención de un stock viral con alto título se realizó al infectar 10 mL de células Sf-9 ( $2 \times 10^6$  cel/ml) en cajas t25 con 500  $\mu$ L del baculovirus recombinante de la transfección, con el objetivo de obtener el pase 1 (P1), mantenido en incubación durante 72 h. Posteriormente se realizó un P2 para aumentar el título viral del stock.

### **6.7 Titulación de stocks de baculovirus**

La titulación de baculovirus se realizó mediante un ensayo de viabilidad celular (Mena, Ramírez, & Palomares, 2003). Células Sf-9 ( $0.18 \times 10^6$  cel/ml) fueron sembradas en placas de cultivo celular de 96 pozos, 50  $\mu$ L por pozo. Se realizó una infección seriada por columnas desde el stock viral hasta la dilución  $10^{-10}$ , dejando la última columna sin infectar. Las placas fueron incubadas durante 6 días en ambiente húmedo a 27 °C sin agitación. Para el revelado cada pozo fue adicionado con 10  $\mu$ L de solución conteniendo MTT (5 mg/mL). Posteriormente se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en agitación orbital y protegidas de la luz. Al final de la incubación, se observaron cristales color violeta, los cuales fueron recuperados por centrifugación durante 10 min a 2000 rpm, retirando el sobrenadante por aspiración. Los cristales fueron diluidos con 50  $\mu$ L de DMSO por cada pozo incubando durante 10 min, finalmente se leyó la absorbancia a 570 nm. Los datos fueron procesados para la obtención de la dosis media letal en cultivo celular (TCLD), dosis media infecciosa en cultivo celular (TCID) y las unidades formadoras de placa por mililitro (ufp/mL).

### **6.8 Expresión de proteínas recombinantes en células de insecto Sf-9**

La expresión de los péptidos-EGFP se realizó mediante la infección de 10 mL de células Sf-9 ( $2 \times 10^6$  cel/mL) usando una multiplicidad de infección (MOI) de 10 ufp/cel del baculovirus recombinante. Las células fueron mantenidas a 27 °C con agitación constante de 100 rpm durante 72 h, tiempo suficiente para la expresión de la proteína recombinante bajo el promotor de poliedrina.

### **6.9 Visualización de células Sf-9 mediante microscopia confocal**

La expresión de los péptidos-EGFP fluorescentes fue visualizada al infectar células Sf-9 con los baculovirus recombinantes, con una MOI= 10 ufp/cel, durante 72 h a 27 °C con agitación constante de 100 rpm. Las células fueron visualizadas en fresco para evitar que el tratamiento de fijación alterara la agregación de los péptidos, para ello se hizo uso del microscopio confocal Olympus FV10i (Olympus, Japón) y la opción de captura de imágenes en Z-stack con pasos de 0.7 µm para la adquisición de todas las imágenes. La visualización de los péptidos-EGFP fluorescentes se realizó haciendo uso del láser para EGFP, con excitación: 490 nm y emisión: 510 nm. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software Fluoview 10-ASW-2.1 (Olympus, Japón).

### **6.10 Reconstrucción 3D de partículas.**

Los archivos de salida de la captura de imágenes por microscopia confocal de fluorescencia, fueron analizados con el software Imaris versión 7.2.2 (Bitplane, Suiza). Todas las imágenes fueron analizadas para la obtención de una reconstrucción 3D. Las partículas 3D formadas por péptidos fueron analizadas y reconstruidas mediante un análisis de superficie para la evaluación de su forma y tamaño. El análisis de superficie se realizó haciendo uso del algoritmo empleado por el software.

### **6.11 Análisis estadístico**

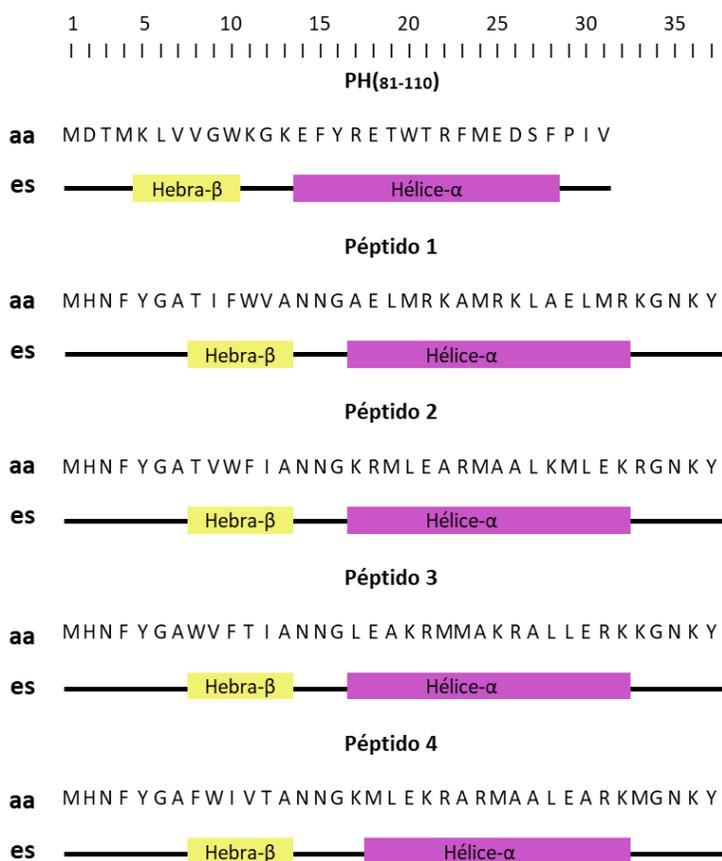
El análisis estadístico para la evaluación del tamaño de las partículas se realizó empleando el software Graphad Prism v. 8.4.2 (GraphPad software, USA). Debido a que los datos tenían una distribución de tipo no normal, los resultados fueron presentados en un gráfico de violín mostrando todos los puntos. Además fueron analizados mediante estadística no paramétrica, a través de una prueba Kruskal-Wallis y pruebas de Dunn como prueba *post-hoc*. Un valor  $p < 0.05$  fue considerado como significancia estadística. Las representaciones de los valores  $p$  de significancia son los siguientes: \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Péptidos con estructura 6 $\beta$ -16 $\alpha$

Todos los péptidos tienen un tamaño de 37 aminoácidos y difieren en su secuencia de aminoácidos con excepción a las regiones tipo linker, en las cuales se conserva la secuencia de aminoácidos para todos los péptidos. La estructura secundaria predicha para todos los péptidos está compuesta por una hebra- $\beta$  de 6 aminoácidos ligada a una hélice- $\alpha$  de 16 aminoácidos.

Un total de 20 péptidos fueron diseñados y analizados mediante predicción de estructura secundaria de proteínas. Solamente 4 de ellos coincidieron con la predicción estructural 6 $\beta$ -16 $\alpha$ , basado en la unidad mínima de autoagregación PH(81-110). (**Figura 12**). La predicción de los péptidos restantes no coincidió con el motivo 6 $\beta$ -16 $\alpha$ .



**Figura 12. Péptidos diseñados con base en la estructura secundaria 6 $\beta$ -16 $\alpha$  de PH(81-110).** aa: secuencia de aminoácidos y es: estructura secundaria.

## **7.2 Péptido 1 con estructura 6 $\beta$ -16 $\alpha$ tiene capacidades de autoagregación para formar partículas**

Para evaluar la capacidad de autoagregación de cada uno de los nuevos péptidos se realizó la construcción de baculovirus recombinantes que expresaran los péptidos fusionados a EGFP como proteína reportera. Dicha construcción se expresó bajo el promotor de alta expresión de poliedrina a través de baculovirus recombinantes en el sistema vector de expresión de baculovirus. Células Sf-9 fueron infectadas con los baculovirus recombinantes con una MOI= 10 ufp/cel y visualizadas mediante microscopia confocal láser de fluorescencia a las 72 h para realizar la observación de los péptidos-EGFP fluorescentes.

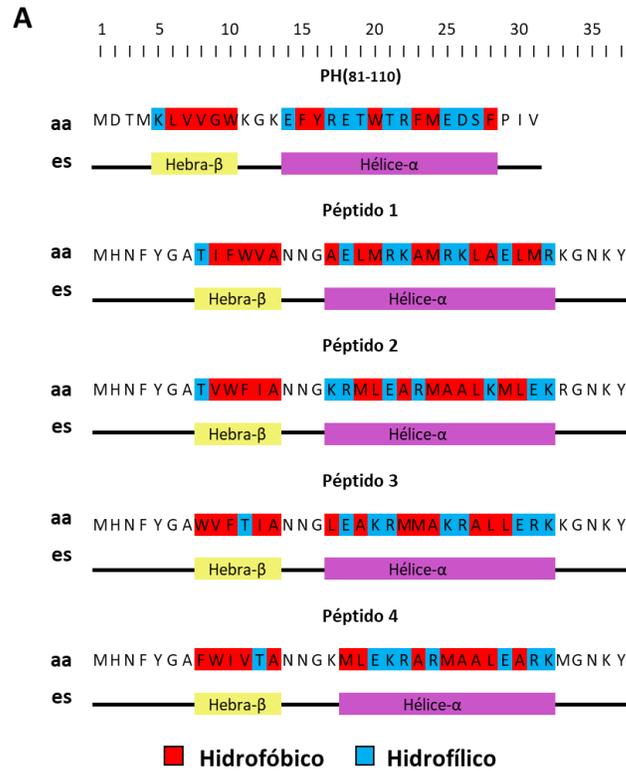
Se observó que el péptido 1 demostró capacidad para autoagregarse y formar partículas visibles, por otra parte, los péptidos 2, 3 y 4 se caracterizaron como péptidos no autoagregables al no formar partículas visibles mediante microscopia confocal (**Figura 13**). Sin embargo, no descartamos que estos últimos péptidos se autoagreguen para formar partículas de menor tamaño, no observables mediante microscopia confocal.



### 7.3 El perfil hidrofóbico de la estructura hélice- $\alpha$ difiere entre el péptido autoagregable y los péptidos no autoagregables

Con el objetivo de identificar los factores intrínsecos que determinan la capacidad de autoagregación del péptido 1 y los péptidos no autoagregables 2, 3 y 4, comenzamos estudiando los perfiles de hidrofobicidad de las estructuras secundarias hebra- $\beta$  y hélice- $\alpha$ , ya que la hidrofobicidad es una característica que contribuye significativamente en los mecanismos de autoagregación en péptidos y proteínas. Descartamos los perfiles de hidrofobicidad de las estructuras tipo *linker* debido a que la secuencia de aminoácidos era la misma para cada uno de los linkers de todos los péptidos.

Observamos que las hebras- $\beta$  de todos los péptidos se componían en su mayoría por aminoácidos hidrofóbicos. Por otra parte, las estructuras hélice- $\alpha$  tenían una composición alterna entre aminoácidos hidrofóbicos y aminoácidos hidrofílicos (**Figura 14. A**). Realizamos una comparación entre todos los péptidos mediante la cual pudiésemos determinar las características que compartían y sus diferencias más notables (**Figura 14. B**). Todos los péptidos tienen un tamaño de 37 aminoácidos, su predicción de estructura secundaria coincide con el motivo estructural  $6\beta$ - $16\alpha$ , la secuencia de aminoácidos de las estructuras linker es la misma para todos y la estructura hebra- $\beta$  es de 6 aminoácidos, en su mayoría hidrofóbicos. La diferencia más notable encontrada hasta ahora, consiste en que la hélice- $\alpha$  del péptido 1 autoagregable posee un perfil hidrofóbico con alternancia de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos con una secuencia aparente, ya que existen como máximo 2 aminoácidos hidrofóbicos de forma continua y máximo 2 aminoácidos hidrofílicos de forma continua, por otra parte, los péptidos no autoagregables 2, 3 y 4, presentaban un perfil hidrofóbico con máximo 4 aminoácidos hidrofóbicos continuos y máximo 3 aminoácidos hidrofílicos de manera continua (**Figura 14**).



**B**

Características de péptidos	
Tamaño	37 aa
Estructura secundaria	
Linkers	M H N F Y G A      A N N G      K G N K Y
Hebra-β	6 aa en su mayoría hidrofóbicos
Hélice-α	<b>Auto-agregables</b> Máximo 2 aa hidrofóbicos o hidrofílicos continuos 
	<b>No auto-agregables</b> Máximo 4 aa hidrofóbicos y 3 aa hidrofílicos continuos 

**■ Hidrofóbico ■ Hidrofílico**

**Figura 14. Propiedades hidrofóbicas difieren entre péptidos autoagregables y no autoagregables. (A)** Estructura primaria, estructura secundaria y perfil de hidrofobicidad de las estructuras secundarias de todos los péptidos diseñados. **(B)** Cuadro comparativo de las características compartidas y diferencias entre el péptido 1 autoagregable y los péptidos 2, 3 y 4 no autoagregables.

#### **7.4 Alterar el perfil hidrofóbico de la hélice- $\alpha$ de los péptidos modifica su capacidad de autoagregación.**

Tomando en consideración que el perfil de hidrofobicidad de la estructura hélice- $\alpha$  podía ser una propiedad que determinara la capacidad de autoagregación del péptido 1, decidimos evaluar si una mutación puntual que afectara su perfil hidrofóbico también afectaría su capacidad de autoagregación. Realizamos una mutación del aminoácido hidrofílico E29, presente en la estructura hélice- $\alpha$ , por un aminoácido hidrofóbico leucina (L), obteniendo un nuevo péptido nombrado Péptido 1.1 (29E $\Delta$ L). El péptido 1 autoagregable que en un principio tenía máximo 2 aminoácidos hidrofóbicos continuos, ahora tenía máximo 5 aminoácidos hidrofóbicos continuos en su hélice alfa (**Figura 15. A.1**). Este nuevo péptido 1.1 (29E $\Delta$ L) perdió sus capacidades de autoagregación (**Figura 15. B.1**). Con base en estos resultados, sugerimos que el perfil hidrofóbico de la hélice- $\alpha$  de los péptidos 6 $\beta$ -16 $\alpha$  puede determinar su capacidad para autoagregarse y formar partículas visibles, al menos cuando se observan mediante microscopia confocal.

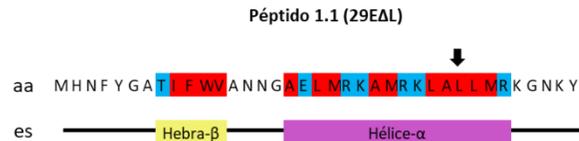
Con base en lo anterior, decidimos realizar lo contrario, es decir, modificar el perfil hidrofóbico de un péptido no autoagregable a un perfil hidrofóbico más parecido al péptido 1 autoagregable, esperando que este nuevo péptido en principio no autoagregable fuese capaz de autoagregarse y formar partículas. Seleccionamos el péptido 4 y el aminoácido hidrofóbico A27, presente en la estructura hélice- $\alpha$ , sustituyéndola por una lisina (K) con propiedades hidrofílicas, obteniendo el péptido nombrado Péptido 4.1 (27A $\Delta$ K), el cual ahora tenía máximo 2 aa hidrofóbicos continuos en lugar de 5 (**Figura 15. A.2**). Evaluamos su capacidad de autoagregación y observamos que las células Sf-9 se mostraban con agregados tipo partícula (**Figura 15. B.2**).

## A.1

**Péptido auto-agregable**



**Péptido no auto-agregable**

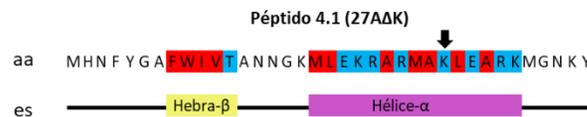


## A.2

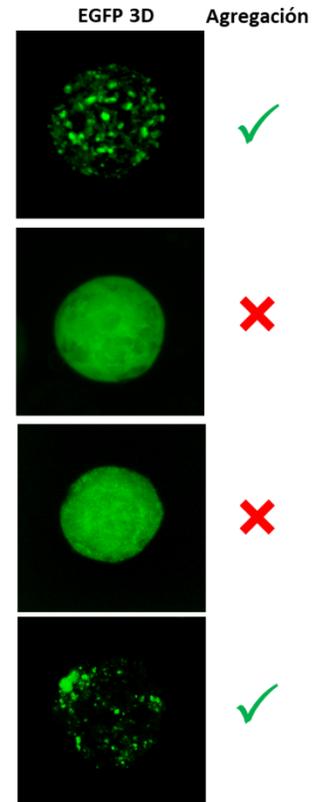
**Péptido no auto-agregable**



**Péptido auto-agregable**



## B.1



**Figura 15. Una mutación de aminoácido que altere el perfil hidrofóbico de la hélice-α de los péptidos modifica su capacidad de autoagregación. (A)** Cambio en el perfil de hidrofobicidad de la estructura hélice-α de un péptido autoagregable (péptido 1) **(A.1)** y un péptido no autoagregable (péptido 4) **(A.2)**. Evaluación de la capacidad de autoagregación para formar partículas de los péptidos mutados Péptido 1.1 (29EΔL) **(B.1)** y Péptido 4.1 (27AΔK) **(B.2)**.

Con estos resultados corroboramos que una mutación puntual que altere el perfil hidrofóbico de la hélice-α de los péptidos 6β-16α, puede ocasionar cambios significativos en su capacidad de autoagregación. Los péptidos autoagregables poseen un motivo estructural 6β-16α, donde la estructura hélice-α presenta un perfil de hidrofobicidad, con un máximo de 2 aminoácidos hidrofóbicos continuos. Aún resta explorar si 2 aminoácidos hidrofílicos continuos también es un factor determinante de los péptidos autoagregables.

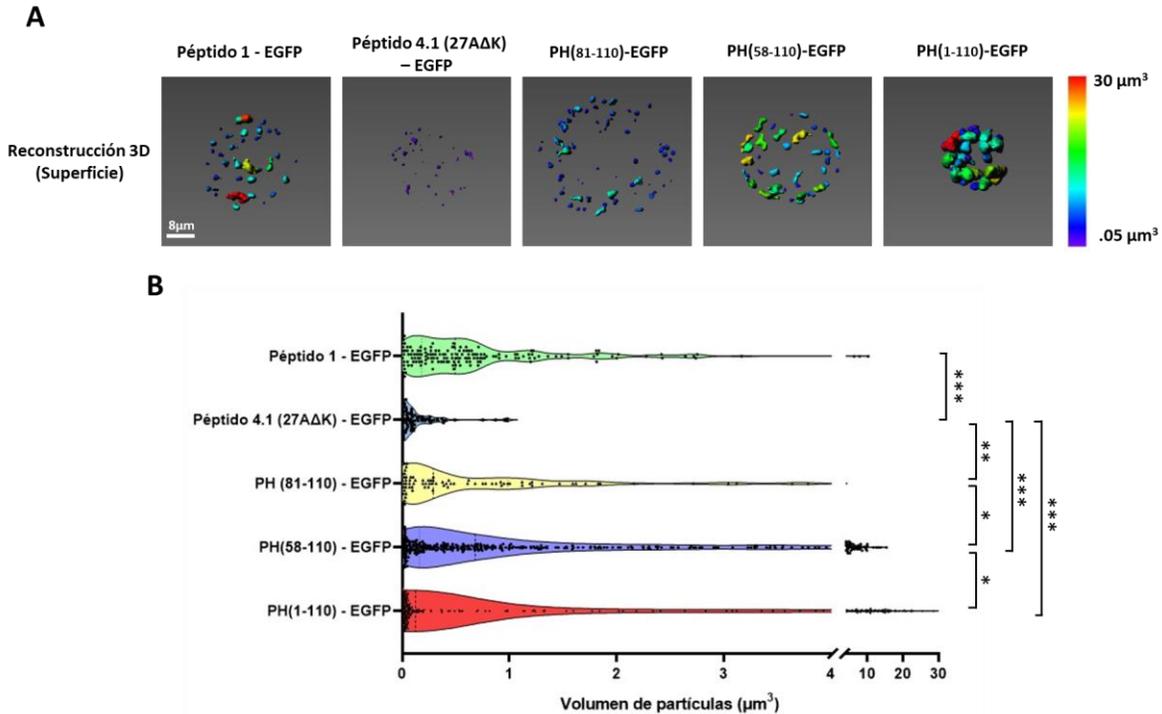
## 7.5 Tamaño de las partículas de péptidos 1, 4.1 (27AΔK) y péptidos de poliedrina

El tamaño y forma de las partículas es una propiedad de gran importancia para las aplicaciones médicas, particularmente en el desarrollo de vacunas particuladas, ya que el tamaño de las partículas determinará si los sistemas biológicos serán capaces o no de interactuar con ellas o procesarlas, incluyendo a las moléculas bioactivas que acarreen.

La microscopia confocal laser de fluorescencia nos ha permitido observar péptidos autoagregables cuando estos se expresan en células de insecto. De esta manera podemos evaluar su forma y tamaño, sin embargo, su resolución se ve limitada, entre 180 a 200 nm, por lo que los objetos visibles pueden tener un tamaño menor que el observado. Con base en lo anterior, hemos realizado un análisis de los tamaños de las partículas mediante la reconstrucción de su superficie, a través de la fluorescencia que emiten.

Evaluamos el tamaño de las partículas formadas por PH<sub>(81-110)</sub>, péptido 1, péptido 4.1 (27AΔK), además incluimos los fragmentos de poliedrina PH<sub>(1-110)</sub> y PH<sub>(58-110)</sub> como referencia de partículas formadas a partir de péptidos de origen natural (**Figura 16**). Como se puede observar, el fragmento PH<sub>(1-110)</sub> produce las partículas de mayor volumen, seguido por los fragmentos PH<sub>(58-110)</sub>, PH<sub>(81-110)</sub> y el péptido 1. Finalmente el péptido 4.1 (27AΔK) produce las partículas de menor volumen.

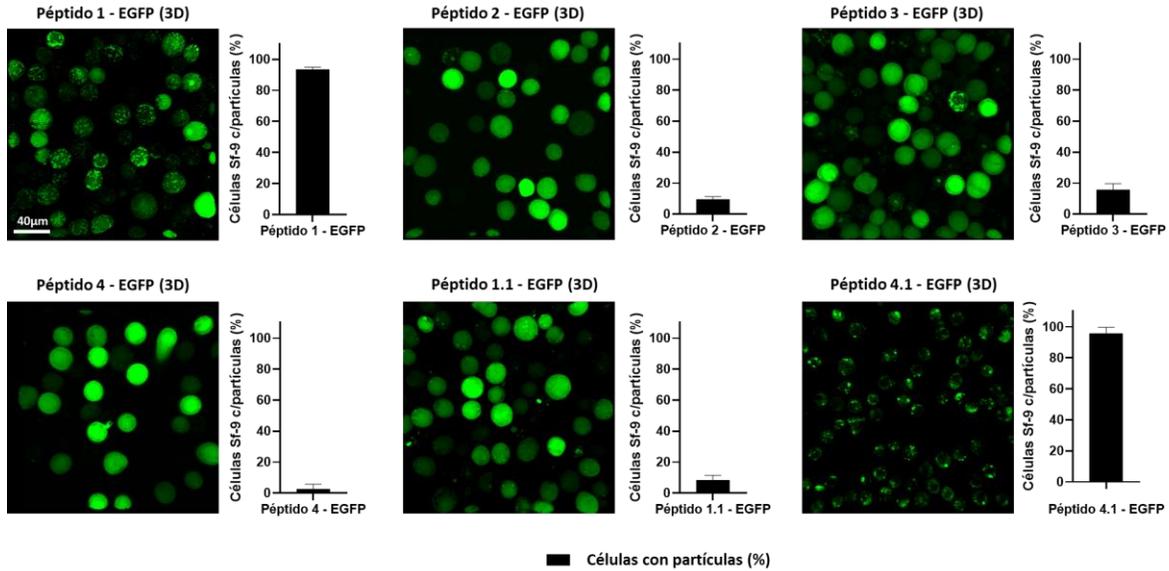
Resulta de gran interés el hecho de que no existe diferencia significativa entre el tamaño de los agregados del péptido 1 y los agregados de los péptidos de poliedrina. El péptido 1 parece formar partículas polidispersas al adoptar diferentes tamaños, por el contrario, el péptido 4.1 (27AΔK) parece tener tamaños significativamente menores a todos los péptidos evaluados. La explicación para esta observación permanece desconocida a la fecha, pero es algo en lo que continuamos trabajando arduamente diseñando nuevos experimentos para identificar la estructura y/o secuencia que determina el volumen final de las partículas producidas por los péptidos 6β-16α.



**Figura 16. Evaluación de autoagregación de péptidos. (A)** Reconstrucción 3D y análisis de superficie de péptidos autoagregables diseñados con base en  $6\beta$ -16 $\alpha$  y péptidos autoagregables de poliedrina fusionados a EGFP. \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 7.6 El péptido 1 y 4.1 (27A $\Delta$ K) forman partículas en al menos 90% de las células

Confirmamos que los péptidos autoagregables estuviesen formando partículas en la mayoría de las células, lo cual resulta de gran importancia debido a que en futuras investigaciones la purificación de las partículas dependerá en gran medida de su autoagregación en el interior de las células. Realizamos la infección de células Sf-9 con los baculovirus recombinantes péptido-EGFP, con una MOI=10 ufp/cel durante 72 h. Hallamos que el péptido 1-EGFP y el péptido 4.1 (27A $\Delta$ K)-EGFP se expresaban como péptidos autoagregables al menos en el 90% de las células, a diferencia de los péptidos 2, 3, 4 y 1.1 (29E $\Delta$ L), los cuales se expresaban como péptidos no autoagregables en la mayoría de las células, con un promedio de células con partículas de tan solo el ~9% para el péptido 2, ~15% para el péptido 3, ~3% para el péptido 4 y ~8% para el péptido 1.1 (29E $\Delta$ L) (**Figura 17**).



**Figura 17. Porcentaje de células con partículas formadas por cada uno de los péptidos-EGFP.**

Nuestros resultados demuestran que los péptidos 1 y 4.1 (27AΔK) forman partículas en la mayoría de las células infectadas, lo que en futuras investigaciones será de gran importancia para su purificación, posiblemente mediante técnicas convencionales de centrifugación.

## 8. DISCUSIÓN

---

A partir de los resultados obtenidos, corroboramos lo siguiente: no todos los péptidos que diseñamos con estructura  $6\beta$ - $16\alpha$  son capaces de autoagregarse para formar partículas visibles. Sin embargo, un péptido  $6\beta$ - $16\alpha$  demostró tener capacidad para autoagregarse y formar partículas de tamaño polidisperso, dicha capacidad se vio afectada al modificar el perfil hidrofóbico de su hélice- $\alpha$ . Por el contrario, uno de los péptidos  $6\beta$ - $16\alpha$  no autoagregable, fue capaz de autoagregarse y formar partículas de tamaño monodisperso, una vez que el perfil hidrofóbico de su hélice- $\alpha$  fue modificado, haciéndolo más parecido al perfil hidrofóbico del péptido 1 autoagregable. Por lo tanto, sugerimos que péptidos autoagregables, basados en el motivo  $6\beta$ - $16\alpha$  de PH<sub>(81-110)</sub>, podrían tener o adquirir la capacidad de autoagregarse, dependiendo del perfil hidrofóbico de sus estructuras secundarias, como lo reportado aquí para la hélice- $\alpha$ .

En la naturaleza, motivos estructurales proteicos parecen repetirse con frecuencia y con preferencia para ciertos tipos de proteínas, por ejemplo, interacciones hélice- $\alpha$ -hélice- $\alpha$  en proteínas transmembranales (Fuchs & Frishman, 2010; Walters & DeGrado, 2006) o proteínas con preferencias geométricas (Källblad & Dean, 2004; Zhang & Grigoryan, 2013), así como otros motivos estructurales suelen verse sobrerrepresentados para otros grupos de proteínas como los empaquetamientos de hélice- $\alpha$  contra hebras- $\beta$  (Hu & Koehl, 2010), torsión de láminas- $\beta$  (Ho & Curmi, 2002), giros- $\beta$  y uniones  $\alpha$ - $\alpha$  (Engel & DeGrado, 2005; Hutchinson, 1994). Nuestra investigación sugiere que péptidos diseñados con una estructura  $6\beta$ - $16\alpha$  son capaces de autoagregarse para formar partículas, si se considera el patrón de organización y características fisicoquímicas de los residuos de aa presentes en las estructuras secundarias, como la hélice- $\alpha$ . Resulta evidente que el diseño de nuevos SAPs con base en un motivo estructural de autoagregación requerirá de más investigación para definir las características y mecanismos de estos péptidos.

Se reconoce ampliamente que la secuencia de aa determina el plegamiento, estructura y función de una proteína, sin embargo, diferentes secuencias de aminoácidos pueden coincidir en estructuras y funciones semejantes, por ejemplo, Kolodny y colaboradores demuestran la existencia de dominios de proteínas no relacionadas que comparten motivos con segmentos estructurales similares, así como propiedades y funciones semejantes (Nepomnyachiy et al., 2014). En sistemas de autoagregación, Stuart y colaboradores demuestran que poliedrinas de Cypovirus tienen mecanismos de autoagregación muy semejantes a los de poliedrinas de baculovirus, a pesar de no estar emparentadas evolutivamente. Incluso siete de las poliedrinas de Cypovirus estudiadas solamente comparten el 12% de su secuencia de aa entre ellas mismas, pero aproximadamente el 80% de los residuos de aa son estructuralmente equivalentes y en su conformación estructural final son casi iguales (Ji et al., 2015). Esto refuerza nuestra propuesta de basar el diseño de nuevos SAPs, en motivos estructurales de proteínas autoagregables conocidas.

Una gran variedad de SAPs han sido diseñados aprovechando las propiedades de motivos estructurales de proteínas de origen natural. Por ejemplo, súperenrollamientos de hélice- $\alpha$  observados en proteínas naturales, como el colágeno (Bella, 2016), proteínas de la envoltura celular en bacterias (Hernandez Alvarez et al., 2019) o proteínas transmembranales (Fuchs & Frishman, 2010) han ayudado a comprender los mecanismos de autoagregación, necesarios para el diseño de nuevas proteínas autoagregables. Por ejemplo, Tirrel y colaboradores son pioneros en SAPs fibrilares, al emplear un par de estructuras hélice- $\alpha$  complementarias tipo “zipper” de leucina que flanquean un dominio polielectrolítico soluble en agua (Petka, 1998). Estas estructuras hélices- $\alpha$  tienen un patrón repetitivo de heptada (abcdefg)<sub>n</sub>, el cual actualmente es un patrón típico usado para el desarrollo de SAPs, donde “a” y “d” son usualmente aa hidrofóbicos y los residuos restantes tienden a ser polares. Estas heptadas pueden autoensamblarse hacia hélices anfipáticas, bajo interacciones hidrofóbicas (Banwell et al., 2009; Lu & Wang, 2018). Este principio ha sido aprovechado por otros investigadores para el desarrollo de SAPs formadores de nanofibras (Banwell et al., 2009; Dong et al., 2008; Mehrban et al., 2014). Por otra parte, las estructuras secundarias hebra- $\beta$  de origen natural también han sido fuente de inspiración para el

desarrollo de nuevos SAPs. Zhang y colaboradores (1993), hallaron en la proteína Zuotina de levadura un péptido de 16 residuos, que más tarde sería llamado EAK16-II. EAK16-II es un oligopeptido autoagregable iónico formador de fibras a través de láminas- $\beta$ , donde la alanina (A) es un residuo hidrofóbico pequeño, mientras que el ácido glutámico (E) y lisina (K) son aa hidrofílicos, cargados de forma negativa y positiva, respectivamente (Zhang et al., 1993).

Varios estudios experimentales han demostrado que es posible diseñar péptidos y proteínas *de novo*, con propiedades como la autoagregación y plegamiento definido cuando estas son diseñadas con base en motivos estructurales donde se establecen las propiedades intrínsecas de residuos de aa y el patrón de aminoácidos polares y no polares (Hecht et al., 1990; Raleigh et al., 1995; Regan & DeGrado, 1988). Hecht predijo la formación de hélices- $\alpha$  o hebras- $\beta$  al combinar patrones de polaridad de aminoácidos, este principio fue aprovechado por Bellesia y colaboradores (2010) para diseñar una proteína con plegamiento y autoensamblaje predefinido, haciendo uso de la alternancia de dos aa polares y dos aa no polares de forma continua para estructuras hélice- $\alpha$  que formaran súper-enrollamientos de hélice- $\alpha$  o bien la formación de láminas- $\beta$  mediante hebras- $\beta$  que tuviesen la alternancia de un aa polar y uno no polar.

Como parte de nuestros resultados, demostramos que los péptidos 1 y 4.1(27A $\Delta$ K) con estructura predicha 6 $\beta$ -16 $\alpha$ , tienen la capacidad de autoagregarse y formar partículas visibles. Aparentemente esta capacidad, se relaciona con el perfil hidrofóbico de sus estructuras secundarias, como lo es la hélice- $\alpha$ . La hélice- $\alpha$  de nuestro péptido 1 tiene una disposición de máximo 2 aa polares continuos y máximo 2 aa no polares continuos, similar a lo reportado por Bellesia (2010), por otra parte la estructura hebra- $\beta$  de nuestros SAPs está compuesta principalmente por aa no polares, lo cual difiere de lo reportado por Bellesia (2010). Esto se puede explicar debido a que la formación de ciertas estructuras secundarias depende de la propensión de aminoácidos para formar hélices- $\alpha$  o hebras- $\beta$ , lo cual suele verse beneficiado cuando aa vecinos también tienen propensión por ciertas estructuras secundarias, independientemente del patrón de polaridad.

En el grupo de investigación hemos logrado un avance significativo respecto al diseño de nuevos péptidos autoagregables, en futuras investigaciones otras herramientas resultarán útiles para mejorar el diseño de nuevos SAPs. Uno de los enfoques más exitosos en ingeniería de proteínas consiste en extraer conocimiento de estructuras de proteínas 3D conocidas y almacenadas en bases de datos como el Protein Data Bank (PDB) o bibliotecas de fragmentos estructurales de proteínas que describen su modularidad (Fernandez-Fuentes, 2006; Joosten et al., 2011; Mackenzie & Grigoryan, 2017; Verschueren et al., 2011), estas bases de datos pueden ser usadas en el diseño estructural global de una proteína funcional. Además, el uso de herramientas bioinformáticas para el diseño computacional de proteínas es un recurso valioso para el diseño y evaluación *in silico* de nuevas proteínas y péptidos autoagregables (Gainza-Cirauqui & Correia, 2018; Norn & André, 2016; Samish, 2017).

Dado que la mayoría de las macromoléculas y agentes biológicamente activos naturales son de tamaño nanométrico, las estructuras de tamaño nanométrico que diseñemos podrían ser capaces de mejorar la interacción con sistemas biológicos complejos como membranas celulares u otras proteínas (Donaldson et al., 2018). Hemos confirmado que el péptido 1 forma partículas polidispersas, compartiendo tamaños similares con los fragmentos de poliedrina PH(1-110) y PH(58-110). Por otra parte el péptido 4.1 (27AΔK), es capaz de formar partículas con un tamaño relativamente menor comparado con PH(1-110) y PH(58-110). Zepeda-Cervantes y colaboradores (2019) han diseñado una vacuna contra el circovirus porcino tipo 2 (PCV2) mediante nanopartículas basadas en el péptido PH(1-110) fusionado a la proteína estructural ORF2 de PCV2, reportando que el tamaño de las partículas se encuentra entre 100 y 400 nm, con un promedio de 200 nm. Dado que nuestras partículas son de un tamaño menor a las formadas por PH(1-110)-EGFP esperamos que su tamaño real sea no mayor a los 200 nm. Esto resulta de gran importancia cuando se piensa en el uso de nanopartículas como acarreadores de antígenos en vacunas ya que el tamaño resulta ser una característica importante por ejemplo en el proceso de migración del complejo nanopartícula-antígeno hacia órganos linfáticos. Manolova (2008) y Tan & Jiang, (2012) reportan que partículas menores a 20 nm pueden drenar fácilmente desde el sitio de vacunación hacia los órganos linfáticos y que por otra parte

las nanopartículas mayores a 200 nm no pueden drenar directamente a través de los poros de fenestración hacia la linfa, por lo que requieren de transporte activo luego de la internalización, incluso células presentadoras de antígeno como las células dendríticas absorben preferentemente nanopartículas de entre 20 y 200 nm (Xiang et al., 2006). El tamaño de las partículas definirá la capacidad de células del sistema inmune para absorberlas por múltiples vías, como la fagocitosis, la macropinositosis, absorción mediada por caveola o absorción mediada por clatrina (Sieczkarski & Whittaker, 2002). Nuestros resultados demuestran diferencias en los tamaños de partículas entre los péptidos diseñados y los péptidos basados en fragmentos de poliedrina. Sin embargo, futuras investigaciones requerirán dar una aproximación más precisa de los tamaños de las partículas, ya que las mediciones mediante microscopia confocal generalmente tienen una resolución máxima de 180 nm a 200 nm en condiciones óptimas (Fouquet et al., 2015). Por lo tanto, objetos visibles pueden tener un tamaño menor que el observado.

Nuestra investigación arroja información importante acerca del diseño y desarrollo de nuevos SAPs haciendo uso de posibles motivos estructurales de autoagregación presentes en fragmentos de proteínas autoagregables naturales como poliedrina. Hemos logrado reconocer algunas características estructurales que podrían ser fundamentales para el diseño de SAPs basados en el motivo  $6\beta$ - $16\alpha$  de PH<sub>(81-110)</sub>. Futuras investigaciones serán fundamentales para definir las características que determinan los mecanismos de su autoagregación, así como la caracterización de la gran variedad de SAPs que podamos desarrollar.

## 9. CONCLUSIÓN

---

En esta investigación hemos diseñado una serie de péptidos basados en el motivo estructural 6-β/16α del péptido autoagregable PH<sub>(81-110)</sub>. Hemos desarrollado los baculovirus recombinantes que expresan los péptidos fusionados GFP y hemos caracterizado sus capacidades de autoagregación en células Sf-9 mediante microscopia confocal de fluorescencia.

Hemos determinado que no todos los péptidos 6-β/16α son capaces de autoagregarse para formar partículas visibles. Sin embargo, hallamos que el péptido 1 demostró tener capacidad para autoagregarse y formar partículas de tamaño polidisperso, dicha capacidad se vio afectada al modificar el perfil hidrofóbico de su hélice-α. Por otra parte, el péptido 4 no autoagregable fue capaz de autoagregarse y formar partículas de tamaño monodisperso, una vez que el perfil hidrofóbico de su hélice-α fue modificado, haciéndolo más parecido al perfil hidrofóbico del péptido 1. Encontramos que los péptidos 6β-16α autoagregables que diseñamos, parecen requerir de un patrón en el perfil de hidrofobicidad de su hélice-α, por lo que sugerimos que el perfil hidrofóbico de las estructuras secundarias, juega un papel fundamental en la capacidad de autoagregación de los péptidos diseñados con base en el motivo 6β-16α de PH<sub>(81-110)</sub>. Esperamos que futuras investigaciones nos permitan determinar con mayor precisión las características de los SAPs 6-β/16α presentados en esta investigación, así como de nuevos péptidos que diseñemos.

## 10. REFERENCIAS

---

1. Airene, K. J., Hu, Y.-C., Kost, T. A., Smith, R. H., Kotin, R. M., Ono, C., Matsuura, Y., Wang, S., & Ylä-Herttuala, S. (2013). Baculovirus: an Insect-derived Vector for Diverse Gene Transfer Applications. *Molecular Therapy*, 21(4), 739–749. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.286>
2. Baculoviridae. (2012). En *Virus Taxonomy* (pp. 163–173). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00013-6>
3. Bale, J. B., Gonen, S., Liu, Y., Sheffler, W., Ellis, D., Thomas, C., Cascio, D., Yeates, T. O., Gonen, T., King, N. P., & Baker, D. (2016). Accurate design of megadalton-scale two-component icosahedral protein complexes. *Science*, 353(6297), 389–394. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8818>
4. Banwell, E. F., Abelardo, E. S., Adams, D. J., Birchall, M. A., Corrigan, A., Donald, A. M., Kirkland, M., Serpell, L. C., Butler, M. F., & Woolfson, D. N. (2009). Rational design and application of responsive  $\alpha$ -helical peptide hydrogels. *Nature Materials*, 8(7), 596–600. <https://doi.org/10.1038/nmat2479>
5. Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
6. Bella, J. (2016). Collagen structure: new tricks from a very old dog. *Biochemical Journal*, 473(8), 1001–1025. <https://doi.org/10.1042/BJ20151169>
7. Bellesia, G., Jewett, A. I., & Shea, J.-E. (2010). Sequence periodicity and secondary structure propensity in model proteins. *Protein Science*, 19(1), 141–154. <https://doi.org/10.1002/pro.288>
8. Bhatia, S. (2016). *Nanotechnology in drug delivery: fundamentals, design, and applications*. Apple Academic Press, Inc.
9. Blissard, G. W., & Theilmann, D. A. (2018). Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells. *Annual Review of Virology*, 5(1), 113–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043356>

10. Butterfield, G. L., Lajoie, M. J., Gustafson, H. H., Sellers, D. L., Nattermann, U., Ellis, D., Bale, J. B., Ke, S., Lenz, G. H., Yehdego, A., Ravichandran, R., Pun, S. H., King, N. P., & Baker, D. (2017). Evolution of a designed protein assembly encapsulating its own RNA genome. *Nature*, *552*(7685), 415–420. <https://doi.org/10.1038/nature25157>
11. Cox, M. M. J. (2012). Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, *30*(10), 1759–1766. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.016>
12. Cruz-Reséndiz, A., Zepeda-Cervantes, J., Sampieri, A., Bastián-Eugenio, C., Acero, G., Sánchez-Betancourt, J. I., Gevorkian, G., & Vaca, L. (2020). A self-aggregating peptide: implications for the development of thermostable vaccine candidates. *BMC Biotechnology*, *20*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0592-9>
13. Deng, L., & Wang, B.-Z. (2018). A Perspective on Nanoparticle Universal Influenza Vaccines. *ACS Infectious Diseases*, *4*(12), 1656–1665. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00206>
14. Ding, X., Liu, D., Booth, G., Gao, W., & Lu, Y. (2018). Virus-Like Particle Engineering: From Rational Design to Versatile Applications. *Biotechnology Journal*, *13*(5), 1700324. <https://doi.org/10.1002/biot.201700324>
15. Donaldson, B., Lateef, Z., Walker, G. F., Young, S. L., & Ward, V. K. (2018). Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation. *Expert Review of Vaccines*, *17*(9), 833–849. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1516552>
16. Dong, H., Paramonov, S. E., & Hartgerink, J. D. (2008). Self-Assembly of  $\alpha$ -Helical Coiled Coil Nanofibers. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(41), 13691–13695. <https://doi.org/10.1021/ja8037323>
17. Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W389–W394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>
18. Edwards-Gayle, C. J. C., & Hamley, I. W. (2017). Self-assembly of bioactive peptides, peptide conjugates, and peptide mimetic materials. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *15*(28), 5867–5876. <https://doi.org/10.1039/C7OB01092C>

19. Engel, D. E., & DeGrado, W. F. (2005).  $\alpha$ - $\alpha$  linking motifs and interhelical orientations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(2), 325–337. <https://doi.org/10.1002/prot.20522>
20. Felberbaum, R. S. (2015). The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology Journal*, 10(5), 702–714. <https://doi.org/10.1002/biot.201400438>
21. Fernandez-Fuentes, N. (2006). A supersecondary structure library and search algorithm for modeling loops in protein structures. *Nucleic Acids Research*, 34(7), 2085–2097. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl156>
22. Fouquet, C., Gilles, J.-F., Heck, N., Dos Santos, M., Schwartzmann, R., Cannaya, V., Morel, M.-P., Davidson, R. S., Trembleau, A., & Bolte, S. (2015). Improving Axial Resolution in Confocal Microscopy with New High Refractive Index Mounting Media. *PLOS ONE*, 10(3), e0121096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121096>
23. Fuchs, A., & Frishman, D. (2010). Structural comparison and classification of alpha-helical transmembrane domains based on helix interaction patterns. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/prot.22768>
24. Gainza-Cirauqui, P., & Correia, B. E. (2018). Computational protein design — the next generation tool to expand synthetic biology applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 52, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.04.001>
25. Gerety, R. J. (1983). Newly licensed hepatitis B vaccine. Known safety and unknown risks. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 249(6), 745–746. <https://doi.org/10.1001/jama.249.6.745>
26. Habibi, N., Kamaly, N., Memic, A., & Shafiee, H. (2016). Self-assembled peptide-based nanostructures: Smart nanomaterials toward targeted drug delivery. *Nano Today*, 11(1), 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.02.004>
27. Han, J., Zhao, D., Li, D., Wang, X., Jin, Z., & Zhao, K. (2018). Polymer-Based Nanomaterials and Applications for Vaccines and Drugs. *Polymers*, 10(1), 31. <https://doi.org/10.3390/polym10010031>

28. Hauser, C. A. E., Deng, R., Mishra, A., Loo, Y., Khoe, U., Zhuang, F., Cheong, D. W., Accardo, A., Sullivan, M. B., Riekkel, C., Ying, J. Y., & Hauser, U. A. (2011). Natural tri- to hexapeptides self-assemble in water to amyloid -type fiber aggregates by unexpected -helical intermediate structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(4), 1361–1366. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014796108>
29. Hecht, M. H., Richardson, J. S., Richardson, D. C., & Ogden, R. C. (1990). *Protein of Native-Like Sequence*. *249*, 8.
30. Hernandez Alvarez, B., Bassler, J., & Lupas, A. N. (2019). Structural diversity of coiled coils in protein fibers of the bacterial cell envelope. *International Journal of Medical Microbiology*, *309*(5), 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.05.011>
31. Herniou, E., & Jehle, J. (2007). Baculovirus Phylogeny and Evolution. *Current Drug Targets*, *8*(10), 1043–1050. <https://doi.org/10.2174/138945007782151306>
32. Hill, B. D., Zak, A., Khera, E., & Wen, F. (2017). Engineering Virus-like Particles for Antigen and Drug Delivery. *Current Protein & Peptide Science*, *19*(1). <https://doi.org/10.2174/1389203718666161122113041>
33. Ho, B. K., & Curmi, P. M. G. (2002). Twist and shear in  $\beta$ -sheets and  $\beta$ -ribbons. *Journal of Molecular Biology*, *317*(2), 291–308. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5385>
34. Hu, C., & Koehl, P. (2010). Helix-sheet packing in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/prot.22688>
35. Hutchinson, E. G. (s/f). *A revised set of potentials for  $\alpha$ -turn formation in proteins*. 10.
36. Inceoglu, A. B., Kamita, S. G., Hinton, A. C., Huang, Q., Severson, T. F., Kang, K., & Hammock, B. D. (2001). Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Management Science*, *57*(10), 981–987. <https://doi.org/10.1002/ps.393>
37. Jacob, R. S., Das, S., Ghosh, S., Anoop, A., Jha, N. N., Khan, T., Singru, P., Kumar, A., & Maji, S. K. (2016). Amyloid formation of growth hormone in presence of zinc: Relevance to its storage in secretory granules. *Scientific Reports*, *6*(1), 23370. <https://doi.org/10.1038/srep23370>
38. Jacob, R. S., Ghosh, D., Singh, P. K., Basu, S. K., Jha, N. N., Das, S., Sukul, P. K., Patil,

- S., Sathaye, S., Kumar, A., Chowdhury, A., Malik, S., Sen, S., & Maji, S. K. (2015). Self healing hydrogels composed of amyloid nano fibrils for cell culture and stem cell differentiation. *Biomaterials*, *54*, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.03.002>
39. Je, Y. H., Jin, B. R., Park, H. W., Roh, J. Y., Chang, J. H., Seo, S. J., Olszewski, J. A., O'Reilly, D. R., & Kang, S. K. (2003). Baculovirus Expression Vectors that Incorporate the Foreign Protein into Viral Occlusion Bodies. *BioTechniques*, *34*(1), 81–87. <https://doi.org/10.2144/03341st04>
40. Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *9*, 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
41. Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology*, *151*(7), 1257–1266. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>
42. Ji, X., Sutton, G., Evans, G., Axford, D., Owen, R., & Stuart, D. I. (2010). How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. *The EMBO Journal*, *29*(2), 505–514. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.352>
43. Jones, R. G., Ober, C. K., Hodge, P., Kratochvíl, P., Moad, G., & Vert, M. (2012). Terminology for aggregation and self-assembly in polymer science (IUPAC Recommendations 2013). *Pure and Applied Chemistry*, *85*(2), 463–492. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-12-03-12>
44. Joosten, R. P., te Beek, T. A. H., Krieger, E., Hekkelman, M. L., Hooft, R. W. W., Schneider, R., Sander, C., & Vriend, G. (2011). A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Research*, *39*(Database), D411–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1105>
45. Källblad, P., & Dean, P. M. (2004). Backbone-backbone geometry of tertiary contacts between  $\alpha$ -helices. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *56*(4), 693–703. <https://doi.org/10.1002/prot.20201>

46. Khalid, K., Tan, X., Mohd Zaid, H. F., Tao, Y., Lye Chew, C., Chu, D.-T., Lam, M. K., Ho, Y.-C., Lim, J. W., & Chin Wei, L. (2020). Advanced in developmental organic and inorganic nanomaterial: a review. *Bioengineered*, 11(1), 328–355. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1736240>
47. King, N. P., Bale, J. B., Sheffler, W., McNamara, D. E., Gonen, S., Gonen, T., Yeates, T. O., & Baker, D. (2014). Accurate design of co-assembling multi-component protein nanomaterials. *Nature*, 510(7503), 103–108. <https://doi.org/10.1038/nature13404>
48. Lakshmanan, A., Zhang, S., & Hauser, C. A. E. (2012). Short self-assembling peptides as building blocks for modern nanodevices. *Trends in Biotechnology*, 30(3), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.11.001>
49. Lee, Trinh, Yoo, Shin, Lee, Kim, Hwang, Lim, & Ryou. (2019). Self-Assembling Peptides and Their Application in the Treatment of Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5850. <https://doi.org/10.3390/ijms20235850>
50. Lloyd, J., & Cheyne, J. (2017). The origins of the vaccine cold chain and a glimpse of the future. *Vaccine*, 35(17), 2115–2120. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.097>
51. López, M. G., Diez, M., Alfonso, V., & Taboga, O. (2018). Biotechnological applications of occlusion bodies of Baculoviruses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), 6765–6774. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9130-2>
52. Lu, J., & Wang, X. (2018). Biomimetic Self-Assembling Peptide Hydrogels for Tissue Engineering Applications. En I. Noh (Ed.), *Biomimetic Medical Materials* (Vol. 1064, pp. 297–312). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0445-3\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0445-3_18)
53. Mackenzie, C. O., & Grigoryan, G. (2017). Protein structural motifs in prediction and design. *Current Opinion in Structural Biology*, 44, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.03.012>
54. Mahapatro, A., & Singh, D. K. (2011). Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 55. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-55>
55. Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A.,

- Singru, P. S., Nilsson, K. P. R., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W., & Riek, R. (2009). Functional Amyloids As Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science*, *325*(5938), 328–332. <https://doi.org/10.1126/science.1173155>
56. Mandal, D., Nasrolahi Shirazi, A., & Parang, K. (2014). Self-assembly of peptides to nanostructures. *Org. Biomol. Chem.*, *12*(22), 3544–3561. <https://doi.org/10.1039/C4OB00447G>
57. Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., & Bachmann, M. F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European Journal of Immunology*, *38*(5), 1404–1413. <https://doi.org/10.1002/eji.200737984>
58. Mehrban, N., Abelardo, E., Wasmuth, A., Hudson, K. L., Mullen, L. M., Thomson, A. R., Birchall, M. A., & Woolfson, D. N. (2014). Assessing Cellular Response to Functionalized  $\alpha$ -Helical Peptide Hydrogels. *Advanced Healthcare Materials*, *3*(9), 1387–1391. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400065>
59. Mishra, A., Loo, Y., Deng, R., Chuah, Y. J., Hee, H. T., Ying, J. Y., & Hauser, C. A. E. (2011). Ultrasmall natural peptides self-assemble to strong temperature-resistant helical fibers in scaffolds suitable for tissue engineering. *Nano Today*, *6*(3), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.05.001>
60. Moscardi, F. (1999). ASSESSMENT OF THE APPLICATION OF BACULOVIRUSES FOR CONTROL OF LEPIDOPTERA. *Annual Review of Entomology*, *44*(1), 257–289. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.257>
61. Nepomnyachiy, S., Ben-Tal, N., & Kolodny, R. (2014). Global view of the protein universe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(32), 11691–11696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403395111>
62. Norn, C. H., & André, I. (2016). Computational design of protein self-assembly. *Current Opinion in Structural Biology*, *39*, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.04.002>
63. Palomares, L. A., Realpe, M., & Ramírez, O. T. (2015). An Overview of Cell Culture Engineering for the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System (BEVS). En M. Al-Rubeai (Ed.), *Animal Cell Culture* (Vol. 9, pp. 501–519). Springer International

Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4_15)

64. Perlmutter, J. D., & Hagan, M. F. (2015). Mechanisms of Virus Assembly. *Annual Review of Physical Chemistry*, 66(1), 217–239. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040214-121637>
65. Petka, W. A. (1998). Reversible Hydrogels from Self-Assembling Artificial Proteins. *Science*, 281(5375), 389–392. <https://doi.org/10.1126/science.281.5375.389>
66. Petrlova, J., Hansen, F. C., van der Plas, M. J. A., Huber, R. G., Mörgelin, M., Malmsten, M., Bond, P. J., & Schmidtchen, A. (2017). Aggregation of thrombin-derived C-terminal fragments as a previously undisclosed host defense mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(21), E4213–E4222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619609114>
67. Qian, C., Liu, X., Xu, Q., Wang, Z., Chen, J., Li, T., Zheng, Q., Yu, H., Gu, Y., Li, S., & Xia, N. (2020). Recent Progress on the Versatility of Virus-Like Particles. *Vaccines*, 8(1), 139. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010139>
68. Rad-Malekshahi, M., Lempsink, L., Amidi, M., Hennink, W. E., & Mastrobattista, E. (2016). Biomedical Applications of Self-Assembling Peptides. *Bioconjugate Chemistry*, 27(1), 3–18. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00487>
69. Raleigh, D. P., Betz, S. F., & DeGrado, W. F. (1995). A de Novo Designed Protein Mimics the Native State of Natural Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 117(28), 7558–7559. <https://doi.org/10.1021/ja00133a035>
70. Regan, L., & DeGrado, W. F. (1988). Characterization of a Helical Protein Designed from First Principles. *Science, New Series*, 241(4868), 976–978.
71. Rohrmann, G. F. (s/f). *Baculovirus Molecular Biology*. 260.
72. Roostalu, J. (s/f). *Microtubule nucleation: beyond the template*. 9.
73. Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 10(S7), S10–S17. <https://doi.org/10.1038/nm1066>
74. Samish, I. (2017). The Framework of Computational Protein Design. En I. Samish (Ed.),

- Computational Protein Design* (Vol. 1529, pp. 3–19). Springer New York.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6637-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6637-0_1)
75. Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2010). Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Letters*, *10*(9), 3223–3230. <https://doi.org/10.1021/nl102184c>
76. Sieczkarski, S. B., & Whittaker, G. R. (2002). Dissecting virus entry via endocytosis. *Journal of General Virology*, *83*(7), 1535–1545. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-7-1535>
77. Smith, G. E., Summers, M. D., & Fraser, M. J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*, *3*(12), 2156–2165. <https://doi.org/10.1128/MCB.3.12.2156>
78. Su, S., & Kang, P. M. (2020). Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine. *Nanomaterials*, *10*(4), 656. <https://doi.org/10.3390/nano10040656>
79. Tan, M., & Jiang, X. (2012). Norovirus P particle: a subviral nanoparticle for vaccine development against norovirus, rotavirus and influenza virus. *Nanomedicine*, *7*(6), 889–897. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.62>
80. Valderrama, J. G., & Villamizar, L. (2013). *Baculovirus: Hospederos y especificidad Baculovirus: Hosts and specificity*. 2, 13.
81. Verschueren, E., Vanhee, P., van der Sloot, A. M., Serrano, L., Rousseau, F., & Schymkowitz, J. (2011). Protein design with fragment databases. *Current Opinion in Structural Biology*, *21*(4), 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.05.002>
82. Walters, R. F. S., & DeGrado, W. F. (2006). Helix-packing motifs in membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(37), 13658–13663. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605878103>
83. Wang, C., Zhu, W., Luo, Y., & Wang, B.-Z. (2018). Gold nanoparticles conjugating recombinant influenza hemagglutinin trimers and flagellin enhanced mucosal cellular immunity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *14*(4), 1349–1360. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.03.007>

84. Wang, C., Zhu, W., & Wang, B.-Z. (2017). Dual-linker gold nanoparticles as adjuvanting carriers for multivalent display of recombinant influenza hemagglutinin trimers and flagellin improve the immunological responses in vivo and in vitro. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 4747–4762. <https://doi.org/10.2147/IJN.S137222>
85. Xiang, S. D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P. L., & Plebanski, M. (2006). Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods*, 40(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.016>
86. Yang, L., Liu, A., Cao, S., Putri, R. M., Jonkheijm, P., & Cornelissen, J. J. L. M. (2016). Self-Assembly of Proteins: Towards Supramolecular Materials. *Chemistry - A European Journal*, 22(44), 15570–15582. <https://doi.org/10.1002/chem.201601943>
87. Zdanowicz, M., & Chroboczek, J. (2016). Virus-like particles as drug delivery vectors. *Acta Biochimica Polonica*, 63(3). [https://doi.org/10.18388/abp.2016\\_1275](https://doi.org/10.18388/abp.2016_1275)
88. Zepeda-Cervantes, J., Cruz-Reséndiz, A., Sampieri, A., Carreón-Nápoles, R., Sánchez-Betancourt, J. I., & Vaca, L. (2019). Incorporation of ORF2 from Porcine Circovirus Type 2(PCV2) into genetically encoded nanoparticles as a novel vaccine using a self-aggregating peptide. *Vaccine*, 37(14), 1928–1937. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.044>
89. Zhang, J., & Grigoryan, G. (2013). Mining Tertiary Structural Motifs for Assessment of Designability. En *Methods in Enzymology* (Vol. 523, pp. 21–40). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394292-0.00002-3>
90. Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C.-X., Mitter, N., Yu, C., & Middelberg, A. P. J. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32(3), 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>
91. Zhou, X.-R., Cao, Y., Zhang, Q., Tian, X.-B., Dong, H., Chen, L., & Luo, S.-Z. (2017). Self-assembly nanostructure controlled sustained release, activity and stability of peptide drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 528(1–2), 723–731. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.051>