



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA DEL FAGO  
VPMS1 Y EVALUACIÓN DE SUS PÉPTIDOS  
COMO UNA ALTERNATIVA PARA INHIBIR EL  
CRECIMIENTO DE *Vibrio parahaemolyticus***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS**

**PRESENTA**

**JESÚS MARTÍN RAMÍREZ OROZCO**

**LA PAZ, B.C.S., JUNIO DEL 2013**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 16 del mes de Mayo del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**"CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA DEL FAGO VPMS1 Y EVALUACIÓN DE SUS PÉPTIDOS  
COMO UNA ALTERNATIVA PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE *Vibrio parahaemolyticus*"**

Presentada por el alumno:

**RAMÍREZ**

Apellido paterno

**OROZCO**

materno

**JESÚS MARTÍN**

nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	4	1	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

  
DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

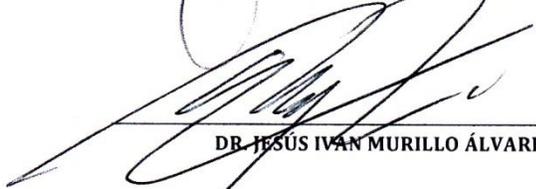
Director de Tesis

  
DRA. VANIA VERÓNICA SERRANO PINTO

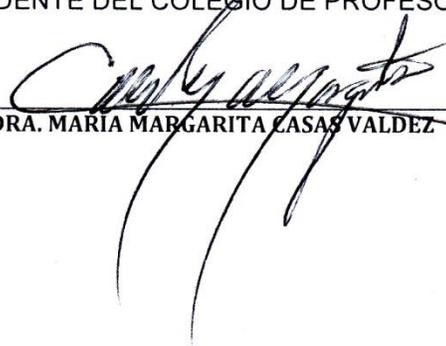
2ª. Directora de Tesis

  
DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

  
DR. VÍCTOR HUGO CRUZ ESCALONA

  
DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN  
CICIMAR  
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 03 del mes Junio del año 2013  
el (la) que suscribe MC. JESÚS MARTÍN RAMÍREZ OROZCO alumno(a) del  
Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS  
con número de registro B091418 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:  
DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ y DRA. VANIA VERÓNICA SERRANO PINTO  
y cede los derechos del trabajo titulado:

"CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA DEL FAGO VPMS1 Y EVALUACIÓN DE SUS PÉPTIDOS  
COMO UNA ALTERNATIVA PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE *Vibrio parahaemolyticus*"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: mramirez04@cibnor.com - sdiaz@ipn.mx - serranovania@hotmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
MC. JESÚS MARTÍN RAMÍREZ OROZCO

nombre y firma

## CONFORMACIÓN DEL COMITÉ

### DIRECTOR:

<b>DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ</b>	<b>CICIMAR-IPN</b>
<b>DRA. VANIA VERÓNICA SERRANO PINTO</b>	<b>CIBNOR, S.C.</b>

### REVISORES, SINODALES:

<b>DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT</b>	<b>CICIMAR-IPN</b>
<b>DR. JESÚS IVAN MURILLO ÁLVAREZ</b>	<b>CICIMAR-IPN</b>
<b>DR. VÍCTOR HUGO CRUZ ESCALONA</b>	<b>CICIMAR-IPN</b>
<b>DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ</b>	<b>CICIMAR-IPN</b>
<b>DRA. VANIA VERÓNICA SERRANO PINTO</b>	<b>CIBNOR, S.C.</b>

### JURADO SUPLENTE

<b>DR. RENATO PEÑA MARTINEZ</b>	<b>CICIMAR-IPN</b>
---------------------------------	--------------------

## **DEDICATORIA**

**A MI ESPOSA**

**NORMA**

**A MIS HIJOS**

**SOCO Y EMCIR**

## AGRADECIMIENTOS

A los proyectos que financiaron el trabajo de laboratorio: Proyectos CONACyT 52107 (CICIMAR) y 85033 (CIBNOR), diversos proyectos en el Canadian Research Institute for Food Safety (CRIFS, University of Guelph).

Al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT.

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, CICIMAR-IPN, no solo por darme la oportunidad de desarrollar el presente trabajo de tesis, sino por todas las facilidades otorgadas durante el mismo. En sus instalaciones se efectuó la primera fase del desarrollo de trabajo, el aislamiento del fago y la selección de la cepa de trabajo.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR, S. C., por otorgarme todas las facilidades y permisos necesarios para lograr esta meta. En sus instalaciones se efectuó la segunda fase del trabajo, produciendo la biomasa del fago y desarrollando un proceso para aislar y purificar su DNA, para poder efectuar su secuenciación.

Al Canadian Research Institute for Food Safety, CRIFS, de la Universidad de Guelph, en Ontario, Canadá, por recibirme en sus instalaciones durante casi un año y otorgarme todas las facilidades y recursos materiales necesarios para culminar estas investigaciones. En sus Laboratorios se culminó con la caracterización molecular del fago, se implementaron las metodologías para el estudio y selección de las moléculas con propiedades antimicrobianas y se establecieron las condiciones para el aislamiento, purificación e identificación de las moléculas diana sobre las que actúan las moléculas antimicrobianas en el hospedero del fago.

A mis directores de tesis, Dra. Vania Serrano y Dr. Sergio Martínez, por sus comentarios, críticas y apoyo, lo cual hago extensivo al resto del Comité Revisor, Dr. Iván Murillo, Dr. Víctor Cruz y Dra. Christine Band.

Al Dr. Mansel Griffiths, Director del CRIFS, asesor académico y financiero durante mi estancia en Canadá.

Al cDr. Eduardo Quiróz, por su invaluable apoyo durante todo el desarrollo del trabajo de tesis, pero sobre todo, durante mi ausencia en el país.

Al personal de CICIMAR, Lina, Alicia y Diana, por su apoyo en las etapas iniciales del trabajo de tesis, con la selección y producción del fago. A Román, por sus comentarios en algunos aspectos de la caracterización genómica del fago. A la Dra. Bárbara González, por sus comentarios y consejos.

Al personal del CIBNOR, M en C Norma Ochoa Álvarez y Biól. Víctor Moyrón Ibarra, por su apoyo en la producción de biomasa del fago y en el montaje de la técnica para conteo de partículas virales, trabajo en el que me apoyaron durante 2 años. A la M

en C Cristina Escobedo y M en C Raúl Llerá, por sus comentarios y consejos en el aislamiento y purificación del DNA del fago.

Al Dr. Javier Caraveo, Dra. Celia Vázquez y Dr. Alejandro Maeda, por su apoyo durante los diversos trámites administrativos efectuados en el CIBNOR.

Al personal del CRIFS, Dr. Mansel Griffiths, Dra. Rocío, Dra. Ángela, Dr. Hani, Dra. Harpret, Dr. Mohammed, Dra. Honney, Dr. Arash y tantos otros, por su valiosa ayuda y apoyo durante mi estancia en el CRIFS.

A la IBQ Lucía Rodríguez y Dr. Francisco Hernández, por su apoyo durante mi ausencia en el país.

A Jennifer Álvarez, por su apoyo en diversas actividades de Laboratorio y logísticas.

A Ángel Carrillo, por encargarse del Laboratorio de Biomedicina en mi ausencia durante casi un año.

A todas aquellas personas que no mencioné y que me ayudaron de alguna u otra manera, muchas gracias.

## ÍNDICE

Índice de figuras.....	ix
Índice de tablas.....	x
Glosario.....	xi
Abreviaturas.....	xiv
Resumen.....	xvi
Abstract.....	xviii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	6
3. Justificación.....	13
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivos.....	17
5.1 Objetivo General.....	17
5.2 Objetivos específicos.....	17
6. Material y Métodos.....	18
6.1 Bacteria y fago	18
6.11 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	18
6.12 Fago VPMS1.....	18
6.2 Análisis de la actividad lítica del fago por prueba de puntos.....	19
6.3 Producción de fagos.....	20
6.4 Conteo de las partículas virales.....	20
6.5 Extracción del ADN del fago.....	21
6.6 Análisis del ADN del fago.....	23
6.7 Determinación de la identidad del ADN.....	24
6.8 Secuenciación del genoma de VPMS1.....	25
6.9 Caracterización del genoma de VPMS1.....	26
6.10 Determinación de los péptidos antimicrobianos.....	27
6.11 Pruebas de actividad antimicrobiana.....	29
6.12 Determinación de la Interacción péptido del fago-	

proteína de la bacteria.....	31
7. Resultados.....	37
7.1 Características del crecimiento del fago VPMS1.....	37
7.2 Producción y conteo de partículas virales (fago).....	38
7.3 Extracción y purificación del ADN del fago VPMS1.....	39
7.4 Análisis del ADN del fago VPMS1.....	40
7.5 Determinación de la identidad del ADN de VPMS1.....	42
7.6 Secuenciación del genoma de VPMS1.....	48
7.7 Caracterización del genoma de VPMS1.....	49
7.8 Determinación de los péptidos antimicrobianos de VPMS1.....	54
7.9 Pruebas de actividad antimicrobiana.....	58
7.10 Determinación de la interacción péptido-proteína.....	61
8. Discusiones.....	70
9. Conclusiones.....	95
10. Recomendaciones.....	99
11. Literatura Citada.....	101
12. Anexo 1.....	120

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Selección de una cepa de fago con crecimiento lítico.....	38
Figura 2 Conteo de Unidades Formadoras de Placa.....	39
Figura 3 Gradiente de proteinasa K.....	40
Figura 4 ADN extraído al fago VPMS1.....	41
Figura 5 Comparativo entre el ADN de <i>V. parahaemolyticus</i> y VPMS1.....	43
Figura 6 Enzimas de restricción actuando sobre el ADN de VPMS1.....	44
Figura 7 Patrón de bandeo de los ADN de VPMS1 y VP.....	45
Figura 8 Amplificación con oligos para eubacterias.....	46
Figura 9 Regresión lineal para el cálculo de peso molecular.....	47
Figura 10 Fragmento de la secuencia de ADN del genoma de VPMS1.....	49
Figura 11 Mapa genómico de VPMS1.....	53
Figura 12 Árbol filogenético de VPMS1.....	54
Figura 13 Curva de crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> contra AMPs a 0.5 µg.....	59
Figura 14 Curva de crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> contra AMPs a 5 µg.....	59
Figura 15 Curva de crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> contra AMPs a 50 µg.....	60
Figura 16 Actividad sinérgica de los AMPs de VPMS1.....	60
Figura 17 Determinación de un método de ruptura celular.....	62
Figura 18 Uso de ligadores para inmovilizar AMPs.....	63
Figura 19 Inmovilización de AMPs en ausencia de ligadores.....	64
Figura 20 Extracto celular y bloqueadores de columna.....	65
Figura 21 Interacción péptido fago-proteína bacteria.....	66
Figura 22 Espectrogramas de identidad de las proteínas.....	68
Figura 23 Alineamientos de identidad con proteínas.....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Gradiente de proteinasa K.....	22
Tabla 2 Cuantificación de ADN de VPMS1.....	42
Tabla 3 Factor de retención de algunos fragmentos de ADN del fago lambda.....	47
Tabla 4 Genes del genoma de VPMS1 y sus funciones.....	51
Tabla 5 Dominios de super-familias encontrados en el genoma de VPMS1.	53
Tabla 6 Características físicas y químicas de los AMPs de VPMS1.....	56
Tabla 7 Secuencia de aminoácidos de los péptidos potencialmente antimicrobianos encontrados en el genoma del fago VPMS1.....	57
Tabla 8 Método de ruptura celular conservando proteínas.....	61

## GLOSARIO

**Anfipatico.** Molécula que posee una región hidrófila y una región hidrofóbica en su estructura (Purves *et al.*, 2004)

**Antibiótico.** Sustancia química producida por microorganismos que mata o inhibe el crecimiento de otro microorganismo (Mlot, 2009)

**Antimicrobiano.** Compuesto que es dañino a los microorganismos, ya sea porque los mata, o porque inhibe su crecimiento (Madigan & Martinko, 2006)

**Atacina.** Péptido antimicrobiano de 20 kDa producido por *Hyalophora* spp. (Carlsson *et al.*, 1998)

**Autolisinas.** Hidrolasas producidas por las bacterias que tienen la propiedad de conducir a la muerte celular de la célula que las contiene (Parisien *et al.*, 2008)

**Bacteriocina.** Proteínas producidas por bacterias que matan o inhiben el crecimiento de otras bacterias (Cleveland *et al.*, 2001)

**Bacteriófago.** Virus específico de bacterias (Leiman *et al.*, 2003)

**Cecropina.** Péptido con propiedad antibacteriana aislado de *Cecropia* que tiene la propiedad de formar hélices-alfa (Ballweber *et al.*, 2002)

**Defensinas.** Pequeños péptidos antimicrobianos que son producidos por los leucocitos y células epiteliales (Klotman & Chang, 2006)

**Disentería.** Trastorno inflamatorio del intestino caracterizado por diarrea frecuente acompañada de dolor abdominal, moco y sangrado (Christopher *et al.*, 2010)

**Electroforesis.** Técnica para la separación de proteínas a través de una matriz aplicando un campo eléctrico (Karp, 2002)

**Genoma.** Totalidad de la información genética de un organismo (Karp, 2002)

**Hemolinfa.** Fluido del sistema circulatorio de los artrópodos (Gullan & Cranston, 2005)

**Hemolisis.** Alteración o destrucción de los eritrocitos (McKinley & O'Loughlin, 2006)

**Hidrófila.** Sustancia polar y por tanto, miscible o soluble en el agua (Ebbing & Gammon, 2005)

**Hidrofóbico (a).** Sustancias no polares y por tanto, inmiscibles o insolubles en el agua (Ebbing & Gammon, 2005)

**Hidrolasa.** Enzima que degrada a los peptidoglicanos (Parisien *et al.*, 2008)

**Inmunidad.** Estado en el cual el organismo no es susceptible a la infección por un patógeno en particular (Karp, 2002)

**Metabolito.** Producto intermediario del metabolismo (Becker, 2006)

**Patógeno.** Un organismo que causa enfermedad (Madigan & Martinko, 2006)

**Péptido.** Cadenas cortas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, por lo general, menos de 100 (Otvos, 2005)

**Profilaxis.** Uso de compuestos antimicrobianos para prevenir contaminación (Krylov, 2001)

**Septicemia.** Presencia de bacterias en la sangre (Hiyoshi *et al*, 2010)

**Virolisinas.** Hidrolasas provenientes de un virus (Parisien *et al.*, 2008)

**Virus.** Parásitos subcelulares incapaces de una existencia por si solos (Becker *et al.*, 2006)

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AMP	Péptidos antimicrobianos
AMPh	Péptidos antimicrobianos hipotéticos
pb	Pares de bases de nucleótidos
BSA	Albúmina del suero bovino
CTRL	Control
DNAsa	Endonucleasa específica para el ADN
dsADN	ADN de doble hebra
ECB	Extracto celular de la bacteria
EcoRI	Enzima de restricción aislada de <i>Escherichia coli</i>
EDC	Hidrocloruro de dimetilaminopropil carbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HindIII	Enzima de restricción aislada de <i>Haemophilus influenzae</i>
KP	Fenómeno Kanagawa
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
MWM	Marcador de peso molecular
NHS	Hidroxisuccinimide
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxylethanol
ORFs	Marcos de lectura abiertos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pst1	Enzima de restricción aislada de <i>Providencia stuartii</i>
Rf	Factor de retención
RNAsa	Ribonucleasa que actúa sobre el RNA
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAE	Amortiguador Tris-Acetato-EDTA
Tdh	Proteína directa termoestable
Trh	Hemolisina relacionada con la TDH

VP            *Vibrio parahaemolyticus*  
VPMS1      Fago VPMS1

## RESUMEN

Es reconocido que la resistencia de las bacterias a los antibióticos continua incrementando desde el primer día en que fueron utilizados. Razón por la cual es importante no solo encontrar nuevas moléculas con actividad antimicrobiana, sino también, nuevas fuentes de las mismas. *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) es una bacteria Gram negativa considerada en todo el mundo como la causa principal de enfermedades gastrointestinales en el humano cuando se consumen alimentos marinos en estado crudo o mal cocinados. Aunado a ello, la alta prevalencia de *V. parahaemolyticus* la convierten en un problema de salud pública.

En este trabajo, se caracterizó y analizó el genoma del fago VPMS1, efectuando diversos análisis bioinformáticos en la búsqueda de moléculas con actividad antimicrobiana, como una alternativa al uso de antibióticos convencionales. Se encontró que el genoma de VPMS1 tiene un tamaño de 42.3 kb y está constituido por 53 genes codificantes. No se encontraron similitudes entre el ADN del genoma de VPMS1 con el ADN de los genomas de los fagos reportados en la base de datos del GenBank, lo que permite suponer que se trata de un nuevo fago. El genoma está organizado en 3 módulos orientados de diferente manera según su expresión de genes. Su contenido G+C es del 47%. La región codificante representa el 91% del genoma y el 9% aparentemente no codifica para ninguna proteína. Treinta genes muestran similitud significativa con alguna proteína con función conocida reportada en la base de datos del GenBank y 23 de ellas no, las cuales posiblemente sean nuevas proteínas con funciones que se podrían derivar de la posición que ocupan en el genoma.

El genoma posee 8 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican para péptidos que presentaron características que los hacen potenciales moléculas para poseer actividad antimicrobiana. El péptido P19850 el cual está constituido por 12 residuos de aminoácidos mostró capacidad de inhibir de manera irreversible el crecimiento de esta bacteria. Los AMPs de VPMS1 mostraron un fuerte sinergismo cuando actuaron en conjunto, potenciando hasta en 8 veces la actividad mostrada por P19850.

Los estudios de interacción e identificación de las moléculas diana para estos péptidos, sugieren que los AMPs de VPMS1 efectúan su actividad antimicrobiana actuando sobre las rutas de transporte de moléculas, solutos, nutrientes y productos de desecho de *V. parahaemolyticus*, desestabilizando la membrana celular y conllevando a la inhibición irreversible del crecimiento celular. En resumen, se concluye que es factible considerar al estudio del genoma de los fagos como una fuente potencial de moléculas con actividad antimicrobiana sobre sus hospederos, por lo cual se acepta la hipótesis planteada en el presente trabajo.

## ABSTRACT

The presence of bacteria resistant to antibiotics is a problem since the discovery of antibiotics. This problem increases daily, which has led to urgent searches for new molecules with antimicrobial activity from new sources. *Vibrio parahaemolyticus* (VP) is a Gram-negative marine bacterium that is an important food-borne pathogen when seafood is not properly prepared. Increasing incidence of *V. parahaemolyticus* has become a public health problem. In this work, we studied a phage genome as a source for antimicrobial molecules as an alternative to conventional antibiotics. VPMS1 is a *V. parahaemolyticus* lytic phage that was isolated from a marine clam. The 42.3 kilobase genome is predicted to encode 53 proteins. Comparison of the VPMS1 DNA genome with known phage genomes show no similarity, thus representing a new *V. parahaemolyticus* phage organized into three differently-oriented modules. The module for packaging covers 12% of the genome; the module for structure covers 31%, and the module for replication and regulation cover 48%. G + C content were 44.67%. The coding region corresponds to 91% of the genome; 9% apparently does not encode any protein. There are 30 genes having significant similarity with some reported proteins in the protein data base, which constitutes 57% of the genome; 23 genes have no significant homology with any reported protein, which constitutes 43%. These could be new proteins with hypothetical functions derived from their position in the genome.

Phylogenetic analysis showed a close similarity of VPMS1 to phages infecting *Enterobacteria*, rather than the *Vibrio* genus. VPMS1 genome has 57 ORFs codifying for peptides, 6 of them showing beta sheets with disulfide bonds and alpha sheets, while 4 of them possess the proline amino acid on their surface, therefore having high probabilities of being antimicrobial molecules. Only 3 molecules showed *in vivo* antimicrobial activity against *V. parahaemolyticus* while only one showed a capacity of irreversible inhibition of the bacterial growth, peptide P19850. The peptide is composed of 12 residues and shares some characteristics with defensins. When

working together, AMPs from VPMS1 showed a high synergism, showing an antimicrobial activity 8 times higher than when P19850 is working alone.

P19850 binds to porins and a protein of the ABC transporter complex. When the AMPs work synergistically, they bind not only to the ABC transporter protein, but to the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase gamma-subunit. These findings suggest that VPMS1 AMPs kill bacteria by blocking their channels for transport of molecules, solutes, nutrients, and waste products across the lipid bilayer membranes of *V. parahaemolyticus* and/or by modifying the stability and limiting the permeability of the bacterial outer membrane. We conclude that the study of the genome of phages is a potential source of antimicrobial molecules that are an alternative to conventional antibiotics.

## 1. INTRODUCCION

Los virus están presentes en cualquier estado de manifestación de vida, representan una de las principales causas de mortandad, son los actores principales de los ciclos geoquímicos y constituyen uno de los reservorios de diversidad genética más importantes sobre la tierra (Suttle, 2005). En los océanos, los virus infectan todas las cosas vivas, desde las bacterias hasta las ballenas. Ellos afectan las formas disponibles de los nutrientes moviéndose entre los reservorios marinos y terrestres, elevando el espectro de emergencia de patógenos. Nuestro entendimiento del efecto de los virus en los sistemas globales y los procesos se continúa develando, eliminando la idea de que los virus y los procesos mediados por los virus son laterales a los procesos globales (Suttle, 2005).

Los océanos están llenos de virus, hay 100 billones de partículas virales por litro de agua en los primeros 50 metros de la mayoría de los ecosistemas marinos. Con un promedio de 10 virus por cada célula de bacteria, estos parásitos imponen un control estricto en la composición de las comunidades microbianas marinas. La presión selectiva ejercida por los virus conlleva a mutaciones continuas en los genomas bacterianos, con adaptaciones genéticas que ocurren a la misma velocidad (Partensky & Garczarek, 2011).

Los bacteriófagos, también llamados fagos, son virus que infectan exclusivamente bacterias, los cuales invaden la célula, irrumpen su metabolismo y eventualmente, causan su lisis (Campbell, 2003). El efecto lítico de los fagos sobre las bacterias fue enunciado en 1896 por el bacteriólogo británico, Ernest Hankin y 2 años más tarde por el bacteriólogo ruso, Gamaleya. Sin embargo, ninguno de ellos entendió ni pudo explicar el fenómeno que habían observado, pues aunque los virus ya habían sido descubiertos unos años antes por Ivanovski, ellos lo desconocían. En 1915 Frederick Twort, un médico-bacteriólogo británico observó el mismo fenómeno, pero al igual que sus antecesores, pensaron que se trataba de una sustancia desconocida o de una enzima y no fue sino hasta 1917, que un microbiólogo canadiense, Félix

D'Herelle, enunció y publicó el resultado de sus investigaciones que habían iniciado en México y concluido en Francia, donde afirmó que los causantes de la muerte de las bacterias eran virus de bacterias, a los que llamó bacteriófagos (Summers, 2001; Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Desde entonces, los fagos fueron considerados ideales para el tratamiento y la profilaxis de las infecciones o enfermedades causadas por las bacterias (Krylov, 2001; Merrill *et al.*, 2003). D'Herelle usó con éxito fagos aislados por el mismo para tratar casos de disentería y otras enfermedades como el cólera o la plaga bubónica. Otros investigadores también usaron la fago-terapia para tratar enfermedades de la piel y de otros tipos. Ello provocó que algunas compañías se dedicaran a producir fagos que contrarrestaran diversas enfermedades ocasionadas por bacterias, como la que eventualmente llevaría el nombre de L'Oréal en París (Francia) o The Elli Lilly en Indianápolis (EUA). Así, el uso de los fagos se extendió en Europa, Asia, y América (Levin & Bull, 2004). Sin embargo, la eficacia de las preparaciones no era tan contundente, pues la integración y producción de las preparaciones de los fagos no eran efectuadas con el suficiente escrutinio que se requería (Merrill *et al.*, 2003). Aunado a ello, en 1929 fue descubierta la penicilina, si bien la autoría del descubrimiento es discutida por muchos científicos, el reconocimiento le corresponde a Alexander Fleming, quien recibió el premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1945 (compartido con Edward Florey y Ernst Chain), por dicha contribución. Pronto se encontró una cepa de hongo altamente productora de la penicilina y en Estados Unidos se establecieron las condiciones de cultivo para producir grandes cantidades de este antibiótico, el cual fue utilizado ampliamente durante la segunda guerra mundial (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

El éxito en el uso de los antibióticos contra las bacterias fue contundente y quizás haya sido el principal motivo de que el uso de los fagos haya caído en el olvido en casi todo el mundo (Merrill *et al.*, 2003), excepto en Europa del este y en la antigua Unión Soviética, en donde las investigaciones con fagos continuó, sin embargo, los

resultados no fueron difundidos al resto del mundo, principalmente, porque no se publicaron en inglés (Matsuzaki & Rashel, 2005).

En el resto del mundo, el interés por los fagos resurgió a mediados de los años 80 del siglo pasado, principalmente ante el surgimiento muy difundido de cepas resistentes a los antibióticos (Cervený *et al.*, 2002), lo cual ha obligado a buscar de manera urgente nuevos metabolitos, drogas u otros métodos que permitan controlar el crecimiento de cepas patógenas resistentes (Wright, 2007; Payne, 2008; Orzech & Nichter, 2008; Fischbach & Walsh, 2009).

Dentro de las estrategias que actualmente son consideradas con potencial antimicrobiano se pueden resaltar tres campos muy prometedores: las hidrolasas de la pared celular bacteriana, los bacteriófagos y más recientemente, los péptidos antimicrobianos. Las hidrolasas de la pared celular bacteriana se dividen en tres grupos, las lisozimas, las autolisinas y las virolisinas. De ellas, las virolisinas son los candidatos más prometedores, debido a que son altamente específicos y tienen la capacidad de lisar rápidamente la pared celular de la bacteria (Parisien *et al.*, 2008). Los bacteriófagos deben ser considerados como excelentes candidatos para terapias antibacterianas ya que ellos son altamente específicos, no son tóxicos a las plantas ni a los animales, y por si fuera poco, a medida que ellos infectan y matan a la bacteria blanco, incrementan su volumen, pero cuando ya han acabado con las bacterias blanco, desaparecen al no tener sustrato donde reproducirse (Summers, 2001). Su eficacia en el tratamiento de enfermedades bacterianas ha sido demostrada en modelos animales o vegetales contra *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus garvieae* y otras más (Cervený *et al.*, 2002; Gill *et al.*, 2006; Westwater *et al.*, 2003).

Por último, los péptidos antimicrobianos son un componente evolutivamente conservado de la respuesta inmune innata, la cual es el principal sistema de defensa de la mayoría de los organismos vivos, y son encontrados en todas las clases de

vida, desde los procariotas hasta los humanos (Yount & Yeaman, 2004). Ellos representan una nueva familia de antibióticos que han estimulado la investigación y el interés clínico, como una nueva opción terapéutica contra las infecciones ocasionadas por bacterias multi-resistentes a las drogas (Pini *et al.*, 2005). A la fecha, se han descrito más de 2,000 péptidos con tales características, indicando su importancia en el sistema innato de inmunidad (Dubin *et al.*, 2005; Jenssen *et al.*, 2006) y algunos de ellos ya se utilizan actualmente en la clínica (Reddy & Aranha, 2004; Dubin *et al.*, 2005).

Se ha descrito el aislamiento de péptidos con actividad antimicrobiana de organismos de todos los dominios en los que se clasifica a los seres vivos. Sin embargo, el estudio de los péptidos producidos por los virus, ha sido muy escasamente estudiado, y básicamente se limita a la descripción de moléculas líticas empleadas por los fagos para su liberación del hospedero (Young *et al.*, 2000; Mendel *et al.*, 2006), o bien, a moléculas peptídicas que participan en la identificación y penetración al hospedero por parte del fago y que poseen actividad antimicrobiana (Arisaka *et al.*, 2003; Rossman *et al.*, 2004). Sin embargo, estos estudios han sido fortuitos, es decir, no fueron realizados haciendo búsquedas de péptidos antimicrobianos, sino del estudio de las moléculas que utilizan los fagos en sus distintas funciones y cuya actividad antimicrobiana resultó ser anexa, así como su naturaleza peptídica.

En este trabajo, se realizó un análisis completo del genoma del fago VPMS1, buscando en su secuencia la presencia de moléculas peptídicas con actividad antimicrobiana contra la bacteria hospedera de este fago, *V. parahaemolyticus* la cual es un patógeno que se encuentra en ambientes marinos y que se asocia con alta frecuencia con desordenes estomacales cuando se consumen alimentos marinos mal cocinados (Butt *et al.*, 2004), así como con problemas en el cultivo de algunas especies marinas (Mahoney *et al.*, 2010). El análisis se llevó a cabo realizando una búsqueda en el genoma del fago, para determinar los marcos de lectura abiertos que codificaban para péptidos. Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de estos marcos de lectura abiertos, y se efectuó un estudio *in silico* para determinar su probable

actividad antimicrobiana utilizando como criterio de selección la presencia de características físico-químicas con probada actividad antimicrobiana. Las moléculas seleccionadas se sintetizaron químicamente y se probaron *in vivo* en cultivos de *V. parahaemolyticus* con el objetivo de determinar si estas moléculas poseían actividad antimicrobiana sobre dichos cultivos. Estos estudios nos permitieron establecer no solo si los fagos pueden ser considerados como una fuente de moléculas antimicrobianas, sino también, algunas propiedades que muestran estas moléculas al trabajar de manera sinérgica, en lugar de hacerlo de manera individual.

## 2. ANTECEDENTES

Los péptidos son moléculas químicas que se forman por la unión de dos o más aminoácidos (aa) mediante enlaces peptídicos. Se les conoce desde hace mucho tiempo, pues se les ha encontrado en muchos seres vivos, aunque en todos los casos, siempre se les había considerado como material de degradación de las proteínas. La delimitación de la definición entre péptido, polipéptido y proteína es en extremo ambigua, ya que todos ellos están formados por las mismas unidades fundamentales y el mismo tipo de enlace. Por lo común, se acepta que un péptido este constituido por la unión de 2 a 100 aminoácidos, de 100 a 200 aminoácidos los polipéptidos y de 200 en adelante las proteínas, que pueden pesar varios miles de Daltons, aunque estos números pueden variar según el autor que se lea (Cudic & Otvos, 2002; Tanaka *et al.*, 2008), sin embargo, no existe ninguna otra forma de diferenciarlos, de ahí que la ambigüedad persista en la literatura actual.

Existen dos tipos de péptidos según su origen: los ribosomales y los no ribosomales. Los ribosomales son sintetizados mediante la traducción del mRNA, mientras que los no ribosomales son el producto de la síntesis por medio de enzimas que son específicas para cada péptido (Hancock & Patrzykat, 2002) y aún existen aquellos que son el producto de la degradación química de alguna proteína, aunque estos últimos no pueden ser considerados como una tercer clase, puesto que derivan de la primera. Según la estructura secundaria del péptido, toman conformaciones alfa-lineales, conformaciones beta de una capa, beta en doble capa y estructuras de giro o anillo.

Los péptidos catiónicos tienen una carga neta de entre +2 y +7 (Yount & Yeaman, 2004), debido al exceso de residuos de arginina y lisina, así como una porción sustantiva de residuos hidrofóbicos (30-50%). Los péptidos pueden o no contener puentes disulfuro (Tanaka *et al.*, 2008), tienen la habilidad de tomar conformaciones anfipáticas, lo que les confiere propiedades hidrofóbicas e hidrófilas (Giuliani *et al.*, 2007).

## **Los péptidos como fuente de moléculas antimicrobianas.**

En algún momento de la evolución de los seres vivos, un antiguo conjunto de mecanismos defensivos basado en receptores de proteínas que reconocían características comunes de los patógenos se convirtió en lo que hoy se conoce como la primera línea de defensa. Esta línea, también llamada inmunidad innata, envuelve células y moléculas que se desplazan hacia el sitio donde se encuentre una infección. Estudios comparativos con diversas especies, sugieren que este mecanismo es tan antiguo como el origen de los organismos multicelulares. Posteriormente, ocurrió algo que hoy se le ha llamado “El *Big Bang* de la inmunología”, los vertebrados evolucionaron un segundo mecanismo de inmunidad, en el cual las células blancas de la sangre son reunidas y dirigidas de manera específica a un patógeno, permaneciendo en la sangre como una memoria inmune. Se estima que este mecanismo “adaptativo” ocurrió hace unos 450 millones de años y pudo ser que surgiera de la introducción de ADN de un virus o un microbio a un pez primitivo (Travis, 2009). Sin embargo, aparentemente ello solo ocurrió en los vertebrados, quienes constituyen una fracción muy pequeña de las especies en la tierra.

Una vez que la infección ha ocurrido, los mecanismos responsables de la inmunidad innata (los cuales incluyen a los péptidos antimicrobianos, los fagocitos, y el sistema del complemento), son activados y rápidamente controlan la replicación del patógeno. De esta manera, la infección es contenida hasta que los linfocitos puedan venir a ocuparse de ella, llevándose a cabo lo que desde hace tiempo se considera que es la función principal de la inmunidad innata, aunque cada vez resulta más claro que el sistema inmune innato tiene un papel mucho más importante y fundamental en la defensa inmune (Medzhitov & Janeway, 2000).

Sin embargo, la inmunidad innata tal como la anteriormente descrita, solo se da en los vertebrados, mientras que los mecanismos de defensa en el resto de los seres

vivientes son llevados a cabo mediante mecanismos más sencillos que la inmunidad innata en los eucariotas. En estos mecanismos de defensa, la principal responsabilidad recae en pequeñas moléculas llamadas péptidos, cuya función primordial es inactivar, atacar y aniquilar al potencial invasor.

Hace aproximadamente 30 años que se descubrió que la piel de los sapos, la hemolinfa de los insectos y los neutrófilos de los humanos, contenían péptidos catiónicos que podían actuar como potentes antimicrobianos (Hancock & Devine, 2004). A la fecha, se han descubierto más de 2,000 péptidos catiónicos en prácticamente todos los organismos, desde las bacterias hasta el hombre (Lazarev & Govorum, 2010). Estos péptidos catiónicos tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana que incluye actividad contra bacterias, parásitos, virus y hongos (Papo & Shai, 2005). Rara vez se recupera la misma secuencia peptídica de las diferentes especies, aun de aquellas estrechamente relacionadas. Los péptidos catiónicos varían considerablemente en su estructura y en su secuencia, con pocas características comunes (Sima *et al.*, 2003). Varían en tamaño de 12 a 50 aminoácidos y tienen masas moleculares de menos de 10,000 Daltons. Los péptidos catiónicos son anfipáticos, lo que significa que poseen tanto una región hidrofóbica que interactúa con los lípidos, como una hidrófila que interactúa con el agua o con residuos cargados negativamente. Esta propiedad, le permite a los péptidos interactuar con las membranas que están compuestas de moléculas anfipáticas, especialmente con las membranas de las bacterias cargadas negativamente. Las células de los animales no poseen carga en su superficie, por lo que no se ven afectadas por los péptidos. Se ha encontrado que los péptidos catiónicos poseen actividad tanto contra las bacterias Gram positivas como con las Gram negativas, con los hongos, parásitos y virus. Más importante aún, los péptidos catiónicos parecen ser efectivos contra muchas cepas de bacterias resistentes a los antibióticos (Wilcox, 2004).

Los péptidos antimicrobianos catiónicos se encuentran donde quiera que haya vida. Las bacterias los usan para competir entre ellas, y los organismos eucariotas los utilizan para protegerse de las infecciones (Patrzykat & Douglas, 2005).

### **Fuente de péptidos antimicrobianos.**

Se han descubierto péptidos de los 3 dominios en los que se clasifica a los seres vivos, Eukarya, Prokarya y Archaea, lo cual hace suponer que prácticamente todos los seres vivos compartimos el mismo sistema primario de defensa, el cual probablemente sea tan antiguo como la vida misma. Las moléculas peptídicas tienen diferentes estructuras y alcances como agentes antimicrobianos, lo que ha generado una diversa y rica gama de fuente de moléculas a nuestro alcance en la lucha contra las bacterias patógenas multi-resistentes.

En las bacterias, se han reportado péptidos con estructuras únicas, y actividades antimicrobianas sin precedente, cuyas secuencias no tienen homólogos en las bases de datos (Faye *et al.*, 2011). A estos péptidos se les da el nombre de bacteriocinas, los cuales se cree se utilizan para defenderse de otras bacterias, incluso aquellas que están estrechamente relacionadas con la misma especie. Son producidos tanto en las bacterias Gram positivas, como las Gram negativas, aunque la defensa parece no ser su única función, pues también actúan como reguladores de su propia expresión, como moléculas señal que interactúan con sus hospederos, o como agentes hemolíticos que incrementan la patogenicidad de las bacterias (Dykes & Hastings, 1997). Las propionicinas, son un tipo de bacteriocinas con un amplio espectro, incluso intra-específico, lo que muestra el papel que juegan dentro del antagonismo en las comunidades bacterianas (Faye *et al.*, 2011). Una de las bacteriocinas más comunes, llamada lantibiótico, es producida por las bacterias ácido lácticas y que muestran una gran actividad antimicrobiana, pues algunas de ellas tienen actividad en el rango nanomolar, mientras que el resto de los péptidos trabajan en el rango micromolar (Cotter *et al.*, 2005).

En el dominio Archaea, se han descrito péptidos con actividad antimicrobiana de estrecho rango, los cuales se utilizan para su defensa contra especies cercanas. Son similares a las bacteriocinas, pero al ser de origen diferente (dominio diferente), se les ha llamado archaeocinas. A diferencia de las bacteriocinas y de los péptidos antimicrobianos encontrados en las bacterias y en los eucariotas, las archaeocinas encontradas hasta el momento solo corresponden a 2 tipos, unos encontrados en las Haloarchaea y otros encontrados en el género *Sulfolobus*. Las halocinas parecen ser una característica universal en las Haloarchaea y se han encontrado cientos de tipos, todos ellos con la misma función, el antagonismo (Price & Shand, 2000). En los hongos se ha encontrado una prometedora defensina llamada plectasin, con una potente actividad antimicrobiana contra cepas resistentes, como las MRSA (multi-resistentes al *Staphylococcus aureus*, por sus siglas en inglés), que posee ventajas sobre la vancomicina, uno de los pocos fármacos que aún muestran actividad contra las MRSA (Schneider *et al.*, 2010).

Los insectos son altamente resistentes a las infecciones bacterianas. Para combatir a los patógenos, los insectos disponen de mecanismos celulares y humorales, siendo la inmunidad innata el mecanismo de esta última. Una vez detectada la invasión por una bacteria, se activa una cascada compleja, la cual resulta en la síntesis de una batería de péptidos antimicrobianos y su liberación en la hemolinfa (Otvos *et al.*, 2000). Los péptidos antimicrobianos son un componente importante en la inmunidad de los insectos, incluyendo los vectores que transmiten los parásitos que causan las mayores enfermedades en los humanos y los animales (Boulanger *et al.*, 2006). Se han descrito péptidos asociados como respuesta ante las infecciones por bacterias y parásitos, por lo que representan el mecanismo de defensa o sistema inmune. Los insectos representan un grupo de animales muy interesantes, pues son por mucho la especie más abundante en el planeta y por tanto, debe ser la que tenga mayor cantidad de péptidos con actividad antimicrobiana. En ellos, los péptidos son producidos en el cuerpo graso (equivalente al hígado) y luego son liberados en la hemolinfa, donde cumplirán su función protectora (Hempel, 2005). Ellos han mostrado una amplia gama de defensa contra bacterias, hongos, y algunos virus. Se

clasifican en cuatro grupos, las cecropinas, las defensinas, péptidos pequeños ricos en prolina y péptidos más grandes ricos en glicina (Chalk *et al.*, 1995). Las moscas responden a las infecciones con defensas humorales e inmunes, que incluyen un poderoso set de antibióticos peptídicos inducibles, así como células de la hemolinfa que proliferan y se diferencian activamente (Hultmark, 2003). Se han descrito más de 34 péptidos antimicrobianos distintos, algunos de ellos de amplio espectro de acción, como las cecropinas, y otros son más especializados, como las atacinas, que solo atacan a las bacterias Gram negativas, o las drosomicinas, que se especializan en atacar a los hongos (Hultmark, 2003).

En otros artrópodos, se han descrito péptidos en la hemolinfa de escorpiones, cuya actividad quizás sea la de la inmunidad innata, pero también se han aislado péptidos del veneno de estos arácnidos, también con actividad antimicrobiana la cual es incluso 60 veces más potente que la de la penicilina (Yuan *et al.*, 2010).

La piel de los anfibios contiene varias moléculas bioactivas (péptidos, proteínas, esteroides, alcaloides, opioides) que poseen actividad terapéutica potente como antibacteriana, antifúngica, antiprotozoaria, antidiabética, antineoplástica, analgésica e inductora del sueño. Las investigaciones sobre las moléculas derivadas de la piel de los anfibios pueden proveer pistas nuevas en el desarrollo de nuevos fármacos para combatir diversas condiciones patofisiológicas (Gómez *et al.*, 2007). Se han aislado numerosos péptidos con actividad antimicrobiana de los peces, dentro de los que se encuentran la catelicidina, la crisopsina, pisidina y otras 81 moléculas que oscilan entre los 14 y los 74 aminoácidos, con propiedades antivirales, antifúngicas, y antiparasitarias (Rajanbabu & Chen, 2011). Aún dentro de los principales mecanismos de defensa de las plantas se describe la activación y síntesis de péptidos antimicrobianos, dentro de los cuales se describe a las defensinas, pequeños péptidos de carácter básico y a las teoninas, también pequeños péptidos básicos ricos en residuos que contienen sulfuros, que presentan efectos tóxicos contra bacterias, hongos, levaduras y animales (Castro & Fontes, 2005).

Es evidente que todos los organismos poseen una variedad de péptidos antimicrobianos con espectro de actividad variable, la cual puede ir de específica, hasta aquellos con un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Una constante con muy pocas excepciones en los trabajos existentes sobre péptidos antimicrobianos, indica que los patógenos presentan nula capacidad para adquirir resistencia contra ellos, aún bajo exposiciones prolongadas (Wilcox, 2004).

Los fagos son virus exclusivos de las bacterias, depredan sobre ellas y en el caso de estar en su estadio lítico, las matan de manera eficaz. Por lo que resulta muy prometedor explorar las moléculas que los fagos utilizan para controlar a su hospedero inhibiendo de manera efectiva su metabolismo para dirigirlo exclusivamente a los intereses de su propio beneficio. Estudiando el genoma de los fagos se puede llegar a obtener alguna de estas moléculas y de esta manera explorar su uso como una molécula que pueda ser utilizada como antimicrobiano. Se conoce desde hace mucho tiempo, que las enzimas que los fagos utilizan para penetrar o salir de sus hospederos son excelentes candidatos como antimicrobianos, sin embargo, estas moléculas no son las únicas que son producidas por los fagos y que pueden ser utilizadas con la finalidad de controlar el crecimiento de sus hospederos. Resulta interesante la presencia de péptidos dentro de los genomas de los fagos, los cuales tomando en cuenta la propiedad antimicrobiana que muchos de ellos poseen en el resto de los seres vivos, hace suponer que muy probablemente algunos de ellos posean dicha actividad antimicrobiana, ya sea lisando a las bacterias de manera directa, o bien bloqueando ciertas regiones o moléculas que resulten poseer funciones vitales para el hospedero.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas a través de los alimentos son de suma importancia a nivel mundial, causando severas pérdidas anuales. La mayoría de las hospitalizaciones y muertes son debidas a agentes bacterianos. *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) es la especie más comúnmente asociada con este tipo de enfermedades humanas, *V. parahaemolyticus* es una bacteria Gram negativa, comúnmente aislada de las regiones costeras y aguas estuarinas. Este organismo se acumula en grandes cantidades en los bivalvos y, como resultado, es frecuentemente asociado con gastroenteritis en humanos después del consumo de alimentos de origen marino sin cocción (crudos), sobre todo de animales filtradores, como los bivalvos (Butt *et al.*, 2004). La enfermedad causada por la ingestión de *V. parahaemolyticus* resulta en diarrea y dolor abdominal. Además, se han reportado septicemia (Hiyoshi *et al.*, 2010) y mortalidad en casos donde hubo la exposición de heridas abiertas o de individuos inmunocomprometidos (Whitaker *et al.*, 2012).

Se estima que existen muchos factores que influyen en la patogenicidad de *V. parahaemolyticus*, dentro de los que se incluye a los asociados con la hemólisis beta, factores de adherencia, varias enzimas, y los productos de los genes *tdh*, *trh* y *ure*. Históricamente la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* se ha asociado con el llamado fenómeno de Kanagawa (KP, por sus siglas en inglés), el cual se observa como una hemólisis beta cuando se crece sobre agar Wagatsuma (Matsuda *et al.*, 2010). Sin embargo, prácticamente todas las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas en la clínica son KP positivas, mientras que solo entre el 1 y el 2% de las cepas ambientales son KP positivas. Ahora se sabe que la reacción de Kanagawa es causada por la proteína directa termoestable (TDH, por sus siglas en inglés), llamada así porque tolera temperaturas de hasta 100°C, y porque su actividad parece ser directa sobre los eritrocitos (no está mediada por la lecitina) (Drake *et al.*, 2007). Estudios posteriores demostraron que algunas cepas de *V. parahaemolyticus* eran patógenas aun en ausencia del factor Kanagawa y de la proteína TDH, encontrándose en su lugar otra proteína muy parecida a esta (pero no la misma),

motivo por el que se le llamo TRH (hemolisina relacionada con la TDH), la cual posee un 67% de similitud con la primera (Drake *et al.*, 2007). Sin embargo, *V. parahaemolyticus* es patógeno aun en ausencia de estas 2 hemolisinas termoestables, lo cual indica que existen otros factores de virulencia, de los cuales se han descrito los factores T3SS1 y T3SS2, pero aun así, se considera que el entendimiento de los factores de virulencia para *V. parahaemolyticus* permanece incompleto (Mahoney *et al.*, 2010).

La densidad de *V. parahaemolyticus* en el ambiente y en los alimentos de origen marino varía conforme las estaciones, ubicación, tipo de muestra y la contaminación (De Paola *et al.*, 2003), y tomando en cuenta que desde finales de los 90 del siglo pasado se ha detectado un incremento en su incidencia, se le considera un problema emergente de salud pública (Ward & Bej, 2006). Sin embargo, *V. parahaemolyticus* no solo resulta ser patógena para los humanos, sino que también se le asocia con problemas en cultivos de peces y camarones principalmente, donde se ha reportado que la vibriosis es uno de los principales problemas a los que se enfrentan los acuicultores, y que pueden causar efectos devastadores en la acuicultura, principalmente del camarón. Los surgimientos de *V. parahaemolyticus* en estas granjas han conducido a altas mortalidades y severas pérdidas económicas en los países productores (Mahoney *et al.*, 2010). La acuicultura aporta la mitad de los alimentos de origen marino que consume el humano, por lo que es realmente importante monitorear y tratar de controlar los elementos que acompañan a los productos que consumimos. En un estudio reciente de la FAO que trata sobre los principales agentes biológicos y químicos asociados con la toxicidad de los alimentos de origen marino, se señalan a tres especies como las más importantes, dos corresponden al género *Vibrio* y una al género *Salmonella* reportándolos como los agentes mayormente causales de epidemias causadas por alimentos contaminados, siendo uno de ellos, *V. parahaemolyticus* (Karunasagar, 2008).

Por otra parte, estudios recientes han revelado la presencia de un alto índice de resistencia de *V. parahaemolyticus* y de *V. cholerae* contra antibióticos de uso

común, como lo son el bacitracina, vancomicina, tetraciclina, furazididona, cefalotina y la eritromicina (Noorlis *et al.*, 2011), lo cual parece ser un dato alarmante si se toma en cuenta el incremento en su incidencia y en la aparición de estas cepas resistentes a los tratamientos disponibles. El tema de la resistencia antimicrobiana a los antibióticos es interesante y requiere por sí solo un apartado que aquí no se abordará, sin embargo, queda evidente que este tópico es universal e incluye prácticamente a toda la micro-biota, por lo que la búsqueda de mecanismos, normas, y políticas gubernamentales son necesarias para tratar de disminuirla, pero junto con ellas, siempre será necesario la búsqueda de nuevas moléculas que nos permitan controlar a las bacterias no deseadas. En este trabajo se propone la exploración de una nueva fuente de moléculas con actividad antimicrobiana, a partir de los expertos biológicos que depredan sobre las bacterias, sus propios bacteriófagos, los cuales por su abundancia superior a la de las bacterias, y a su mayor tasa de mutación, hacen suponer una fuente inagotable de moléculas con propiedades antimicrobianas.

#### **4. HIPOTESIS**

Los péptidos codificados en el genoma de VPMS1 pueden ser utilizados como herramientas que controlen el crecimiento de su hospedero, *Vibrio parahaemolyticus*.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el genoma del fago VPMS1 y evaluar los péptidos codificados en su secuencia, para ser utilizados como herramientas que inhiban el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*.

### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Purificar el ADN de VPMS1 y obtener la secuencia de su genoma.
2. Caracterizar el genoma de VPMS1 y determinar el número de marcos de lectura teóricos contenidos en su secuencia.
3. Seleccionar y sintetizar los péptidos codificados que tengan probabilidad de poseer actividad antimicrobiana.
4. Determinar el efecto antimicrobiano de los péptidos sintetizados, sobre *Vibrio parahaemolyticus*.
5. Identificar la región y la proteína bacteriana sobre la que actúan los péptidos sintetizados que posean actividad antimicrobiana.

## **6. Material y métodos**

### **6.1 Bacteria y fago**

#### **6.11 *Vibrio parahaemolyticus*.**

Se utilizó una cepa de colección, obtenida de la ATCC (American Type Cell Culture, EUA), con clave 17802.

Mantenimiento de la cepa. El stock original se mantuvo preservado a -80°C en una solución de glicerol al 50%.

Reactivación y reposición de los stocks de *V. parahaemolyticus*. Cuando fue necesario, se retiró uno de los tubos, se aclimató a temperatura ambiente y reactivó de la siguiente manera. El tubo stock se incubó en baño de hielo por 20 minutos. En la campana de flujo laminar, se inoculó una asada de *V. parahaemolyticus* obtenida del tubo stock, en 10 mL de medio 2216-caldo (Difco). El tubo stock se regresó al congelador de -80°C marcándolo con una “x”, por cada vez que se retiró del congelador. El tubo inoculado se incubó por 18 horas a 37°C y 200 rpm.

Cepa de trabajo de *V. parahaemolyticus*. Del cultivo se tomaron 10µL (medidos con un asa microbiológica) y se sembraron por estría cruzada en medio 2216-agar (DIFCO). Se incubó a 37°C por 24 horas. Transcurridas las 24 horas, la placa se preservó a temperatura ambiente, cubriéndola de la intemperie en un contenedor plástico. El cultivo generado en esta placa constituyó la cepa de trabajo, la cual fue mantenida por no más de un mes.

#### **6.12 Fago VPMS1**

Cepa stock original del fago. Los stocks de las cepas de fagos de la Colección de Fagos del CICIMAR se encuentran preservados en lotes de 1 mL, en medio 2216-

caldo a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Uno de estos lotes constituyó el stock original del fago, del cual se hicieron 5 alícuotas de 1 mL cada una y se conservaron a  $4^{\circ}\text{C}$ , protegidas de la luz.

Cepa de trabajo del fago. Con un asa microbiológica de  $10\mu\text{L}$ , se tomó un inóculo de la cepa de trabajo de *V. parahaemolyticus* y se depositó en 20 mL de medio 2216-caldo. Se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  y 200 rpm por 9 horas. Se retiró el cultivo y se agregaron  $100\mu\text{L}$  de la cepa stock del fago, se regresó a las mismas condiciones de incubación por 6 horas. Se centrifugó a  $20,000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó el sobrenadante cuidando de no arrastrar parte del paquete celular, para ello, se dejó una capa del sobrenadante sobre el paquete celular. El sobrenadante recuperado se conservó en stocks de 1 mL a  $4^{\circ}\text{C}$ , efectuando un análisis de actividad lítica del fago por el método de prueba de puntos (ver 6.2). Estos viales de 1 mL constituyeron la cepa de trabajo del fago, cada vez que se trabajó se retiró un vial del stock y se descartó, iniciando el proceso de generación a partir del stock original.

## **6.2 Análisis de la actividad lítica del fago por prueba de puntos.**

Se tomaron  $100\mu\text{L}$  de un cultivo de biomasa de *V. parahaemolyticus* y se depositaron en la superficie de una placa de Petri con medio 2216-agar, difundiénolos por arrastre por toda el área con la ayuda de un hisopo clínico estéril. Se incubó por 6 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se marcaron de manera equidistante una serie de puntos a una distancia de 2 cm de la circunferencia de la placa. En cada punto marcado se agregaron  $5\mu\text{L}$  de la cepa de trabajo de fagos. Se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Como control negativo, se agregó a uno de los puntos  $5\mu\text{L}$  del medio de cultivo líquido y como control doble negativo, se utilizaron  $5\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Transcurrido el tiempo, se revisaron las placas y se anotó el resultado.

### **6.3 Producción de fagos.**

A 10 mL de medio 2216-líquido, se le agregó la biomasa tomada con un asa de 10  $\mu$ L de la cepa de trabajo de *V. parahaemolyticus*. Se incubó a 37°C y 200 rpm por 6 horas. Transcurrido el tiempo, se inocularon 5  $\mu$ L de la cepa de trabajo del fago. Se incubó a 37°C y 200 rpm por 12 horas. Se agregaron 100  $\mu$ L de cloroformo al cultivo, se agitó y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, agitando suavemente cada 5 minutos. Se centrifugó a 15,000 x g a 4°C por 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante, dejando un remanente sobre el precipitado, para evitar su arrastre accidental. En la campana de flujo laminar y ambiente estéril, se filtró el sobrenadante con un filtro estéril con un poro de 0.2  $\mu$ , con la ayuda de una jeringa hipodérmica estéril. El líquido filtrado se recuperó y se efectuó la prueba de puntos para verificar la presencia del fago, y se conservó a 4°C protegiéndolo de la luz hasta su uso.

### **6.4 Conteo de las partículas virales.**

Método de la doble capa de agar (Kropinski *et al.*, 2009). Se preparó una solución de biomasa de *V. parahaemolyticus*. Se ajustó la densidad óptica a una lectura de absorbancia de 0.5 unidades. Se efectuó una dilución decimal serial de una solución de trabajo de la cepa de fagos a un volumen final de 1 mL, iniciando la serie con el tubo  $10^{-1}$  y hasta llegar a la dilución  $10^{-10}$ . En un tubo de ensayo de 5 mL, se agregaron 3 mL de medio 2216-agar y se incubó a 45°C por 30 minutos (a esta temperatura el medio de cultivo está líquido; se prepararon 10 tubos en total). Se le inocularon 100  $\mu$ L de la primer dilución de fagos preparada y 100  $\mu$ L del cultivo de bacterias, se agitó por inversión y se inoculó todo el contenido del tubo en una placa de Petri con medio 2216-agar sólido, se difundió de manera homogénea por toda la superficie con la ayuda de un triángulo de vidrio estéril, se tapó la placa y se dejó reposar por 15 minutos o hasta que solidificó. Se repitió el proceso para cada una de las diluciones seriales. Las placas de Petri se incubaron a 37°C por 18 horas. Transcurrido el tiempo, se revisaron y se contó el número de unidades formadoras de

“placa” UFP (áreas sin crecimiento de bacterias). Se calculó el número de partículas virales (equivalen a cada UFP) aplicando la siguiente fórmula:

Número de partículas virales = (Número de UFP) x (10) x (Recíproco de la dilución)

## 6.5 Extracción del ADN del Fago

Se estableció un sistema para extraer ADN del fago sin llevar contaminantes por los ácidos nucleicos del hospedero. Se evaluaron una serie de pruebas montadas con base en la literatura, sin embargo, ninguna de ellas funcionó adecuadamente (datos no mostrados). Aquí únicamente se describe el método final, el cual es una mezcla de pasos de procedimientos ampliamente utilizados en la purificación del ADN de manera casi universal, la única variante radica en el tratamiento del ADN por las nucleasas y la proteinasa K, los tiempos de incubación y la aplicación secuencial que resultaron ser críticas para evitar la contaminación por ADN de *V. parahaemolyticus* y para evitar el daño al ADN del fago.

Establecimiento de un gradiente adecuado de proteinasa K para la eliminación de las nucleasas ADNasa y ARNasa.

Tomando como referencia la Tabla 1, se hicieron las mezclas descritas para las pruebas 3, 4, 5, 6 y 7 sin agregar en ningún caso el ADN de *V. parahaemolyticus*. Se incubó a 37°C por 30 minutos. Se retiraron los tubos de la incubación y se hicieron las mezclas para los tubos 1 y 2. Se agregó el ADN de *V. parahaemolyticus* a todas las pruebas. Se incubó a 37°C por 30 minutos. Se corrió un gel de electroforesis de acuerdo a la técnica descrita en la sección 6.6 y se verificó la prueba en la que no hubiera presencia de ADN.

**Tabla 1** Gradiente de proteinasa K (PK) para determinar la cantidad necesaria de PK ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) para eliminar las nucleasas ADNasa y ARNasa ( $1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

Prueba	ADN VP	Amortiguador	DNAasa	ARNasa	PK
1 (MWM)	8 $\mu\text{L}$	---	---	---	---
2 (CTRL)	8 $\mu\text{L}$	---	---	---	---
3 PK0	8 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	---
4 PK1	8 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
5 PK5	8 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
6 PK10	8 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
7 PK15	8 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$

Extracción de ADN del fago. Se produjo la biomasa del fago conforme al procedimiento antes descrito. Se agregó ADNasa I (Sigma) y ARNasa (Promega) a razón de 100 unidades por mililitro de biomasa de fagos, se adicionó amortiguador 10 x de la ADNasa I, a razón de 1 a 10 en relación a la biomasa de fagos (amortiguador:biomasa). Se homogenizó por agitación manual orbital suave y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 0.1 M y se incubó por 15 minutos a  $65^\circ\text{C}$ . Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Se agregó cloruro de calcio 10 mM, 100x, a razón de 1 a 100 en relación a la biomasa de fagos y se incubó por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Se agregó amortiguador de lisis (Anexo 1) en relación 1 a 1 y se mezcló por pipeteo x 30 veces (succión/eyección). Se agregó una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico equilibrada (25:24:1) y se mezcló por pipeteo x 30 veces (succión/eyección). Se centrifugó a  $5,000 \times g$  por 30 segundos. Con mucho cuidado se recuperó la fase superior, cuidando de dejar una capa de ésta sobre la fase intermedia, con la finalidad de no arrastrar contaminación. El ADN recuperado se distribuyó en viales de 1 mL y se conservó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Purificación del ADN. Cuando el ADN extraído se conservó a  $-20^\circ\text{C}$ , se retiró un stock y descongeló en baño de hielo. El ADN se purificó utilizando el kit de purificación GeneClean Spin Kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). Al ADN, se le agregaron 400 $\mu\text{L}$  de cristales y se homogenizó por pipeteo x 30 veces (inyección/eyección). La mezcla se transfirió a una columna de purificación cuidando no rebasar la marca límite y se centrifugó a  $15,000 \times g$  por 2 minutos. Se eliminó el

centrifugado y a la columna se le agregaron 300  $\mu\text{L}$  de solución de lavado (alcohol al 75%). Se mezcló por pipeteo (mismas condiciones ya descritas) y se centrifugó a 15,000 x  $g$  por 2 minutos. Se repitió el proceso de lavado una vez más. Después del segundo lavado, la columna de purificación se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó una vez más (ahora en seco) para estar seguros de no dejar residuos de la solución de lavado. Se destapó la columna y se dejó reposar por 2 minutos. Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de agua milli-Q estéril y se mezcló por pipeteo (técnica ya descrita). Se centrifugó a 10,000 x  $g$  por 2 minutos. Se recuperó el centrifugado, se tomaron 7  $\mu\text{L}$  para efectuar análisis y el resto se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **6.6 Análisis del ADN del fago.**

Mediante electroforesis en gel de agarosa.

Sobre papel parafilm, se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de la solución de ADN, en otra parte del parafilm colocaron 3  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular (Fermentas) y se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga 3x (Anexo 1) a cada una de las muestras, se mezcló por pipeteo x 3 (inyección/eyección). Se recuperaron las mezclas y se sembraron de manera individual en uno de los pocillos del gel de agarosa al 1%. La electroforesis se efectuó a 100 V por 30 minutos, o hasta que el marcador de avanzada salió del gel. Se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se documentaron los resultados en un fotodocumentador (Biorad, Gel Doc XR), bajo exposición de luz ultravioleta.

Cuantificando en un espectrofotómetro.

Se efectuó mediante un nanofotómetro (Implen), aplicando el procedimiento descrito por el fabricante. Se tomó 1  $\mu\text{L}$  del ADN y se colocó en una columna de cuarzo, se tomó la lectura para dsADN (ADN de doble hebra) utilizando la plataforma adecuada y se leyó la concentración de ADN.

## 6.7 Determinación de la identidad del ADN.

Para efectuar este estudio, se extrajo ADN de la cepa de *V. parahaemolyticus*. Se produjo biomasa de *V. parahaemolyticus* acorde a los procedimientos ya descritos. Se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó a  $5,000 \times g$  por 5 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 mL de amortiguador de lisis, se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), se incubó por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . A partir de aquí, se siguió el protocolo ya descrito para la obtención del ADN del fago, desde el punto donde se agrega el amortiguador de lisis. Incluidos los pasos de análisis por gel de agarosa y cuantificación en el nanofotómetro.

Análisis comparativos entre el ADN del fago y el ADN de la bacteria.

En gel de electroforesis.

Se corrió un gel de electroforesis de la manera ya descrita y se comparó el patrón de corrimiento del ADN de *V. parahaemolyticus* con el del fago.

Fragmentando el ADN con enzimas de restricción.

El ADN del fago se trató con las enzimas de restricción Pst1, EcoRI y HindIII para seleccionar aquella con la que mostró mejor patrón de bandeo. El ADN del fago y el ADN de *V. parahaemolyticus* se trataron con la enzima seleccionada, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1%, se visualizó en el fotodocumentador y se compararon los patrones de bandeo para ambas moléculas.

Mediante amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se tomaron 100 ng del ADN del fago y de la bacteria y se efectuó una reacción de PCR (Anexo 1) utilizando oligos para eubacterias (120F ACTGGCGGACGGGTGAGTAA; 518R CGTATTACCGCGGCTGCTGG). Al final de la reacción de PCR, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 2% y se visualizó en el fotodocumentador comparando los patrones de bandeo de ambos ADN.

Tamaño del genoma del fago.

Esta determinación se efectuó sumando el peso molecular de las bandas de las fracciones generadas en el genoma al ser incubados con las enzimas de restricción. La suma de dichas fracciones es equivalente en cierta medida con el peso del genoma completo. Para el cálculo del tamaño del genoma de VPMS1 se utilizaron los datos obtenidos en el gel al que se tomó la fotografía que aparece en la figura 7. Se midieron las distancias recorridas por los fragmentos de ADN del marcador de peso molecular y del ADN del fago digerido por la enzima de restricción EcoRI, este valor es el factor de retención (Rf) para cada banda en particular. Los datos se utilizaron para efectuar una regresión lineal a los valores obtenidos de Rf para las bandas del marcador de peso molecular y a los logaritmos en base 10 calculados a sus pesos moleculares correspondientes (Tabla 3). Para calcular el peso molecular de las muestras, se midió el Rf de cada muestra y se le aplicó la ecuación de la regresión lineal. Al valor que se obtuvo se le aplicó el anti-logaritmo base 10 y el resultado que se obtuvo correspondió al peso molecular de la muestra (Fig. 8).

## **6.8 Secuenciación del genoma de VPMS1**

Producción de ADN para su secuenciación.

Mediante el método seleccionado de producción de biomasa del fago, extracción y purificación de su ADN, se produjo lo necesario para obtener 10µg de ADN puro, el cual se disolvió en agua mili Q y se conservó a -10°C hasta su envío a secuenciar.

Secuenciación del genoma.

Se obtuvo la secuencia del genoma del fago mediante un secuenciador de última generación, Illumina GAIIx, en los Laboratorios de Base Clear (Leiden, Holanda).

Ensamblaje de la secuencia.

Se efectuó utilizando la opción “*De novo assembly*” del software Workbench versión 4.0 del paquete CLC Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Dinamarca).

## 6.9 Caracterización del genoma de VPMS1

Análisis general del genoma de VPMS1.

El genoma de VPMS1 fue analizado con el software de CLC, obteniéndose las características generales del genoma y el número de posible de marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas en inglés), así como la hebra consenso.

Análisis Bioinformáticos efectuados al genoma.

Los datos obtenidos con el software de CLC, fueron corroborados y/o complementados con otros diversos programas computacionales (softwares), que se describen a continuación.

Determinación del número de marcos de lectura abiertos (ORF).

Los ORF obtenidos con el software CLC fueron verificados con el software Open Reading Frame Finder, de la NCBI (National Center for Biological Information, USA); con el software Sequin (NCBI); y con el software Heurístico GeneMarkS (Besemer & Borodovsky, 2005). En todos los casos, los ORF fueron verificados mediante inspección visual, creando de esta manera una secuencia de genes consenso integrando al genoma completo para el fago VPMS1. Cuando fue necesario, los genes hipotéticos fueron removidos de la secuencia consenso.

Análisis de los genes. Los genes fueron analizados mediante el software BLASTp (NCBI), utilizando una matriz no redundante para proteínas, empleando los algoritmos generados por la matriz BLOSUM 62. Solo se consideraron como válidos los resultados cuyo valor de análisis estadístico “e” (e-valor) fueron inferiores a 0.01, y cuyo porcentaje de cobertura e identidad fueron superiores al 30%, en caso contrario las comparaciones fueron consideradas no válidas.

Determinación de proteínas altamente conservadas.

Para este análisis, se utilizó el buscador de familias de proteínas conservadas de la NCBI, así como el software Pfam 26.0 del Instituto Sanger (Punta *et al.*, 2012).

Determinación de ARN de transferencia (tRNA).

Este estudio se efectuó empleando el software tRNA scan-SE 1.21 (Schattner *et al.*, 2005).

Determinación de promotores de expresión.

La búsqueda de promotores se efectuó empleando el software BPROM (Mount Kisco, NY).

Determinación de naturaleza lipoproteínica de las proteínas. Se efectuó utilizando el software LipoP 1.0 (Wang *et al.*, 2009).

Construcción del árbol filogenético de VPMS1.

Se obtuvo aplicando el software MEGA 5.1

#### **6.10 Determinación de los péptidos antimicrobianos.**

Para determinar a los genes que codifican para péptidos, se efectuó un análisis del tamaño de los ORFs que se encuentran en el genoma del fago, seleccionándose aquellos cuyas proteínas hipotéticas tuvieron un tamaño en aminoácidos menor a 100 residuos, y que por tanto, son considerados péptidos (Cudic & Otvos, 2002).

Los genes se determinaron aplicando una ecuación simple sobre el tamaño nucleotídico del gen para determinar el número de codones, y los resultados fueron anotados usando la matriz del CLC-bio.

Fórmula para determinación de tamaño proteínico:

$$\text{TPc} = \text{Valor absoluto } [(\text{pNIE} - \text{pNTE}) / 3]$$

Dónde: TPc es igual al tamaño proteínico determinado en codones.

pNIE es igual a el número natural que indica la posición de inicio de la expresión del gen.

pNTE es igual al número natural que indica la posición de fin de la expresión del gen.

Criterio de selección de genes que codifiquen para péptido:

El gen es un péptido si  $\text{TPc} < 100$

Para la búsqueda de péptidos con probable actividad antimicrobiana se efectuó una selección utilizando criterios de predicción construidos sobre una base de datos creada con los péptidos antimicrobianos conocidos a la fecha, la cual consta con 1800 moléculas, la plataforma se llama APD (Base de datos de péptidos antimicrobianos, por sus siglas en inglés, Departamento de Patología y Microbiología, Nebraska, USA) el cual es el más utilizado para estos fines. Bajo esta plataforma bioinformática se calculó el peso molecular, hidrofobicidad, índice de Boman, carga neta de la superficie, plegamiento tridimensional (laminas alfa, hojas beta) formación de puentes disulfuro y presencia de aminoácidos característicos de péptidos antimicrobianos, para cada una de las 57 moléculas expresadas de manera hipotética por los ORFs encontrados dentro del genoma de VPMS1. Con base en las características descritas, se seleccionaron aquellos péptidos hipotéticos que tuviesen probabilidad potencial para ser consideradas moléculas con actividad antimicrobiana.

Los péptidos seleccionados con posible actividad antimicrobiana fueron enviados a sintetizar a los Laboratorios de LifeTein, enviando las secuencias de los aminoácidos con sus respectivos códigos (Life Tein LLC, New Jersey, EUA).

## **6.11 Pruebas de actividad antimicrobiana.**

Este ensayo se llevó a cabo efectuando curvas de crecimiento de *V. parahaemolyticus* determinadas a través de micro-cultivos en placas, con parámetros controlados utilizando el equipo BioScreen C (Growth Curves USA, NJ, USA). Los micro-cultivos de *V. parahaemolyticus* fueron ensayados con distintas concentraciones de los péptidos sintéticos y se dio seguimiento a las curvas de crecimiento por un periodo de 18 horas, con una velocidad de agitación de 150 rpm, temperatura de 37°C y efectuando lecturas de absorbancia cada dos horas.

### **Péptidos antimicrobianos hipotéticos (AMPh) ensayados.**

Junto con los péptidos que se enviaron a sintetizar a LifeTein, se adicionó la secuencia de un péptido antimicrobiano de referencia, con una alta actividad antimicrobiana. Esta molécula, llamada DCV, fue aislada de *Crassostrea virginica*, y corresponde a una defensina, cuyo tamaño es de 38 aa y como característica principal, posee 6 cisteínas en su estructura, a la cual se debe su naturaleza antimicrobiana (Seo *et al.*, 2005).

### **Preparación de las concentraciones de los péptidos sintéticos a inocular.**

Se ensayaron 3 concentraciones diferentes de cada uno de los AMPs, los cuales fueron diluidos utilizando agua grado mili-Q estéril. Los péptidos se diluyeron para obtener concentraciones que una vez diluidas en las micro-curvas de crecimiento rindieran una concentración final de  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  y  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Cuando fue necesario preservar las soluciones, éstas se conservaron a -80°C en alícuotas.

### **Determinación de sinergismo entre los péptidos.**

Para determinar el posible sinergismo entre las moléculas de AMPs ensayadas, se preparó una mezcla de AMPs de tal manera que la concentración final obtenida fuera la misma que la de las moléculas de AMP individuales, para poder efectuar los ensayos a las diluciones de cultivo antes mencionadas. Procedimiento, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones de AMP con una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , se

depositaron en un tubo Eppendorf (al final se tienen 80  $\mu$ L de una mezcla de AMPs). Se homogenizó por pipeteo. Concentración obtenida, 1  $\mu$ g de mezcla de AMPs por  $\mu$ L de solución.

#### **Preparación del pre-inóculo.**

Se preparó un pre-inóculo de *V. parahaemolyticus* de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 7.1, ajustando la densidad óptica de las células a una lectura de 0.1 leyendo una dilución 1:10 del cultivo a una absorbancia de 580 nm en un espectrofotómetro

#### **Micro-curvas de crecimiento.**

En condiciones estériles, se abrió una placa BioScreen estéril, con 100 celdas para micro cultivos y se prepararon las curvas de crecimiento de la siguiente manera.

#### **Control negativo de crecimiento de *V. parahaemolyticus*.**

En 3 celdas de cultivo se depositaron 200  $\mu$ L de medio de cultivo 2216-caldo estéril y se taparon las celdas.

#### **Control positivo de crecimiento de *V. parahaemolyticus*.**

En 3 celdas de cultivo se depositaron 180  $\mu$ L de medio de cultivo 2216-caldo estéril. Se inocularon agregando 20  $\mu$ L de pre-inóculo con densidad óptica ajustada. Se taparon las celdas.

#### **Control positivo de actividad antimicrobiana.**

Se utilizó el péptido DCV, el cual se preparó y utilizó a las mismas concentraciones que los AMPs de VPMS1.

#### **Réplicas de los experimentos.**

Se efectuaron un total de 3 réplicas para cada curva de crecimiento.

## **Ensayos.**

En 3 celdas de cultivo se depositaron 180  $\mu$ L de medio de cultivo 2216-caldo estéril. Se inocularon 20  $\mu$ L de pre-inóculo con densidad óptica ajustada. Se agregaron 10  $\mu$ L de la solución de AMP. Se mezcló por pipeteo. Se colocó la placa de cultivo en la recámara del equipo BioScreen C. Se ajustaron los parámetros de cultivo bajo las siguientes condiciones.

Temperatura del cultivo: 37°C +/- 0.5°C

Velocidad de agitación: 150 rpm

Mezclado antes de cada lectura: 10 seg / 300 rpm

Tiempo de incubación: 18 horas

Periodicidad entre cada lectura: 2 horas

Absorbancia de lectura: 580 nm

## **6.12 Determinación de la Interacción péptido del fago-proteína de la bacteria**

### **Determinación de un método para obtener extracto celular de *V. parahaemolyticus*.**

Se produjo un cultivo de *V. parahaemolyticus* en 10 mL de medio 2216-caldo, según el procedimiento descrito con anterioridad y se inocularon 100  $\mu$ L de este cultivo en 30 mL de medio 2216-caldo. Se incubó a 37°C y 200 rpm por 18 horas. Se centrifugó el cultivo a 5,000 x *g* y 4 °C por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de glicerol al 10% estéril. Se repitió el proceso de lavado 2 veces más. El pellet obtenido se conservó en glicerol al 10% a -80°C hasta su uso.

En este punto, se ensayaron distintos procedimientos para obtener el extracto celular de *V. parahaemolyticus* sin dañar sus proteínas, eligiendo aquel que rindió mayor cantidad y calidad de las mismas, todos los amortiguadores de lisis se prepararon agregando inhibidores de proteasas para preservar la integridad de las proteínas de

los extractos. Se ensayaron amortiguadores de lisis conteniendo 2 distintos detergentes, el SDS (Sodium duodesyl sulfate) y el NP-40 (Nonidet), así como dos métodos distintos de ruptura mecánica: perlas de vidrio de 0.1 mm impulsadas por agitación tipo vortex y sonicación.

#### **Método de ruptura mecánica usando perlas de vidrio.**

Uno de los viales conteniendo la biomasa de *V. parahaemolyticus* se centrifugó a 5,000 x g y 4°C por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 mL de amortiguador de lisis (tabla 1) y se agregaron 200 mg de perlas de vidrio de 0.1 mm estériles. Se agitó por movimiento tipo vortex a su máxima potencia, aplicando 30 segundos de agitación por 1 minuto de reposo e incubación en baño de hielo (este proceso agitación/incubación se repitió 10 veces).

#### **Recuperación del extracto celular bacteriano (ECB).**

Se centrifugó a 15,000 x g y 4°C por 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante, cuidando de no arrastrar pellet contaminante. Este sobrenadante recuperado constituyó el ECB. Se conservó a -80°C.

#### **Método de ruptura mecánico usando sonicación.**

Uno de los viales conteniendo la biomasa de *V. parahaemolyticus* se centrifugó a 5,000 x g y 4°C por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 mL de amortiguador de lisis (Anexo 1) conteniendo ya sea SDS 1%, o bien NP-40 1%. El tubo se sometió a sonicación a su máxima potencia por 30 segundos, incubando durante 1 minuto en baño de hielo. Este proceso sonicación/incubación, se repitió 10 veces. El ECB se recuperó mediante el método descrito previamente.

Los extractos obtenidos se evaluaron resolviendo las proteínas mediante electroforesis preparativa desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 12% (Anexo 1) y determinando su concentración de proteínas en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

## **Documentación de los geles de poliacrilamida.**

### **Documentación digital**

Se retiró el gel de la solución de desteñido. Se suspendió el gel en el aire, permitiendo que el exceso de solución se eliminara. Se colocó sobre la plataforma de documentación visualizando con luz blanca (BioRad Gel Doc). Se tomó una foto y se conservó el archivo. El gel se regresó a la solución de desteñido.

### **Documentación física.**

Se retiró el exceso de solución de desteñido del gel. Se tomó una hoja de celofán y se sumergió en agua bi-destilada. Se colocó sobre una superficie plana. Colocando sobre ella el gel de poliacrilamida. Se colocó sobre el gel otra hoja de celofán tratada de la misma manera que a la primera. Se colocó un marco de acrílico sobre la superficie, cerrando el sistema. Se eliminaron las burbujas entre los papeles, se colocó el sistema en una fuente de calor homogénea y se dejó secar por 24 horas.

### **Obtención del extracto celular.**

Se produjeron 300 mL de cultivo de *V. parahaemolyticus* de acuerdo al procedimiento ya descrito, incubando a 37°C por 18 horas a 200 rpm. Las células se recuperaron centrifugando a 5,000 x *g* por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 3 veces agregándole 15 mL de glicerol al 10% estéril, agitando por inversión y centrifugando para eliminar el sobrenadante. Al final, el pelet se re-suspendió en 15 mL del amortiguador de lisis seleccionado (NP-40), se homogenizó y se aplicó el procedimiento de ruptura de lisis con el sonicador de acuerdo a las condiciones ya descritas. Las fracciones celulares se centrifugaron a 15,000 x *g* por 30 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, se montaron en cartuchos de diálisis de 30 mL (Slide-A-Lyzer, Thermo Scientific) utilizando amortiguador PBS 150 mM, pH 7.8, en volúmenes de 5L. Las diálisis se efectuaron en un cuarto frío a 4 °C por 18 horas, con agitación constante moderada, efectuando 3 recambios de amortiguador de lisis, en orden sucesivo, a la media hora, a las 1.5 horas y el último

a las 3 horas. Se recuperaron los extractos dializados y se conservaron en stocks de 1 mL a -80°C hasta su uso.

### **Resolución de las fracciones celulares de *V. parahaemolyticus*.**

Las fracciones celulares se resolvieron de acuerdo a los métodos ya descritos, cuantificando su concentración de proteínas y evaluando la integridad de las proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

### **Activación de las columnas para fijación de los péptidos y evaluación de bloqueadores.**

Columnas para inmovilización de los péptidos. Se utilizaron columnas CovaLink™ NH (Thermo Fisher Scientific Inc.), que son columnas de poliestireno recubiertas con grupos aminos primarios. Las columnas se equilibraron agregándoles amortiguador de carbonatos 50 mM, pH 7.0, por 30 minutos. El amortiguador se retiró y se cargaron las muestras conforme a las siguientes condiciones.

### **Inmovilización de la muestra en la columna.**

Se cargaron 100 µL de la muestra a inmovilizar en la columna activada. Se incubaron a temperatura ambiente y con agitación constante de 150 rpm por 2 horas.

### **Bloqueo de la columna.**

Se cargaron 150 µL de solución bloqueadora (Tris 25 mM-Glicina 192 mM). Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y 150 rpm. Se retiró la solución bloqueadora y se aplicó el procedimiento de lavado.

### **Lavado de la columna.**

Se agregaron 200 µL de solución de lavado (PBS-SDS 0.1%) a la columna. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y 150 rpm. Se descartó la solución de lavado y se repitió el proceso de lavado 2 veces más, para completar 3 lavados en total.

### **Recuperación de muestras de la columna.**

Se cargaron 100 µL de PBS-SDS 1% a la columna e incubando por una hora bajo las condiciones ya descritas. Se recuperó la solución, se tomó una alícuota de 10 µL para efectuar el análisis y el resto se conservó a -20°C hasta su uso.

### **Determinación de la concentración de proteína mínima detectable inmovilizada en las columnas.**

Para efectuar esta determinación se utilizó la fracción 5 de albúmina bovina purificada (BSA por sus siglas en inglés; SIGMA), de la cual se preparó un gradiente de concentración de 0 a 100 µg de BSA por mL, utilizando el amortiguador de equilibrio como solvente.

### **Determinación de la potenciación de la fijación del AMP utilizando un ligador (cross-linker).**

Se utilizaron 2 ligadores ampliamente utilizados en la fijación de proteínas, el EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida, Thermo Scientific) y el Sulfo-SMCC (Succinimidil 4-[N-maleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato, Thermo Scientific). Se pesaron 400 µg de EDC y 1,100 µg de Sulfo-SMCC, se agregó 1 mL de amortiguador de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés, ver anexo 1). Se agitó por inversión hasta su disolución. Se cargaron 150 µL en la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Se agregaron 0.2 µL de mercaptoetanol y se mezcló. Se decantó y se aplicó el procedimiento para inmovilizar proteínas en las columnas.

### **Determinación de la reactividad de los extractos celulares con la columna CovaLink.**

Se aplicaron 100 µL de ECB a la columna. Se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente y 150 rpm. Se retiró el ECB. Se lavó la columna con solución de lavado y se eluyó. Se tomaron 10 µL para análisis y el resto se conservó a -20°C hasta su uso.

### **Determinación del bloqueador a la columna CovaLink.**

Como bloqueador de las regiones de la columna que no reaccionaron con los AMPs, se utilizó glicina (SIGMA) en amortiguador Tris (25 mM Tris-base; 192 mM glicina). Primero se incubó el bloqueador como si se tratase de una muestra, luego se eliminó la solución bloqueadora, se lavó la columna 3 veces de acuerdo al método descrito previamente y finalmente se agregó la muestra, en este caso, 100 µL de extracto de bacterias y se siguió el protocolo para inmovilizar proteínas.

#### **Ligación del AMP de VPMS1 con las fracciones proteínicas del extracto celular de *V. parahaemolyticus*.**

Se inmovilizó el P19850 o bien la mezcla de AMPs en la columna de acuerdo al método descrito para inmovilizar proteínas. Se lavó la columna. Se aplicó el protocolo para bloquear las regiones de la columna que no hayan reaccionado con el AMP. Se lavó la columna. Se agregaron 100 µL de extracto celular de *V. parahaemolyticus*. Se aplicó el protocolo para inmovilizar proteínas. Se lavó la columna. Se aplicó el protocolo para recuperar las proteínas.

#### **Análisis estadístico.**

Los resultados se evaluaron estadísticamente usando el ANDEVA de dos vías, tomando como variable dependiente la absorbancia medida a 580 nm para la hora 18 del cultivo celular y como factores de evaluación los distintos péptidos ensayados y su concentración. Se realizó la prueba de Tukey para evaluar las diferencias significativas entre las medias, utilizando una  $p < 0.05$ .

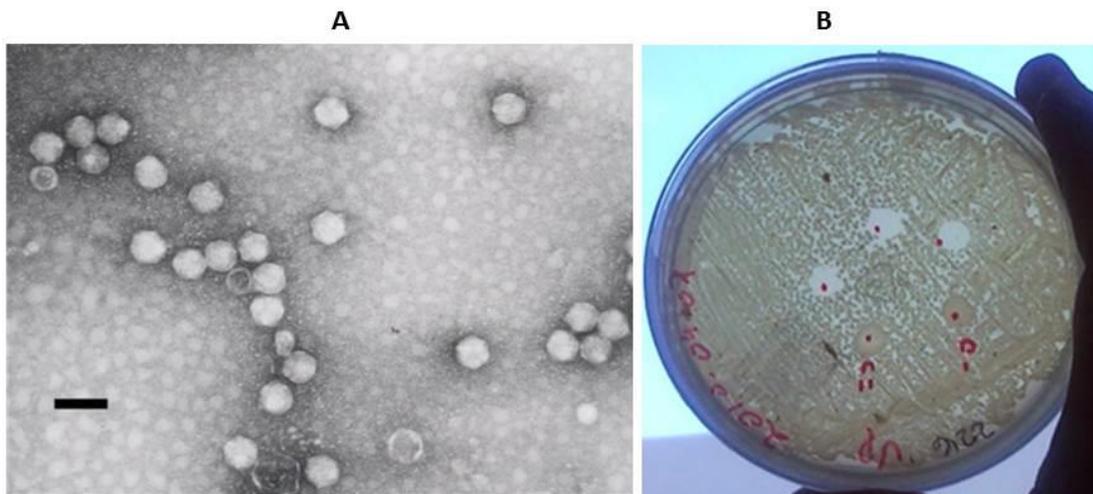
## 7.0 Resultados

### 7.1 Características del crecimiento del fago VPMS1

El fago VPMS1 fue aislado de la almeja marina *Megapitaria squalida* (Martínez & Morales, 2013), los resultados de su caracterización indican que corresponde a un podovirus perteneciente a la familia Podoviridae, orden Caudovirales, posee una cabeza isométrica de 60 nm y una cola corta de 10 nm (Fig. 1 A) (Ramírez *et al.*, 2013).

Al crecer sobre medio sólido, a las 18 horas de crecimiento el fago se presenta como una zona transparente circular llamada “calva o placa”, la cual se debe a la ausencia de células o colonias de la bacteria, producto de su lisis por el crecimiento del fago (Fig. 1 B). La “calva” presentó 13 mm de diámetro (en promedio), con escasa aparición de colonias resistentes, internándose la más profunda a una distancia de 2 mm de la periferia de dicha zona de actividad. Sin embargo, estas colonias de *V. parahaemolyticus* se presentaron de manera aislada, escasa, contando hasta con un máximo número de 3 colonias por placa de cultivo. El diámetro de crecimiento de estas colonias fue de 1 mm.

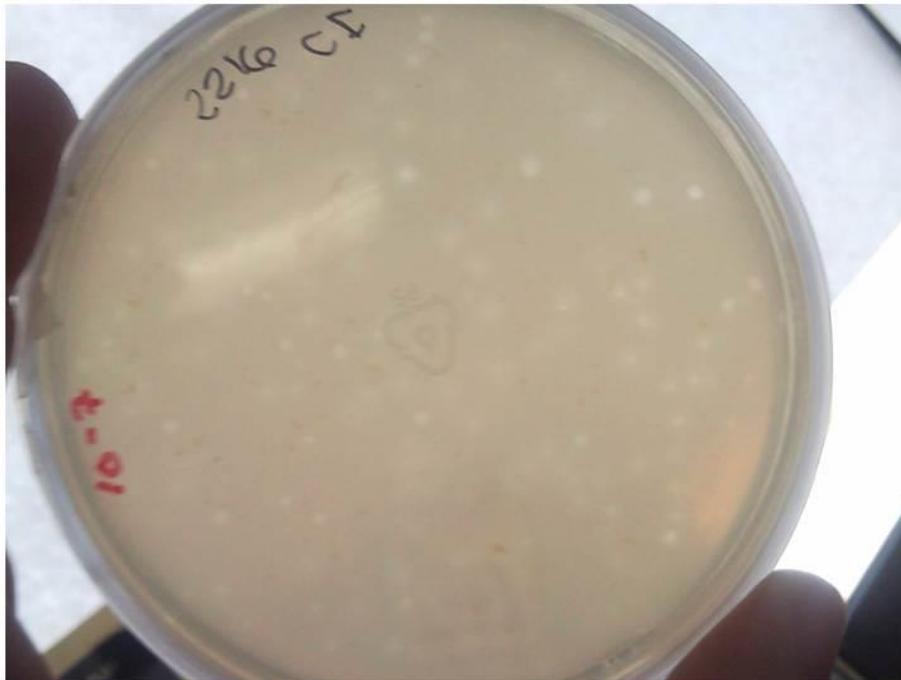
Las placas de Petri con la cepa de *V. parahaemolyticus* y la cepa VPMS1 se incubaron por un periodo de tiempo prolongado para verificar el desarrollo de las colonias resistentes, el seguimiento se llevó por 4 meses. Durante este tiempo, la zona de actividad lítica de VPMS1 no aumentó de manera significativa con respecto al resultado obtenido en la incubación a 18 horas, mostrando solo un incremento de 1.5 mm a las 48 horas de incubación. Transcurridos los 4 meses de incubación, no se detectó ningún avance de las colonias de *V. parahaemolyticus* que crecieron dentro de la zona de actividad lítica de VPMS1.



**Figura 1** Fago VPMS1. (A) Micrografía electrónica del fago, aumento a 50 k, escala de la barra: 100 nm (Ramírez *et al.*, 2013). (B) Característica del fago al desarrollarse sobre un cultivo de *V. parahaemolyticus* en placas de Petri con medio sólido.

## 7.2 Producción y conteo de partículas virales (fago).

Los números de unidades formadoras de placa (UFP) fueron muy numerosos en las diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ , por lo que no fue posible su contabilización. En la dilución  $10^{-8}$ , el número promedio de UFP fue igual 19 ( $\pm 4$ ), a partir de lo cual se estimó un 19 millones de UFP por mililitro ( $1.9 \times 10^{10}$  UFP  $\cdot$  mL $^{-1}$ ) de cultivo.

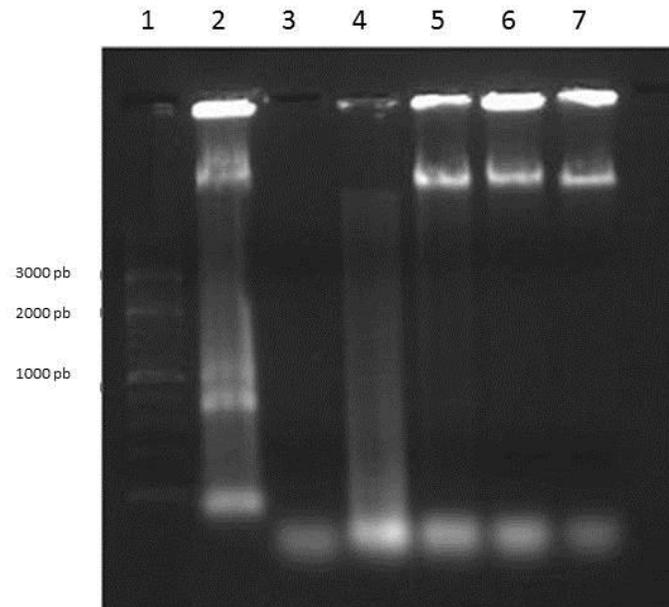


**Figura 2** Conteo de Unidades Formadoras de Placa (UFP) por el método de doble agar (Kropinski, 2009). Las partículas virales se presentan como “placas” que son pequeños círculos transparentes en donde no se aprecia crecimiento de la bacteria sembrada por arrastre y que por tanto, debería estar presente en toda la caja de Petri.

### 7.3 Extracción y purificación del ADN del fago VPMS1

Para poder eliminar el ADN proveniente de *V. parahaemolyticus* del sobrenadante que contiene a los fagos, fue necesario tratar a la solución de fagos, libre de bacterias y desechos celulares, con nucleasas, de acuerdo a las condiciones indicadas en la sección de materiales y métodos. En la figura 3, podemos apreciar bandas luminosas que corresponden al ADN de VP, en esencia de los carriles 2 al 7, todas las pruebas contenían la misma cantidad de ADN, por lo tanto todas deberían mostrarse exactamente igual a la que se aprecia en el carril 2, que es ADN sin tratar. La prueba 3, nos muestra el efecto de las nucleasas sobre el ADN de *V. parahaemolyticus* el cual desaparece notoriamente, indicando la efectividad de la concentración empleada de nucleasas. Los resultados de las pruebas 4 a 7, nos muestran el efecto de la proteinasa K sobre las nucleasas, indicándonos al mismo

tiempo la cantidad necesaria de PK a la concentración empleada para eliminar a las nucleasas, lo cual queda evidenciado por la presencia de bandas de ADN a partir del carril 5. La cantidad necesaria de PK para eliminar todo resto de nucleasas es de 10  $\mu\text{L}$  de PK a una concentración de 20 mg de proteinasa por cada mililitro de solución de fagos conteniendo  $1\text{U mL}^{-1}$  de DNAsa y  $1\text{U mL}^{-1}$  de RNAsa.



**Figura 3** Gradiente de proteinasa K. Cada carril muestra de manera indirecta el efecto de la proteinasa K a distintas concentraciones sobre reacciones de lisis efectuadas entre el ADN de *Vibrio parahaemolyticus*, DNAsa y RNAsa. (1) Marcador de peso molecular en pares de bases (pb). (2) Control negativo. (3)  $0\ \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . (4)  $20\ \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . (5)  $100\ \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . (6)  $200\ \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . (7)  $300\ \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

#### 7.4 Análisis del ADN del fago VPMS1

La electroforesis aplicada al ADN genómico de VPMS1 mostró la presencia de una sola banda, la cual corrió muy cerca de la banda del marcador de peso molecular equivalente a los 23 mil pares de bases (Fig. 4, carriles 1 y 2). La eficiencia de la recuperación del ADN por el método aplicado fue de  $60\ \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (Tabla 2). Al aplicar una segunda extracción de ADN a la columna, la recuperación fue mínima, por lo que resulta inapropiado emplearla en el protocolo de extracción (Fig. 4, carril 3).



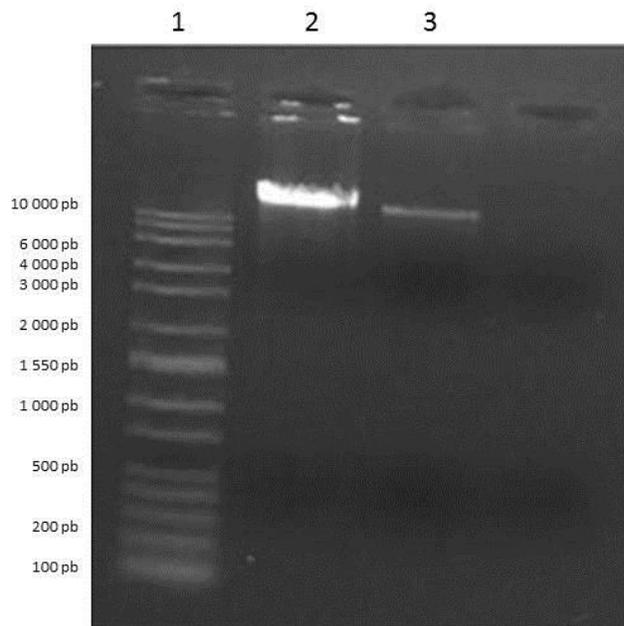
**Figura 4** ADN del fago VPMS1. Los números a la izquierda de la figura indican el peso molecular de las bandas del carril 1 expresado en pares de bases (pb). Carril 2, ADN de VPMS1 extraído de la columna de purificación. Carril 3, segunda extracción hecha a la misma columna.

**Tabla 2** Cuantificación del ADN de VPMS1 obtenido al ser purificado con el kit GenClean

	Concentración de ADN (ng · $\mu\text{L}^{-1}$ )	Desv. Est.
Primera elusión	60	5
Segunda elusión	52.5	4

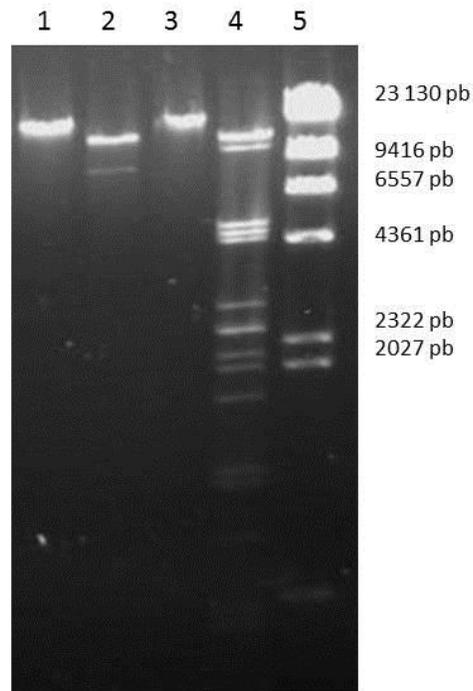
### 7.5 Determinación de la identidad del ADN de VPMS1

El ADN genómico de *V. parahaemolyticus* fue ligeramente más pesado que el ADN de VPMS1 (Fig. 5, carriles 2 y 3 respectivamente), sin embargo esta diferencia por sí misma, no es demasiado concluyente como para poder decidir sobre la identidad de ambos materiales nucleicos. La diferencia en la intensidad de las bandas, puede ser debida a las diferentes concentraciones de ADN utilizadas para *V. parahaemolyticus* y VPMS1, para el primer caso se utilizaron 115 ng ·  $\mu\text{L}^{-1}$  y para el segundo 67 ng ·  $\mu\text{L}^{-1}$ . En ambos casos el ADN se muestra sin degradación.



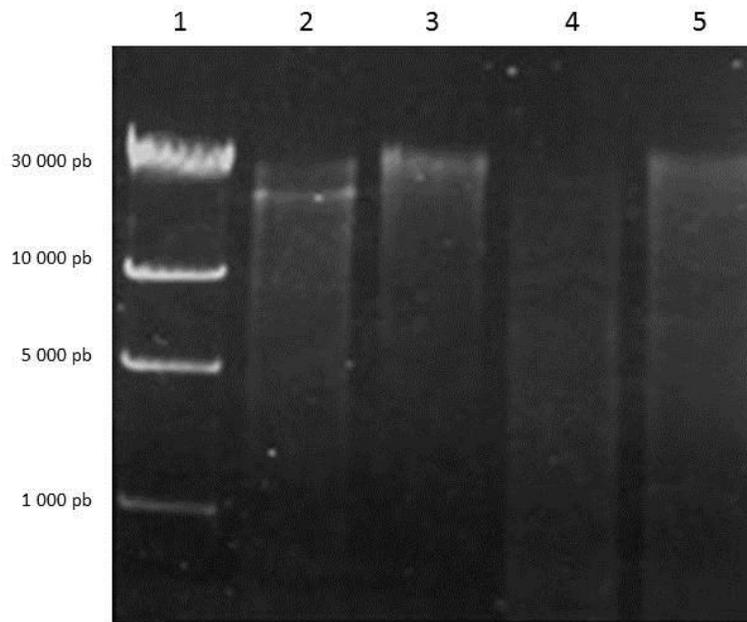
**Figura 5** Comparativo entre el ADN de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* y el ADN de su fago VPMS1. Carril 1, Marcador de peso molecular expresado en pares de bases (pb); Carril 2, DNA de *V. parahaemolyticus*; Carril 3, DNA de VPMS1.

Las enzimas de restricción Pst1 y Hind III no mostraron efecto sobre el ADN del fago, sin embargo, la enzima EcoRI separó al ADN genómico en 2 fracciones fácilmente identificables (Fig. 6, carril 2).



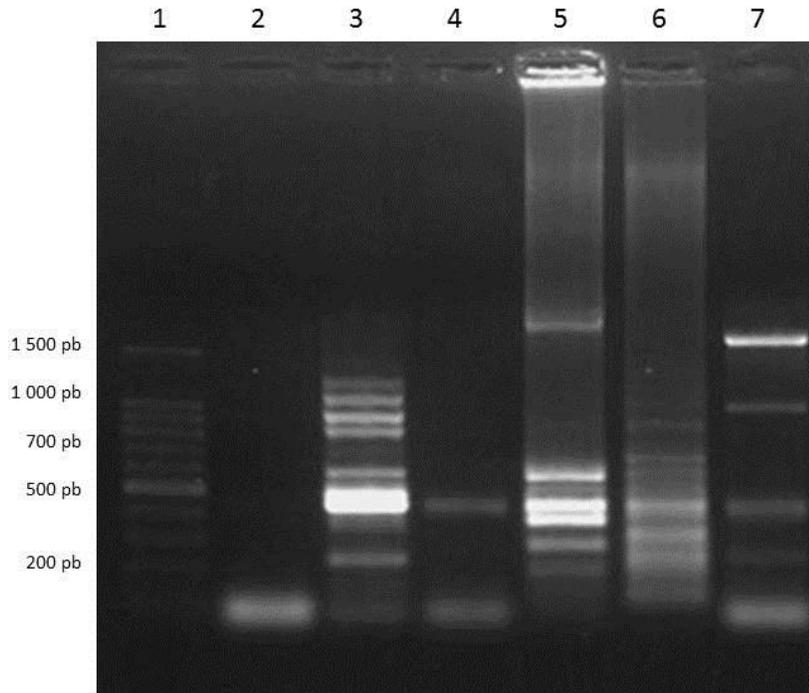
**Figura 6** Patrón de bandeo del ADN de VPMS1 al ser tratado con diferentes enzimas de restricción, con Pst 1 (carril 1), con EcoRI (carril 2) y con Hind III (carril 3). El carril 4 es el control empleado, corresponde a DNA del fago lambda. El carril 5 es el marcador de peso molecular expresado en pares de bases (pb).

Cuando el ADN del fago y de la bacteria fueron tratados con la enzima EcoRI, se encontró una marcada diferencia: el ADN de VPMS1 fue separado en 2 fragmentos de menor tamaño, mientras que el ADN de *V. parahaemolyticus* fue degradado casi en su totalidad (Fig. 7, carriles 2 y 4 respectivamente).



**Figura 7** Patrón de bandeo del ADN de *Vibrio parahaemolyticus* (VP) y VPMS1 al ser tratados con la enzima de restricción EcoRI. Carril 1, marcador de peso molecular expresado en pares de bases (pb); carril 2, ADN de VPMS1; Carril 3, ADN control de VPMS1; Carril 4, ADN de VP; Carril 5, ADN control de VP.

Al amplificar el ADN de VPMS1 y de *V. parahaemolyticus* se obtuvieron diferentes patrones de bandas. Mientras VPMS1 presenta 6 bandas, 5 de ellas claramente definidas y existe una más después de la segunda banda de arriba hacia abajo del gel, aunque en la fotografía no se aprecie, estas bandas se encuentran separadas de manera casi equidistante, sin aglomerarse en un solo sitio. Por su parte, el ADN de *V. parahaemolyticus* presenta un patrón muy distinto al de VPMS1, conformado por una serie de bandas amplificadas por debajo de los 1500 pb, muchas de ellas formando aglomerados (Fig. 8).

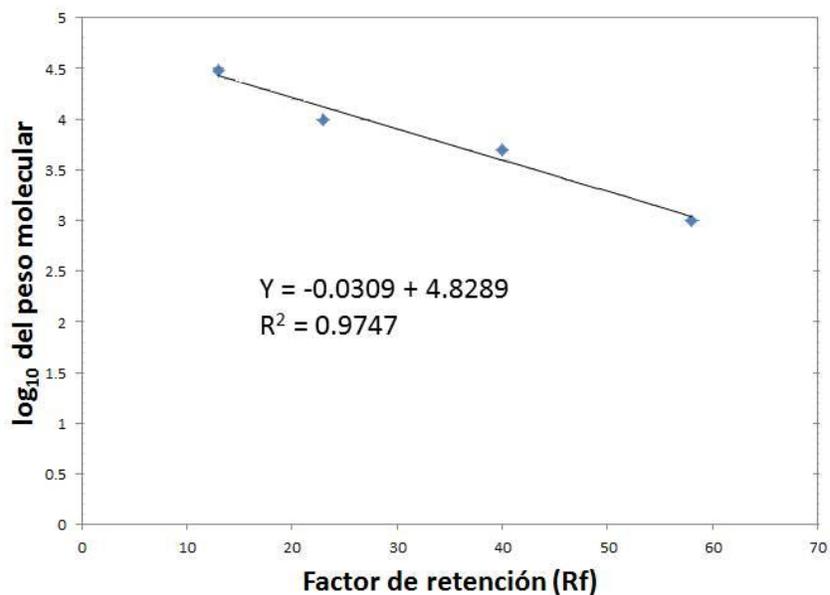


**Figura 8** Patrón de bandeo del ADN de distintas fuentes al ser amplificados con oligos de eubacterias. 1, marcador de peso molecular expresado en pares de bases (pb); 2, control negativo; 3, *Vibrio parahaemolyticus*; 4, ballena; 5, fago lambda; 6, tortuga verde; 7, fago VPMS1.

Aplicando el procedimiento descrito en la sección 6.7, se obtiene que los valores de Rf para el marcador de peso molecular son de 13 mm banda de 30,000 da; 23 mm banda de 10,000 da; 40 mm banda de 5,000 da; 58 mm banda de 1,000 da. Mientras que para el ADN de VPMS1, los valores de Rf son 16 mm para el fragmento más pesado y de 18 mm para el fragmento más liviano. En la Tabla 3, se muestran los valores ordenados para efectuar los cálculos respectivos y obtener el peso molecular del genoma de VPMS1.

**Tabla 3** Factor de retención de algunos fragmentos de ADN del fago lambda y logaritmo de su peso molecular

Peso molecular (pb)	Factor de retención Rf	Logaritmo del peso molecular
30,000	13	4.47712125
10,000	23	4
5,000	40	3.69897
1,000	58	3



**Figura 9** Regresión lineal aplicada a los logaritmos base 10 de los pesos moleculares de las fracciones de un marcador de peso molecular y sus correspondientes factores de retención.

El factor de retención para los fragmentos de ADN obtenidos para el fago VPMS1 correspondió a 18 y 16 mm para el más liviano y el más pesado (respectivamente). Al aplicar la ecuación de regresión lineal y obtener el antilogaritmo a estos valores, se obtuvo que los valores de sus pesos moleculares correspondieron a 18,736.99 y

21,602.30 pb respectivamente, lo cual indica que el peso molecular aproximado para el ADN genómico del fago VPMS1 es de 40,339.29 pb.

## **7.6 Secuenciación del genoma de VPMS1**

La secuenciación del fago, se efectuó con una cobertura de 155x, con 6,584,044 lecturas en fragmentos de 200 bases. Una vez ensambladas las secuencias individuales (Fig. 10), se obtuvo que el fago VPMS1 está constituido por un genoma cuya extensión es de 42,360 nucleótidos (42.3 kb), y un contenido G+C del 44.67%. La secuencia de nucleótidos fue analizada utilizando diversas herramientas informáticas. El genoma de VPMS1 está constituido por 91 marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas en inglés). Se encuentra dentro del genoma, una región equivalente a 1,184 nucleótidos que no tiene codificación aparente, la cual se distribuye en distintos sitios a lo largo del genoma del fago. El fragmento no codificante de mayor tamaño tiene una extensión de 120 nucleótidos. Al hacer una búsqueda comparativa entre la secuencia de nucleótidos del genoma completo de VPMS1 y aquellas que se encuentran ingresadas en la base de datos del Centro Nacional de Investigación Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés), no se encontró similitud con alguna otra secuencia de fagos registradas, siendo el fragmento de identidad equivalente al 1% para el mejor acercamiento.

5'- CCTTGTGAATAGCTGTACCGATTGCTGCTCGGCTGTTCCGGAATAGAAGCTCACACCCCTAAGAAAGACTTGGCCCA  
 CTGCCAAGAAGACAGCCATAGAAGGTATCGACTGCGGACGGGCGGATGCGGATTGACTCGTTGTTACTTTTAATAG  
 CTCAGTCATGACTGACTCCTTGTGTATGATTTAGATTTATATATTTAATAAATGGAAAATGCTAAATAAAAATATCT  
 ATAAGATATCCGTTTGGTTATAAGCCCTGAATGGAGCCAGGTCAGACGAAAATCTGAGCCTGGCTGATTATATTC  
 AGGATTAATTTTCGTCTGATGACGAGCCTGACAATCGCGATTTAATCTCGTTTTCGGCCAAGGTCGCGTAGCCAGA  
 AATGTCATGCCAGTTGTCGTCGTAATCCGCTGAGCCATTTAAAATACGAGCTAACTTATGCATAATCATTTCCGGCTG  
 CAGACTTCTGCACGTCATTAGGGCCTCCAGCCTGGTTGCACGTCATAGCACGCTTCATAGCCTGCTCAGCTGC  
 AGCATGTACATGGAAGGCCATACACAGACTCACGAGCTTTAATAGTGTGCGGCTCCAGTACTGCCTTTAACAGCC  
 TGCTTAGGCTTAAACGAAGCTCATATCAATTAGTACAACCTTCTGGCTAAACTTACAGGGGCTCCTAGTACGGCGTC  
 AATGTATAGCGTAGCATTTCTAGAGTAGGAGAACTTGTGCGCTTGTGACCTGAGGCTAGCACGTTAAAGTTC  
 CTGGGCTAACACGACCCAGTCACACACATATTTAGGTAAGTACTGAGCTGCCTCATCAATATTTAGTATACGTTCCATT  
 AGTTAATGCCTCACGTTTGTCTAGTAGTGCCTGAAGGCGTGGTTCTGGAGATACAAAGTATGGGCTTTGTCCACC  
 AGCATTAGCTTAACTGCAGGGTCAGTCTTTTTAACTGACTTAGAGTCGTTAGAGTCGCATACGATTAGTAGCGCA  
 GCAATACACTGTTCTGACGTTAGGCGCATAGCTAACATTTAGTAAACGACGCTTTAATAATCATGTGCAGACCTGT  
 AGCAACTGGGTACTCTGCTTCTGACTCCAGGACTGCAAGTGCATGCTGATGAAGTACGCATAGTCCGGCTCATA  
 GTGTTCTCAATCAAGCGAGAGAATACTTCATTAGCGTGGTCTCCGCAACAGCATTAGCTTCTTCTGACACATCAG  
 CTTTCCATAGTGGCCTAGTGAACATAGATGATGTCGCATAATGCGTCTAGTTTGTCTACTTCAGTTAGTGTCTCG  
 AGCCACTCTGGAAGCTTCTTTAAGAAGGTCTAGTGTAGGTGGTGGTTGACTCTTGTGGATAGCGCTTTTGGT  
 TCCACGAAATAACGCGCGGAATACTCTATGCATGTAATAAATACTCCAGGTGGCTAGCGAAACGTAATCACTAA  
 TAAAAATGTAGACGGTTCAAAGTGAAGAAGTCTTTACCAGGTTCAAGTCAAGTCAAGTGTGTACATAGGTGCAGTCAT  
 TGTGCCAATACAGAAATGAAGCACGCGCTCACATAAATCATTGCATTGTCAAGGTGGTCTGCATACATGACAG  
 TCACCGAACACCATAGTACACGACGAGGCTTCATATTGAATTCATTAGCTAATGACACAATCCAGGTGTAAGCTA  
 AGATAATGTCAGCAGGTACACCAATCATTAGGTGAGCACTACGTTGAGTCCATAGCATGCCAGGTATTGCCCATC  
 GCGAACGTAGAAGTGGTAGCTGTAGTGACAGCAGGCTAGACTTAGTTGCTCCAGGTTCCAGCGGTTCCAGCCATT  
 AATAAGCATGCGACGGTCGTTTGGATTGACTCCAGGCAATACTTCAGGTGGTCTACTGACCGTTACGAAGCCA -3'

**Figura 10** Un fragmento de la secuencia de ADN del genoma del fago VPMS1, las secuencias obtenidas masivamente, con un tamaño promedio de 200 bases, fueron ensambladas mediante el programa CLC Genomics Workbench vs 4.0

## 7.7 Caracterización del genoma de VPMS1

Los ORF fueron analizados mediante el programa Workbench ya descrito y fueron confirmados con el ORF-finder de la NCBI y la plataforma Sequin, así como también con el GenMark-P, utilizando en todos los casos el código genético para bacterias. Cuando llegó a existir conflicto de ORFs, estos se analizaron de manera visual y cuando fue necesario, fueron descartados. De esta forma, se determinó que el genoma del fago está integrado por 53 genes, ordenados en 3 módulos que se encuentran orientados de distinta manera según su función dentro del genoma. El módulo de empaquetamiento cubre el 13% del genoma; el módulo estructural cubre el 34%; mientras que el módulo para la replicación y la regulación representa el 53% del genoma. 30 genes muestran homología significativa con alguna proteína con función conocida reportada en la base de datos del GenBank, mientras que los 23 restantes o no correlacionan de manera significativa con proteínas de función

conocida, o lo hacen con proteínas hipotéticas (Tabla 4). No se encontraron secuencias repetidas en los extremos de la secuencia de nucleótidos, así como tampoco fragmentos que indicasen que el genoma fuera circular. No se encontraron tRNAs, sin embargo, si se encontraron diversas regiones promotoras de la expresión de varios genes (Tabla 5).

Con estos resultados se construyó el mapa genómico del fago VPMS1 (Fig. 11), en él se muestran los distintos genes, los módulos y las regiones reguladoras de la expresión de cada uno de los genes.

**Tabla 4** Características generales de los genes putativos de VPMS1 y homología con las proteínas en el GenBank.

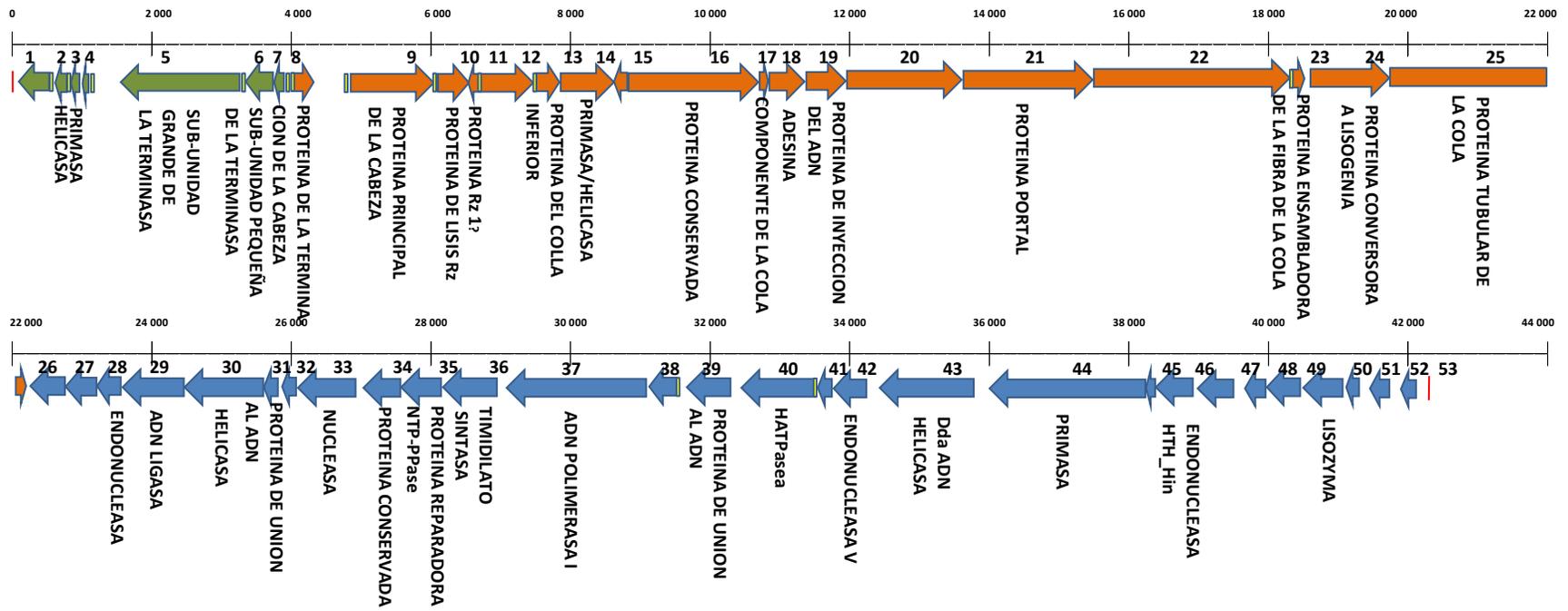
Gen	Tamaño (a.a.)	Inicio	Fin	Secuencia promotora	Acceso al GenBank	e-valor	Proteína homologa y fago
MS01	161	65	550	ATGTAGCCT	ADX89297.1	7.00E-04	Proteína hipotética (Fago ICP1_2001_A, <i>Vibrio</i> )
MS02	58	620	796	AAGTAACT	ACL77960.1	5.00E-03	Helicasa (Fago JSE, <i>Enterobacteria</i> )
MS03	48	814	960		ADM73619.1	1.00E-03	Primasa (Fago 949 <i>Lactococcus</i> )
MS04	30	1005	1097	TAGTACAAT	ADD25729.1	3.00E-03	Proteína hipotética (Fago 1358, <i>Lactococcus</i> )
MS05	549	1592	3241	TAATAAAAT	YP_006590034.1	3.00E-70	Sub-unidad grande de la terminasa (Fago 103P14B1, <i>Moraxella catarrhalis</i> )
MS06	175	3204	3731		AEI70910.1	2.00E-03	Sub-unidad pequeña de la terminasa (Podovirus EBPR)
MS07	56	3712	3882	TTGTA CTCT	AFQ22623.1	3.20E-02	Proteína de la terminación de la cabeza (Fago IME13, <i>Stenotrophomonas</i> )
MS08	112	3987	4325	ACGTACAAT	ADW01313.1	1.00E-03	Proteína hipotética (Fago Sha1, <i>Lactobacillus</i> )
MS09	380	4870	6012	CGCTAAAAT	YP_002922722.1	1.00E-08	Proteína principal de la cápside (Fago BcepIL02, <i>Burkholderia</i> )
MS10	147	6066	6509	CGCTAGCAT	YP_006590002.1	2.00E-04	Proteína de lisis Rz (Fago DC1 <i>Burkholderia</i> )
MS11	49	6529	6678	GAGTACACT	NP_050556.1	1.80E-02	Proteína hipotética (Fago 933W <i>Enterobacteria</i> )
MS12	304	6563	7477		NP_049518.1	7.00E-04	Proteína hipotética (Fago 933W, <i>Enterobacteria</i> )
MS13	101	7477	7782	TTGTATAAT	NP_073694.1	1.70E-02	Proteínas del collar inferior (Fago GA-1, <i>Bacillus</i> )
MS14	268	7783	8589		YP_004327242.1	1.20E-02	Primasa/helicasa (Fago PAK_P1, <i>Pseudomonas</i> )
MS15	76	8576	8806		YP_001604304.1	8.20E-02	Proteína hipotética (Fago RSL1, <i>Ralstonia</i> )
MS16	630	8792	10684		YP_002922735.1	6.00E-15	Proteína hipotética (Fago BcepIL02, <i>Burkholderia</i> )
MS17	46	10681	10821		CBH95067.1	1.00E-03	Componente de la cola (Fago phi80, <i>Enterobacteria</i> )
MS18	164	10821	11315		ADJ39877.1	4.00E-12	Adhesina (Fago T4T, <i>Enterobacteria</i> )
MS19	196	11297	11887		YP_003344928.1	2.00E-03	Proteína de la inyección del ADN (Fago Xfas53, <i>Xylella</i> )
MS20	571	11887	13602		NP_050962.1	1.40E-02	Proteína hipotética (Fago APSE-1, <i>Acyrtosiphon</i> )
MS21	615	13602	15449		YP_002922718.1	3.00E-08	Proteína portal (Fago BcepIL02, <i>Burkholderia</i> )
MS22	961	15449	18334		CBY99650.1	1.00E-03	Proteína hipotética (Fago phi92, <i>Enterobacteria</i> )
MS23	61	18334	18519	TAATAAAAT	YP_003335800.1	1.90E-02	Proteína ensambladora de la fibra de la cola (Fago D108, <i>Escherichia</i> )
MS24	421	18598	19863		CAD54902.1	6.00E-04	Proteína convertora a lisogenia (Fago P2-EC46, <i>Enterobacteria</i> )
MS25	764	19903	22197		CBX44498.1	4.80E-02	Proteína tubular de la cola (Fago Ea100, <i>Erwinia amylovora</i> )
MS26	170	22241	22753		AFQ22715.1	8.00E-03	Proteína hipotética (Fago IME13, <i>Stenotrophomonas</i> )
MS27	151	22756	23211		NP_046646.1	3.00E-03	Proteína hipotética (Fago SPBc2, <i>Bacillus</i> )
MS28	109	23208	23537		ADV02564.1	3.00E-07	Endonucleasa (Fago SC2,

										<i>Liberibacter</i> )
MS29	302	23524	24432		YP_004508627.1	3.00E-44				ADN ligasa (Fago S-CRM01, <i>Synechococcus</i> )
MS30	396	24432	25622		NP_803332.1	2.00E-12				Helicasa (Fago phi 12, <i>Staphylococcus</i> )
MS31	61	25619	25804		NP_597807.1	5.00E-04				Proteína de unión al ADN (Fago Sfi21, <i>Streptococcus</i> )
MS32	54	25888	26052		AAC48870.1	6.00E-03				Proteína hipotética (Fago phi31, <i>Lactococcus</i> )
MS33	281	26062	26907		YP_004508485.1	9.90E-07				Nucleasa (Fago S-CRM01, <i>Synechococcus</i> )
MS34	176	27058	27588		YP_001294904.1	1.00E-21				Proteína hipotética (Fago BcepNY3, <i>Burkholderia</i> )
MS35	189	27588	28157		ABF57477.1	3.00E-11				Proteína reparadora del ADN NTP-PPasa (Fago P1201, <i>Corynebacterium</i> )
MS36	270	28150	28962		YP_005102473.1	2.00E-39				Timidilato sintasa (Fago B124-14, <i>Bacteroides</i> )
MS37	623	29151	31022		YP_001467864.1	4.00E-18				ADN polimerasa I ( <i>Thermus</i> fago P23-45)
MS38	140	31098	31520	TCTTAGATT	YP_006886.1	1.00E-04				Proteína hipotética (Fago T5, <i>Enterobacteria</i> )
MS39	217	31666	32319		NP_813756.1	7.00E-05				Proteína de unión al ADN (Fago gh-1, <i>Pseudomonas</i> )
MS40	346	32429	33469	TATTAAT	AEK07458.1	8.00E-03				Proteína hipotética (Fago 513, <i>Mycobacterium</i> )
MS41	80	33532	33774		AEL79662.1	8.90E-02				Proteína hipotética (Fago vB_EcoP_G7C, <i>Escherichia</i> )
MS42	154	33768	34232		NP_049733.1	5.00E-17				Endonucleasa V (fago T4 <i>Enterobacteria</i> )
MS43	447	34441	35784		YP_239000.1	2.00E-19				Dda ADN helicasa (Fago RB43, <i>Enterobacteria</i> )
MS44	748	36007	38253		YP_002321451.1	8.00E-06				Primasa (Fago S1, <i>Stenotrophomonas</i> )
MS45	38	38255	38371		AEJ93129.1	6.50E-02				Proteína hipotética (Fago Mutaforma13, <i>Mycobacterium</i> )
MS46	182	38368	38916		YP_004251021.1	8.00E-05				Endonucleasa HTH_Hin (Fago ICP1, <i>Vibrio</i> )
MS47	171	38987	39502		YP_002875630.1	1.10E-02				Proteína hipotética (Fago VP93, <i>Vibrio</i> )
MS48	102	39651	39959		NP_050998.1	2.00E-05				Proteína hipotética (Fago PhiPA3, <i>Acyrtosiphon</i> )
MS49	152	39959	40417		AEH03756.1	6.00E-04				Hypothetical protein ( <i>Pseudomonas</i> phage PhiPA3)
MS50	187	40490	41053		ADX87518.1	7.00E-03				Lisozima (Fago ICP3_2009_B, <i>Vibrio</i> )
MS51	61	41102	41287		YP_002898951.1	1.30E-01				Proteína hipotética (Fago EE36P1, <i>Roseobacteria</i> )
MS52	85	41514	41771		YP_002922399.1	7.00E-03				Proteína hipotética (Fago JS10, <i>Enterobacteria</i> )
MS53	81	41887	42132		YP_004300575.1	4.00E-03				Proteína hipotética (Fago 285P, <i>Enterobacteria</i> )

El genoma caracterizado del fago VPMS1 se subió a la base de datos del GenBank de la NCBI, con **número de acceso JX880072**.

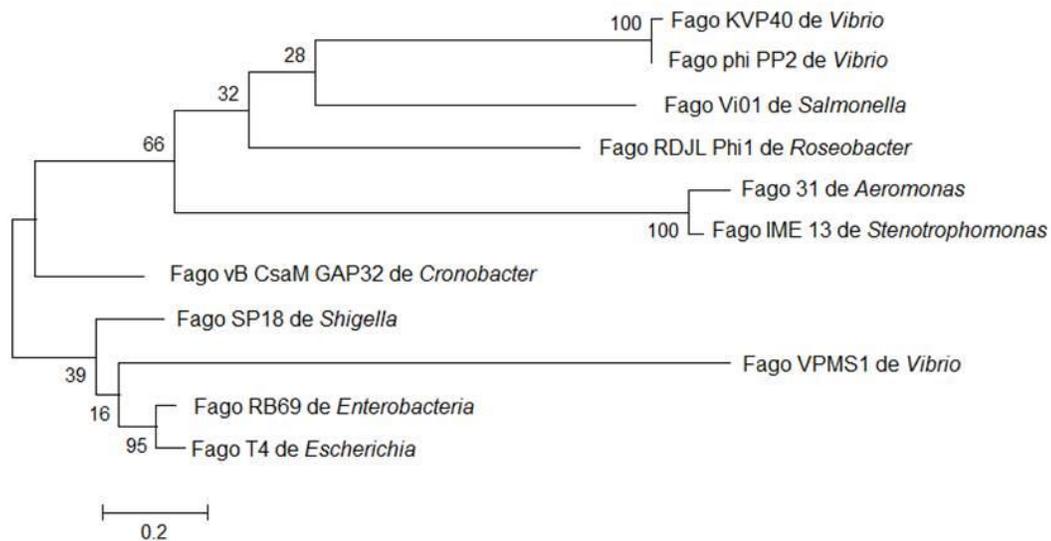
**Tabla 5** Dominios de super-familias encontrados en los genes del genoma de VPMS1

Gen	Dominio de super-familia	e-valor	Código de acceso	Descripción
MS05	17 superfamily	8.57E-05	PHA02533	Proteína de la terminasa grande
MS06	HTH superfamily	3.87E-04	pfam13518	Dominio hélice-giro-hélice
MS09	DUF 4043 superfamily	1.27E-11	pfam13252	Proteína con función desconocida
MS28	Restriction_endonuclease_like_superfamily	2.41E-06	cl00277	Super-familia de la endonucleasa
MS29	PRK09125	3.21E-22	PRK09125	ADN ligasa
MS30	P-loop_NTPase superfamily	4.59E-06	smart00487	Super-familia de helicasas DEXDc, DEAD
MS31	HTH_3	1.20E-04	CL0123	Dominio hélice-giro-hélice
MS33	PDDEXK_1	9.90E-07	pfam12705	Super-familia nucleasa PD-(D/E)XK
MS35	NTP-Ppase_DR2231_like	3.30E-06	cd11530	Nucleosido trifosfato pirofosfohidrolasa
MS36	Thymidylat synt	2.15E-62	pfam00303	Timidilato sintasa
MS37	DNA_pol_A	1.39E-34	cd08639	ADN polimerasa A
MS39	DUF2815	1.80E-05	n/a	Proteína con función desconocida
MS40	HATPase_c_3	5.64E-03	pfam13589	Histidina kinasa, DNA girasa B, y HSP90 ATPasa
MS42	Pyr_excise superfamily	5.13E-08	pfam03013	Dimero Pirimidina ADN glicosilasa
MS43	P-loop_NTPase superfamily	7.33E-18	pfam13604	Dominio AAA
MS44	Primase_Cterm	2.12E-05	TIGR01613	Primasa
MS46	HTH_Hin	7.77E-08	cd00569	Dominio hélice-giro-hélice de proteínas Hin



**Figura 11** Mapa genómico del fago VPMS1, las secuencias promotoras se encuentran señaladas en amarillo, el inicio y el fin del genoma está marcado por líneas en rojo. La dirección de las flechas indica el sentido de la expresión del gen. En color verde se marca el módulo de empaquetamiento; en color marrón se indica el módulo estructural; en color azul se indica el módulo de replicación y regulación génica. Aunque no se encontró un módulo para lisis celular, los genes 10, 11 y 50 codifican para proteínas de lisis celular.

Para comparar al fago VPMS1 con otros fagos reportados para *V. parahaemolyticus* y otras bacterias, se construyó un árbol filogenético con las secuencias de aminoácidos de la proteína endonucleasa para algunos fagos de distintos géneros de bacterias. Los resultados indican que el fago VPMS1 posee en apariencia una lejana distancia evolutiva de otros fagos reportados para *V. parahaemolyticus* marcando mejor coincidencia con los fagos reportados para las *Enterobacterias*.



**Figura 12** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de aminoácidos de la proteína endonucleasa para distintos fagos reportados para *Vibrio* y para otros géneros de bacterias. VPMS1 parece estar más emparentado con los fagos de las *Enterobacterias* que con los de *Vibrio*.

## 7.8 Determinación de los péptidos antimicrobianos de VPMS1

Se identificaron un total de 57 ORFs que codifican para péptidos, el más grande de ellos constituido por 86 aminoácidos, el más pequeño por 9 aminoácidos, el tamaño promedio de los ORFs fue de 32 aminoácidos. Dieciséis genes de VPMS1 codifican para más de un péptido funcional, siendo el caso extremo el gen MS40.1, el cual tiene un tamaño de 39 nucleótidos y codifica para 4 ORFs funcionales. Veintitrés

ORFs que codifican para péptidos se encuentran aislados en el genoma de VPMS1, 12 ORFs se encuentran traslapados con otros genes y 6 ORFs se encuentran completamente embebidos en un gen más grande. Al ser analizadas las secuencias de estos péptidos en la base de datos del GenBank de la NCBI, la mayor parte de las veces el análisis no generó resultados debido al tamaño pequeño de las secuencias, por lo que solo se mencionan aquellos casos en los que sí se pudo efectuar la comparación y en donde existió similitud con proteínas de actividad conocida. Solo se encontraron 3 moléculas de péptidos que cumplieran con estas condiciones. El ORF 3712..3882 (MS07) codifica para un péptido de 56 aa, el cual muestra similitud significativa con una proteína protectora de la cabeza. El ORF 18335..18520 (MS23) de 61 aa mostró similitud con una proteína que participa en el ensamble de las fibras a la cola. Por último, el ORF 25620..25805 (MS31) también de 61 aa, muestra similitud con una proteína que se une a la molécula de ADN.

Los análisis efectuados con el APD, a los 57 péptidos codificados, arrojaron un total de 10 péptidos con propiedades altamente potenciales de actividad antimicrobiana. Los marcos de lectura, ORF 3712..3882 (MS07), ORF 19850..19888 (MS24.1), ORF 25854..25937 (MS32.1), ORF 34353..34526 (MS42.1), ORF 40412..40501 (MS49.1), y ORF 11273..11359 (MS18.1) codifican para péptidos que pueden formar puentes disulfuro, hojas beta y alfa hélice, características que prevalecen en péptidos con actividad antimicrobiana. Mientras que los genes ORF 4776..4835 (MS08.1), ORF 41815..41856 (MS52.1), ORF 42126..42152 (MS53.1), ORF 10348..10413 (MS16.1) contienen en su estructura propiedades de alto grado de hidrofobicidad, carga neta positiva y la presencia de prolina en su superficie, características compartidas por péptidos con alta actividad antimicrobiana (Tabla 6). El tamaño de estas moléculas, así como el ORF por el cual son codificados y la secuencia de aminoácidos se resumen en la Tabla 7. El péptido con potencialidad de poseer actividad antimicrobiana más pequeño fue de 9 aa, mientras que el más grande tuvo un tamaño de 50 aa, con un promedio general de 28aa.

**Tabla 6** Características físicas y químicas de los AMPs de VPMS1

NOMBRE	INICIO	FIN	PESO MOLECULAR (da)	Hidrofobicidad	Carga Neta	Indice de Boman (Kcal/mol)	Características de la molécula
P3712	3712	2882	5845.9	47%	+3	0	Puentes disulfuro, hojas beta y alfa hélice
P4776	4776	4835	2086.2	25%	+2	1.92	Posee P en su estructura
P19850	19850	19888	1508.7	50%	-1	0.49	Puentes disulfuro, hojas beta y alfa hélice
P25854	25854	25937	3016.6	55%	+3	-0.48	Puentes disulfuro, hojas beta y alfa hélice
P34353	34353	34526	6198.2	38%	+6	1.81	Puentes disulfuro, hojas beta y alfa hélice
P40412	40412	40501	3419.1	62%	+1	-0.99	Puentes disulfuro, hojas beta y alfa hélice
P41815	41815	41856	1511.8	38%	+2	0.42	Posee P en su estructura
P42126	42126	42152	801.9	25%	+1	0.23	Posee P en su estructura
P10348	10348	10413	2297.7	28%	+3	2.13	Posee P en su estructura
P11273	11273	11359	3200.6	25%	+5	3.03	Puentes disulfuro, hojas beta y alfa hélice

**Tabla 7** Secuencia de aminoácidos de los péptidos potencialmente antimicrobianos encontrados en el genoma del fago VPMS1

NOMBRE	ORF	TAMAÑO	SECUENCIA DE AMINOACIDOS
P3712	-3	57	SRPLPSIFSCFHCNTSLVTSALKLIPLVSQYILTSSTLTLVGLVLSLVEKVNTA
P4776	-1	20	SVSSSQAHFNQPPPGIADKH
P19850	+1	12	MYCSFYHDLCLN
P25854	+3	28	GPICCAAKAKLLLFHFFKSELYFNPGI
P 34353	+1	58	MCKSKPDNVPKAHVRSFKSCQPQRGNELIDCPRCG GAGALYWNRICQVCAGEGVITK
P 40412	+1	30	MKASLFYIMVYIYALVCTWWVSTLGDKLC
P 41815	+1	14	MFVSYSKPKNPII
P 42126	+3	9	GHIGSPQL
P 10348	-2	22	RLLLPLNNSCSTPPLRPNKTS
P 11273	-2	29	RRDGATYYCCSACYCTPRHKTSLSRGS

Los péptidos indicados en la Tabla 7 se enviaron a sintetizar, sin embargo por cuestiones logísticas, los péptidos P 40412 y P 3712 no fueron incluidos. También se incluyó 1 péptido control con actividad antimicrobiana positiva para VP, cuya secuencia de aminoácidos se indica a continuación.

DCV - GFGCPWNRYQCHSHCRSIGRLGGYCAGSLRLTCTCYRS

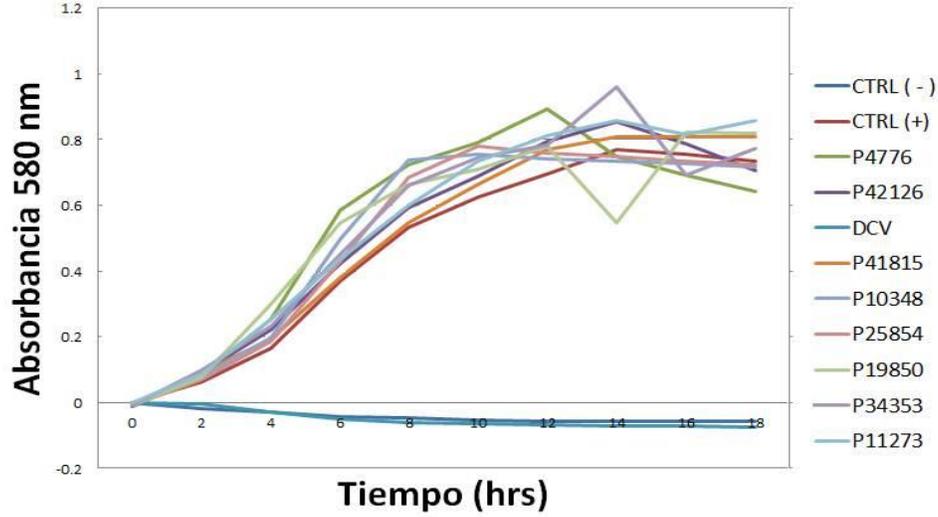
## 7.9 Pruebas de actividad antimicrobiana

En términos generales, la curva típica de crecimiento para *V. parahaemolyticus* se presenta con una mínima fase de adaptación al medio de cultivo, la cual solo le toma un periodo de 2 horas en llevar a cabo, para posteriormente iniciar la fase logarítmica de crecimiento la cual culmina a las 12 horas de cultivo, iniciando su fase de crecimiento estacionaria, o de reposo, donde la generación de nuevas células ya no es significativa, por lo que se puede decir que esta ha terminado (Fig. 13).

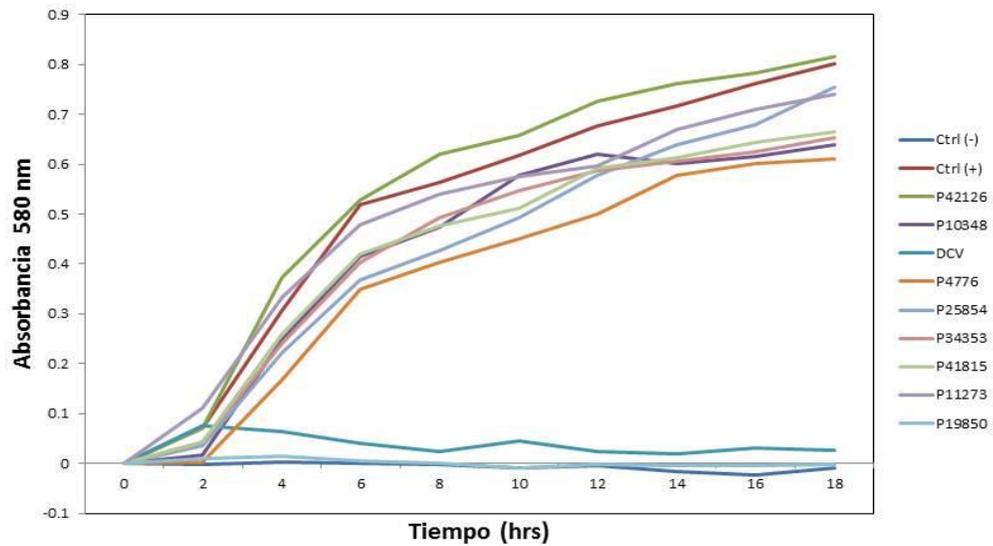
Cuando los cultivos de *V. parahaemolyticus* fueron expuestos a concentraciones de  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de los distintos AMPs, no se observó ningún efecto adverso sobre el crecimiento celular de dichos cultivos. Al incrementar la dosis de los AMPs a una concentración de  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , el péptido P4776 tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de *V. parahaemolyticus* el cual es evidente desde el inicio de la curva de crecimiento y se mantiene a lo largo de todo el experimento, sin embargo, su efecto no es significativo, pues a pesar de ello, la bacteria muestra un crecimiento abundante muy cercano a los valores normales inferiores para la curva típica de *V. parahaemolyticus* (Fig. 14).

Por su parte, el péptido P19850 muestra una actividad antimicrobiana con efectos similares a los encontrados por el AMP DCV, no existiendo diferencia entre ambas curvas de crecimiento. Al aumentar la dosis de los AMPs, a  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 15), el resto de los AMPs permanecen sin actividad antimicrobiana, mientras que el efecto antimicrobiano de las moléculas de los AMP P19850y DCV continuó mostrando el efecto irreversible de actividad antimicrobiana.

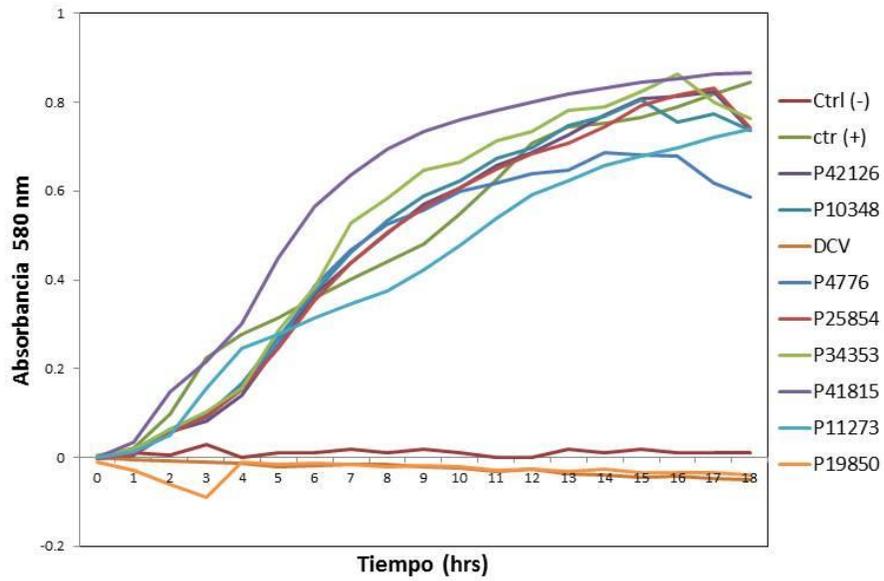
Cuando los AMPs de VPMS1 actuaron de manera simultánea (Fig. 16), se observó una actividad antimicrobiana severa a la concentración de  $5\mu\text{g}/\text{mL}$ , incluso con un efecto notoriamente lítico.



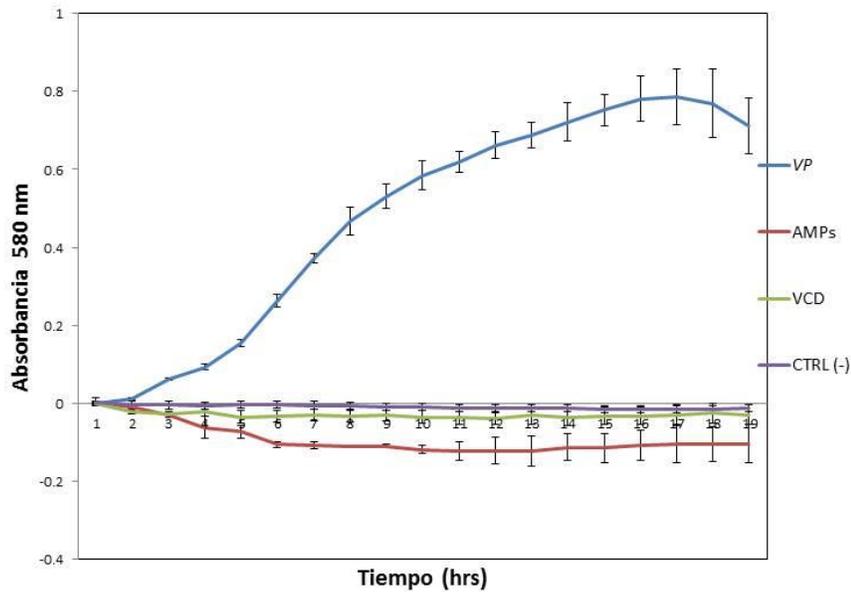
**Figura 13** Curva de crecimiento de *V. parahaemolyticus* inoculada con péptidos antimicrobianos a una concentración de  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Cada curva representa la media de 3 réplicas.



**Figura 14** Curvas de crecimiento de *V. parahaemolyticus* inoculadas con péptidos antimicrobianos a una concentración de  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  de cultivo. Cada curva es la media de 3 réplicas.



**Figura 15** Curvas de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* inoculadas con péptidos antimicrobianos a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cultivo. Cada curva es la media de 3 réplicas.



**Figura 16** Efecto sinérgico de los péptidos antimicrobianos hipotéticos de VPMS1. Las curvas son la media de 3 réplicas.

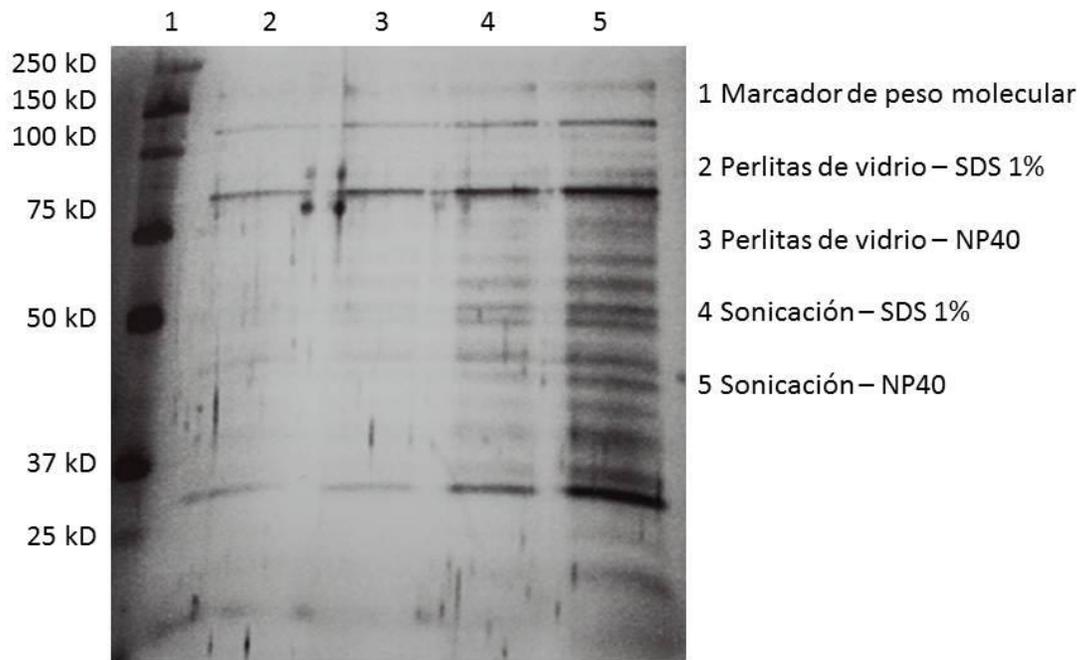
### 7.10 Determinación de la interacción péptido-proteína del fago y la bacteria respectivamente.

Derivado de la Tabla 8, se puede determinar que entre los métodos mecánicos probados y bajo las condiciones aplicadas, el método que incluye la disrupción por ultrasonido es 3 veces más efectivo que el método que incluye el uso de las perlas de vidrio, esta razón se mantuvo independientemente del amortiguador de lisis utilizado. Por su parte, el uso del amortiguador de lisis NP40, resultó ser 1.7 veces más efectivo que el amortiguador de lisis SDS, proporción que a su vez fue también independiente del método de ruptura mecánica ensayado.

**Tabla 8** Determinación de un método de ruptura celular bacteriana a través de la eficiencia en recuperación de proteínas.

	Proteínas en mg mL <sup>-1</sup>		Proporción NP40 / SDS
	SDS 1%	NP-40	
SONICACION	15.54 +/- 1.71	26.15 +/-2.73	1.68
PERLAS DE VIDRIO DE 0.1 mm	4.96 +/-1.2	8.55 +/-2.3	1.72
Proporción sonicación / perlas	3.14	3.06	

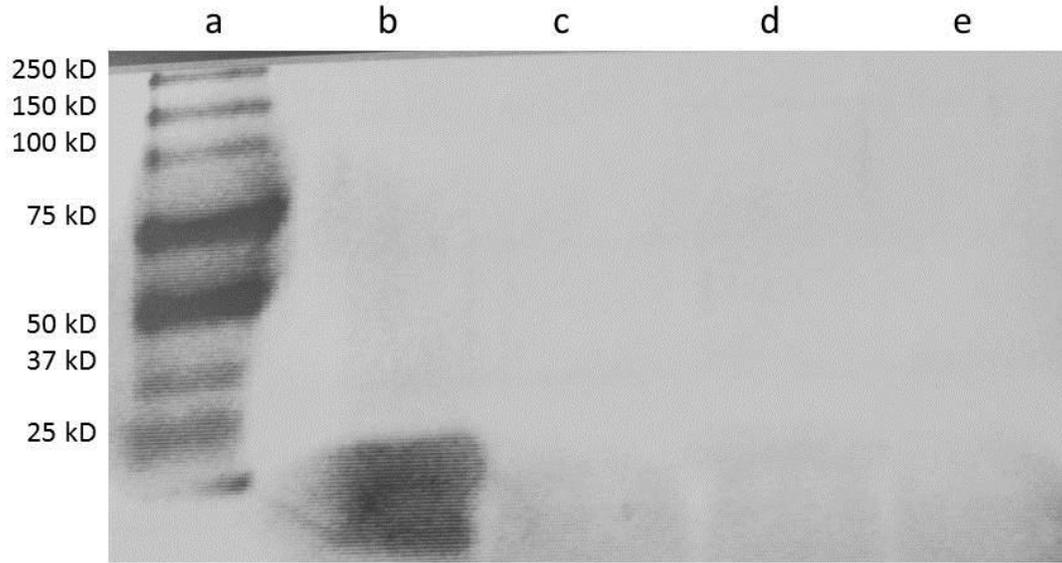
Al analizar en geles de poliacrilamida los extractos celulares obtenidos mediante los métodos de ruptura ensayados, se observó que independientemente del método aplicado, la integridad de las proteínas se mantiene, pues las fracciones proteínicas obtenidas se muestran sin degradación en todos los métodos ensayados (Fig. 17). La extracción de ADN que combino al mejor método mecánico con el mejor amortiguador de lisis, fue la que mostró la mayor concentración de proteínas y la mejor nitidez de bandas (Tabla 8; Fig., 17).



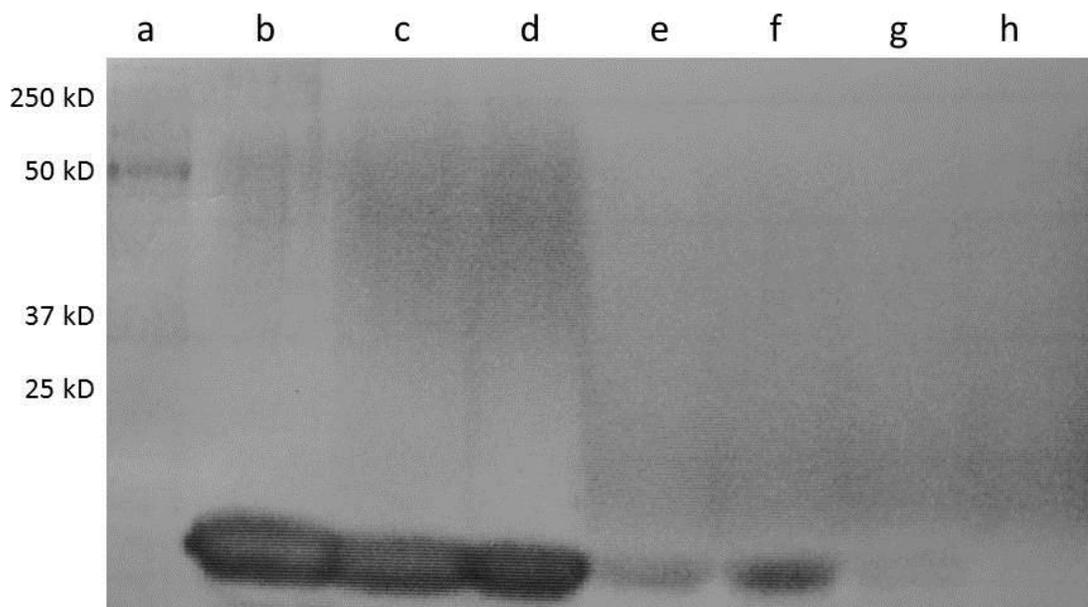
**Figura 17** Verificación de las proteínas recuperadas al utilizar distintos métodos de ruptura celular.

La ligación de la BSA con la columna empieza a ser detectable a partir de los 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sin embargo la mejor resolución se obtiene a los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por lo que los péptidos a ligar se utilizaron a esta concentración.

El uso de ligadores es ampliamente utilizado para inmovilizar a las proteínas sobre superficies inertes, sin embargo, estos no funcionaron de manera adecuada para el péptido P19850, el cual únicamente fue inmovilizado en la columna a una concentración de 5,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 18). Cuando los ligadores fueron omitidos, el péptido P19850 se unió de manera natural a la superficie de la membrana, incluso a concentraciones de 156.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo cual representa una eficiencia de 32 veces con respecto al uso de ligadores (Fig. 19).

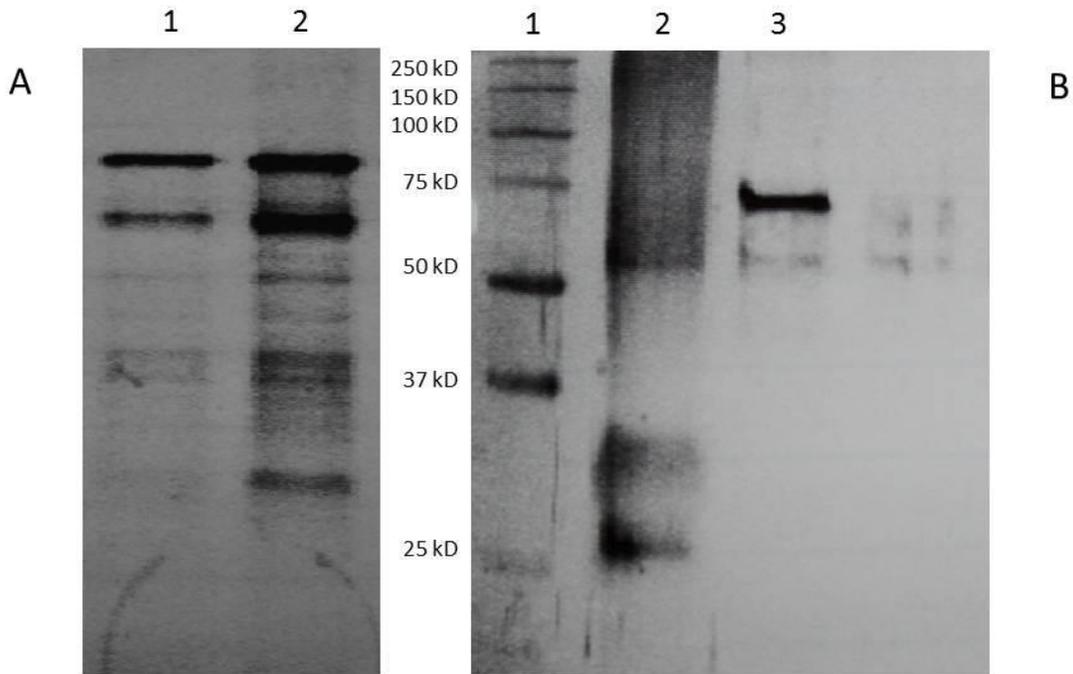


**Figura 18** Uso de ligadores para mejorar la inmovilización del péptido P19850 a la columna. Se utilizaron distintas concentraciones del péptido. Carril a, marcador de peso molecular; Carril b,  $5000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; c,  $2500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; d,  $1250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; e,  $625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$



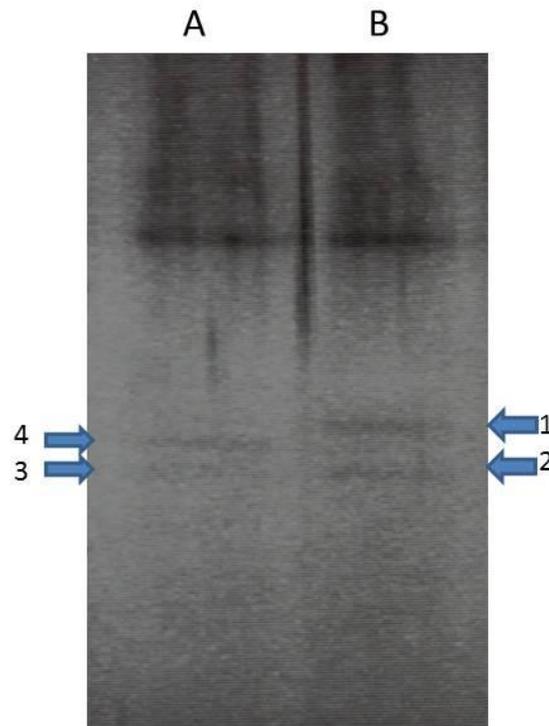
**Figura 19** Inmovilización y recuperación del péptido P19850 a la columna, sin utilizar ligadores. Se utilizaron distintas concentraciones del péptido. Carril a, marcador de peso molecular expresado en kilo daltons (kD); Carril b,  $5000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; c,  $2500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; d,  $1250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; e,  $625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; Carril f,  $312.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; Carril g,  $156.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; Carril h,  $78.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

El extracto celular de *V. parahaemolyticus* también se unió con buena eficiencia a la columna, aunque a concentraciones mucho mayores que las utilizadas para fijar al péptido P19850 (Fig. 20A). Los bloqueadores utilizados impidieron que el extracto de la bacteria se fijara a la columna, sin embargo, la azocaseína generó demasiadas bandas debidas a sus fracciones proteínicas, por lo que no fue una buena opción para bloquear los sitios de la columna que no reaccionaron. La glicina solo generó un par de bandas claramente identificables, por lo que fue el bloqueador seleccionado (Fig. 20B).



**Figura 20** A, Extracto celular de *Vibrio parahaemolyticus* fijado y eluido de la columna; 1, segunda elusión; 2, primera elusión. B, efecto de los bloqueadores de la columna sobre la inmovilización del extracto de bacteria; 1, MWM; 2, azocaseína; 3, Glicina.

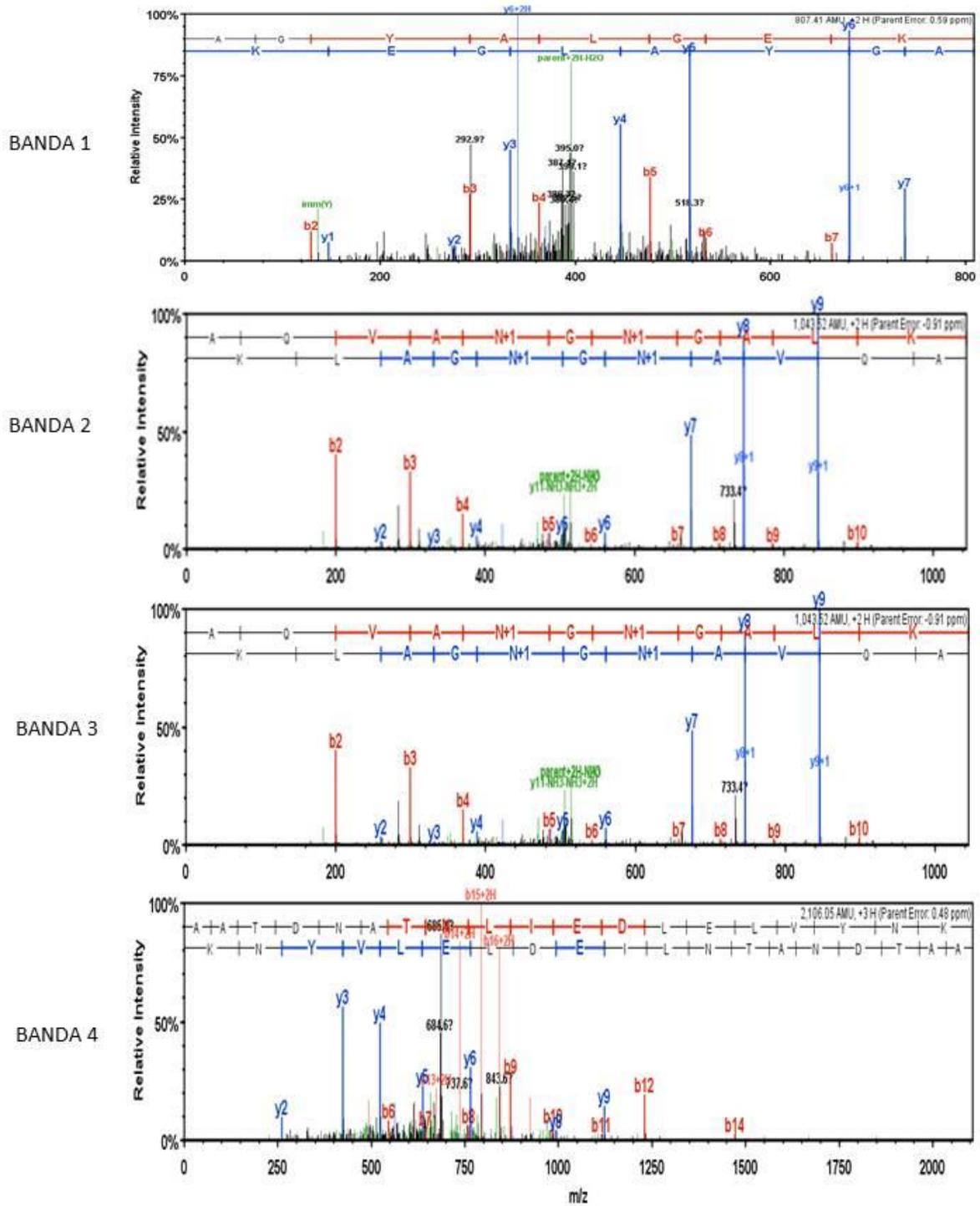
La electroforesis obtenida de las muestras eluidas de la columna donde interaccionó el ECB y la mezcla de péptidos, indica la presencia de 2 bandas claramente separadas y que representan a las proteínas que interaccionaron con dichos péptidos (Fig. 21A). Por su parte, las proteínas que interaccionaron con el P19850 también fueron dos (Fig. 21 B), una de ellas, etiquetada con el número 2, pareciera ser la misma proteína que interaccionó con la mezcla de péptidos y que en la figura se representó con el número 3.



**Figura 21** Proteínas del extracto celular de *Vibrio parahaemolyticus* que interactúan con la mezcla de péptidos de VPMS1 (A) y el péptido P19850 (B)

Las bandas se recuperaron con el auxilio de un bisturí estéril, se depositaron en un tubo para crio-preservar con tapón de rosca y se les adicionaron 50  $\mu$ L de ácido acético al 1% preparado en agua milli-Q. Se etiquetaron y la identidad de las proteínas se determinó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas LCMS/MS (Advanced Protein Technology Centre, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canadá). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software proteómico Scaffold 3 (Portland, Oregon, USA), el cual usa como interfase la comparación de secuencias de las muestras, contra las que se encuentran en tiempo real en la base de datos de la NCBI. El péptido P19850 se ligó con 2 proteínas del extracto celular de *V. parahaemolyticus* la banda 1 resultó ser una porina, la banda 2 fue identificada como una proteína participante en el transporte de fosfato (ABC), en el caso de la mezcla de AMPs, estos se unieron también con 2 proteínas, las cuales corresponden a las bandas 3 y 4 en la Fig. 21. La

banda 3 corresponde también a la proteína que participa en el transporte de fosfato, y la proteína 4 fue identificada como la sub-unidad gamma de la ATP sintasa (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>), todas ellas identificadas como componentes de *V. parahaemolyticus*.



**Figura 22** Espectrogramas de identidad de las proteínas de *Vibrio parahaemolyticus* que interaccionaron con los péptidos antimicrobianos del fago VPMS1

BANDA 1

gi|339785037 (100%), 37,280.9 Da  
porin [Vibrio parahaemolyticus]  
23 unique peptides, 58 unique spectra, 1228 total spectra, 305341 amino acids (89% coverage)

```
MKKTLLAVAV VASATSVNAA EVFKSEEGSV DFIGQLRPTL LFLDSTDHTA ELNTSSSRMG
VNGVYVNDL LKYLGEVEIG VALGDNYGAG ADSSERTDDT VVRRRHIFGF DMGDMGTLRF
GKECTFADDV YGADYSYFFG GSALLYGHEW NNDISQIKYSF ENDAFWLKAG YALGEKDKNE
EVREVFYGKS FGELSVHAGV LSSVKKIAVK NYAHNTENLS FEVTGEYELG EHTLGATYYY
NEEDKNANS TVDSHGISLA GMFAVAPKTT LYSGYELVMS SSDVAGTVDA DSRFYAGVE
YKFSKWARVF AEGAYVFEET KLDNSKVDSK TDFGVGARVY W
```

BANDA 2

gi|28901316 (100%), 28,713.7 Da  
phosphate ABC transporter periplasmic phosphate-binding protein [Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633]  
14 unique peptides, 34 unique spectra, 356 total spectra, 149273 amino acids (55% coverage)

```
MKKTVIGAI A LLGAMAVTPV SAKETISAVG SSSVTPLMEV FSETYMKTNP NVFIEVQGGP
SSAGVKAANK GSADLGMSSR NLKESKEPT LVEEVVARDG IAVVYVNPQNK LAGLTAEQVT
AIYKGEVSNW KEVGGEDKPI VAITRD TASG TRGAFEDIMA LKMKISGKKV SAISORAQVA
MNGALKTMV ASNPYAIGYI SLGTVONTVN ALAIDGVDAT VANVKNGSYK YARPFLVLYK
EGKPSAETQK FLDWMLTEDA QKLVDQNGYI SVH
```

BANDA 3

gi|153837782 (100%), 30,105.2 Da  
extracellular tungstate binding protein [Vibrio parahaemolyticus AQ3810]  
17 unique peptides, 27 unique spectra, 106 total spectra, 177272 amino acids (65% coverage)

```
MKKIALTLAA TSITLVSYSA FSAQDAEHVR LATTSTYHS GLLDYLLPQF EKDTGYKVDV
IAAGTGKALK MGENGDVDLV MTHAPKAEGT FVEKGYGVLP RKLMYNDFVI VGPKTDPAKI
KDDSEVLDVF KEIANKNATF ISRGDDSGTH KKEMGFWAQT KIEPNFGGYR SVGQGMGPTL
NMASEMQGYT MSDRGTWLAY QNKLDLEILF QGDEKLFNPF QVILVNPERY PTINYQAKA
FSDWLVNPRG QELINGFRLN GKQLFVANA ESK
```

BANDA 4

gi|28899844 (100%), 31,859.9 Da  
FOF1 ATP synthase subunit gamma [Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633]  
22 unique peptides, 34 unique spectra, 140 total spectra, 234288 amino acids (81% coverage)

```
MAGAKEIRNK IGSVKSTQKI TKAMEMVAAS KMRRSQDAME ASRPPYAETMR KVIGHVANAN
LEYRHPYLEE REAKRVGYII VSDRGLCGG LNINVFKKAV TDIQTWKEKG AEIELAVIGS
KATAFFKHGG AKVAAQVSGI GDSPSLEDLI GSVGVMKKY DEGELDRLYV VFNKFNVTMV
QOPTIDQLLP LPKSDSKEMQ REHSWDYIYE PEPKPLDRTL LVRYVESQVY QGVYENLACE
QAARMIAMKA ATDNATNLIE DLELVYNNKAR QAAITQELSE IVGGASAV
```

**Figura 23** Alineamientos de identidad de las secuencias de las proteínas de *Vibrio parahaemolyticus* que interaccionaron con los péptidos antimicrobianos del fago VPMS1. Los alineamientos se realizaron con proteínas reportadas en la base de datos del GenBank. Las regiones amarillas indican las similitudes entre ambas secuencias. Los alineamientos solo se consideraron como validos cuando su e-valor fue inferior a 0.00001

## 8.0 Discusiones

VPMS1 es un fago con DNA de doble hebra (dsDNA, por sus siglas en ingles) que infecta *V. parahaemolyticus*, el cual mostró una alta capacidad lítica sobre los cultivos de *V. parahaemolyticus*, alcanzando índices de conteo de partículas virales equiparables a los reportados para otros fagos líticos. La producción de suficiente biomasa de VPMS1 se llevó a cabo sin problemas utilizando matraces de 125 mL, la cual se recuperó de la manera ya descrita obteniéndose buenas cantidades que fueron utilizadas para extraer su DNA.

Dentro de los métodos publicados para obtener el ADN de los fagos, existen a su vez una gran diversidad de variantes, las más comunes implican la separación de las bacterias y de su ADN mediante técnicas de ultracentrifugación donde se aplican velocidades tan extremas como 200,000 x g y la utilización de gradientes generados con el uso de cloruro de cesio (Sambrock & Rusell, 2001). Con estos métodos resulta ser problemática la obtención del ADN, no solo porque es complicado el procedimiento, sino también por el bajo rendimiento que se obtiene (Ming-Tsan *et al.*, 1998). Existen alternativas donde se crean diferentes gradientes de densidad de la solución bacteria-fagos utilizando reactivos como el polietilen glicol, cloruro de zinc (Santos, 1991), cloruro de cobre y centrifugaciones a velocidades no tan extremas, llegando a ser de 15 ó 20,000 g.

En nuestro caso, se ensayaron diversos métodos para obtener y purificar el ADN de VPMS1, sin éxito, pues en algunos casos no pudo ser extraído el ADN y en otros se encontró en cantidad insuficiente o contaminado, por lo que fue necesario aplicar variantes que llegaron incluso a prescindir del uso del polietilen glicol, el cual solo contaminaba el proceso de purificación del ADN del fago. Al final de los ensayos se obtuvieron dos métodos que permitieron obtener el ADN del fago de manera pura, es decir, sin la presencia del ADN del hospedero, ni proteínas o debris celulares, pero ambos distintos a los reportados en la literatura.

El primero de ellos, incluyó el uso de filtros de alúmina con un tamaño de poro de 0.02  $\mu$ . Las bacterias fueron previamente retenidas en una membrana con un poro de 0.2  $\mu$ m, es decir 200 nm, mientras que el tamaño de los fagos oscila entre los 20 y los 200 nm para los más pequeños y los más grandes respectivamente. Por resultados previos realizados para caracterizar el fago VPMS1, se conocía ya que este fago se trataba de un podovirus (Fig. 1A), con un tamaño máximo de 70 nm, por lo que al filtrar la mezcla bacteria-fago en un filtro de 0.2  $\mu$ m implicaba la inminente separación de las células de la bacteria, mientras que una posterior filtración en la membrana de 0.02  $\mu$ m implicaba la retención de las partículas víricas en dicha membrana.

Lavados posteriores con un amortiguador apropiado permitieron eliminar cualquier residuo proveniente de la bacteria. Los fagos así recuperados se trataron con proteínasa K y amortiguador de lisis para extraer el ADN vírico, el cual se purificó por métodos convencionales. Este método dio muy buenos resultados en cuanto a la calidad de ADN obtenido, sin embargo, con una desventaja notoria, pues las membranas de alúmina se bloquearon fácilmente permitiendo la purificación de una cantidad limitada de fagos.

El segundo método prescindió el uso de la membrana de alúmina, y se basó principalmente en aprovechar la naturaleza de los fagos, cuyo material genético se encuentra protegido dentro de una cápside proteínica. Para ello, primeramente se eliminaron las bacterias y sus restos celulares mediante una centrifugación a 20,000 x g, eliminando el precipitado, restando únicamente una solución en donde se encuentran mezclados componentes solubles productos del metabolismo del hospedero y quizás de la expresión de los fagos, mezclados con las partículas virales.

El tratamiento con nucleasas fue primordial y clave para eliminar todo rastro de material nucleico producto del hospedero, donde la protección debida a la cápside del fago fue esencial para impedir la propia degradación del material genómico de

VPMS1. Como paso siguiente, el uso de la proteinasa K, eliminó toda actividad de las nucleasas hasta degradarlas en su totalidad, mientras que al mismo tiempo debilitó la cápside del fago para permitir su disrupción y la liberación del material genético de las partículas virales. Posteriormente la purificación del ADN del fago se llevó a cabo de manera convencional, utilizando columnas de sílica, intercambio iónico y lavados con etanol a distintas concentraciones. El resultado en cuanto a la calidad del ADN obtenido fue similar al del primer método, pero sin el inconveniente de las membranas de alúmina.

Basados en las micrografías electrónicas obtenidas para VPMS1 (Fig. 1), se estima que su tamaño es de 60 nm y pertenece a la familia *Podoviridae*, debido a que presenta ADN de doble hebra, cabeza icosaédrica y una cola corta no contráctil (Ramírez *et al.*, 2013). El ADN es lineal, al igual que los genomas de los fagos líticos reportados a la fecha, los cuales se comportan de la misma manera. Este arreglo en la estructura del ADN es importante pues va de acuerdo con la naturaleza del ciclo de vida del fago, el cual es lítico y por tanto, no tiene necesidad de volverse circular o incorporarse al genoma de su hospedero.

La secuencia nucleotídica de VPMS1 se obtuvo con un secuenciador masivo de última generación con el cual se obtuvieron 32,920 lecturas con una extensión de 200 nucleótidos cada una, los cuales al ser ensamblados generaron una secuencia consenso con un tamaño total de 42.3 kb, lo cual se encuentra dentro del promedio de tamaño para los podovirus registrados en la base de datos de la red de genomas (GenomeNet) del Centro de Bioinformática de la Universidad de Kyoto ([www.genome.jp](http://www.genome.jp)). No se encontraron secuencias repetidas en los extremos del genoma, situación que ayuda a tener certeza en la validez del ensamble final de la secuencia, toda vez que su presencia puede convertirse en problemática y conducir a errores durante dicho ensamblaje.

Al efectuar un estudio comparativo entre la secuencia de nucleótidos de VPMS1 contra las secuencias reportadas en el GenBank, el porcentaje de identidad más alto correspondió al 1%, motivo por el cual se determina que este genoma corresponde a

un fago no reportado en dicha base de datos, es decir, corresponde a un nuevo fago. El Contenido G+C tiene un valor relativamente bajo cuando es comparado contra el reportado para otros podovirus, sin embargo, su valor se encuentra muy cercano al valor encontrado para su hospedero (Han *et al.*, 2008).

El 43% de los genes de VPMS1 no muestran similitud con proteínas cuya función este reportada, o bien, muestran una muy baja semejanza (superior a 0.01) con otras proteínas ya reportadas en la base de datos del GenBank, constituyendo de esta forma nuevas proteínas cuya función podría derivarse de la posición que ocupan dentro del genoma.

Los genes codificantes están envueltos en la replicación y la reparación del material nucleico, en el metabolismo, la lisis, proteínas estructurales y otras enzimas (Tabla 4), los cuales se describen en detalle más adelante. En la mayoría de los casos, las proteínas con las que marcan similitud las proteínas de VPMS1 corresponden a fagos que infectan bacterias Gram negativas. Es de llamar la atención el orden en el que estos genes se encuentran distribuidos dentro del genoma, cuya agrupación obedece a la función que desempeñan, lo cual podría ser predecible, sin embargo, la orientación misma del sentido de la expresión de los genes es algo inusual en los mapas genómicos publicados a la fecha.

De esta forma, resulta ser fácil el observar 3 módulos en el mapa genómico del fago, orientados de distinta manera, el primero de ellos, el módulo para el empaquetamiento, el cual ocupa el espacio del nucleótido 1 al 3,986 con 7 genes, ocupando el 13% del genoma; el módulo estructural ocupa el espacio del nucleótido 3,987 al 22,240 contiene 18 genes, lo cual representa el 34% del genoma, es aquí donde se encuentran los 2 únicos genes que se expresan en sentido inverso en relación con sus compañeros de módulo, el gen MS11, una proteína hipotética que probablemente se encuentre involucrada en la lisis del hospedero (se discute posteriormente), y poco más adelante, el gen MS15, otra proteína hipotética con funciones no conocidas. Por último, el módulo para la replicación y la regulación,

inicia en el nucleótido 22,241 para finalizar junto con el genoma total, en el nucleótido 42,132 en este fragmento se encuentran 28 genes que representan el 53% del genoma total, implicando que el mayor esfuerzo del genoma del fago está enfocado al control de expresión y la síntesis de su material nucleico.

La presencia de tRNAs es importante porque se cree que ellas facilitan una tasa de translación más rápida, sin embargo, estas regiones no se encuentran en todos los genomas de los fagos, tal es el caso de VPMS1, el cual no cuenta con ninguna de ellas, según los resultados arrojados por los tres programas bioinformáticos utilizados para tal fin. Sin embargo, se encontraron regiones promotoras para 13 genes (Tabla 4), 5 de ellos formando parte del módulo 1, cubriendo el 71% de dicho módulo.

#### Módulo de empaquetamiento

El gen MS01, con función hipotética, muestra gran similitud con el gen TUST1-2 del fago ICP1, el cual infecta a *Vibrio cholerae*. En ICP1, este gen también se encuentra al inicio del genoma, indicando alguna función específica al inicio de la expresión del genoma, quizás la de una helicasa, por su posición y por el parentesco que muestran algunas regiones de la proteína hipotética contra la de la helicasa sintetizada por el fago LKD1 (*Pseudomonas aeruginosa*), con quien muestra un 43% de similitud. La participación de la helicasa y la primasa dentro de este módulo quizás obedezcan a motivos que tienen que ver con la protección del material nucleico que será empaquetado, toda vez que una de sus principales funciones es justamente la reparación del material genético (Perumal *et al.*, 2010), siendo una característica en los fagos la multifuncionalidad de algunas de sus proteínas (Miller *et al.*, 2003).

En este módulo se encuentra el complejo terminasa, formado por una unidad grande y una unidad pequeña. La sub-unidad pequeña participa en el inicio del empaquetamiento del material genético, primero reconociendo el sitio donde se unirá al ADN, transformando su arquitectura para su interacción con la sub-unidad grande, previo a la translocación del ADN en la pro-capside viral (Zhao *et al.*, 2012). La sub-

unidad grande, la cual es el componente mayoritario de la holoenzima, participa para la escisión del ADN concatémico generando el fragmento de ADN individual que se introducirá a la pro-cápside del fago, ligando el ADN monomérico a su conector y traslocándolo al interior de la cabeza del fago (Shen *et al.*, 2012).

## Módulo estructural

El módulo 2 está caracterizado por genes dedicados mayoritariamente a la síntesis de proteínas estructurales, sin embargo, se encuentran dentro de este fragmento del genoma, genes cuya función es la lisis del hospedero y uno más, el gen MS24, el cual tendría la función de convertir el fago de su estado lítico, al estado lisogénico, situación que se discute más adelante.

### Proteínas de la cápside del fago.

El gen MS08 no presentó homología significativa con otras proteínas reportadas en las bases de datos, sin embargo, la cercanía o similitud a las proteínas con función conocida, corresponden a proteínas cuya función es la unión de la cabeza del fago a la cola, como es el caso del fago Sha1, de *Lactobacillus plantarum*, razón por la cual se integró este gen a éste módulo. El gen MS09 corresponde a la proteína principal de la cápside del fago, la cual eventualmente formará la estructura principal que tendrá la función de proteger el genoma de la nueva partícula viral.

No se encontraron indicios de proteínas promotoras del ensamblaje de la cápside, ni de las proteínas que sirven para estabilizar la estructura una vez ensamblada. Estas proteínas tienen como característica principal el poseer dominios HTH (hélice-giro-hélice por sus siglas en inglés) en su extremo carboxilo (Sun *et al.*, 2000). Mientras que la mayoría de fagos poseen una sola proteína estabilizadora, existen algunos fagos, como el T4 que poseen hasta 6 diferentes proteínas (Berger *et al.*, 1999). Sin embargo, en VPMS1 no se encontró ninguna proteína que cubriera el perfil ni de

semejanza con proteínas ya identificadas para otros fagos, ni de sus regiones caracterizadas.

El gen MS21 codifica para la proteína portal, la cual una vez integrada tendrá la función de ser la entrada y/o salida del material genético del fago. La proteína portal forma un anillo en una vortex, la cual se integra una vez armada la cápside (Singer *et al.*, 2005). Esta estructura de proteínas interactúa fuertemente con las unidades de empaquetamiento para que estas puedan efectuar de manera efectiva su función.

### Proteínas de la cola del fago

Muchas familias de virus de bacterias emplean una estructura molecular especial llamada cola, ausente en los virus que infectan a otras bacterias, animales y plantas (Leiman *et al.*, 2003), estos fagos con cola son el grupo más abundante de organismos en la biosfera (Hendrix *et al.*, 2003). La cola es utilizada durante la infección, la cual emplean para el reconocimiento y la fijación del fago al hospedero, penetración de la membrana celular, y para la transferencia del material genético de la cápside del virus al citoplasma celular del hospedero (Leiman *et al.*, 2004). Las proteínas integradoras de la cola del fago encontradas en VPMS1 son varias, encabezadas por la proteína del collar del fago, fibras adhesinas, proteínas tubulares y ensambladoras.

El gen MS13 codifica para la proteína del collar del fago, el cual se encuentra inmediatamente después del portal que comunica con la cápside viral, y es el responsable de unir la cola del virus con la cabeza. Para diversos virus, como el T4, se ha encontrado que son varias las proteínas que participan en la integración de la cola del fago, para el caso del citado virus son 22 las proteínas involucradas en dicho proceso (Leiman *et al.*, 2003). En VPMS1, encontramos al menos 4 proteínas cumpliendo esta función. El gen MS25 codifica para la proteína que será el componente principal del tubo de la cola, mientras que el gen MS17 es un componente con funciones secundarias en dicho proceso. El gen MS23 expresa la

proteína responsable para el ensamblaje de las fibras adhesinas que a su vez serán codificadas por el gen MS18 y que una vez integrada la partícula viral jugarán un papel importante para el fago en su estado infectivo, pues ellas son las responsables de la fijación a la superficie del hospedero, la cual hacen de manera irreversible permitiendo al fago anclarse y depositar su material genético al interior del citoplasma (Weigele *et al.*, 2003).

En el fago T4 se ha reportado una base de proteínas en el extremo de la cola (Akhter *et al.*, 2007), esta base es un complejo de proteínas en el cual se ensamblan las fibras adhesinas, sin embargo en VPMS1 no hemos encontrado ninguna proteína homóloga a ella, aunque los genes MS20 y MS22 bien pudieran cumplir dicha función, pues son vecinos al gen de la proteína portal y no se les pudo asignar función alguna después de los análisis bioinformáticos llevados a cabo (Fig. 11).

#### Proteínas lisogénicas?

Es de llamar la atención la presencia del gen 24 dentro del genoma de VPMS1, el cual se encuentra formando parte del módulo estructural del fago. Este gen codifica para una proteína asociada con la conversión de los fagos al estado lisogénico. Este hecho compromete la identidad del fago VPMS1, el cual ha sido identificado como un fago estrictamente lítico, y por tanto, no debería tener en su arsenal genético genes codificando para una conversión lisogénica. VPMS1 fue designado como fago lítico justamente efectuando estudios de lisis sobre las células de *V. parahaemolyticus* (Fig. 1 y 2), y en nuestros estudios de laboratorio en todo momento ha presentado un comportamiento lítico con actividad muy significativa.

La presencia de un gen cuya expresión obedece a comportamientos esencialmente lisogénicos es muy interesante, podría ser que VPMS1 no es enteramente lítico? quizás en ciertas fases de su crecimiento cambie su estado de expresión, pero ello va en contra de nuestras observaciones físicas en las placas de Petri, pues a este fago le hemos dado seguimiento por alrededor de 4 años, periodo de tiempo en el

que se ha resembrado en incontables ocasiones y las características han sido las ya descritas. Ello nos lleva a plantear otras explicaciones para la presencia de este gen.

Para que un fago sea lisogénico, es necesario que cuente con un set de genes que le permitirán llevar a cabo dicha función. Los fagos lisogénicos se integran al genoma viral en el cromosoma bacteriano, donde permanecerán por periodos de tiempo variables. Para efectuar la integración, los fagos temperados necesitan un gen que codifique para una proteína integrasa, la cual participa en la recombinación entre una secuencia de ADN del fago (*attP*) y una secuencia de ADN de la bacteria (*attB*) (Morita *et al.*, 2012). Mientras algunas integrasas efectúan sus funciones solas, otras requieren la presencia de factores de origen vírico o del hospedero.

Además de ello, para que el fago integrado en el genoma del hospedero sea liberado, se requiere de una enzima proveniente del fago, llamada excionasa, la cual actúa en los sitios híbridos de unión (*att*) formados durante la recombinación (Groth & Calos, 2004). Esta enzima también requiere de cofactores para poder actuar, pero sobre todo, requiere que el mecanismo que la ha mantenido inhibida sea deshabilitado (Lewis *et al.*, 2011). En el fago Lambda, esta función la desempeña una proteína represora, llamada CI, la cual ejerce su función cuando las condiciones de crecimiento del hospedero son estables (Anderson & Yang, 2008), auto-regulándose mediante un proceso conocido como retro-alimentación. Bajos niveles de CI activan la expresión de las proteínas que antes estaban reprimidas cambiando el estado del fago de lisogénico a lítico (Little & Michalowski, 2010).

Para que un fago presente su estado lisogénico, es necesario que se encuentren todos o varios de los genes antes descritos y que codifican para estas proteínas y en el caso de VPMS1, únicamente se encontró el gen que promueve la conversión lisogénica, pero no se encontró el gen que le permitirá integrarse al genoma de su hospedero, ni el gen cuya expresión le permitirá salir de dicho genoma para constituirse como unidad vírica, ni los genes represores que lo mantendrán en un estado lisogénico efectivo, ni los factores requeridos para la expresión de estas

enzimas. Es por ello que resulta evidente que no es posible que el estado de lisogenia se presente en VPMS1, quizás la presencia de este gen indique que en algún momento el fago fue lisogénico y posteriormente se volvió lítico estricto, perdiendo el resto del set de lisogenia.

### Módulo de replicación y regulación

Este módulo por si solo representa el 50% de los genes con los que cuenta el fago, VPMS1 cuenta con al menos 6 genes dedicados a la reparación del material nucléico, 4 nucleasas, 1 primasa y 1 sintasa. El gen MS36 codifica para una timidilato sintasa, una enzima muy importante cuya función universal es la reparación del ADN (Carreras *et al.*, 1995), la cual es utilizada cuando durante la replicación del ADN se generan sub-productos que no son necesarios y que deben ser eliminados (Moroz *et al.*, 2005) antes de ser incorporados por la DNA polimerasa, como los NTPS anormales, removiendo de esta manera lesiones producidas por nucleótidos modificados (Galperin *et al.*, 2006).

Las endonucleasas son glicosilasas del ADN que cortan las pirimidinas que han sido dañadas en su mayor parte por la radiación UV. La reparación es iniciada por la endonucleasa V, la cual actúa sobre el enlace fosfodiéster del nucleótido dañado, para la remoción de la parte dañada, actúan la fracción exonucleasa de la DNA polimerasa I, quien efectúa la escisión dejando un agujero que es tapado con la ayuda de la misma DNA polimerasa y de la proteína ligasa (Chia *et al.*, 2010). En el fago VPMS1, los genes que codifican para las nucleasas se encuentran distribuidos en diversos sitios dentro del módulo de replicación y regulación (MS28, MS33, MS42 y MS46) mostrando de cierta manera la importancia que tiene la integridad del material nucléico.

El gen que codifica para la DNA polimerasa I es el gen 37, el cual posee en su estructura proteínica dos dominios altamente conservados. En el lado amínico se encuentra el dominio que le da su actividad de replicación, mientras que en el lado

carboxílico, se encuentra el dominio que corresponde a su actividad como exonucleasa. Al poseer ambos dominios en la misma estructura, la DNA polimerasa I de VPMS1 corresponde a la familia de DNA polimerasas A, que se caracteriza por poseer ambos dominios, el de replicación y el de reparación (Filée *et al.*, 2002).

Los genes MS31 y MS39 de VPMS1 codifican para proteínas que se unen al ADN, y cuya función muy probablemente sea la de la regulación del material genético, pues se ha demostrado que las proteínas que se unen a las secuencias nucleicas juegan un papel importante en la regulación de la replicación del material genético (Vinson *et al.*, 1988), por lo general actuando sobre las hebras sencillas del ADN y potenciando la actividad de la ADN polimerasa (Reuben & Gefter, 1973).

Para la replicación del ADN intervienen diversas enzimas y proteínas, dentro de las primeras en actuar sobre la hebra del ADN se encuentran las helicasas. VPMS1 posee 3 genes que codifican para helicasas. La primera de ellas es codificada por el gen MS2 y se encuentra en el módulo de empaquetamiento con la función de participar en la reparación. La segunda es codificada por el gen el gen MS30, en el módulo de replicación, en donde lleva a cabo la función de separar la doble hebra del ADN. Esta separación del ADN permite que cada hebra sencilla sea copiada (Patel & Donmez, 2006). Por su parte las Dda helicasas cumplen la misma función que las helicasas, aunque se piensa que son ellas las que participan en la iniciación de la replicación (Perumal *et al.*, 2010), función desempeñada por la proteína expresada por el gen MS43 en VPMS1.

Aunque no se encontró un gen que codificara para la RNA polimerasa, si se encontraron genes que codifican para primasas (Genes MS2 y MS44), que son las enzimas cuya función es sintetizar cadenas cortas de RNA que serán las que inicien la síntesis del ADN (Kuchta & Stengel, 2010). En el caso del Gen MS2, por la posición que mantiene en el genoma del fago, se presume que su función sea para reparación de fragmentos pequeños de ADN dañados. En el caso del gen MS44, el

cual se encuentra en el módulo de replicación, es el iniciador de la replicación del genoma de VPMS1.

Proteínas de lisis.

En el genoma de VPMS1 no se encontraron genes que codifiquen para la síntesis de las enzimas lisina y holina, que son las enzimas líticas que se encuentran en la mayoría de los fagos y que utilizan para entrar al hospedero, y salir de él una vez que se han multiplicado en el proceso lítico. Sin embargo, si cuenta con otras enzimas de lisis, las cuales muy probablemente está utilizando en lugar de la lisina y la holina. El gen MS10 codifica para una proteína conocida como Rz, se ha reportado que estas proteínas se encuentran formando parte de un set de proteínas junto con la lisina y la holina cuya función es la de potenciar la lisis bacteriana (Ceyssens *et al.*, 2006).

En VPMS1, el gen MS10 se encuentra aislado, en un extremo del módulo estructural, junto a un pequeño gen cuya tamaño y ordenamiento obedece más a la expresión de una proteína que acompaña en todo momento al gen Rz llamada Rz1 (Krupovic *et al.*, 2008). Las proteínas Rz y Rz1 son consideradas ubicuas entre los fagos de las bacterias Gram negativas, sin embargo, Summer *et al.*, (2007), encontraron que para estas proteínas algunas veces no es lo más acertado tomar como base la similitud en las secuencias de aminoácidos para encontrar las proteínas que efectúan estas funciones, sino que son necesarias estrategias basadas primordialmente en el arreglo de los genes y señales de ubicación.

En el fago Lambda, la proteína Rz tiene un tamaño de 153 aminoácidos (Berry *et al.*, 2008), mientras que la proteína Rz de VPMS1 tiene una longitud de 147 aminoácidos. En el fago lambda la proteína Rz se encuentra acoplada con una proteína pequeña llamada Rz1, la cual tiene un tamaño de 40 aminoácidos y se encuentra completamente embebida en el gen de la proteína Rz, aunque en otros fagos esta pequeña proteína se encuentra no embebida, sino traslapada (Summer *et al.*, 2007), y otros más donde se encuentran completamente separadas (Berry *et al.*,

2008). El gen MS11 no se encuentra traslapado con el gen MS10, pero se encuentra inmediatamente a su lado, y codifica para una proteína cuyo tamaño es de 49 aminoácidos.

Al ser analizado este gen con el software LipoP 1.0 y el software APD2, los resultados indicaron que la proteína hipotética posee al menos 4 pliegues con potencialidad de funciones de corte, la molécula contiene un 4% de prolinas, puede formar alfa-hélices y posee 11 residuos en una superficie hidrofóbica con lo cual su capacidad de interaccionar con la superficie de la membrana bacteriana es muy grande. Por encontrarse al lado del gen que codifica para la proteína Rz y por las características físicas de la molécula expresada, este gen es un fuerte candidato para ser una proteína tipo Rz1 la cual quizás actúe al lado de la proteína Rz para perforar la membrana de *V. parahaemolyticus* una vez finalizado el proceso de infección y replicación vírica.

En uno de los extremos del fago, se encuentra un gen que codifica para la enzima lisozima, la cual muy probablemente utilice VPMS1 para iniciar el proceso de infección en las células de *V. parahaemolyticus* toda vez que se ha reportado que esta enzima se utiliza para digerir la pared celular permitiendo la penetración de la cola del fago a la membrana interna del hospedero (Leiman *et al.*, 2003).

#### Péptidos antimicrobianos

Dentro del genoma de VPMS1 se encuentran 57 ORFs con capacidad molecular de ser expresados y producir por tanto proteínas en estado funcional. 34 ORFs se encuentran formando parte de otros genes más grandes, ya sea traslapados o completamente embebidos en dichos genes, por lo que no se puede establecer su identidad como un gen independiente, pero tampoco descartarse, porque es sabido que existen genes que se encuentran traslapados o completamente embebidos en otros genes y sin embargo, bajo ciertas condiciones se logran expresar, complementando la actividad desarrollada por el gen más grande (Krupovic *et al.*,

2008; Berry *et al.*, 2008), tal es el caso de los genes que codifican para las proteínas Rz y Rz1, de las cuales ya se discutió en la sección de proteínas de lisis de VPMS1.

El ORFs 3712..3882 (MS07) codifica para un péptido de 56 aminoácidos, y representa a una molécula reconocida como proveedora de papel protector al ADN cuando éste ha sido empacado en la cabeza del fago, haciéndolo resistente a la degradación por DNAsas (Linderoth *et al.*, 1991). La proteína MS23 participa en el ensamblaje de las fibras a la cola, mientras que la proteína MS31 es una proteína que también se une al ADN y participa muy probablemente en funciones de regulación de la expresión del material nucleico.

En la actualidad, la mayoría de los investigadores se están enfocando en los modelos *in silico* para la búsqueda de nuevos AMP, debido a que los modelos computacionales pueden acelerar el proceso del diseño y descubrimiento de drogas antimicrobianas (Wang *et al.*, 2011). Se ha observado la prevalencia de ciertos tipos de residuos sobre la superficie de los péptidos que poseen actividad antimicrobiana, particularmente en los extremos amino o carboxilo. Ello ha permitido que las predicciones sobre la actividad se realicen a través de la secuencia de aminoácidos, con una precisión del 80 al 90% con respecto a los valores encontrados *in vivo* (Lata *et al.*, 2007). La composición de los aminoácidos es una característica básica de la secuencia de la proteína, la cual está estrechamente correlacionada con sus atributos, como el tipo de pliegue, estructura secundaria y dominio (Wang *et al.*, 2011), pero no es la única característica que se debe observar para tratar de predecir la actividad de una molécula, sino también sus características físico-químicas, como la hidrofobicidad, carga neta de la molécula en su superficie y la prevalencia de ciertos residuos de aminoácidos en su superficie (Thakur *et al.*, 2012).

En general, la plataforma más utilizada para tratar de mejorar las características antimicrobianas de las moléculas y de predecir su actividad, es la plataforma llamada APD2, del Departamento de Patología y Microbiología, del Centro Médico de la Universidad de Nebraska, la cual cuenta con una amplia base de datos donde se

anidan las secuencias de los péptidos antimicrobianos descubiertos, sin importar su origen. Los algoritmos utilizados en esta plataforma permiten afinar las búsquedas según los intereses del usuario, en nuestro caso, nos enfocamos en obtener información de características de la secuencia primaria de los péptidos analizados y de sus propiedades fisicoquímicas las cuales se comparten con cierta consistencia en las moléculas con actividad positiva ya reportada (Wang *et al.*, 2008).

En la Tabla 6, se resumen las características más relevantes encontradas como resultado de los análisis efectuados con cada una de las 37 moléculas de péptidos, incluyendo en la Tabla únicamente las secuencias con potencialidad de poseer actividad antimicrobiana. Resaltan dentro de los resultados la prevalencia de hojas beta, hojas alfa y doble hélice, las cuales se encontraron en el 60% de los péptidos seleccionados y la presencia de prolina en la superficie de la estructura del restante 40% de péptidos con potencialidad de poseer actividad antimicrobiana.

La estructura beta, es una propiedad de pliegue que presentan los aminoácidos en ciertas regiones, gracias a la cual forman puentes disulfuro, estructuras que les confieren la propiedad antimicrobiana a las moléculas en las que se les ha observado, principalmente, en las defensinas, cuyo tamaño oscila en promedio entre los 30 y los 50 aa y las saponinas, cuyo tamaño suele ser más grande, en promedio de 80 aa (datos estadísticos obtenidos de la base de datos de la APD2). De los 6 péptidos codificados por VPMS1 que presentan este tipo de estructura, 5 tienen un tamaño que cae dentro del rango de los 28 a los 58 aa, por lo que podemos decir que cumplen con la característica del tamaño de moléculas tipo defensinas.

Los péptidos que poseen prolina en su superficie no actúan sobre la membrana de la célula de la bacteria, sino que interactúan con los componentes de la membrana pasando al citoplasma, en donde actúan sobre componentes intracelulares de manera irreversible (Castle *et al.*, 1999). Otvos (2005) señala que en algunos péptidos, cuando la prolina está presente en la superficie de la molécula, ésta posee actividad antimicrobiana y que su acción no obedece a la desestabilización de la

membrana celular, sino a su interacción efectiva con la molécula de ADN. Cuando la molécula de prolina es sustituida por otro aminoácido, el efecto se pierde. Se ha descubierto que este efecto está en función directa con el número de prolinas presentes en la superficie de las moléculas (Zhang *et al.*, 1999).

Sin embargo, el ADN no es el único blanco de los péptidos que poseen prolina en su superficie, sino que también pueden atacar a otros componentes esenciales para la vitalidad de la célula, como el caso de la drosocina, la cual mata a las bacterias asociándose con la proteína DnaK, inhibiendo el plegamiento de la proteína, con su mortal efecto consecuente (Otvos *et al.*, 2000; Kragol *et al.*, 2001). En VPMS1 se encontraron 4 péptidos que poseen prolinas en su superficie, una elevada hidrofobicidad superior al 25% y una carga neta en la superficie entre +1 y +3, características que los convierten en moléculas candidatas a poseer actividad antimicrobiana.

En años recientes, el uso de los programas bioinformáticos para el análisis y la predicción de la actividad de las moléculas *in silico*, tomando como base la estructura y las propiedades físico-químicas de moléculas con actividades probadas *in vivo*, se ha vuelto una actividad que ha ganado mucho auge dentro de la comunidad científica, donde se han reportado estudios que indican una efectividad en las predicciones con valores tan elevados que oscilan entre el 80 y el 90% (Torrent *et al.*, 2011; Thakur *et al.*, 2012). Sin embargo, al efectuar el análisis *in silico* para la predicción de moléculas con actividad antimicrobiana aplicado a la secuencia de los péptidos codificables encontrados en el genoma de VPMS1, encontramos un total de 8 moléculas con potencial actividad antimicrobiana, las cuales compartían características muy prometedoras con las moléculas antimicrobianas que se encuentran en la base de datos de la plataforma más utilizada para estudios *in silico*, la plataforma APD.

Sin embargo, al sintetizar químicamente estas moléculas hipotéticas con potencial actividad antimicrobiana, únicamente 3 de ellas mostraron cierta actividad negativa

sobre el crecimiento de *V. parahaemolyticus* mientras solo una de ellas mostró verdadera actividad antimicrobiana, la cual según nuestros resultados, es irreversible y con efectos equiparables a los mostrados por uno de los péptidos antimicrobianos más efectivos que se han reportado a la fecha para *V. parahaemolyticus* la DCV. Ello indica que el porcentaje de efectividad de la predicción obtenida por el análisis *in silico*, al menos en nuestro caso, es del 37.5%, si se toman en cuenta las 3 moléculas antes referidas, y del 12.5%, si se toma en cuenta la única molécula con actividad antimicrobiana 100% efectiva, el péptido P19850.

De las Tablas 6 y 7, podemos deducir que este péptido, es una molécula pequeña, compuesta por 12 residuos, un peso molecular de 1,508.7 Da, una alta hidrofobicidad, del 50%, proveniente de 2 cisteínas, 2 leucinas, 1 metionina y 1 fenilalanina. Posee 10 aminoácidos neutros o sin carga, y a pesar de poseer 1 aminoácido con carga positiva (histidina) y uno con carga negativa (leucina) los cuales son vecinos dentro de la estructura primaria de la molécula, en su conjunto la molécula posee una carga neta de -1, motivo por el cual debe ser considerado como péptido antimicrobiano aniónico (AAMP, por sus siglas en inglés).

A pesar de que la mayoría de AMPs en la naturaleza son catiónicos (CAMP, por sus siglas en inglés), se han reportado un número significativo de AAMPs, los cuales sirven como armas importantes en la respuesta de la inmunidad innata. Los péptidos que son aniónicos, son ricos en ácido glutámico y aspártico, con tamaños que oscilan entre los 5 y los 70 aa, con cargas netas de -1 a -2, aunque se han reportado algunos con cargas de hasta -7 (Lavery, 2011). Por lo general, es aceptado que la carga positiva neta de los AMPs es una de las características principales para su interacción con la membrana de las bacterias, la cual posee una carga negativa, por lo que la interacción con la membrana es el principal obstáculo al que se enfrentan los AAMPs. Un mecanismo propuesto para la introducción de los AAMPs al interior de las células de las bacterias, las cuales poseen una carga negativa, indica que los AAMPs son atraídos hacia la superficie negativa de la bacteria debido a una interacción promovida por la hidrofobicidad, posteriormente, los AMP se acumulan en

un mismo sitio y cuando alcanzan la concentración suficiente, penetran la membrana celular por un cambio en el potencial de la superficie derivado de la concentración de AAMPs en la membrana (Tang *et al.*, 2008). Sin embargo, también se conoce que para lograr esta interacción, los AAMPs tienen que adoptar varias estructuras anfifílicas, las cuales varían de las hélices-alfa, a las hojas-beta o las estructuras cíclicas derivadas de la cisteína que se observan en algunas plantas (Harris *et al.*, 2009).

Los AMPs que contienen cisteína en su estructura son conocidos como defensinas, y se caracterizan por la formación de puentes disulfuro, llegando a poseer 3 ó 4 puentes. Las defensinas de los vertebrados se pueden agrupar en 3 grupos, los cuales se diferencian por los pliegues alfa o beta, y contienen 6 residuos (Klotman & Chang, 2006). Las defensinas son la familia de AMPs más distribuida en los invertebrados, y se diferencian de las de los vertebrados por sus puentes disulfuro, llegando a poseer hasta 8 residuos de cisteínas. Estos AMPs se caracterizan por contener 6 residuos de cisteína, a las que les deben la formación de 3 puentes disulfuro, lo que les confiere estabilidad (Ganz, 2003). P19850 posee 2 cisteínas en su estructura, la primera a dos aminoácidos de la terminal amina y la otra a 2 aminoácidos de la terminal carboxílica del péptido.

Se sabe que el grupo tiol (-SH) que contiene la cisteína es la especie más reactiva presente en los péptidos, y consecuentemente estos péptidos pueden formar dímeros mediante la oxidación de los tioles, uniendo dos cadenas a través de puentes disulfuro (Diamond *et al.*, 1991). Los péptidos que contienen 2 ó más cisteínas pueden formar puentes disulfuro intramoleculares que dan como consecuencia péptidos cíclicos. Por lo que la probabilidad de que P19850 adquiera una estructura cíclica en solución, es muy grande.

Por otra parte, a pesar de que P19850 no posee carga positiva en su estructura, la cual es muy importante para la interacción con la membrana negativa de *V. parahaemolyticus* sí cumple con otra característica igual de importante que la carga

positiva para la interacción de los CAMP con las membranas negativas, poseer del 30 al 50% de hidrofobicidad en su estructura, pues los residuos hidrofóbicos juegan un papel vital permitiendo una estructura anfifílica típica que permite la interacción con las membranas (Lavery *et al.*, 2011) como ya se mencionó anteriormente. Además, la influencia de la histidina, la cual posee carga positiva, puede conferirle capacidad de interacción con las membranas cargadas negativamente, y/o con los lipopolisacáridos, y posee residuos no polares, como la fenilalanina, que facilitan la permeabilización y la disrupción de la membrana (Hou *et al.*, 2010).

Presumiblemente P19850 actúa al interior de la célula de *V. parahaemolyticus* pues es notorio que mientras actúa por sí solo a concentraciones de 0.5 µg/mL, este no muestra actividad antimicrobiana, mientras que si actúa en compañía del resto de AMPs de VPMS1 a concentraciones muy similares (0.625 µg/mL), el efecto antimicrobiano es equiparable a cuando se le utiliza a las concentraciones letales de 5 µg/mL. Sin embargo, este comportamiento también se puede deber a la naturaleza aniónica del péptido motivo por el cual tiende a ser repelido de la membrana exterior de la bacteria, quizás al interactuar en compañía del resto de AMPs, los cuales son todos catiónicos, se facilite la exposición de P19850 a los sitios en donde el resto de péptidos están actuando.

El incremento en la capacidad antimicrobiana observada, se puede explicar de diferentes maneras. Se sabe que muchos péptidos catiónicos interactúan con la membrana de las bacterias Gram (-), haciéndola más permeable (Hancock 1984). Es posible que el resto de AMPs de VPMS1, los cuales poseen carga positiva, la cual va de +1 hasta +6, puedan causar un incremento en esta permeabilidad, interactuando con los lipopolisacáridos (LPS), facilitando de esta forma, la introducción del péptido P19850 a su objetivo citoplasmático. De esta forma, la sinergia observada puede ser el resultado de ya sea del incremento del péptido mediante la facilitación proporcionada por los otros AMPs que actúan sobre la membrana citoplasmática y/o la capa LPS, o bien, otra posibilidad puede ser la inhibición secuencial del mismo blanco (Westerhoff *et al.*, 1995; Ulvatne *et al.*, 2001).

La habilidad de algunos péptidos para cruzar la membrana celular, constituye una de las herramientas más prometedoras para distintos usos, quizás el principal, el de utilizarlas como moléculas acarreadoras (Joliot & Prochiantz, 2004). Estas moléculas reciben el nombre de CPPs (Cell Penetrating Peptides, por sus siglas en inglés) y han demostrado una liberación eficiente hacia el interior de la célula de diversas moléculas, como ADN plasmídico, siRNA, proteínas, péptidos y liposomas, tanto *in vitro*, como *in vivo*, facilitando de esta manera la interacción entre la molécula acarreada y su blanco intracelular (Morris *et al.*, 2008).

Aunque los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo esta entrega son diversos y particulares de cada molécula acarreadora, se ha descubierto que los péptidos que contienen arginina en su estructura, juegan un papel fundamental en algunos procesos de internación de los péptidos al interior (Futaki *et al.*, 2007) y/o al exterior de las células de las bacterias (Wu *et al.*, 2000). Los péptidos P34353 y P11273, poseen 3 y 4 residuos de arginina en su estructura primaria (respectivamente), por lo que quizás estas moléculas sean de las principales promotoras sinérgicas que auxilian a la internación del péptido P19850 al interior de la célula de *V. parahaemolyticus* donde efectúa su letal acción.

El hecho de que el péptido P19850 no actúe sobre la membrana implica que este péptido no compromete la integridad de la membrana, reduciendo por lo tanto el riesgo de una toxicidad inespecífica (Schneider *et al.*, 2010).

Por lo general, los métodos tradicionales para romper las células bacterianas emplean un amortiguador a un pH y molaridad que mantenga la integridad de los componentes celulares, acompañado de un detergente fuerte que ayude a desestabilizar la membrana celular y enzimas de digestión que en conjunto terminaran destruyendo la membrana y la pared celular. En estos procesos la utilización de la enzima juega un papel fundamental y efectúa una importante aportación para llevar a cabo la ruptura celular, siendo la más utilizada la lisozima.

Sin embargo, cuando lo que interesa es la proteína, en estos casos no es posible utilizar enzimas proteolíticas y por tanto, los métodos de ruptura tienden a buscar métodos distintos que permitan obtener los componentes proteínicos lo más íntegros posibles. En nuestro caso, para romper las células de *V. parahaemolyticus* se utilizaron una combinación de dos métodos mecánicos y dos métodos químicos, el SDS, el Nonidet NP40, la sonicación ultrasónica, y perlas de vidrio impulsadas por movimiento vortex. El mejor método de ruptura mecánica resultó ser el uso de sonido ultrasónico, mientras que el mejor método de ruptura química, correspondió al empleo del detergente Nonidet NP40. Cuando ambos procesos fueron combinados, el rendimiento de recuperación de proteínas fue del orden de 30 mg de proteína por mililitro de extracto celular. Mientras que la integridad de las proteínas se mantuvo a lo largo del proceso.

Mientras que tanto el extracto celular de *V. parahaemolyticus* como los AMPs de VPMS1 se unieron de manera correcta con la columna CovaLink, resulta interesante el hecho de que los ligadores utilizados no tuvieron efecto sobre el P19850. Hasta donde se ha reportado en la literatura, no existen limitantes para que las proteínas se ligan al Sulfo-SMCC y al EDC (Timkovich, 1977; Niveleau *et al.*, 1992). El EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) es un ligador que reacciona con el grupo carboxilo formando una amina reactiva, la cual reacciona con una amina primaria para formar una amida. El Sulfo-NHS se agrega para estabilizar la reacción y potenciar la ligación covalente (Sondergard *et al.*, 1990). En todo caso, estos ligadores se utilizan para potenciar la capacidad de ligación natural de las proteínas a las aminas primarias expuestas en la columna de poliestireno, aprovechándose de que la amina reactiva proveniente del EDC es fácilmente sustituible por una amina primaria (como la de los péptidos) formando en ese caso un nuevo enlace amida más urea como sub-producto (Staros *et al.*, 1986). En todo caso la reacción de ligación por parte del péptido utilizando estos ligadores si se llevó a cabo, pero de manera mucho menos eficiente que la generada de manera espontánea entre la

amina expuesta por la columna y el grupo carboxilo del péptido, siendo innecesario e incluso contraproducente, el empleo de los ligadores.

Estudios recientes evaluando los niveles de expresión de los genes de *V. parahaemolyticus* cuando es sometido a condiciones de estrés al ser retado con dosis letales y sub-letales de AMPs, han revelado que la célula responde activando mecanismos de defensa, minimizando la expresión de algunos genes y sobre-expresando la de algunos otros. Como mecanismo de defensa se sobre-expresa la producción de la proteína OmpV, la cual está relacionada con la porina y se sugiere que detecta y responde a los AMPs expulsándolos a través del mecanismo conocido como eflujo. De la misma manera, también se sobre expresa la producción de la sub-unidad alfa de la ATP sintasa, lo cual facilita el mecanismo de acción energético del eflujo de los AMPs. También se sobre expresan genes de reparación y se reprimen genes estructurales como las flagelinas y genes de transporte de carbohidratos, sugiriéndose que las proteínas que se sobre-expresan pueden ser atractivas moléculas blanco para desarrollar agentes antimicrobianos más efectivos (Chiu *et al.*, 2010).

El primer paso para penetrar al interior de las células de las bacterias Gram negativas, es cruzar la membrana externa, la cual forma una barrera protectora para proteger la célula. Los mecanismos exactos mediante los cuales se lleva a cabo el transporte de materiales a través de la bi-capa lipídica es aún desconocido, sin embargo, el otro mecanismo incluye la presencia de proteínas embebidas en la membrana celular externa (James *et al.*, 2009). Estas proteínas, llamadas porinas, se encuentran en las bacterias Gram negativas y son las que conforman los llamados canales de proteínas, cumpliendo la función de permitir el paso de moléculas de bajo peso molecular a través de la membrana, algunas son específicas, como la malto-porina, mientras que muchas otras son inespecíficas (Mahendran *et al.*, 2010). La importancia de estos canales en el transporte de los solutos no solo implica el paso de nutrientes al interior de la célula, sino también la eliminación de desechos (Bacalum *et al.*, 2009).

Esta ruta de flujo de moléculas, es también aprovechada para la introducción de muchos antibióticos al interior de las células. La fuerte atracción interactiva entre el antibiótico y el canal facilita la permeabilidad de la droga con gran eficiencia, pero con diferentes tasas de flujo, la droga primero se une fuertemente a la proteína y posteriormente se transloca a través de los distintos canales de porinas, para llegar al blanco sobre el que actúa (Mahendran *et al.*, 2010).

La interacción del P19850 con la porina, puede obedecer a cualquiera de dos hipótesis, la primera, que el péptido bloquee el consumo de nutrientes mediante el bloqueo de la proteína que participa en el canal de transporte, pues dada su importancia, pueden actuar como blancos para la adhesión de compuestos bactericidas a la superficie de la bacteria (Vila *et al.*, 2007), y la segunda, que la interacción del péptido con la porina obedezca a la relación entre ambas para permitir el paso del péptido al interior de la célula, con lo cual alcanzará su molécula blanco donde actúa (Veiga *et al.*, 2011).

Sin embargo, cuando los antibióticos se adhieren a las porinas para posteriormente introducirse a las células, esta interacción aunque fuerte, no es permanente, sino que es variable y depende de la estructura de los compuestos que están interaccionando con las porinas, registrándose tiempos de permanencia de máximo 3 ms para las moléculas más grandes que logran utilizar este canal de flujo, mientras que es de 200  $\mu$ s para el resto de las moléculas (Mahendran *et al.*, 2010). Tomando en cuenta que los periodos de incubación entre los extractos celulares de *V. parahaemolyticus* y el péptido P19850 se llevó a cabo por un periodo de 2 horas, y que además la interacción estuvo mediada en todo momento por una agitación a 150 rpm, es indicativo de que la interacción entre el péptido y la proteína de *V. parahaemolyticus* se llevó a cabo de manera permanente e irreversible de manera espontánea.

Estudios efectuados con el antibiótico lactoferrina, indican que este antibiótico puede actuar como bloqueador para la porina OmpC, por lo que la actividad antimicrobiana

de este antibiótico depende de su unión con las porinas, modificando la estabilidad y/o permeabilidad de la membrana externa (Sallmann *et al.*, 1999), por lo que se sugiere un mecanismo de acción similar para el péptido P19850 en su actividad como molécula antimicrobiana.

La segunda proteína con la que interactúa el péptido P19850, es una proteína del cassette conocido como transporte ABC (ATP Binding Cassette, por sus siglas en inglés), que son proteínas transportadoras que acarrean diversos sustratos a través de la membrana de las células (Grote *et al.*, 2009) y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Locher *et al.*, 2002). Este sistema es esencial para el consumo de nutrientes, incluyendo elementos raros, como el tungsteno y el molibdeno y también participa en la eliminación de desechos celulares o sustancias no deseadas, como los antibióticos. Para mover las moléculas a través de la membrana, la energía necesaria es proporcionada por la hidrólisis del ATP (Hollenstein *et al.*, 2007).

Este sistema de transporte se ha implicado con la resistencia a los antibióticos, así como también, a la persistencia del cáncer y representa por tanto, un blanco importante para el desarrollo de agentes que reviertan la resistencia a las drogas (Reyes & Chang, 2005). Probablemente la interacción del péptido P19850 con las proteínas del sistema ATP, implique un bloqueo del sistema de transporte, mediante lo cual elementos importantes e imprescindibles para la bacteria conduzcan a la muerte celular.

Cuando los péptidos antimicrobianos hipotéticos de VPMS1 actuaron en conjunto con el péptido P19850, el efecto antimicrobiano se vio potenciado, observándose también un efecto evidentemente lítico sobre las células de *V. parahaemolyticus*. Las dos proteínas que se recuperaron de la columna en donde se inmovilizaron el conjunto de péptidos de VPMS1, correspondieron una de ellas a la proteína del sistema de transporte ABC, del que ya se comentó, mientras que la otra, correspondió a una proteína identificada como sub-unidad gamma de la ATP sintasa

(F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>). Las ATP sintasas se localizan en las mitocondrias, los cloroplastos de eucariotas y las membranas de las bacterias, catalizando el paso final en la fosforilación oxidativa. En las bacterias, el sistema F<sub>0</sub> se encuentra constituido por 3 polipéptidos (a, b, c), mientras que la porción F<sub>1</sub> comprende 5 polipéptidos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). La sub-unidad menor  $\gamma$  es necesaria para el acoplamiento del protón en la síntesis del ATP (Uhlin *et al.*, 1997).

Las mutaciones en esta sub-unidad han demostrado que causan una severa disminución en la eficiencia entre el acople del protón y la ATPasa, con la consecuente pérdida de energía (Nakamoto *et al.*, 1993), en particular en los aminoácidos Met, Arg o Lys, es donde sufre mayor efecto el acoplamiento de energía (Shin *et al.*, 1992). Lo cual hace sugerir, que los AMPs de VPMS1 actúan sobre esta sub-unidad comprometiendo la capacidad energética de las células de *V. parahaemolyticus* quien en combinación con el péptido P19850, terminan por causar la muerte de la bacteria.

## 9.0 Conclusiones

La cepa VPMS1 es una cepa de fagos aislada a partir de una almeja, la cual parasita de manera lítica sobre la cepa 17802 de *Vibrio parahaemolyticus* con alta eficiencia, con apariciones de colonias de *V. parahaemolyticus* resistentes, las cuales son controladas de manera efectiva evitando su propagación por periodos de tiempo de varios meses.

El ADN de los fagos se puede obtener mediante eliminación de las bacterias y los residuos celulares por centrifugación, el sobrenadante se trata con nucleasas para eliminar el material genómico proveniente de la bacteria, aprovechando que el material genómico del fago se encuentra protegido de manera natural por su cápside de proteínas. Las nucleasas se eliminan por un tratamiento posterior con proteinasa K, la cual las eliminará de manera efectiva al mismo tiempo que liberará al material genético proveniente del fago, el cual no sufre daños. El ADN del fago obtenido, se purifica por métodos convencionales, en nuestro caso a través de columnas de silica, fijando el ADN en soporte iónico, y lavando con alcohol a distintas concentraciones, para finalmente ser eluído y conservado en agua grado milli-Q a temperaturas de -80°C, donde permanece íntegro hasta por periodos de años.

VPMS1 es un fago lítico que actúa sobre *V. parahaemolyticus*, por su morfología, tamaño y características generales, corresponde a un podovirus. El tamaño del genoma del fago VPMS1 es de 42.3 kb. Su contenido G+C es del 44.67%. La máxima similitud obtenida para el genoma del fago, al ser comparada contra los genomas de fagos que se encuentran en la base de datos del GenBank, fue del 1%, por lo que VPMS1 se ha designado como un nuevo bacteriófago cuyo hospedero es *V. parahaemolyticus*. El genoma de VPMS1 está integrado por 53 genes que cubren el 91% del genoma, mientras que el 9% restante en apariencia no codifica para ningún gen. La mayoría de las coincidencias para las secuencias de las proteínas del fago con las proteínas homólogas en la base de datos, mostraron emparejamientos

con fagos que actúan sobre bacterias Gram negativas. No se encontraron tRNAs en la secuencia. En general, el genoma está organizado en 3 módulos, uno para el empaquetamiento del material genético y proteínas asociadas, uno para las proteínas estructurales y uno más para la replicación del material genético y la regulación. El fago parece estar evolutivamente más relacionado con los fagos de la *Enterobacterias* que con los fagos para *Vibrio*. La presencia de un gen para lisogenia, sugiere que VPMS1 probablemente en algún momento de su evolución era un fago lisogénico.

Dentro del genoma de VPMS1 existen 57 ORFs que codifican para péptidos, al efectuar un análisis *in silico* para determinar su probable actividad antimicrobiana, tomando en cuenta características como carga neta de la molécula, hidrofobicidad, formación de hojas alfa y beta, presencia de residuos en su superficie con probada actividad antimicrobiana, se encontró que 6 de ellos poseen pliegues tipo hojas beta con puentes disulfuro y hojas alfa, mientras que 4 poseen residuos de prolina en su superficie, características que los hacen potenciales moléculas para poseer actividad antimicrobiana.

De las 8 moléculas con potencialidad antimicrobiana hipotética, solo 3 de ellas mostraron efecto sobre el crecimiento de *V. parahaemolyticus*, mientras que solo una de ellas mostró capacidad de inhibir de manera irreversible el crecimiento de esta bacteria.

Los programas para analizar y predecir la actividad antimicrobiana de los péptidos basados únicamente en su estructura primaria pueden llegar a ser una buena herramienta que ahorra recursos económicos y de tiempo en la búsqueda de moléculas con actividad antimicrobiana, sin embargo, a pesar de lo citado en la literatura, donde se menciona una efectividad del 80% en la predicción, en nuestro caso esta fue tan solo del 12.5%, por lo que podríamos concluir según nuestra experiencia, que dicha predicción aún está lejos de que pueda ser considerada una alternativa fiable para descubrir nuevas moléculas con actividad antimicrobiana.

El péptido P19850 es una molécula con actividad antimicrobiana contra *V. parahaemolyticus*, la cual comparte características con las defensinas, pero sin llegar a ser parte de este grupo, pues solo posee un par de residuos de cisteína. La actividad de este péptido se incrementa notoriamente hasta en 8 veces cuando actúa sinérgicamente con los péptidos P3712, P4776, P25854, P34353, P41815, P42126, P10348 y P11273, los cuales facilitan su interacción con las moléculas blanco sobre las que actúa.

Las columnas de poliestireno acopladas con aminas primarias son una buena matriz para inmovilizar a los péptidos antimicrobianos de VPMS1, no siendo necesaria la utilización de ligadores para lograr tal propósito. La unión entre las moléculas de AMPs y las proteínas del extracto celular bacteriano son lo suficientemente fuertes como para soportar lavados con detergente al 0.1% y tolerar una agitación a 300 rpm por periodos de tiempo de hasta 2 horas. Pero no son lo suficientemente fuertes como para evitar su elusión al incrementar el detergente a un 1%, lo cual permite su fácil recuperación de la matriz a la que estaban inmovilizados.

El péptido P19850, de tan solo 12 residuos, posee una buena actividad antimicrobiana en contra de las células de *V. parahaemolyticus* siendo su concentración mínima inhibitoria de  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Los AMPs de VPMS1 muestran un fuerte sinergismo cuando actúan en conjunto sobre los cultivos de *V. parahaemolyticus* cuya actividad antimicrobiana si es igualada en concentraciones individuales, supera hasta en 8 veces la actividad antimicrobiana mostrada por P19850.

El péptido P19850 parece actuar sobre los canales de transporte de nutrientes y moléculas esenciales para *V. parahaemolyticus*, actuando principalmente contra la porina y la proteína del sistema de transporte ABC, la cual también se ve afectada cuando P19850 actúa en conjunto con el resto de AMPs, atacando también a la sub-

unidad pequeña de la ATP sintasa. Comprometiendo con todo ello drásticamente la disponibilidad de energía y bloqueando el sistema de transporte de nutrientes y solutos para *Vibrio* con su eventual muerte celular.

En conclusión, la hipótesis planteada se acepta, el genoma de los fagos contiene genes cuyas proteínas codificantes poseen actividad antimicrobiana en contra de la bacteria sobre la que se replican y por lo tanto, pueden ser considerados como una fuente de moléculas que pueden utilizarse como alternativas a los antibióticos convencionales.

## 10.0 Recomendaciones

El estudio *in silico* para determinar la actividad antimicrobiana de moléculas de aminoácidos pequeñas, como los péptidos, promete ser una herramienta que permitirá ahorrar recursos económicos y de tiempo en la búsqueda de moléculas con actividad antimicrobiana, sin embargo, su baja efectividad en dicha predicción, podría conllevar a la pérdida de moléculas que quizás posean propiedades únicas no exploradas y por tanto que no se encuentran en las bases de datos de las plataformas para estudios *in silico*.

Por otra parte, las conformaciones tridimensionales que adquieren estas moléculas y que son las que determinarán las regiones que se encuentren en contacto con las superficies, pueden no ser iguales en todas las moléculas, por lo que quizás las moléculas con propiedades antimicrobianas hipotéticas no resulten serlo en la realidad. El uso de estas herramientas debe ser tomado con mucho cuidado y como método alternativo de selección, más no único.

Se recomienda realizar estudios profundos sobre las 7 moléculas restantes que no presentaron actividad antimicrobiana *in vivo*, con la finalidad de verificar otras propiedades de las mismas, como son el grado de sinergismo molécula a molécula, o al menos eliminando la presencia del péptido P19850, para verificar si la actividad antimicrobiana observada al trabajar con todas las moléculas al mismo tiempo se debió a un efecto potenciador de la actividad antimicrobiana de P19850, o quizás al resto de las moléculas por sí mismas.

Otra investigación que se podría llevar a cabo, es comprobar si los péptidos antimicrobianos realmente tienen la capacidad de introducirse al interior de la célula de *V. parahaemolyticus*, pues quizás es al interior de la célula donde lleven a cabo su actividad antimicrobiana.

Por último, es también muy importante verificar la especificidad del péptido P19850, con otras especies de *Vibrio* y con otros géneros de bacterias, pues quizás su utilidad no se limite a *V. parahaemolyticus*.

## 11. Literatura citada

Akhter T., Zhao L., Kohda A., Mio K., Kanamaru S. & Arisaka F. 2007. The neck of bacteriophage T4 is a ring-like structure formed by hetero-oligomer of gp13 and gp14. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774: 1036-1043.

Anderson M. L. & Yang H. 2008. DNA looping can enhance lysogenic CI transcription in phage lambda. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (15): 5827-5832.

Arisaka F., Kanamaru S., Leiman P. & Rossmann M.G. 2003 The tail lysozyme complex of bacteriophage T4. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 16–21.

Bacalum M., Weingart H. & Radu M. 2009. Interaction between ceftazimide and bacterial porin OmpF analyzed by fluorescence. *Romanian Journal of Biophysics*, 19(2): 105–116.

Ballweber L. M., Jaynes J. E., Stamm W. E. & Lampe M. F. 2002. *In vitro* microbicidal activities of cecropin Peptides D2A21 and D4E1 and Gel Formulations Containing 0.1 to 2% D2A21 against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (1): 34-41

Becker W. M., Kleinsmith L. J. & Hardin J. 2006. *The World of the cell*. Pearson, San Francisco, CA, 796p.

Bell G.R., Traxler G.S. & Dworschak C. 1988. Development *in vitro* and pathogenicity of an erythromycin resistant strain of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonids. *Disease of Aquatic Organisms*, 4: 19-25.

Berger B., Hoest G. W., Paulson J. R. & Shor P. W. 1999. On the structure of the scaffolding core of bacteriophage T4. *Journal of Computational Biology*, 6(1): 1-12.

Berry J., Summer E. J., Struck D. K. & Young R. 2008. The final step in the phage infection cycle: the Rz and Rz1 lysis proteins link the inner and outer membranes. *Molecular Microbiology*, 70(2): 341-351.

Boulanger N., Bulet P. & Lowenberger C. 2006. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *TRENDS in Parasitology*, 22 (6): 262-268.

Butt A. A., Aldridge K. E. & Sanders C. 2004. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 4: 201-212.

Campbell, A. 2003. The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews*, 4: 471-477.

Carreras C. W. & Santi D. V. 1995. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annual Review Biochemistry*, 64: 721-762.

Carlsson A., Nystrom T., de Cock Hans & Bennich H. 1998. Attacin – an insect immune protein – binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer membrane protein synthesis. *Microbiology*, 144: 2179-2188.

Castle M., Nazarlan A., Yi S. S. & Tempst P. 1999. Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 32 555–32 564.

Castro M. S., Fontes W. 2005. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters*, 12: 11-16.

Cervený K. E., DePaola A., Duckworth D. H. & Gulig P. A. 2002. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron dextran treated mice. *Infection and Immunity*, 70 (11): 6251-6262.

Ceyssens P. J., Lavigne R., Mattheus W, Chibeu A., Hertveldt K., Mast J., Robben J., & Volckaert G. 2006. Genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phages LKD16 and LKA1: Establishment of the KMV subgroup within the T7 supergroup. *Journal of Bacteriology*, 188(19): 6924-6931.

Chalk R., Albuquerque C. M. R., Ham P. J., & Townson H. 1995. Full sequence and characterization of two insect defensins: immune peptides from mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 261: 217-221.

Chia C. L., Ya C. Y., Goodman S. D., Yung H. Y., Shwu-Bin L., Jau T. K., Keh S. T. & Woei H. F. 2010. Endonuclease V mediated deoxynosine excision repair *in vitro*. *DNA Repair*, 9: 1073-1079.

Chiu Y., Kuo T. Y., Lin C. C. & Chen W. J. 2010. Proteomic analysis reveals responsive proteins of *Vibrio parahaemolyticus* on exposure to cationic antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 80-89.

Christopher P. R. H., David K. V., John S. M. & Sankarapandian V. 2010. Antibiotic therapy for *Shigella dysentery*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 8. Art. No.: CD006784. DOI: 10.1002/14651858.CD006784.pub4.

Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F. & Chikindas M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1-20.

Cotter P. D., Hill C. & Ross R. P. 2005. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Current Protein and Peptide Science*, 6: 61-75.

Cudic M. & Otvos L. Jr. 2002. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Current Drug Targets*, 3: 101-106.

De Paola A., Nordstrom J., Bowers J., Wells j. & Cook D. 2003. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (3): 1521-1526.

Diamond G., Zasloff M., Eck H., Brasseur M., Maloy L. & Bevins C. L. 1991 Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: Peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 88: 3952-3956.

Díaz S F & Morales A. H. 2013. Efficacy of phage therapy to prevent mortality during vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture*, doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.03.007

Drake S. L., DePaola A. & Jaykus L. A. 2007. An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6: 120-144.

Dubin A., Mak P., Dubin G., Rzychon M., Stec N., Wladyka B., Maziarka K. & Chmiel D. 2005. New generation of peptide antibiotics. *Acta Biochimica Polonica*, 52 (3): 633-638.

Dykes G. A. & Hastings J. W. 1997. Selection and fitness in bacteriocin producing bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London*, 264: 683-687.

Ebbing D. D. & Gammon S. D. 2005. *General Chemistry*. Houghton Mifflin, NY, 1062p.

Faye T., Holo H., Langsrud T., Nes I. F. & Brede D. A. 2011. The unconventional antimicrobial peptides of the classical propionibacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 89: 549-554.

Filée J., Forterre P., Sen L. T. & Laurent J. 2002. Evolution of DNA polymerase families: Evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins. *Journal of molecular Evolution*, 54: 763-773.

Fischbach M. A. & Walsh C. T. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 325: 1089-1093.

Futaki S., Nakase I., Tadokoro A., Takeuchi T. & Jones A. T. 2007. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochemical Society Transactions*, 35: 784-787.

Galperin M. Y., Moroz O. V., Wilson K. S. & Murzin A. G. 2006. House cleaning, a part of good housekeeping. *Molecular Microbiology*, 59 (1): 5-19.

Ganz T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature*, 3: 710-720.

Gill J.J., Pacan J. C., Carson M. E., Leslie K. E., Griffiths M. W. & Sabour P. M. 2006. Efficacy and Pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50 (9): 2912-2918.

Giuliani A., Pirri G., Fabiole S. & Nicoletto F. 2007. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*, 2(1): 1-33.

Gómes A., Giri B., Saha A., Mishra R., Dasgupta S. C., Debnath A. & Gómes A. 2007. Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development . Indian Journal of Experimental Biology, 45: 579-593.

Grote M., Polyhach Y., Jeschke G., Steinhoff H. J., Schneider E. & Bordignon E. 2009. Transmembrane Signaling in the Maltose ABCTransporter MalFGK2-E. The Journal of Biological Chemistry, 284 (26): 17521-17526.

Groth A. C. & Calos M. P. 2004. Phage integrases: Biology and applications. Journal of Molecular Biology, 335: 667-678.

Gullan P. J., Cranston P. S. 2005. The insects: An outline of entomology. Blackwell, MA, 468p.

Han H., Hin-Chung W., Kan B., Guo Z., Zeng X., Yin S., Liu X., Yang R. & Zhou D. 2008. Genome plasticity of *Vibrio parahaemolyticus*: microevolution of 'pandemic group'. BMC Genomics, 9: 570. doi:10.1186/1471-2164-9-570

Hancock R. E. W. & Devine D. A. 2004. "Antimicrobial" or "host defense" peptides. Cambridge University Press, 408p.

Hancock R. E. W., Patrzykat A. 2002. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. Current Drug Targets infectious Disorders, 2: 79-83.

Harris F., Dennison S. R. & Phoenix D. A. 2009. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. Current Protein & Peptide Science, 10(6): 585-606.

Hempel P. S. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annual Review of Entomology, 50: 529-551.

Hendrix R. W., Hatfull G. F. & Smith M. C. M. 2003. Bacteriophages with tails: chasing their origins and evolution. *Research in Microbiology*, 154: 253-257.

Hiyoshi H., Kodama T., Lida T., & Honda T. 2010. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice. *Infection and Immunity*, 78 (4): 1772-1780.

Hollenstein K., Frei D. C. & Locher K. P. 2007. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*, 448 (8): 213-216.

Hou S., Liu Z., Young A. W., Mark S. L., Kallenbach N. R. & Ren D. 2010. Effects of Trp- and Arg- containing antimicrobial-peptide structure on inhibition of *Escherichia coli* planktonic growth and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (6): 1967-1974.

Hultmark D. 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology*, 15: 12-19.

James C. E., Mahendran K. R., Molitor A., Bolla J., Bessonov A. N., Winterhalter M. & Pages J. M. 2009. How  $\beta$ -lactam Antibiotics Enter Bacteria: A Dialogue with the Porins. *PLoS ONE* 4(5): e5453. doi:10.1371/journal.pone.0005453.

Jenssen H., Hamill P. & Hancock R. E. W. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (3): 491-511.

Joliot A. & Prochiantz A. 2004. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nature Cell Biology*, 6: 189-196.

Karp G. 2002. *Cell and Molecular Biology: concepts and experiments*. Wiley, NY, 785p.

Karunasagar, I. 2008. Food safety and public health risks associated with products of aquaculture. In M.G. Bondad-Reantaso, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe (eds). Understanding and applying risk analysis in aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper.No. 519.Rome, FAO pp. 9–25.

Klotman M. E. & Chang T. L. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nature Reviews*, 6:447-456.

Kragol G., Lovas S., Varadi G., Condie B. A., Hoffmann R. & Otvos Laszlo Jr. 2001. The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, 40: 3016–3026.

Kropinski A. M., Mazzocco A., Waddell T. E., Lingohr E. & Johnson R. P. 2009. *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Humana Press, 371p.

Krupovic M., Cvirkalté K. V. & Bamford D. H. 2008. Identification and functional analysis of the Rz/Rz1 like accessory lysis genes in the membrane containing bacteriophage PRD1. *Molecular Microbiology*, 68 (2): 492-503.

Krylov V. N. 2001. Phage therapy in terms of bacteriophage genetics: hopes, prospects, safety, limitations. *Russian Journal of Genetics*, 37: 715-730.

Kuchta R. D. & Stengel G. 2010. Mechanism and evolution of DNA primases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804: 1180-1189.

Lata S., Sharma B. K. & Raghava G. P. S. 2007. Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics*, 8: 263, doi:10.1186/1471-2105-8-263

Laverty G., Gorman S. P. & Gilmore B. F. 2011. The potential of antimicrobial peptides as biocides. *International journal of Molecular Sciences*, 12: 6566-6569.

Lazarev V. N. & Govorum V. M. 2010. Antimicrobial peptides and their use in medicine. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(9): 803-814.

Lee H. H. & Collins J. J. 2012. Microbial environments confound antibiotic efficacy. *Nature Chemical Biology*, 8: 6-9.

Leiman P. G., Chipman P. R., Kostyuchenko V. A., Mesyanzhinov V. V. & Rossman M. G. 2004. Three dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. *Cell*, 118:419-429.

Leiman P. G., Kanamaru S., Mesyanzhinov V. V., Arisaka F. & Rossman M. G. 2003. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 2356-2370.

Lessl M., Bryans J. S., Richards D. & Asadullah K. 2011. Crowd sourcing in drug discovery. *Nature Reviews*, 10: 241-242.

Levin B. R., Bull J. J. 2004. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature*, 2: 166-173.

Lewis D., Le P., Zurla C., Finzi L. & Adhya S. 2011. Multilevel autoregulation of lambda repressor protein CI by DNA looping *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (36): 14807-14812.

Lewis K., 2012. Recover the lost art of drug discovery. *Nature*, 485: 439-440.

Linderoth N. A., Ziermann R., Haggard-Ljungquist E., Christie G. E. & Calendar R., 1991. Nucleotide sequence of the DNA packaging and capsid synthesis genes of bacteriophage P2. *Nucleic Acids Research*, 19(25): 7207-7214.

Little J. W. & Michalowski C. B., 2010. Stability and instability in the lysogenic state of phage lambda. *Journal of Bacteriology*, 192 (22): 6064-6076.

Locher K. P., Lee A. T. & Rees D. C. 2002. The *E. coli* BtuCD structure: A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, 296: 1091-1098.

Madigan M. T. & Martinko J. M. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson, NJ, 992p.

Mahendran K., Kreir M., Weingart H., Fertig N. & Winterhalter M., 2010. Permeation of Antibiotics through *Escherichia coli* OmpF and OmpC Porins: Screening for Influx on a Single-Molecule Level. *Journal of Biomolecular Screening* 15(3):302-307.

Mahoney J., Gerding M., Jones S. & Whistler C. 2010. Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (22): 7459-7465.

Matsuda S., Kodama T., Okada N., Okayama K., Honda T. & Iida T. 2010. Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin with lipids rafts in essential for cytotoxicity but not hemolytic activity. *Infection and Immunity*, 78 (2): 603-610.

Matsuzaki S. & Rashel M. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 11: 211-219.

McKinley M., O'Loughlin V. D. 2006. *Human anatomy*. Mc Graw Hill, NY, 888p.

Medzhitov I., Janeway C. 2000. Innate Immunity. *The New England Journal of Medicine*, 343 (5): 338-344.

Mendel S., Holbourn J.M., Schouten J.A. & Bugg T.D.H. 2006. Interaction of the transmembrane domain of lysis protein E from bacteriophage uX174 with bacterial translocase MraY and peptidyl-prolyl isomerase SlyD. *Microbiology* 152: 2959–2967.

Merril C. R., Scholl D. & Adhya S. L. 2003. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2: 489-497.

Miller E. S., Heidelberg J. F., Eisen J. A., Nelson W. C., Durkin A. S., Ciecko A., Feldblyum T. V., White O., Paulsen I. T., Nierman W. C., Lee J., Szczepinski B. & Fraser C. M. 2003. Complete genome sequence of the broad-host-range Vibriophage KVP40: Comparative genomics of a T4-related bacteriophage. *Journal of Bacteriology*, 185 (17): 5220-5233.

Ming-Tsan S., Tyamagondlu V. V. & Rolf B. 1998. Large and small scale precipitation of bacteriophage lamda lysate and DNA. *Bio Techniques*, 25: 44-46.

Mlot C. 2009. Antibiotics in nature: Beyond biological warfare. *Science*, 234: 1637-1639.

Morita K., Morimura K., Fusada N., Komatsu M., Ikeda H., Hirano N. & Takahashi H. 2012. Site-specific genome integration in alphaproteobacteria mediated by TG1 integrase. *Applied Microbiology Biotechnology*, 93: 295-304.

Moroz O. V., Murzin A. G., Makarova K. S., Koonin E. V., Wilson K. S. & Galperin M. Y. 2005. Dimeric dUTPases, HisE and MazG belong to a new superfamily of all-alpha NTP pyrophosphohydrolases with potential “House Cleaning” functions. *Journal of Molecular Biology*, 347:243-255.

Morris M. C., Deshayes S., Heitz F. & Divita G. 2008. Cell-penetrating peptides: From molecular mechanisms to therapeutics. *Biology of the Cell*, 100: 201-217.

Nakamoto R. K., Maeda M. & Futai M. 1993. The gamma subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (2): 867-872.

Niveleau A., Sage D., Reynaud C., Bruno C., Legastelois S., Thomas V. & Dante R. 1992. Covalent linking of haptens, proteins and nucleic acids to a modified polystyrene support. *Journal of Immunological Methods*, 159: 177-187.

Noorlis A., Ghazali F., Cheah Y., Zainazor T., Wong W., Tunung R., Pui C., Nishibuchi M., Nakaguchi Y., & Son R. 2011. Antibiotic resistance and biosafety of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from freshwater fish at retail level. *International Food Research Journal*, 18 (4): 1523-1530.

Orzech K. M., Nichter M. 2008. From resilience to resistance: Political ecological lessons from antibiotic and pesticide resistance. *Annual Review of Anthropology*, 37: 267-282.

Otvos L. Jr, Insung O., Rogers M. E., Consolvo P. J., Condie B. A., Lovas S., Bulet P. & Blaszczyk-Thurin M. 2000. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*, 39:14 150–14 159.

Otvos L. Jr. 2005. Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *Journal of Peptide Science*, 11: 697-706.

Papo N. & Shai Y. 2005. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 789-790.

Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R. & Lan C. Q. 2008. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1-13.

Partensky F. Garczarek L. 2011. Arms race in a drop of sea water. *Nature*, 474: 582-583.

Patel S. S., Donmez I., 2006. Mechanism of helicases. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (27): 18265-18268.

Patrzykat A., Douglas S. E. 2005. Antimicrobial peptides: Cooperative approaches to protection. *Protein and Peptide Letters*, 12: 19-25.

Payne David J. 2008. Desperately seeking new antibiotics. *Science*, 321: 1644 – 1645.

Perumal S. K., Raney K. D., Benkovic S. J. 2010. Analysis of the DNA translocation and unwinding activities of T4 phage helicases. *Methods*, 51: 277-288.

Pini A., Giuliani A., Falciani C., Runci Y., Ricci C., Lelli B., Malossi M., Neri P., Rossolini G. M. & Bracci L. 2005. Antimicrobial activity of novel dendrimeric peptides obtained by phage display selection and rational modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (7): 2665-2672.

Price L. B., 2012. 35 years of resistance. *Nature*, 10: 373.

Price L. B., Shand R. F. 2000. Halocin S8: a 36 aminoacid microhalocin from the Haloarchaeal strain S8a. *Journal of Bacteriology*, 182 (17): 4951-4958.

Purves W. K., Sadava D., Orians G. H. & Craig H. H. 2004. *Life: the science of biology*. Sinauer, VA, 1120p.

Rajanbabu V., Chen J. Y. 2011. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides*, 32: 415-420.

Ramírez O. J. M., Serrano P. V., Ochoa A. N., Makarov R. & Martínez D. S. F. 2013. Genome sequence analysis of the *Vibrio parahaemolyticus* lytic bacteriophage VPMS1. Archives of Virology (En prensa).

Reddy K. V. R., Aranha Yedery, C. 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. International Journal of Antimicrobial Agents, 24: 536–547.

Reuben R. C., Geffer M. L. 1973. A DNA-binding protein induced by bacteriophage T7. Proceedings of the National Academy of Sciences, 70 (6): 1846-1850.

Reyes C. L., Chang G. 2005. Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP Vanadate and lipopolysaccharide. Science, 308: 1028-1031.

Rossmann M.G., Mesyanzhinov V.V., Arisaka F. & Leiman P.G. 2004. The bacteriophage T4 DNA injection machine. Current Opinion in Structural Biology, 14: 171–180.

Sallmann F. R, Baveye D. S., Pattus F., Salmon V., Branza N., Spik G. & Legrand D. 1999. Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human lactoferrin. The Journal of Biological Chemistry, 274 (23): 16107-16114.

Sambrook J. & Rusell D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1:2100.

Santos M. A., 1991. An improved method for the small scale preparation of bacteriophage DNA based on phage precipitation by zinc chloride. Nucleic Acid Research, 19(19): 5442.

Schneider T., Kruse T., Wimmer R., Wiedemann I., Sass V., Pag U., Jansen A., Nielsen A. K., Mygind P. H., Raventós D. S., Neve S., Ravn B., Bonvin A. M. J. J., De Maria L., Andersen A. S., Gamelgaard L. K., Sahl H. G. & Kristensen H. H. 2010.

Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor lipid II. *Science*, 328: 1168-1172.

Seo J. K., Crawford J. M., Stone K. L. & Noga E. J. 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338: 1998-2004.

Shen X., Li M., Zeng Y., Hu X., Tan Y., Rao X., Jin X., Li S., Zhu J., Zhang K. & Hu F. 2012. Functional identification of the DNA packaging terminase from *Pseudomonas aeruginosa* phage Pa P3. *Archives of Virology*, 157: 2133-2141.

Shin K., Nakamoto R. K., Maeda M. & Futai M. 1992. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase gamma subunit mutations perturb the coupling between catalysis and transport. *The Journal of Biological Chemistry*. 267 (29): 20835-20839.

Sima P., Trebichavsky I. & Sigler K. 2003. Mammalian antibiotic peptides. *Folia Microbiologica*, 48(2): 123-137.

Singer G. P., Newcomb W. W., Thomsen D. R., Homa F. L. & Brown J. C. 2005. Identification of a region in the herpes simplex virus scaffolding protein required for interaction with portal. *Journal of Virology*, 79 (1): 132-139.

Sondergard A. J., Lauritzen E., Lind K. & Holm A. 1990. Covalently linked peptides for enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunological Methods*, 131: 99-104.

Staros J. V., Wright R. W. & Swingle D. M. 1986. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical Biochemistry*, 156 (1): 220-222.

Sulakvelidze A., Alavidze Z. & Morris J. G. Jr. 2001. Bacteriophage Therapy, minireview. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (3): 649-659.

Summer E. J., Berry J., Tran T. A., Niu L., Struck D. k., & Young R. 2007. Rz/Rz1 lysis gene equivalents in phages of Gram-negative hosts. *Journal of Molecular Biology.*, 373, pp 1098-1112.

Summers W. C. 2001. Bacteriophage therapy. *Annual Review of Microbiology.*, 55: 437-451.

Sun Y., Parker M. H., Weigele P., Casjens S., Prevelige P. E., & Krishna R. 2000. Structure of the Coat Protein-binding Domain of the Scaffolding Protein from a double-stranded DNA Virus. *Journal of Molecular Biology*, 297: 1195-1202.

Suttle Curtis A. 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437: 356-361.

Tanaka T., Kokuryu Y. & Matsunaga T. 2008. Novel method for selection of antimicrobial peptides from a phage display library by use of bacterial magnetic particles. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (24): 7600-7606.

Tang Y. L., Shi Y. H., Zhao W., Hao G. & Le G. W. 2008. Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5(Val-Glu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible larvae of housefly and its effect on surface potential of bacterial membrane. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48: 1187–1194.

Thakur N., Qureshi A. & Kumar M. 2012. AVPpred: collection and prediction of highly effective antiviral peptides. *Nucleic Acids Research*, 40: W199-W204.

Timkovich, R. 1977. Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. *Analytical Biochemistry*, 79:135-43.

Torrent M., Andreu D., Nogués V. M. & Boix E. 2011. Connecting peptide physicochemical and antimicrobial properties by a rational prediction model. *PLoS ONE* 6(2): e16968. doi:10.1371/journal.pone.0016968

- Travis J. 2009. On the origin of the immune system. *Science*, 324: 580-582.
- Uhlen U., Cox G. B. & Guss J. M. 1997. Crystal structure of the epsilon subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure*, 5(9): 1219-1230.
- Ulvatne H., Karoliussen S., Stiberg T., Rekdal O. & Svendsen J. S. 2001. Short antibacterial peptides and erythromycin act synergically against *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 203-208.
- Veiga C. P., Fusté E., Vinuesa T., Viñas M., Villa T. G. 2011. Synergism between Outer Membrane Proteins and Antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (5): 2206-2211.
- Vila J., Martí S. & Sánchez-Céspedes J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 1210-1215.
- Vinson C. R., LaMarco K. L., Johnson P. F., Landschulz W. H. & McKnight S. L. 1988. In situ detection of sequence specific DNA binding activity specified by a recombinant bacteriophage. *Genes and Development*, 2: 801-806.
- Wang G., Li X. & Wang Z. 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*, 37: D933-D937.
- Wang H., Claveau D., Vaillancourt J., Roemer T. & Meredith T., 2011. High frequency transposition for determining antibacterial mode of action. *Nature Chemical Biology*, 7: 720-729.
- Ward L., Bej A. 2006. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (3): 2031-2042.

Weigle P. R., Scanlon E. & King J. 2003. Homotrimeric, beta-stranded viral adhesins and tail proteins. *Journal of Bacteriology*, 185 (14): 4022-4030.

Westerhoff H., Zasloff M., Rosner L., Hendler R., De Waal A., Vaz G. A., Jongsma P. M., Riethorst A. & Juretic D. 1995. Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. *European Journal of Biochemistry*, 228: 257-264.

Westwater C., Kasman L. M., Schofield D. A., Werner P. A., Dolan J. W., Schmidt Michael G. & Norris J. S. 2003. Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47 (4): 1301-1307.

Whitaker W. B., Parent M. A., Boyd A., Richards G. P. & Boyd E. F. 2012. The *Vibrio parahaemolyticus* ToxRS regulator is required for stress tolerance and colonization in a novel orogastric Streptomycin-induced adult Murine model. *Infection and Immunity*, 80: 1834-1845.

Wilcox S. 2004. The new antimicrobials: Cationic peptides. *Bio Teach Journal*, 2: 88-91.

Wright G. 2007. A new target for antibiotic development. *Science*, 315: 1373-1374.

Wu L. F., Ize B., Chanal A., Quentin Y. & Fichant G. 2000. Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: Evolution and mechanism. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(2): 179-189.

Young R., Wang I.N. & Roof W.D. 2000. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiology*, 8: 120–128.

Yount N. Y., Yeaman M. R. 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (19): 7363-7368.

Yuan W., Cao L., Ma Y., Mao P., Wang W., Zhao R., Wu Y., Cao Z. & Li W. 2010. Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. *Peptides*, 31: 22-26.

Zhang L., Benz R. & Hancock R. E. W. 1999. Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides. *Biochemistry*, 38: 8102-8111.

Zhao H., Kamau Y. N., Christensen T. E. & Tang L. 2012. Structural and functional studies of the phage Sf6 terminase small subunit reveal a DNA-spooling device facilitated by structural plasticity. *Journal of Molecular Biology*, 423: 431-426.

## **12. Anexo 1**

### **Electroforesis y soluciones químicas diversas.**

#### **12.1 Electroforesis desnaturalizante**

Las electroforesis efectuadas en este trabajo, tanto la desnaturalizante como la nativa y la semi-desnaturalizante, se llevaron a cabo utilizando el sistema para electroforesis Mini Protean II, de Biorad.

Electroforesis desnaturalizante. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se colocaron 20  $\mu$ L de muestra, se agregaron 10  $\mu$ L de amortiguador de carga desnaturalizante 2x, se mezcló por pipeteo. Se aseguraron los tubos y se colocaron en un termoblock precalentado a temperatura de ebullición del agua, se incubó por 5 minutos. Se enfrió al chorro del agua o en baño de hielo. Se aplicó a un gel de poliacrilamida desnaturalizante. Se corrió la electroforesis por 30 minutos a 80V, una vez que las muestras traspasaron el gel de pre-empaque, se subió el voltaje a 120 V. Se dejó correr hasta que el frente indicador salió del gel. Se tiñó y destiñó según el procedimiento indicado más adelante.

##### 12.11 Gel desnaturalizante.

En un matraz Kitasato de 25 mL se prepararon 5 mL de la mezcla (12%) descrita en la Tabla 1, sin agregar el APS ni el TEMED. Se mezcló por agitación manual. Se conectó el matraz Kitasato a una bomba de vacío, se encendió la bomba y se abrió el vacío a una potencia moderada. Se colocó un tapón de goma sellando el matraz, se agitó suavemente por 10 segundos. Se dejó en este sistema de vacío por 5 minutos, agitando cada minuto. Se cerró el vacío, se retiró el tapón de goma y se desmontó el matraz Kitasato del sistema de vacío. Cuidando de no agitar mucho, se agregó el PSA y el TEMED. Se agitó suavemente y se vació el contenido de la mezcla en un casete para preparar geles, con un volumen de 5 mL hasta llegar a un 80% de su

capacidad. Se agregó 1 mL de agua bi-destilada a la superficie del molde. El exceso de la mezcla se depositó en un tubo Eppendorf. Se dejó polimerizar por 45 minutos. Se verificó la polimerización revisando la mezcla depositada en el tubo Eppendorf. Se retiró el agua de la superficie del gel, se secó el exceso con una servilleta. Se preparó la mezcla para el gel de pre-empaque (PAGE-5%) siguiendo el mismo procedimiento ya descrito para el gel de resolución, pero cuidando de utilizar amortiguador Tris 0.5 M, pH 6.8 en lugar del 0.5M pH 8.8. Una vez finalizada la preparación de la mezcla, se vació su contenido en el molde donde se preparó el gel de corrida, hasta cubrir el 100% del molde. El exceso se colocó en un tubo Eppendorf. Se sumergió un peine (molde para hacer pocillos, de 0.75 cm de grosor) y se dejó reposar por 45 minutos. Se verificó la gelificación de la manera ya descrita. Se retiró el peine y se desarmó el sistema del molde retirando los vidrios.

Tabla 1 Preparación de geles de poliacrilamida a distintas concentraciones

Reactivos	12%	5%
Agua desionizada	2.4 mL	1.6 mL
Amortiguador Tris 1.5 M, pH 8.8	1.25 mL	1.3 mL
SDS 10%	50 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Acrilamida/bis acrilamida 30% (29:1)	1.25 mL	2 mL
APS 10%	35 $\mu$ L	50 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

## 12.12 Electroforesis

El sándwich vidrio-gel-vidrio se montó en la cubeta del sistema para correr electroforesis, se cerró la cubeta, llenándola con amortiguador de corrimiento (Tris-Glicina, ver más abajo) y se verificó la no existencia de fugas. Se colocó el amortiguador exterior en el sistema, se colocó la tapa del mini-protean y se corrió la electroforesis a 80 V durante el pre-empaque y a 120 V durante el gel de resolución.

## 12.13 Amortiguador de carga desnaturizante 2X.

Tris HCl, pH 6.8, 0.125M  
 SDS 4%  
 Mercaptoetanol 5%

Glicerol 20%  
Azul de bromofenol 0.01%

#### 12.14 Amortiguador Tris-Glicina 10x

0.25 M Tris base	3.038 g
2M Glicina	15.01 g
1% SDS	1 g
Agua bi-destilada	50 mL

Se mezclan los ingredientes en el agua bi-destilada hasta su disolución. Se afora a 100 mL. No es necesario ajustar el pH.

## 12.2 Electroforesis nativa.

El protocolo, procedimiento y reactivos fueron prácticamente los mismos que se utilizaron para la electroforesis desnaturizante, con excepción del SDS, el mercaptoetanol y el amortiguador de carga. Los dos primeros fueron omitidos, mientras que el tercero cambio su formulación, como se indica a continuación.

#### 12.21 Amortiguador de carga nativo.

Tris HCl, pH 6.8, 0.125M  
Glicerol 20%  
Azul de bromofenol 0.01%

## 12.3 Fijación, tinción y des-tinción de geles de poliacrilamida.

#### 12.31 Tinción con azul de Coomassie.

El gel se retiró del sistema mini-protean, se retiró el gel de pre-empaque y el gel de resolución se colocó en un recipiente para tinción (plástico con cierre hermético). Se agregó solución para teñir (ver más abajo), cubriendo perfectamente al gel. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se retiró la solución para teñir. Se agregó solución rápida para decolorar (ver más abajo). Se incubó con agitación lenta,

por 15 minutos. Se eliminó la solución para desteñir. Se agregó solución lenta para desteñir. Se dejó a temperatura ambiente durante 18 horas.

#### 12.32 Solución para teñir con azul de Coomassie.

Azul de Coomassie R250 (brillante)

Metanol 45mL

Agua bi-destilada 45mL

Ácido Acético Glacial 10 mL

Papel Whatman #1

Se mezcló el metanol y el agua, se adicionó el azul de Coomassie, se agitó hasta su disolución. Se agregó el ácido acético, se mezcló. Se filtró utilizando el papel Whatman, con la ayuda de un sistema de filtración conectado a vacío.

#### 12.33 Solución rápida para decolorar.

Metanol 50 mL

Agua bi-destilada 40 mL

Ácido acético glacial 10 mL

Se mezclan los ingredientes y se conservan en un frasco con tapón.

12.34 Solución lenta para decolorar (en esta puede estar el gel por tiempo indefinido).

Metanol 5 mL

Agua bi-destilada 85 mL

Ácido acético glacial 10 mL

Se mezclan los ingredientes y se conservan en un frasco con tapón.

### 12.35 Tinción con plata.

Se utilizó el kit para tinción con plata Silver Stain Plus Kit No. Cat. 161-0449 (Biorad, Hercules, CA).

### 12.3 Amortiguador de lisis

En amortiguador Tris 50 mM, pH 8.0, se agregaron los siguientes ingredientes pesados de tal manera que los compuestos quedaron a la molaridad y/o concentración expresada.

EDTA 100 mM

NaCl 100 mM

SDS 1%

### 12.4 Amortiguador TAE 50x

Tris Base	242 g
-----------	-------

0.5M EDTA pH 8.0	100 mL
------------------	--------

Ácido acético glacial	57.2 mL
-----------------------	---------

Se pesaron y/o midieron los ingredientes descritos, disolviendo en 500mL de agua bi-destilada. Se aforaron a 1L, no fue necesario ajustar el pH.

### 12.5 Amortiguador de carga para ácidos nucleicos

Se utilizó uno de catálogo, Gel Loading Amortiguador, No. Cat. G2526-5ML, SIGMA

## 12.6 Amortiguador PBS 0.15M, pH 7.2

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Agua bi-destilada	500 mL

Los ingredientes se disolvieron en el agua bi-destilada. Se aforó a 1L, ajustando el pH con HCl 3M o NaOH 5M.

## 12.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En un tubo de 200 µL-estéril para PCR, se preparó la mezcla indicada en la Tabla 2. Se colocaron las muestras en un termociclador, siguiendo el programa especificado en la Tabla 3.

Tabla 2 Mezcla de reacción para efectuar la reacción en cadena de la polimerasa.

Reactivo	Cantidad (µL)
Agua grado PCR	7.25
Cloruro de magnesio 50 mM	1.5
Amortiguador para PCR 10X sin cloruro de magnesio	1.25
Mezcla de dNTPs 10 mM	0.25
Oligo forward	1
Oligo reversa	1
Taq polimerasa	0.25
Templado (DNA 60 ng/µL)	1

Tabla 3 Programa para efectuar la reacción en cadena en un termociclador

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
95	1 min	1
95	30 seg	30
50.7	40 seg	
72	1 min	
72	7 min	1
4	Permanente	1

### 12.8 Amortiguador MES 0.5 M

Disolver 97.6 g de MES en 800 mL de agua dd (doble destilada)

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 10 N

Aforar a 1 L con agua dd