

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN NANOCIENCIAS Y
NANOTECNOLOGÍA**

**Encapsulación de β -defensina 2 humana y dos mutantes recombinantes en
nanopartículas de sílice mesoporosa y su efecto antimicrobiano contra
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis***

Tesis que presenta:

M. B. GABRIEL MARCELINO PÉREZ

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

EN NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

Director de tesis:

DR. SALVADOR GALLARDO HERNÁNDEZ

Ciudad de México

Noviembre, 2021

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) por brindar el ambiente para desarrollar el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para realizar este trabajo a través de la beca de estudios doctorales y de sus múltiples programas en apoyo a las actividades científicas en México.

Mi eterna gratitud a la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares y el Dr. Salvador Gallardo Hernández por ser un ejemplo para mí como persona y como investigador. Gracias por la confianza y el apoyo.

A mis asesores Dra. María de los Ángeles Hernández Pérez, Dra. Refugio Rodríguez Vázquez, Dr. Iouri Koudriavtsev, por enseñarme a buscar soluciones a los problemas presentados.

A mi asesor no oficial el Dr. Roberto Ruiz Medrano, por su apoyo e interés en mi trabajo de investigación.

A los auxiliares de investigación M. en C. Brenda Yazmín Vargas Hernández, por el entrenamiento en electroforesis en gel de poliacrilamida y agarosa y al M. en C. Leandro Alberto Núñez Muñoz por su asesoría en técnicas de biología molecular y por compartir conmigo en todo momento sus conocimientos.

A mis compañeros y amigos: Yebran, Mario, Micaela, Berenice, Pedro, José Luis, Laura, Sarahi, Luis Alberto, Daniela; gracias por compartir los mejores momentos en el laboratorio y por animarme.

Y a los que hicieron posible este sueño, mis padres, Roberta Pérez Hernández y Gabriel Marcelino Ayala y mis hermanos Erika y Edgar.

Dedico esta tesis

A mis padres,

Roberta y Gabriel

*Gracias por su apoyo y comprensión, por sus cuidados, por la vida, pero sobre todo su
amor.*

A mis hermanos,

Erika y Edgar

A Daniela Roca Velazquez

*Por su constante apoyo, por compartir su vida conmigo, por su amistad y por su
amor*

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
CAPÍTULO I. ESTADO DEL ARTE	12
1.1. <i>Solanum lycopersicum</i> L.	12
1.2. Chancro bacteriano del tomate	13
1.2.1. Infección de <i>S. lycopersicum</i> por <i>Cmm</i>	15
1.2.2. Estrategias para el control de <i>Cmm</i>	16
1.3. Péptidos antimicrobianos	17
1.3.1. Clasificación de los AMPs	20
1.3.2. Mecanismo de acción de los AMPs sobre bacterias.....	20
1.4. Defensinas	23
1.5. Nanotecnología	27
1.5.1. Nanoencapsulación	28
1.6. Nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) como nanoportadores de proteínas y péptidos.....	28
1.6.1. Ingeniería de las MSN para la adsorción y liberación de proteínas.....	31
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN	36
CAPÍTULO III. HIPÓTESIS	37
CAPÍTULO IV. OBJETIVOS	38
4.1. Objetivo general	38
4.2. Objetivos específicos.....	38
CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1. División de la estrategia experimental.....	39
5.2. Plásmidos	40
5.2.1. Obtención de la mutante h β D2-M.....	40

5.3.	Expresión de los AMPs	41
5.4.	Purificación de los AMPs.....	42
5.5.	Síntesis de las MSN.....	43
5.6.	Caracterización de las MSN	44
5.7.	Ensayo de actividad antimicrobiana y determinación del IC ₅₀ de los AMPs.....	45
5.8.	Adsorción y liberación de los AMPs.....	46
5.9.	Actividad antimicrobiana de los complejos MSN/AMPs	47
5.10.	Efecto de la pepsina sobre los complejos MSN/AMPs	48
5.11.	Análisis estadístico.....	49
CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		50
6.1.	Construcciones de hβD2 y hβD2-M	50
6.2.	Expresión y purificación de los AMPs.....	51
6.3.	Ensayos de actividad antimicrobiana contra <i>Cmm</i>	52
6.4.	Caracterización de las MSN	54
6.5.	Adsorción y liberación de los AMPs.....	57
6.6.	Bioactividad de las MSN cargadas con los AMPs contra <i>Cmm</i>	59
6.7.	Efecto de la pepsina sobre los AMPs y los complejos MSN/AMPs.....	60
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES.....		62
CAPÍTULO VIII. PERSPECTIVAS		63
CAPÍTULO IX. REFERENCIAS		64
ANEXOS.....		79
ANEXO 1.	Transformación de células competentes.....	79
PRODUCTIVIDAD ADICIONAL		80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes etapas de desarrollo de <i>S. lycopersicum</i>	13
Figura 2. Fuentes de obtención y clasificación de los AMPs de acuerdo con su estructura.	19
Figura 3. Modelos de acción hipotéticos de la actividad extracelular de los AMPs.	24
Figura 4. Modelos de cintas representativos de la clasificación de las defensinas. A) α -defensina-6 humana, B) h β D2 y C) theta-defensina HTD-2.....	26
Figura 5. Esquema ilustrativo de una NP de sílice mesoporosa. Las leyendas en color negro indican los principales grupos de biomoléculas que pueden administrarse a través de las MSN, en cuanto a las leyendas de color azul resaltan las características intra/extrapartícula más importantes de las MSN.....	31
Figura 6. Estrategia experimental para la subclonación, expresión y purificación de los AMPs, síntesis y caracterización de las MSN y MSN/AMPs vs. <i>Cmm</i>	39
Figura 7. ORFs de los AMPs subclonados en el vector pCri-4a.	40
Figura 8. Análisis molecular de las construcciones. A) gel de agarosa al 1.5% de los productos del ensayo de doble restricción; carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: producto del ensayo de restricción de la construcción pCri-4a-h β D2 y carril 3: producto del ensayo de restricción de la construcción pCri-4a-h β D2-M, B) electroferograma del ORF de la h β D2 y C) electroferograma del ORF de la h β D2-M donde se señalan las mutaciones realizadas.....	50
Figura 9. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes. A) expresión y purificación de la h β D2; carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: fase insoluble, carril 3: fase soluble, carril 4: fracción no unida al primer paso de purificación por Ni ²⁺ -IMAC, carril 5: fracción unida al primer paso de purificación por Ni ²⁺ -IMAC,	

carril 6: fracción después de la escisión por la proteasa TEV, carril 7: fracción unida al segundo paso de purificación por Ni ²⁺ -IMAC y carril 8: fracción no unida al segundo paso de purificación por Ni ²⁺ -IMAC y B) expresión y purificación de la hβD2-M; el plan de carga es el mismo que para hβD2.	53
Figura 10. Evaluación de actividad antimicrobiana de los AMPs contra <i>Cmm</i> mediante el método de difusión en agar.....	54
Figura 11. Caracterización de las MSN. A) micrografía de SEM, B) micrografía de TEM, C) espectros de FT-IR y Raman, D) isothermas de adsorción-desorción de N ₂ y E) distribución de diámetro de poro (modelo BJH).....	56
Figura 12. Mediciones de los AMPs con el <i>software</i> Pymol. A) hβD2, B) hβD2-M y C) TRX-hβD2-M.	59
Figura 13. Caracterización de los complejos MSN/AMPs. A) concentración de AMP liberados, B) liberación acumulativa de los AMPs, C) evaluación de la actividad antimicrobiana por difusión en agar, D) evaluación de la actividad antimicrobiana en medio líquido y E) efecto de la pepsina sobre los AMPs y los complejos MSN/AMPs.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades que afectan a <i>S. lycopersicum</i>	14
Tabla 2. Clasificación de los AMPs.....	21
Tabla 3. Continuación de la clasificación de los AMPs.	22
Tabla 4. Proteínas y péptidos encapsulados en MSN.....	32
Tabla 5. Diferentes tratamientos realizados para la síntesis de las MSN.	44
Tabla 6. Características fisicoquímicas de los AMPs.	52
Tabla 7. IC ₅₀ de los AMPs contra <i>Cmm</i>	54
Tabla 8. Propiedades de las matrices de sílice mesoporosa sintetizadas.....	58

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNp	ADN plasmídico
AMPs	Péptidos antimicrobianos
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DHMA	<i>N,N</i> -Dimetilhexadecilamina
F127	Poli(etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol)-bloque-poli(etilenglicol) diacrilato
hβD2	β -defensina 2 humana
hβD2-M	β -defensina 2 humana mutada
IC₅₀	Concentración inhibidora media máxima
MSN	Nanopartículas de sílice mesoporosa
VC	Volúmenes de columna
ORF	Marco de lectura abierto
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TEOS	Ortosilicato de tetraetilo
TRX-hβD2-M	Tiorredoxina- β -defensina 2 humana mutada

RESUMEN

La enfermedad del chancro bacteriano del tomate es causada por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). A nivel mundial, esta enfermedad causa severas pérdidas económicas a los agricultores si no se trata adecuada y oportunamente, su control en cultivos a cielo abierto e invernadero se basa principalmente en la aplicación de plaguicidas químicos, sin embargo, su uso indiscriminado ha propiciado la resistencia del patógeno. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son oligopéptidos catiónicos anfipáticos con los cuales se ha logrado inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos de humanos y fitopatógenos. A pesar de sus grandes propiedades, los AMPs suelen ser susceptibles a las condiciones medioambientales, por lo que una alternativa que se ha propuesto en los últimos años para evitar estos inconvenientes es su encapsulación a través de matrices orgánicas e inorgánicas.

En el presente trabajo se diseñaron dos construcciones que codifican para la β -defensina 2 humana y dos mutantes. Los AMPs se expresaron en *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3) y se purificaron a través de cromatografía de afinidad. De igual forma, se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) a través del método sol-gel. Los AMPs fueron adsorbidos en las MSN, estos complejos inhibieron el desarrollo de *Cmm* aun cuando fueron sometidos a un tratamiento con la peptidasa pepsina. Este trabajo es el inicio de una línea de investigación nanobiotecnológica en el Cinvestav, enfocada principalmente a mitigar el desarrollo de microorganismos fitopatógenos que afectan a cultivos de interés agrícola.

ABSTRACT

Bacterial tomato canker disease is caused by the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). Worldwide, this disease causes severe economic losses to farmers if not treated properly and timely, its control in open fields and greenhouse crops is based mainly on the application of chemical pesticides, however, its indiscriminate use has led to the resistance of the pathogen. Antimicrobial peptides (AMPs) are amphipathic cationic oligopeptides that have been used to inhibit the growth of pathogenic microorganisms of humans and plant pathogens. Despite their great properties, AMPs are often susceptible to environmental conditions, therefore an alternative that has been proposed in recent years to avoid these drawbacks is their encapsulation through organic and inorganic matrices.

In the present work, two constructs encoding for human β -defensin 2 and two mutants were designed. The AMPs were expressed in *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3) and purified by affinity chromatography. Similarly, the synthesis of mesoporous silica nanoparticles (MSN) was carried out through the sol-gel method. AMPs were adsorbed on MSNs, these complexes inhibited *Cmm* development even when subjected to pepsin peptidase treatment. This work is the beginning of a line of nanobiotechnological research at Cinvestav, focused mainly on mitigating the development of phytopathogenic microorganisms that affect crops of agricultural interest.

CAPÍTULO I. ESTADO DEL ARTE

1.1. *Solanum lycopersicum* L.

Solanum lycopersicum L. (tomate) es un arbusto perenne perteneciente a la familia de las Solanáceas (Conti et al., 2021). El cultivo de esta hortaliza es uno de los más importantes a nivel mundial, tan solo en 2019 se destinaron 5 millones de hectáreas para su cultivo, de las cuales se obtuvieron más de 180 millones de toneladas de frutos cosechados (FAO, 2020).

El género *Solanum* contiene entre 1500 y 2000 especies, de las cuales *S. lycopersicum* es la más conocida. Esta planta es originaria de América del Sur y fue domesticada en Asia central y meridional, sin embargo, su uso como alimento se originó en México hace más de dos mil años. La palabra *lycopersicum* se deriva del griego *lyco*, que significa lobo y *persicum*, que significa melocotón, esto quiere decir, melocotón lobo (Waheed et al., 2020).

De acuerdo con Shamshiri et al., (2018) *S. lycopersicum* presenta cinco etapas de desarrollo, las cuales son germinación y crecimiento temprano con hojas iniciales (25-35 días), período vegetativo (20-25 días), floración (20-30 días), fructificación temprana (20-30 días) y fructificación madura (15-20 días) (**Figura 1**). El tiempo exacto para cada etapa depende de las variedades y factores ambientales como absorción de agua, temperatura del aire, condiciones de luz, condiciones del suelo y nutrientes. Para que una variedad temprana, media y tardía alcancen la madurez comercializable se requieren de 50-65, 70-80, y 85-95 días, respectivamente. Es importante mencionar que los frutos se cosechan solo cuando han alcanzado la etapa verde madura (enredadera) (Shamshiri et al., 2018; Waheed et al., 2020).

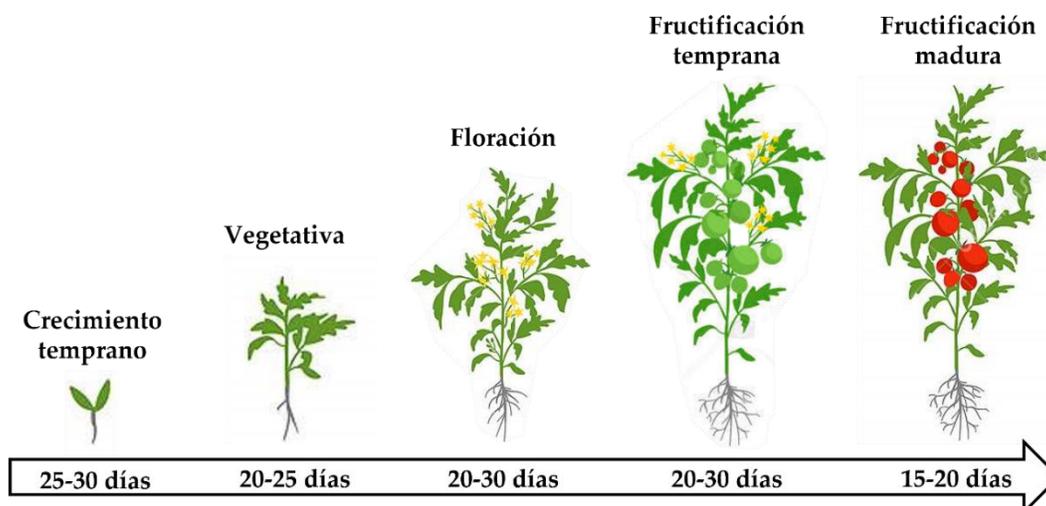


Figura 1. Diferentes etapas de desarrollo de *S. lycopersicum*.

1.2. Chancro bacteriano del tomate

Dependiendo de la etapa de desarrollo y condiciones ambientales el cultivo de *S. lycopersicum* puede verse afectado negativamente por estrés, plagas y enfermedades que no solo causan daños al tallo y al fruto, sino también al sistema de raíces de la planta (**Tabla 1**). Específicamente, *Cmm* es una bacteria Gram-positiva causante de la enfermedad del chancro bacteriano del tomate, la cual puede causar grandes pérdidas económicas a los agricultores si no se trata adecuada y oportunamente (Dey & Raghuwanshi, 2020; Parrotta et al., 2020). A principios del siglo XX, Erwin Smith reporta por primera vez la enfermedad del chancro bacteriano, no obstante, la bacteria fue aislada hasta 1909 dentro de un invernadero de Michigan, EE. UU (Peritore-Galve et al., 2021). Hoy en día *Cmm* se encuentra distribuida en todo el mundo principalmente en áreas donde se produce tomate, esto se debe en gran parte a su propagación por semillas contaminadas y trasplantes asintomáticos; la certificación de estos dos últimos hasta ahora no ha sido una opción viable ya que los métodos de detección basados en técnicas moleculares en algunas ocasiones no pueden diferenciar con facilidad las semillas libres de *Cmm* de las

contaminadas, así como también las cepas de *Clavibacter* no patógenas (Ramachandran et al., 2021).

Tabla 1. Enfermedades que afectan a *S. lycopersicum* (López Marín, 2016).

Microorganismo	Síntomas	Control químico
Hongos		
<i>Phytophthora infestans</i>	Causa la necrosis del follaje, tallos y frutos de la planta en cualquier etapa de su crecimiento.	Aplicación de fungicidas como clorotalonil, azoxistrobina y metalazil + mancozeb, entre otros.
<i>Alternaria</i> sp., <i>A. solani</i> y <i>A. lycopersici</i>	Forma un chancro negro en el tallo cerca del suelo, afecta las hojas, los frutos y los pecíolos.	Aplicación de fungicidas como boscalid + pyraclostrobin, ferban y sulfato de cobre pentahidratado.
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	La planta presenta caída de los pecíolos de las hojas superiores y amarillamiento de las hojas inferiores.	Uso de fungicidas como clorotalonil, oxiclورو de cobre y mancozeb.
Bacterias		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Causa marchitamiento de las hojas en la parte superior de la planta y amarillamiento de las hojas bajas.	Plaguicidas a base de cobre suplementado con antibióticos.
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Provoca manchas redondeadas en las hojas y más alargadas en los pecíolos y tallos.	Plaguicidas a base de cobre suplementado con antibióticos.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> y <i>X. perforans</i>	Causa manchas angulares grasientas de 2 a 3 mm en hojas, tallos y frutos.	Plaguicidas a base de cobre suplementado con antibióticos.
Virus		
Virus del mosaico del tabaco (TMV)	Causa que las hojas se encrespen y deformen reduciendo el follaje de la planta.	Desinfectar las semillas con plaguicidas o realizar un tratamiento térmico de dos a 4 días a 70 °C.
Virus del bronceado del tomate o marchitez manchada del tomate (TSWV)	Provoca enanismo, necrosis, clorosis, atrofiamiento y lesiones locales en las plantas.	Aplicación de insecticidas como cipermetrina y deltametrina.
Virus de la clorosis del tomate (ToCV)	Las hojas bajas e intermedias presentan clorosis muy marcada, que va agravándose conforme la hoja envejece.	Aplicación de insecticidas.

1.2.1. Infección de *S. lycopersicum* por *Cmm*

Cmm puede infectar a *S. lycopersicum* a través de semillas en desarrollo y por medio de la penetración de los tejidos de los frutos. La infección de semillas en desarrollo se lleva a cabo de forma sistémica, aquí el patógeno coloniza y prolifera en los vasos del xilema, esto produce la marchitez unilateral del foliolo, necrosis marginal de las hojas, chancros del tallo y peciolo y generalmente conlleva a la muerte de la planta (Chalupowicz et al., 2017; Gartemann et al., 2003; Nandi et al., 2018).

Por otro lado, la diseminación (salpicadura) de *Cmm* a través de la poda, el enrejado y la lluvia arrastrada por el viento provocan la infección de los frutos; el sello distintivo de este tipo de infección son lesiones en forma de ojo de pájaro, que son centros necróticos rodeados por un halo blanco en la epidermis del fruto. Para que *Cmm* llegue a los vasos de xilema del fruto, esta tiene que movilizarse a través de la epidermis externa, el colénquima y las capas del parénquima; la forma en cómo se propaga a través de los tejidos del fruto aun no es del todo esclarecida. Mediante análisis de microscopia confocal de una cepa que expresa la proteína verde fluorescente Tancos et al., (2013) lograron observar una colonización intracelular (ataca a los tejidos de la planta y crece entre las células), lo anterior sugiere que *Cmm* puede estar utilizando un sistema complejo de enzimas carbohidratos activas (CAZymes) y explotando los procesos del huésped para difundirse hasta el xilema del fruto (Peritore-Galve et al., 2021).

Los frutos suelen ser susceptibles a la infección de *Cmm* dos días después de la anthesis (dpa) y suelen presentar resistencia a los 20 dpa o cuando están por alcanzar la etapa verde madura. La etapa en que el fruto es resistente a *Cmm* varía de acuerdo con el cultivar (cultivos que tienen un fenotipo en particular pero no poseen un genotipo semejante) y la especie de *Solanum*, por lo tanto, las plantas que

se infectan en etapas avanzadas de desarrollo suelen ser asintomáticas o presentar un proceso de marchitamiento lento, por lo regular las plantas sobreviven la infección y llegan a producir frutos comercializables (Chalupowicz et al., 2017; Nandi et al., 2018; Sharabani et al., 2014). La infección de los frutos es una etapa sumamente crítica ya que tanto el producto comercializable, así como las semillas que contienen pueden contaminarse y ser futuros focos de infección (Peritore-Galve et al., 2021). Dependiendo de las condiciones climáticas *Cmm* puede sobrevivir en semillas y residuos de plantas contaminadas por meses e incluso años (Romero et al., 2018; Vega & Romero, 2016).

1.2.2. Estrategias para el control de *Cmm*

Actualmente el control de enfermedades que aquejan a *S. lycopersicum* se basa principalmente en la aplicación de plaguicidas químicos (Nandi et al., 2018; Ombiro et al., 2018). Sin embargo, con el paso del tiempo su uso indiscriminado ha demostrado tener efectos secundarios como por ejemplo altos requerimientos de agua para el riego, la reducción de la calidad del fruto, la erosión del suelo, peligros tanto para la salud humana como ambiental y principalmente ha propiciado el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos (Dey & Raghuwanshi, 2020; Lahiri & Orr, 2018).

Específicamente, el control del chancro bacteriano en campo se limita a regar las plantas sintomáticas con aerosoles plaguicidas a base de cobre (oxicloruro de cobre, carbonato de amonio cúprico, óxido de cobre, etc.) suplementados con antibióticos (estreptomina, ácido oxolínico, kasugamicina, oxitetraciclina, 8-hidroxi-quinolina, bronopol, etc.) (de León et al., 2008; Milijasevic et al., 2009). Para mitigar esta enfermedad en los cultivos a cielo abierto e invernadero, los agricultores rocían los plaguicidas de forma preventiva o después de la aparición de los síntomas, esto reduce considerablemente las poblaciones bacterianas

(Peritore-Galve et al., 2021). A pesar de los grandes avances que se han tenido en la síntesis de compuestos antimicrobianos, actualmente no existen productos químicos para controlar de manera integral esta enfermedad. Aunado a lo anterior, se han propuesto otras alternativas más ecoamigables para el control de *Cmm* entre las que destacan la aplicación de nanomateriales orgánicos e inorgánicos con actividad antimicrobiana (nanopartículas de Ag, Cu, quitosano), el control biológico, la aplicación de bacteriófagos, la introducción de cultivares resistentes (aún no se encuentran disponibles comercialmente) y la aplicación directa de biomoléculas con actividad antimicrobiana (Choi et al., 2014; Cumplido-Nájera et al., 2019; Sánchez-López et al., 2020; Wittmann et al., 2016).

1.3. Péptidos antimicrobianos

Los AMPs son oligopéptidos catiónicos anfipáticos relativamente cortos con longitud, secuencia y estructuras variables que protegen a su anfitrión de un amplio espectro de bacterias, hongos, virus y protozoos; por lo regular están compuestos de 5-100 residuos de L-aminoácidos definidos en estructuras secundarias formadas por α -hélices, hojas β o ambas (Bahar & Ren, 2013; Biswaro et al., 2018; Lei et al., 2019; Seyfi et al., 2020). Dentro de los AMPs se incluyen poli (aminoácidos), pequeños péptidos antibacterianos sintéticos y polipéptidos (Yan et al., 2021). A lo largo de varias décadas, los AMPs se han aislado y purificado a partir de bacterias, hongos, algas, plantas, insectos, anfibios y mamíferos (**Figura 2**). Es importante mencionar que los AMPs presentan promiscuidad proteica, esto quiere decir que no tienen especificidad a una sola molécula (Franco, 2011).

Algunos reportes atribuyen el descubrimiento de los AMPs eucariotas a trabajos realizados en el año de 1896, aquí demostraron que una sustancia de la harina de trigo inhibía el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* (Stec, 2006). Por otro lado, el descubrimiento de los AMPs procariontes fue reportado hasta 1939, cuando

lograron aislar sustancias antimicrobianas a partir de *Bacillus brevis* y demostraron que presentaban actividad contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas (Dubos, 1939b, 1939a). La identificación de la lisozima por Alexander Fleming a finales de la década de 1920 fue considerada como el primer caso donde se aislaba un péptido con actividad antimicrobiana (Fleming, 1920), no obstante, ahora se sabe que la lisozima tiene actividad catalítica específica, por lo cual dejó de ser considerada como un AMP (Barbiroli et al., 2012). Con el descubrimiento de la penicilina y la estreptomicina en los años 1928 y 1943, respectivamente, comenzó la “Edad de Oro de los Antibióticos”; este hecho originó el desinterés por la investigación de las biomoléculas con actividad antimicrobiana como la lisozima y los AMPs los principales componentes de la defensa inmunológica de la mayoría de los seres vivos (Bentley, 2009; Zaffiri et al., 2012). Un año previo al descubrimiento de la estreptomicina, la sustancia que habían detectado en la harina de trigo en 1896 fue aislada del endospermo de *Triticum aestivum* y se descubrió que era un péptido que inhibía el crecimiento de una variedad de bacterias fitopatógenas, entre ellas *P. solanacearum* y *X. campestris* (Fernandez de Caleyá et al., 1972). A mediados de la década de 1970 este péptido fue nombrado purationina un miembro de la familia de las tioninas, estos AMPs se encuentran distribuidos en todo el reino vegetal (Ohtani et al., 1977). El acontecimiento anterior y el surgimiento de las primeras cepas resistentes a múltiples fármacos en la década anterior dieron fin a la “Edad de Oro de los Antibióticos” y con ello surgió nuevamente el interés por las moléculas de defensa del anfitrión (AMPs) (Davies, 2006). Este punto fue considerado como el verdadero origen de la investigación de los AMPs, los primeros estudios demostraron que las proteínas catiónicas de los neutrófilos humanos eran responsables de matar bacterias patógenas (Zeya & Spitznagel, 1966). En las décadas de los 70s y 80s se aislaron un gran número de AMPs y proteínas antimicrobianas a partir de leucocitos de humanos y conejos, entre ellas las que ahora conocemos como

α -defensinas (Selsted et al., 1983, 1985). Años más tarde fueron aisladas e identificadas las primeras β y θ defensinas a partir de granulocitos de bovinos y leucocitos de *Macaca mulatta* (Selsted et al., 1993; Tang et al., 1999). Para la década de 1990 se identificaron los primeros AMPs aniónicos de rumiantes y anfibios, siendo estos últimos una de las fuentes más ricas de AMPs (Brogden et al., 1997, 2003). A partir de esta década comenzó una carrera por aislar, identificar y sintetizar AMPs con mejor especificidad y actividad antimicrobiana contra cepas tanto patógenas de humanos como fitopatógenas. De acuerdo con la base de datos APD3 ahora se conocen más de 3273 AMPs incluidos algunos sintéticos (Wang et al., 2016).

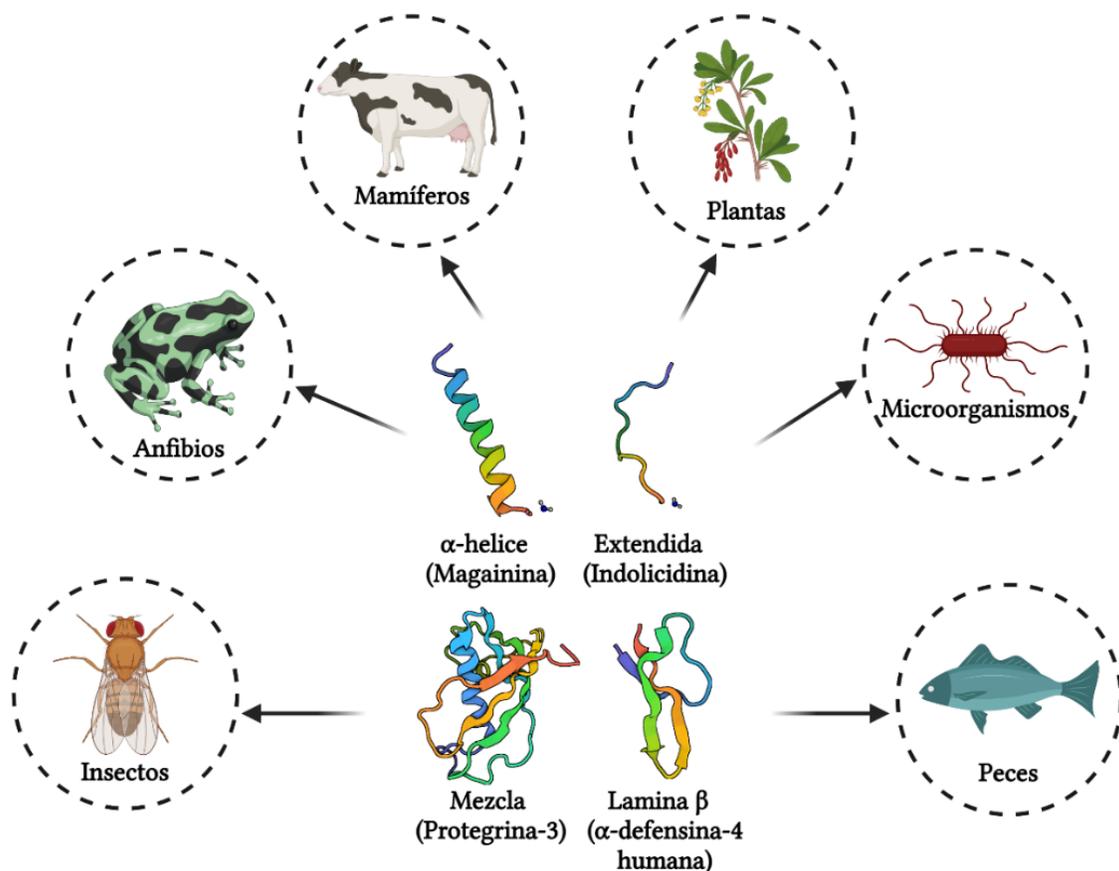


Figura 2. Fuentes de obtención y clasificación de los AMPs de acuerdo con su estructura.

1.3.1. Clasificación de los AMPs

A causa de la gran diversidad de los AMPs naturales, estos tienen múltiples clasificaciones basadas en su fuente, actividad, características estructurales y especies ricas en aminoácidos (**Tabla 2 y 3**) (Huan et al., 2020).

En la actualidad la mayoría de los AMPs se obtienen mediante síntesis química, sin embargo, este método conlleva un alto costo, los rendimientos son bajos y en general los AMPs no se pliegan correctamente por lo cual no tienen actividad, debido a lo anterior, el escalamiento de producción y aplicación de los AMPs como fármacos o bioplaguicidas se ha visto limitado. Una alternativa a esta problemática ha sido utilizar microorganismos como nanofábricas para la obtención de AMPs, entre estos destacan *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* de donde se han obtenido AMPs con altos rendimientos y correctamente plegados a bajo costo. La producción de AMPs en *E. coli* suele presentar dificultades debido a la toxicidad de los AMPs hacia el anfitrión, sin embargo, a través la incorporación de etiquetas fusión que neutralizan la carga positiva de los AMPs como la proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión S-transferasa (GST), tiorredoxina (TRX), etc., en los plásmidos de expresión ha sido posible llevar a cabo la producción de AMPs utilizando este modelo (Wibowo & Zhao, 2019).

1.3.2. Mecanismo de acción de los AMPs sobre bacterias

El mecanismo de acción de la actividad extracelular de los AMPs por la cual inhiben el desarrollo de los microorganismos aún no se ha dilucidado por completo, no obstante, gracias a las observaciones que se han realizado mediante diferentes técnicas complementarias y las propiedades fisicoquímicas de los AMPs se han formulado hipótesis de diferentes modelos del cómo pueden estar actuando.

Tabla 2. Clasificación de los AMPs (Huan et al., 2020).

Subclasificación	Principales características	Ejemplos
Clasificación basada en fuentes		
AMPs derivados de mamíferos	Se han identificado en humanos, ovejas, ganado y otros vertebrados. Los AMPs identificados en humanos se encuentran en la piel, ojos, oídos, boca, tracto respiratorio, pulmones, intestino y la uretra.	Cetelicidinas y defensinas.
AMPs derivados de anfibios	Las ranas son la principal fuente de AMPs de anfibios, sus secreciones cutáneas son ricas en AMPs.	Magainina.
AMPs derivados de insectos	Se sintetizan principalmente en los cuerpos grasos y células sanguíneas.	Cecropinas.
AMPs derivados de microorganismos	Se han aislado de bacterias, hongos y arqueas.	Nisina y gramicidina.
Clasificación basada en especies ricas en aminoácidos		
AMPs ricos en prolina (PrAMP)	Presentan un mecanismo de acción diferente a la mayoría de los AMPs, estos ingresan al citoplasma bacteriano y se dirigen hasta el ribosoma para interferir con la síntesis de proteínas.	Tur1A, PPXR, PRPX y pPR-AMP1.
AMPs ricos en triptófano y arginina	Debido al alto contenido de Trp y Arg, estos AMPs presentan un mayor efecto en la interfaz de la bicapa lipídica y promueven interacciones a larga distancia con las paredes bacterianas.	Indolicidina, tritripticina y Octa 2.
AMPs ricos en histidina	Muestran una buena permeación de las paredes bacterianas promoviendo su ruptura y muerte celular.	HV2 y L4H4.
AMPs ricos en glicina	Contienen del 14-22% de residuos de glicina, estos tienen un papel importante sobre su estructura terciaria.	Péptidos derivados de catelicidinas (GG3).

Tabla 3. Continuación de la clasificación de los AMPs (Huan et al., 2020).

Subclasificación	Principales características	Ejemplos
Clasificación basada en la actividad		
Péptidos antibacterianos	Representan una gran parte de los AMPs y tienen un amplio efecto inhibitorio contra bacterias patógenas de humanos.	AMPs naturales y sintéticos como la nisina, cecropinas y defensinas.
Péptidos antifúngicos (AFP)	Son una subclase de AMPs utilizados para el tratamiento de infecciones provocadas por hongos resistentes a la mayoría de los fármacos existentes.	El péptido AurH1 derivado de la aureina es uno de los AFP más importantes.
Péptidos antivirales (AVP)	Exhiben un efecto letal sobre los virus, inhiben su unión al hospedero (efecto neutralizante), destruyen su cápside e inhiben su replicación.	α y β defensinas, dermaseptinas, gramicidina D y la enfuvitida.
Péptidos antiparasitarios	Han demostrado tener un efecto letal contra parásitos de importancia médica como la malaria.	Catelicidina y temporinas.
Péptidos anticancerígenos (ACP)	Inhiben el desarrollo del cáncer a través del reclutamiento de células inmunes (células dendríticas), inducción de la necrosis o apoptosis de las células cancerosas, inhibición de la angiogénesis para eliminar la nutrición tumoral y prevenir la metástasis y la activación de proteínas funcionales que intervienen en la transcripción y traducción de genes de las células tumorales.	Tritrpticina y sus análogos, puroindolina A y la indolicidina.
Clasificación basada en estructuras		
Péptidos lineales α -helicoidales	Dependiendo sus propiedades fisicoquímicas, los AMPs pueden presentar algunas de las actividades mencionada en la clasificación anterior. Recientemente se han reportado AMPs con estructuras complejas y cíclicos.	Magainina
Péptidos de lámina β		α -defensina-4 humana
Péptidos de extensión lineal		Indolicidina
Péptidos que combinan en su estructura α -hélices y laminas β .		Protegrina-3

Los modelos más aceptados hasta ahora son el de agujero de gusano o poro toroidal, alfombra y barril-duela (**Figura 3**) (Lei et al., 2019). En el modelo de agujero de gusano o poro toroidal, los péptidos se posicionan en dirección paralela con una membrana lipídica de doble capa, en esta orientación la región hidrofílica se coloca hacia la región hidrofílica de los lípidos y la fase acuosa se encuentra fuera de la membrana mientras que la región hidrofóbica se coloca en el centro hidrófobo de la membrana; finalmente los AMPs incrustados verticalmente dentro de la membrana celular se agregan y cambian de conformación provocando la desestabilización de la monocapa de fosfolípidos hasta generar un agujero anular con un diámetro de 1-2 nm aproximadamente (Huan et al., 2020; Lei et al., 2019; Seyfi et al., 2020). En el modelo de alfombra los AMPs se colocan en paralelo a la pared celular, sus extremos hidrofílico e hidrófobo se posiciona hacia el medio acuoso y la bicapa lipídica, respectivamente; la inserción de los AMPs a concentraciones adecuadas modifica la tensión superficial e incrementa la curvatura de la membrana provocando su deformación, esto eventualmente causa la desintegración de las membranas celulares (Lei et al., 2019; Seyfi et al., 2020). Para el último modelo de barril-duela, se plantea la hipótesis que los AMPs se unen a la membrana celular y se internalizan dentro de la bicapa lipídica gracias a su extremo hidrófobo, dentro los AMPs se agregan entre sí y forman canales iónicos provocando que el contenido citoplasmático salga y las bacterias mueran (Huan et al., 2020; Lei et al., 2019).

1.4. Defensinas

Las defensinas son una de las familias más grandes de AMPs producidos por vertebrados, invertebrados, hongos y plantas. Se caracterizan por tener un motivo altamente conservado de 6-cisteína estabilizado mediante puentes disulfuro. De acuerdo con la alienación de sus puentes disulfuro las defensinas se clasifican en α , β y θ -defensinas (**Figura 4A-C**) (Semple & Dorin, 2012).

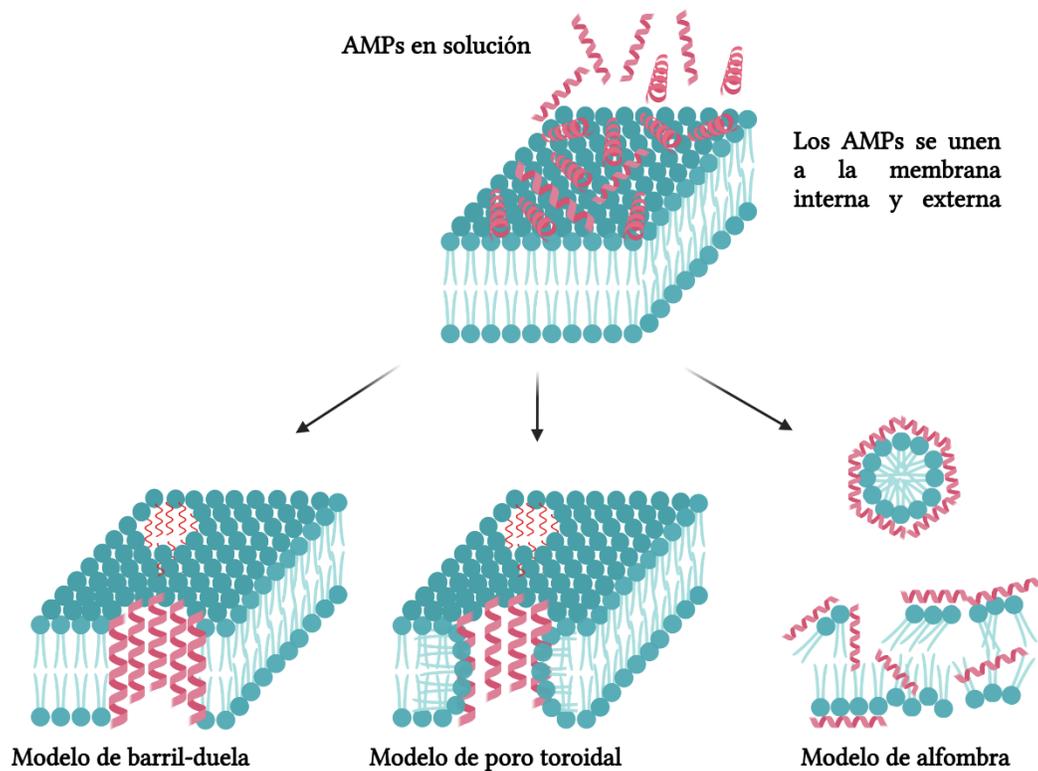


Figura 3. Modelos de acción hipotéticos de la actividad extracelular de los AMPs.

Las α -defensinas están codificadas por cinco genes, en el cromosoma 8p23.1 se encuentran los genes de la h α D1 y h α D3 (Schutte et al., 2002). Los genes de la α -defensina entérica humana y la α -defensina de neutrófilos humanos (HNP) constan de dos y tres exones (parte de la secuencia de genes que contienen la información para producir proteínas), respectivamente, el segundo y tercer exón de la HNP son homólogos al segundo exón de las defensinas entéricas (Swain et al., 2018). Por otro lado, los genes que codifican la mayoría β -defensinas humanas se encuentran ubicados en el cromosoma 8p23-p22 y algunos otros se han identificado en los cromosomas 20p13 y 6p12; hasta hoy, se han identificado 28 genes que codifican β -defensinas humanas y 43 genes para β -defensinas de ratón (Schutte et al., 2002). Los genes de las β -defensinas están compuestos por dos exones, el primero codifica una señal rica en leucina y el dominio líder de la preproteína, mientras que

el segundo exón codifica el péptido maduro con el dominio de seis cisteínas (Meade et al., 2014). Por último, las θ -defensinas se producen a partir de las α -defensinas por medio de mutaciones aleatorias en el péptido maduro (Swain et al., 2018).

El peso de las α -defensinas oscila entre 3.5-4 kDa, en su estructura presenta tres pares de enlaces de cisteína intramoleculares (Cys I-VI, Cys II-IV y Cys II-V). Las β -defensinas son péptidos un poco más grandes con un peso de 4-6 kDa y al igual que las α -defensinas presentan tres enlaces entre cisteínas con posiciones diferentes (Cys I-V, Cys II-IV y Cys III-VI). A pesar de su diminuto tamaño, estos AMPs tienen una estructura terciaria confusa con un núcleo de tres componentes de una lámina β antiparalela (Oppenheim et al., 2003). Por otro lado, las θ -defensinas presentan una estructura cíclica debido a la formación de un enlace peptídico entre sus extremos amino y carboxilo terminal, el cual se genera por la unión de dos α -defensinas truncas, de igual forma se estabilizan por tres puentes disulfuro (Cys I-VI, Cys II-V y Cys III-V) (Wang, 2014).

Las defensinas se encuentran distribuidas en gran parte de los tejidos, especialmente en células epiteliales y mesenquimales de humanos adultos. Además de su expresión constitutiva, también se puede inducir su expresión por señales microbianas, virales, citocinas proinflamatorias y desarrollo embriológico (Kalenik et al., 2018; Swain et al., 2018). Específicamente, la h β D2 está compuesta por 41 aminoácidos y al igual que las otras β -defensinas tiene un motivo de 6-cisteína estabilizado por tres puentes disulfuro conservados (**Figura 4B**) (Hoover et al., 2000). Esta fue identificada por primera vez a partir de lesiones provocadas por psoriasis (enfermedad inflamatoria crónica de la piel que se caracteriza por la aparición de lesiones rojizas escamosas) y se ha determinado que se expresa en los epitelios de la mayoría de los órganos, incluso en el epitelio superficial del pulmón y las células serosas de las glándulas submucosas (Bals et al., 1998; Harder et al., 1997). La h β D2

ha demostrado tener una excelente actividad antimicrobiana contra cepas patógenas de humanos como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, entre algunas otras (Järvå et al., 2018; Routsias et al., 2010; Schröder & Harder, 1999).

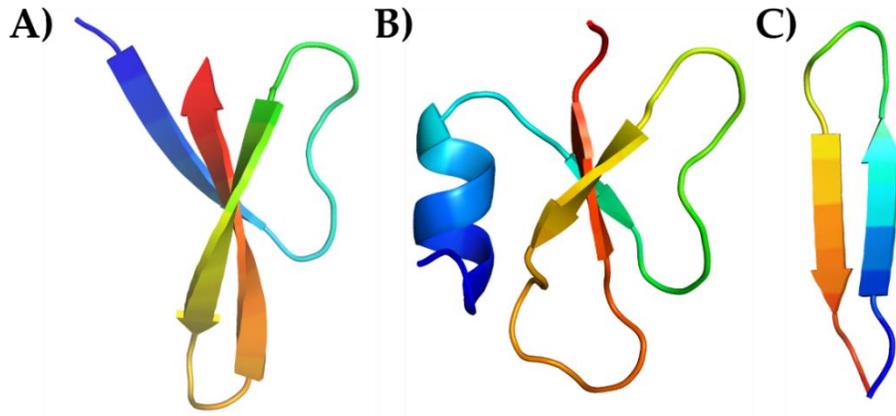


Figura 4. Modelos de cintas representativos de la clasificación de las defensinas. A) α -defensina-6 humana, B) h β D2 y C) theta-defensina HTD-2.

La mayoría de las investigaciones se han enfocado en evaluar la actividad antimicrobiana de los AMPs de origen humano contra cepas patógenas multidrogorresistentes que afectan a nuestra especie, sin embargo, su actividad no se ha explotado para inhibir el desarrollo de microorganismos fitopatógenos que afectan a cultivos de interés agrícola como el de *S. lycopersicum*. A pesar de sus grandes propiedades, los AMPs exhiben diferentes inconvenientes como susceptibilidad a las proteasas, su actividad se ve reducida a concentraciones altas de sal, cambios de pH y temperatura y a concentraciones superiores a los 10 $\mu\text{g/mL}$ suelen producir efectos proinflamatorios (Gordon et al., 2005). Una alternativa que se ha propuesto en los últimos años para evitar los efectos antes mencionados es la encapsulación de los AMPs a través de matrices orgánicas e inorgánicas.

1.5. Nanotecnología

La naturaleza creó los principales componentes de la vida como los ácidos nucleicos, proteínas, azúcares, lípidos y hormonas a escala nanométrica; el hombre inspirado en la naturaleza ha diseñado y sintetizado materiales a la misma escala con el propósito de mejorar su calidad de vida en el aspecto del bienestar material (Weiss et al., 2006). Rychard Feynman propuso por primera vez el concepto de nanoestructuras en 1959, posteriormente, en 1974, Nario Taguchi acuñó el término nanotecnología y lo describió como la manipulación de partículas submicrométricas. En la actualidad, el prefijo “nano” en la palabra nanotecnología se refiere a una milmillonésima (1×10^{-9}). En este contexto, la nanotecnología se define como el diseño, síntesis, caracterización y manipulación de la materia a escala nanométrica (1-100 nm) (Bhushan, 2017). La nanotecnología se basa en reconocer que las partículas con tamaños inferiores a 100 nm presentan nuevas propiedades y comportamientos en comparación con sus homólogos en estado masivo. Al reducir el tamaño de partícula incrementa la relación superficie-volumen, esto provoca que los nanomateriales manifiesten una química y física distintas, lo cual se ve reflejado en sus propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas, antimicrobianas, etc. (Loos, 2015). En los últimos años la nanotecnología se ha convertido en uno de los campos más importantes y excitantes de la investigación científica, así como de muchas industrias incluyendo la agricultura.

Las aplicaciones de la nanotecnología en la industria de la agricultura son nanofertilizantes para estimular el crecimiento de los cultivos, nanobioplaguicidas para combatir plagas y enfermedades, nanobiosensores para la detección de plagas, enfermedades y diferentes tipos de estrés que puedan afectar a los cultivos, nano-remediación de suelos contaminados y la nanoencapsulación o nanoportación

para la entrega controlada de fertilizantes, herbicidas y plaguicidas (Usman et al., 2020).

1.5.1. Nanoencapsulación

La encapsulación es un proceso que implica el recubrimiento de un compuesto activo (material del núcleo) con un material encapsulante (material de la pared) (Kaur & Kaur, 2021). Por otro lado, las nanopartículas (NPs) son entidades estructurales con un diámetro que oscila de 1-100 nm (Bhushan, 2017). A través de las diferentes técnicas de encapsulación se pueden obtener NPs en forma de nanocápsulas y nanoesferas; las nanocápsulas son sistemas vesiculares donde el compuesto bioactivo está confinado a una cavidad rodeada por una membrana de polímero único, mientras que las nanoesferas son sistemas de matriz donde el compuesto de interés se encuentra disperso uniformemente (Ezhilarasi et al., 2013). En este contexto, la nanoencapsulación se define como una tecnología con la cual se tiene la posibilidad de incorporar compuestos bioactivos (fármacos, proteínas, péptidos, nutraceuticos, antioxidantes, etc.) en matrices o sistemas vesiculares a escala nanométrica para protegerlos de condiciones adversas y ya en su aplicación final el compuesto de interés sea liberado de forma controlada en sitios específicos (Ezhilarasi et al., 2013; Kaur & Kaur, 2021). Las matrices y sistemas vesiculares se pueden construir a partir de proteínas, polisacáridos, polímeros sintéticos y materiales inorgánicos (Jafari, 2017).

1.6. Nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) como nanoportadores de proteínas y péptidos

Las biomacromoléculas (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y glicanos) juegan un papel crucial en los seres vivos siendo responsables del biorreconocimiento, transducción de señales y rutas de replicación.

Desgraciadamente, la mayoría de estas biomacromoléculas son sumamente lábiles *in vivo*; para poder utilizarlas se requiere modificarlas químicamente o diseñar vehículos que aseguren su conservación durante un largo periodo de tiempo (Castillo et al., 2020). Actualmente, los principales sistemas para la entrega de biomoléculas se basan en materiales orgánicos como liposomas y virus, formulados a partir de virus inactivos, lípidos y polímeros sintéticos. Este tipo de materiales solo son adecuados para la entrega de ácidos nucleicos. Además, a causa de su inestabilidad intrínseca, difícil manipulación y baja capacidad de carga, se ven limitadas sus aplicaciones para llevar a cabo el suministro de biomoléculas de gran tamaño y complejidad como los péptidos y las proteínas (Braun et al., 2016; Tu et al., 2016; Xu et al., 2019)

Como se mencionó anteriormente, las proteínas y los péptidos participan en una gran variedad de procesos vitales en los seres vivos. La actividad de estas biomoléculas ha sido aprovechada por el sector industrial desde finales del siglo XIX, con el propósito de mejorar la eficiencia y rentabilidad de los procesos existentes. Las principales industrias que involucran el uso de proteínas y péptidos son la del papel, textiles, detergentes, bebidas, farmacéutica y de alimentos (Huan et al., 2020; Rabert et al., 2013). Para que las proteínas y péptidos puedan ser utilizadas como fármacos, inmunoestimuladores, factores de crecimiento, proapoptóticos, agentes antimicrobianos, suplementos alimenticios, catalizadores, etc. (**Figura 5**), deben superarse varias limitantes entre las cuales destacan su degradación por proteasas, desnaturalización por compuestos químicos e inactivación por cambios de pH y temperatura; por lo cual su suministro de manera controlada en sitios específicos sigue siendo todo un desafío (Tu et al., 2016; Xu et al., 2019).

El rápido desarrollo de nanomateriales inorgánicos como las MSN, puntos cuánticos, nanomateriales a base de carbono y NPs magnéticas ha traído consigo la generación de nuevos sistemas para la administración de proteínas y péptidos. Esto solo ha sido posible gracias al tamaño y carga de las NPs, dichas propiedades les permiten establecer interacciones muy cercanas con su objetivo al igual que realizar interacciones no convencionales entre partículas y cargas (compuestos bioactivos) (Castillo et al., 2020). A través de los nuevos nanoportadores las proteínas y péptidos pueden superar deficiencias como baja solubilidad, escasa estabilidad, dificultad para atravesar membranas celulares, falta de especificidad y toxicidad.

Recientemente la FDA clasificó a la sílice amorfa como un material GRAS (generalmente reconocido como seguro) y dio su aprobación para utilizar MSN en algunos ensayos clínicos en humanos (Benezra et al., 2011; Küçüktürkmen & Rosenholm, 2021). Las MSN (poros con tamaños de 2-50 nm) han atraído mucha atención en el campo de la administración de proteínas y AMPs debido a su biocompatibilidad, alta estabilidad, distribución de tamaño de poro uniforme, estructura rígida, alta área superficial, morfología fácilmente controlable, alta capacidad de carga, facilidad de modificación de su superficie interna y externa, producción rentable, alto volumen de poro, eficiente transferencia de la carga y tamaño de poro sintonizable, (**Figura 5**) (Dai et al., 2011; Gu et al., 2013; Luo et al., 2015; Luo et al., 2017). Con base a la combinación de estas propiedades, las MSN tienen un gran potencial como una plataforma no invasiva para el suministro de las biomoléculas de interés, especialmente para terapias enzimáticas, complejos antimicrobianos, vacunas y formación de imágenes 3D (Cai et al., 2011; Mody et al., 2013; Shuvaev & Muzykantov, 2014). En la **Tabla 4** se pueden observar algunos ejemplos de proteínas y péptidos que han sido encapsulados dentro de MSN.

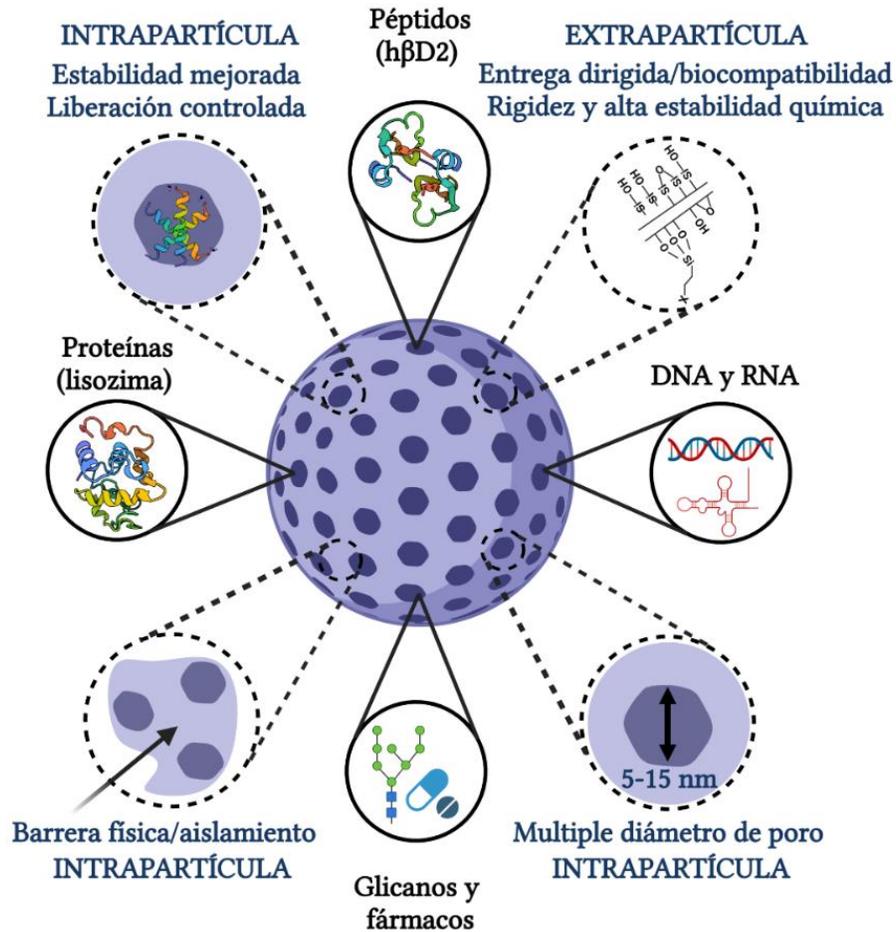


Figura 5. Esquema ilustrativo de una NP de sílice mesoporosa. Las leyendas en color negro indican los principales grupos de biomoléculas que pueden administrarse a través de las MSN, en cuanto a las leyendas de color azul resaltan las características intra/extrapartícula más importantes de las MSN.

1.6.1. Ingeniería de las MSN para la adsorción y liberación de proteínas

Se han diseñado y desarrollado numerosos protocolos para la síntesis de MSN con el objetivo de controlar el tamaño y morfología de partícula, diámetro de poro y área de superficie; la mayoría de estos protocolos involucran el proceso sol-gel (Wu & Lin, 2013). Este proceso es una técnica química húmeda que envuelve la transición de monómeros en una solución coloidal (sol) hasta una fase sólida (gel) mediante la evaporación de disolventes, deshidratación y reticulación química entre las partículas sólidas o precursores disueltos (Palmero, 2021). La síntesis de MSN

por este proceso consiste básicamente en el autoensamblaje de micelas de ceriltrimetilamonio (CTAB) o bromuro de trimetiloctilamonio (OTAB) y oligómeros de silicato cargados negativamente a través de interacciones electrostáticas. La agregación de los oligómeros de silicato en las micelas del surfactante finaliza cuando la carga eléctrica (negativa) neta de la superficie es lo suficientemente alta como para evitar un mayor crecimiento, resultando en la formación de MSN con tamaño y morfologías específicas (Huang et al., 2017). El diámetro de partícula, el tamaño, estructura y volumen de los poros, la funcionalización de la superficie, así como el área de superficie, son las principales características de las MSN que juegan un papel crucial en la adsorción, protección y liberación de las proteínas (Xu et al., 2019), por lo cual se profundizaran sus efectos a continuación.

Tabla 4. Proteínas y péptidos encapsulados en MSN.

	Tamaño de poro (nm)	Actividad	Referencia
Proteínas			
Proteína morfogenética ósea humana recombinante-2	10-30	Regeneración ósea	(Dai et al., 2011)
Citocromo C	4.6	Proteína modelo	(Gu et al., 2013)
Baylase RP (peroxidasa)	10.9-12.3	Catálisis	(Sahare et al., 2016)
α -lactoalbúmina, ovoalbúmina, albúmina de suero bovino, catalasa, hemoglobina, lisozima y citocromo c	5	Proteínas modelo	(Tu et al., 2016)
Dipeptidil peptidasa-4	3.9	Hipoglucémico	(Huang et al., 2017)
Proteína verde fluorescente y proteína roja fluorescente	2.6-4.7	Imagenología	(Shi et al., 2019)
Péptidos			
Péptido formador de hueso LL-37	4.95-5.56	Regeneración ósea	(Luo et al., 2015)
AMP KR-12	3.1-3.5	Antimicrobiano	(Braun et al., 2016)
Bactofencina A	1.5-3.5	Antimicrobiano	(Diosa et al., 2019)
Nisina A	6-6.8	Antimicrobiano	(Durack et al., 2019)
AMP NZX	2.8	Antimicrobiano	(Flynn et al., 2019)
	3	Antimicrobiano	(Tenland et al., 2019)

- 1) *Tamaño de partícula ajustable.* El tamaño de partícula es uno de los parámetros más importantes para lograr una óptima adsorción y liberación de proteínas y péptidos. Por ejemplo, para fines médicos se requieren partículas con tamaños de 50-300 nm, esto facilita el transporte del compuesto de interés al citosol de las células a través de una vía endocítica y su subsiguiente procesamiento endosómico (Martens et al., 2014; Tu et al., 2016). Sin embargo, dependiendo de la aplicación final del nanosistema, dichos valores pueden incrementarse o reducirse. En los casos donde se requiere una mayor movilidad, las partículas de menor tamaño son idóneas, mientras que los nanosistemas con fines de almacenamiento de biomoléculas, el diámetro de las partículas debe aumentarse considerablemente (Castillo et al., 2020).
- 2) *Tamaño de poro.* Generalmente las proteínas se adsorben en la superficie externa y no en el interior de los poros de las MSN, debido principalmente al pequeño diámetro de los poros (<3 nm) (Katiyar et al., 2005). Por lo cual, es necesario que el diámetro de los poros de las MSN sea superior a las dimensiones de las proteínas. Regularmente, las MSN con diámetro de poro grande (>10 nm) tienden a adsorber mayores concentraciones de fármacos y presentar tasas de liberación más rápidas en comparación con las MSN con diámetro de poro pequeños, lo cual puede atribuirse a un efecto de impedimento estérico (Xu et al., 2019). Para que las biomacromoléculas puedan adsorberse fácilmente dentro las MSN, se han desarrollado dos rutas para incrementar su diámetro de poro, la primera de ellas consiste en utilizar tensoactivos con cadenas de carbono más largas como plantillas, en cambio, en la segunda se usan agentes de expansión para incrementar el tamaño de las plantillas del tensoactivo (Knežević & Durand, 2015). En el presente trabajo optamos por la segunda ruta.

- 3) *Volumen de poro y superficie.* Para que las MSN puedan encapsular biomacromoléculas con alta eficiencia y mejorar su solubilidad, su volumen de poro y área superficial deben ser superiores a $1 \text{ cm}^3/\text{g}$ y $700 \text{ m}^2/\text{g}$, respectivamente (Zhou et al., 2018). Por lo regular, las MSN con alto volumen de poro y una gran área de superficie pueden adsorber una alta concentración de proteínas, siempre cuando, el tamaño de los poros sea superior a las dimensiones de las proteínas (Xu et al., 2019).
- 4) *Estructura de los poros.* Las MSN presentan una estructura porosa ordenada de largo alcance sin interconexiones entre canales porosos individuales, esto permite un excelente control al realizar cinéticas de carga y liberación de moléculas sencillas como los fármacos (Zhou et al., 2018). Sin embargo, la variabilidad de la estructura de los poros (geometría de los poros) puede afectar la carga y liberación de biomacromoléculas. Algunos estudios han demostrado que las MSN con tamaños de poro grande ($>40 \text{ nm}$) en forma de cilindro, son idóneas para encapsular y administrar biomacromoléculas de gran tamaño como la proteína β -galactosidasa (464 kDa) y el anticuerpo inmunoglobulina G (150 kDa) (Meka et al., 2016; Xu et al., 2015).
- 5) *Funcionalización de superficies.* La adsorción de biomacromoléculas en la superficie de los canales de los poros, se realiza generalmente a través de interacciones electrostáticas (Pang et al., 2012). Mediante la modificación química de la superficie de las MSN con grupos funcionales adecuados se pueden favorecer interacciones específicas con proteínas; esto solo ha sido posible gracias a la alta densidad de grupos silanol presentes en las superficies de las MSN y la gran cantidad de silanos orgánicos disponibles (Bouchoucha et al., 2014; Braun et al., 2016). Si se funcionaliza adecuadamente la superficie, es posible realizar una fuerte interacción de largo alcance entre las proteínas y los canales de los poros a través del incremento de las fuerzas

electrostáticas (Li & Wang, 2013). Como resultado de la funcionalización se puede aumentar la cantidad de las biomacromoléculas cargadas en las MSN y disminuir sus velocidades de liberación (Xu et al., 2015, 2019).

A pesar de contar con bastante información acerca de la síntesis de MSN, aún sigue siendo todo un reto obtener partículas con tamaños inferiores a 200 nm, área de superficie alta, estructura de poro específica, volumen de poro alto y un diámetro de poro superior a 5 nm, características esenciales para llevar a cabo la encapsulación en altas concentraciones de biomacromoléculas y disminuir su tasa de liberación en ensayos *in vivo*.

CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN

El control del chancro bacteriano del tomate se basa en el uso de plaguicidas químicos, sin embargo, su uso indiscriminado ha propiciado la resistencia del actinomiceto, por lo que surge la necesidad de buscar alternativas nanotecnológicas para su control. Biomoléculas como los AMPs han demostrado tener propiedades antimicrobianas, no obstante, son inestables termodinámicamente a las condiciones medioambientales. Por otro lado, a través de la nanoencapsulación se ha logrado mejorar la estabilidad de compuestos biológicamente activos; en este contexto, la adsorción de la h β D2 y dos mutantes recombinantes en nanopartículas de sílice mesoporosa puede ser una alternativa para evitar su inestabilidad y de esta forma controlar el desarrollo de *Cmm*.

CAPÍTULO III. HIPÓTESIS

Los AMPs h β D2, TRX-h β D2-M y h β D2-M serán más estables termodinámicamente a las condiciones medioambientales dentro de una matriz de sílice mesoporosa y al ser liberados tendrá la capacidad de inhibir el desarrollo de la bacteria fitopatógena *Cmm*.

CAPÍTULO IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de nanopartículas de sílice mesoporosa cargadas con h β D2 y dos mutantes recombinantes en controlar el desarrollo de *Cmm* mediante pruebas *in vitro*.

4.2 Objetivos específicos

- Expresar y purificar h β D2 y dos mutantes empleando *Escherichia coli* Rosetta (DE3) como sistema de expresión.
- Sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente nanopartículas de sílice mesoporosa, para así evaluar su capacidad de adsorción y liberación de AMPs.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los AMPs y los complejos AMPs/MSN contra *Cmm* mediante pruebas en medio sólido y líquido.
- Evaluar la función de las MSN como agentes protectores para los AMPs contra la actividad de la pepsina porcina.

CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. División de la estrategia experimental

1. Subclonación del ORF de la h β D2 en el vector de expresión pCri-4a.
 - a) Obtención de la mutante h β D2-M mediante la sustitución de dos codones con oligonucleótidos específicos tomando como molde el gen de la h β D2.
2. Expresión y purificación de los AMPs.
3. Síntesis y caracterización de las MSN.
 - b) Adsorción y liberación de los AMPs.
4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los AMPs y los complejos MSN/AMPs.
 - c) Evaluación de las MSN como agentes protectores para los AMPs.

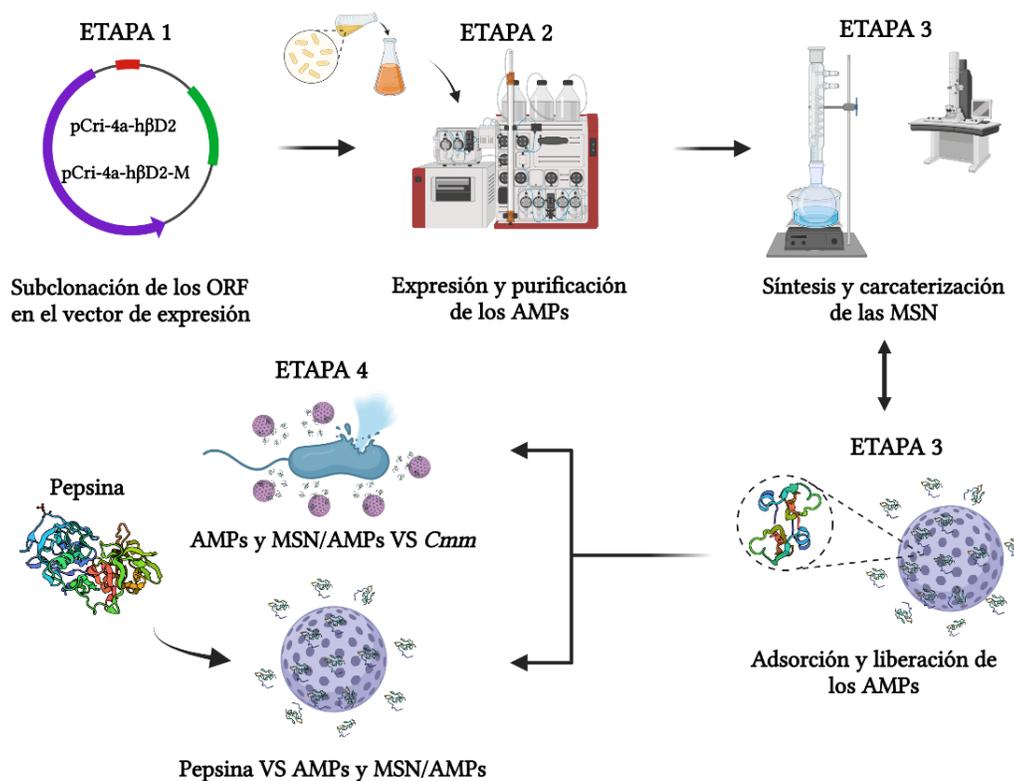


Figura 6. Estrategia experimental para la subclonación, expresión y purificación de los AMPs, síntesis y caracterización de las MSN y MSN/AMPs vs. *Cmm*.

5.2. Plásmidos

La secuencia de aminoácidos de la h β D2 humana se obtuvo del Banco de Datos de Proteínas (1FD3). La secuencia del gen que codifica para la h β D2 con codones optimizados para *E. coli* fue clonada dentro del vector pUC57 (pUC57-h β D2) entre los sitios de restricción NcoI y XhoI, por la empresa GenScript. El plásmido se reconstituyó en agua Milli-Q y se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* Mach1 T1 mediante el método de choque térmico (**Anexo 1**). Los vectores pUC57-h β D2 y pCri-4a se digirieron con las enzimas NcoI y XhoI, después los productos de restricción se ligaron con la enzima T4 ADN ligasa (NEB, USA) para obtener el plásmido recombinante pCri-4a-h β D2. Con la construcción pCri-4a-h β D2 se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* Mach1 T1. El vector de expresión pCri-4a permite la expresión de una etiqueta de 6 histidinas unida a la proteína tiorredoxina (TrxA) y contiene un sitio de escisión para la proteasa del virus de ataque químico del tabaco (TEV), por lo tanto, la h β D2 se expresó unida a TrxA (**Figura 7**).

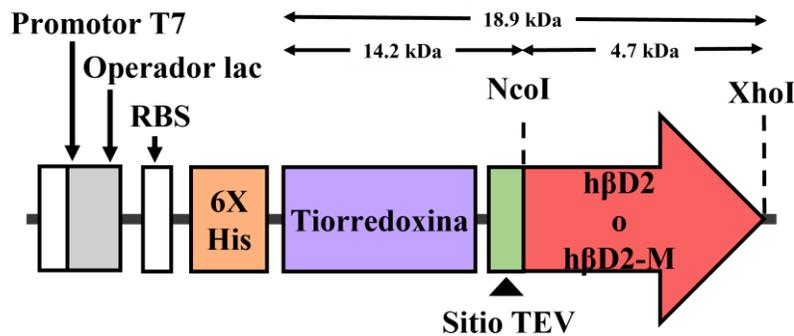


Figura 7. ORFs de los AMPs subclonados en el vector pCri-4a.

5.2.1. Obtención de la mutante h β D2-M

Para mejorar la actividad intrínseca de h β D2, se llevó a cabo una mutagénesis dirigida, incorporando un residuo de glicina en el extremo amino terminal y un

residuo de arginina en el extremo carboxilo terminal (pCri-4a-h β D2-M). Dichas mutaciones se realizaron a través de la técnica de PCR, utilizando los oligonucleótidos h β D2-MF (5'GCCATGGGGGGTATTGGCGATCCAGTTACC-3') y h β D2-MR (5'CTCGAGCTACCGTTTTTTGCAGCATTTTCGTACCTGGCAA-3'). Los productos de PCR se purificaron y ligaron al plásmido pCR8/GW/TOPO (pCR8-h β D2-M). Posteriormente, el ORF de la h β D2-M se subclonó en el vector de expresión pCri-4a (pCri-4a-h β D2-M) como se describe en la sección 5.1. El ADNp de las clonas positivas de h β D2 y h β D2-M se analizaron por un ensayo de doble restricción con las enzimas NcoI y XhoI (NEB, USA) y se verificaron mediante secuenciación de ADN.

5.3. Expresión de los AMPs

E. coli Rosetta (DE3) transformado previamente con el plásmido pCri4a-h β D2 o pCri-4a-h β D2-M se sembró en 50 mL caldo de lisogenia (LB) suplementado con sulfato de kanamicina (50 μ g/ml), cloranfenicol (20 μ g/ml) y glucosa (5 g/L); el cultivo se incubó a 37 °C por 16 h a 180 rpm. 4 L de medio Terrific Broth (peptona 12 g/L, extracto de levadura 24 g/L, K₂HPO₄ 9.4 g/L, KH₂PO₄ 2.2 g/L, glicerol 4 mL/L) suplementado con los mismos antibióticos y azúcar mencionados anteriormente fueron inoculados al 1% a partir del preinóculo. Los cultivos se mantuvieron bajo temperatura (37 °C) y agitación constante (200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica (D.O._{600 nm}) de 0.7-0.8. La expresión de las proteínas de fusión se realizó mediante la adición de isopropil β -d-galactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Después de llevar a cabo la inducción el cultivo se incubó a 18 °C por 16 h a 150 rpm. Las células se recolectaron por centrifugación a 5000 \times g durante 30 min a 4 °C y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción de las proteínas.

5.4. Purificación de los AMPs

Los sedimentos celulares (aproximadamente 15 g) se resuspendieron en 120 mL de tampón A (NaH_2PO_4 20 mM, Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, pH 7.4) y se lisaron por sonicación en un baño de hielo utilizando el equipo Ultrasonic Homogenizer 750 (Cole-Parmer, USA). El proceso de sonicación se llevó a cabo durante 7 min a una amplitud del 40% con pulsos alternados de 10 s encendido y 40 s apagado. El lisado celular se centrifugó a $164\,391\times g$ durante 35 min a 4 °C.

La purificación de las proteínas se realizó por cromatografía líquida rápida de proteína (FPLC) mediante el equipo AKTA pure (GE Healthcare, USA), para ello se utilizó una columna de cromatografía con metal inmovilizado cargada con Ni^{2+} (Ni^{2+} -IMAC). El clarificado obtenido se filtró a través de una membrana con tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore, USA) y se cargó en la columna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare, USA) previamente equilibrada con tampón A. Después de cargar la muestra, la columna se lavó con 5 VC del mismo buffer para eliminar las proteínas contaminantes. Por último, las proteínas de interés se eluyeron a través de un gradiente lineal (0-100%) con tampón B (NaH_2PO_4 20 mM, Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 500 mM, pH 8.4) durante 15 volúmenes de columna. La pureza de las proteínas se determinó mediante la técnica de Tricina-SDS-PAGE al 10% (Schägger, 2006).

Las fracciones eluidas que contenían la proteína de interés se sometieron a un intercambio de tampón B por C (glutación reducido 1 mM, glutación oxidado 1 mM, Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) utilizando la columna HiPrep 26/10. Las fracciones desaladas se combinaron y se adicionó la enzima TEV en una relación 1:1000 v/v para llevar a cabo la escisión de las etiquetas de fusión, la mezcla de reacción se dejó incubando a 4 °C durante 16 h. Después del proceso de escisión, la

muestra se volvió a purificar mediante Ni²⁺-IMAC manejando las condiciones mencionadas anteriormente. Las proteínas no unidas a la columna, correspondientes a los AMPs (fase no unida) se concentraron hasta 0.5 mL con un concentrador centrifugo con tamaño de corte de 3 kDa (Millipore, USA).

La actividad antimicrobiana de hβD2 y hβD2-M se evaluó tanto a pH básico (Tris 50 mM pH 8.4) como ácido (CH₃COOH 10 mM pH 2.4), por lo tanto, el cambio de buffer de los AMPs se realizó a través de un concentrador centrifugo con tamaño de corte de 3 kDa. Para determinar la concentración y rendimiento de proteína total en cada uno de los procesos de purificación se utilizó el kit comercial Pierce™ BCA™ (ThermoFisher, USA).

5.5. Síntesis de las MSN

Las MSN se sintetizaron en base a lo reportado por Gu *et al.*, (2013). Con el propósito de incrementar el diámetro de poro, la metodología original se modificó y para ello se realizaron cuatro tratamientos diferentes (**Tabla 5**). El método implementado para el tratamiento 1 se describe brevemente a continuación: en un matraz bola de fondo plano de 500 mL bajo condiciones de temperatura ambiente (22-25 °C) se disolvieron 0.5 g de CTAB (agente director de estructura) y 50 mg de F127 en 0.4 mL de DHMA (mediador del tamaño de poro), a la mezcla con agitación vigorosa (600 rpm) se le adicionaron 240 mL de agua desionizada y 1.75 mL de NaOH 2 M. Después de que la solución se clarificara, se incrementó la temperatura hasta 80 °C. Una vez estabilizada la temperatura, se añadió 2.5 mL de TEOS gota a gota y el matraz se conectó a reflujo manteniendo las mismas condiciones de temperatura y agitación durante 2 h. Culminado el periodo de incubación la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y las MSN se concentraron y lavaron por centrifugación con etanol y luego con agua dos veces, respectivamente. Para eliminar la plantilla de surfactante, 1 g del material obtenido fue disuelto en una

solución de etanol acidificada con ácido clorhídrico (1 mL de HCl al 37% y 100 mL de etanol absoluto) y se sometió a reflujo a 80 °C durante 24 h a 600 rpm. Las MSN se concentraron y lavaron de nuevo mediante centrifugación con metanol dos veces, el material obtenido se secó a 50 °C por 16 h y se almaceno para su uso posterior.

Tabla 5. Diferentes tratamientos realizados para la síntesis de las MSN.

Reactivo	Tratamiento 1 (MSN5.4)	Tratamiento 2 (MSN 4.8)	Tratamiento 3 (MSN0.9)	Tratamiento 4 (MSN0.9')
F127	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg
DHMA	0.4 mL	0.8 mL	0.4 mL	0.8 mL
CTAB	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
H ₂ O	240 mL	240 mL	240 mL	240 mL
NaOH	1.75 mL	1.75 mL	1.75 mL	1.75 mL
TEOS	2.5 mL	2.5 mL	1.1875 mL	1.1875 mL

5.6. Caracterización de las MSN

La distribución del tamaño de partícula de las NPs se determinó mediante dispersión de luz dinámica con un dispersor de luz dinámica Zetasizer Nano ZSP (Microtrac, USA). Para conocer los posibles grupos funcionales del material en estudio, se realizó espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) utilizando un espectrofotómetro infrarrojo Nicolet 6700 (Thermo Electron Scientific Instruments Corporation, USA). Se utilizó espectroscopia Raman para determinar los diferentes modos vibracionales de las MSN, el análisis se efectuó en el sistema AFM-Raman NTEGRA SPECTRA II (NT-MDT, Rusia) utilizando un láser azul de estado sólido (455 nm). La morfología, el tamaño y la porosidad del MSN se determinaron mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) y barrido (SEM). Las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM 2010 (JEOL, USA) utilizando una aceleración de 200 KV. Mientras que por SEM fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido AURIGA 3916-FESEM (CARL ZEISS, USA) usando una aceleración de 2 KV a una distancia de trabajo de

3.7 mm. Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno del MSN se obtuvieron utilizando un sortómetro Minisorb II (BEL, Japón) a 77 K. Previo al análisis, las muestras fueron desgasificadas a temperatura ambiente durante 24 h. Las áreas de superficie específicas se determinaron en función de los datos de adsorción utilizando el modelo Brunauer-Emmett-Teller (BET) (**Ecuación 1**).

$$\frac{1}{W\left(\left(\frac{P_0}{P}\right)-1\right)} = \frac{1}{W_m C} + \frac{C-1}{W_m C} \left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (1)$$

donde W es el peso del gas absorbido, P/P_0 es la presión relativa, W_m el peso de adsorbato como monocapa y C la constante de BET. A partir de las ramas de las isothermas de adsorción y el modelo Barret-Joyner-Halenda (BJH), se determinaron las distribuciones del volumen y tamaño de los poros. Finalmente, el volumen total de poros se calculó en base a la cantidad de N_2 absorbido a una presión relativa (P/P_0) de 0.99.

5.7. Ensayo de actividad antimicrobiana y determinación del IC_{50} de los AMPs

Cmm fue cultivada en caldo Mueller-Hinton (MHB) a 37 °C por 16 h a 180 rpm. Empleando 0.5 mL del cultivo anterior, se inocularon 50 mL de MHB fresco. El cultivo se mantuvo bajo las condiciones mencionadas anteriormente hasta alcanzar una $D.O_{600\text{ nm}}$ de 0.2-0.3. Se añadieron 0.5 mL del cultivo y se inocularon 9.5 mL de agar MHB precalentado a 37 °C el cual se homogenizó vigorosamente y enseguida se vertió en una caja Petri que contenía agar MHB para formar una capa uniforme de 2 mm. Seca la superficie, se agregaron diferentes volúmenes (5, 10 y 15 μL) de los AMPs (50 μM) en estudio. Las placas se incubaron durante 24 h a 28 °C, luego se midieron los halos de inhibición formados. Se usaron CH_3COOH y Tris como controles negativos. La concentración de 50 μM se eligió con base a la revisión bibliográfica realizada.

Una vez verificada la actividad antimicrobiana de los AMPs por el método de difusión en agar, se determinó su IC₅₀ con base a lo reportado por Tay et al., (2011) y Liu et al., (2013). El método implementado se describe brevemente a continuación: se sembró *Cmm* en medio líquido MHB, el cultivo se incubó a 28 °C a 200 rpm durante 16 h, a partir de este preinóculo se inoculó medio fresco de MHB al 1% y se mantuvo bajo las mismas condiciones hasta que alcanzara una D.O._{600 nm} de 0.5. Del cultivo anterior se tomaron 200 µL y se agregaron a 40 mL de medio MHB fresco para tener una concentración celular de 2.5×10⁶ unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL), a este último se le denominó “cultivo diluido”. En una microplaca de 96 pozos se adicionaron 25 µL de medio MHB (para mantener el crecimiento celular), 150 µL del cultivo diluido (para tener una concentración final de 1.5×10⁶ UFC/mL), diferentes volúmenes del péptido a evaluar para tener concentraciones finales de 0-50 µg/mL (el stock de los AMPs fue de 200 µg/mL) y CH₃COOH o Tris (dependiendo del pH que se evaluó) para completar un volumen final de 200 µL. La microplaca se incubó a 28 °C a 100 rpm en el espectrofotómetro de microplaca MULTISKAN Sky (Thermo Scientific, USA), cada 4 h el equipo automáticamente realizó mediciones de D.O._{600 nm} hasta las 32 h. Como controles negativo y positivo se manejaron medio MHB (sin *Cmm*) y el cultivo de *Cmm* sin el AMP, respectivamente. Los experimentos de este ensayo se realizaron por triplicado. El IC₅₀ se define como la concentración mínima de AMP que se requiere para inhibir el 50% del crecimiento de *Cmm*.

5.8. Adsorción y liberación de los AMPs

A un microtubo con 5 mg de MSN5.4 previamente esterilizados por luz UV se le adicionaron 0.5 mg de AMP a evaluar y la cantidad necesaria de PBS 67 mM pH 7.0 para completar un volumen final de 1 mL. La mezcla se mantuvo en agitación constante en un balancín durante 16 h a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a

10,000 × g durante 15 min a 4°C, al final del período de incubación el sobrenadante se retiró cuidadosamente y se analizó por el kit Pierce™ BCA Protein para determinar la concentración de proteína total y de esta forma estimar de forma indirecta el porcentaje de adsorción de los AMPs por las MSN5.4. Como controles se manejaron los AMPs en PBS a la misma concentración.

En lo que respecta a la determinación del porcentaje liberado de los AMPs, se volvió a realizar la metodología mencionada en el párrafo anterior. Tras eliminar el sobrenadante y secar el pellet, se agregó 1 mL de PBS estéril y con ayuda de un vortex se homogenizó hasta obtener una mezcla homogénea. Los microtubos permanecieron en agitación y temperatura (28±2 °C) constante durante todo el periodo de análisis planeado (2, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 h). Entre cada punto de muestreo, los microtubos se centrifugaron a 10,000 × g por 15 min a 4°C, el pellet resultante se resuspendió en 1 mL de PBS estéril (Durack et al., 2019). Los sobrenadantes se analizaron mediante el kit Pierce™ BCA Protein para determinar la concentración de proteína total que se liberó hasta ese instante de tiempo. Para ambos ensayos, los experimentos se realizaron por triplicado.

5.9. Actividad antimicrobiana de los complejos MSN/AMPs

La actividad antimicrobiana de los complejos MSN/AMPs se evaluó tanto en medio sólido (cualitativo) como líquido (cuantitativo). Para los ensayos en medio sólido, el proceso de adsorción se llevó a cabo como se describe en la sección 5.7. El pellet se resuspendió en 1 mL de PBS estéril. Posteriormente, se depositaron diferentes volúmenes de la mezcla MSN/AMPs en cajas Petri con medio MHB y *Cmm* (sección 5.6). Las placas se incubaron durante 24 h a 28 °C, culminado el periodo de incubación se midieron los halos de inhibición con ayuda del *software* ImageJ. Se emplearon como controles las MSN (5 mg/mL) y los AMPs (0.5 mg/mL) en PBS. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los complejos MSN/AMPs en medio líquido, primero se realizó el cultivo de *Cmm* como se describe en la sección 5.7. De igual forma se llevó a cabo el proceso de adsorción de los AMPs por las MSN (sección 5.8), después de eliminar el sobrenadante y secar los complejos MSN/AMPs por medio de una campana de flujo laminar se resuspendieron en 3 mL del cultivo diluido de *Cmm* y se incubaron a 28 °C durante 24 h a 180 rpm. Después del periodo de incubación, se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^6 de las cuales se tomaron 100 μ L y se sembraron cajas con medio MHB (Durack et al., 2019). Las placas se incubaron a 28 °C durante 72 h y se contaron las colonias que crecieron, estas se expresaron como UFC/mL. Como controles negativo y positivo se emplearon las MSN (5 mg/mL) y los AMPs (0.5 mg/mL) en PBS, respectivamente. Los experimentos para este ensayo se realizaron por duplicado.

5.10. Efecto de la pepsina sobre los complejos MSN/AMPs

Con la finalidad de evaluar el efecto protector de las MSN sobre los AMPs ante la degradación enzimática, tanto los AMPs como los complejos MSN/AMPs se hicieron interaccionar con la pepsina de cerdo. A continuación, se detalla el procedimiento realizado.

El cultivo de *Cmm* y el proceso de adsorción se realizaron como se describe en las secciones 5.8 y 5.9. Después de eliminar el sobrenadante y secar los complejos MSN/AMPs se adicionaron 200 μ L de pepsina (1 mg/mL) se incubaron a 37 °C durante 16 h en agitación constante. A continuación, los microtubos se centrifugaron a $5000 \times g$ por 10 min a 4 °C. El pellet resultante se lavó dos veces con agua desionizada y se centrifugó a $5000 \times g$ por 10 min a 4 °C, entre cada lavado. Los complejos MSN/AMPs se resuspendieron en 3 mL del cultivo diluido de *Cmm* y se incubaron a 28 °C durante 24 h a 180 rpm. Posterior al periodo de incubación se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^6 de las cuales se tomaron 100 μ L y se

sembraron cajas Petri con medio MHB. Las placas se incubaron a 28 °C durante 72 h y se contaron las colonias, estas se expresaron como UFC/mL. Como controles se manejaron las MSN (5 mg/mL) en PBS y los AMPs (1 mg/mL) tratados con pepsina (1 mg/mL) en una proporción 5:1 (péptido:enzima) (Durack et al., 2019). Los experimentos para este ensayo se realizaron por duplicado.

5.11. Análisis estadístico

Los datos de las mediciones del crecimiento de los halos de inhibición y las UFC/mL se presentaron como la media y las barras representan la desviación estándar. El análisis de los datos se realizó mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se utilizó la prueba de Tukey para calcular los valores p , valores de $p \leq 0.0028$ se consideraron estadísticamente significativos.

CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Construcciones de hβD2 y hβD2-M

Recapitulando, se diseñaron dos construcciones que codificaban para la hβD2 y la mutante hβD2-M, el ORF de ambos péptidos clonados en el vector de expresión se puede apreciar en la **Figura 8**. La orientación de los fragmentos de ADN que codificaban para hβD2 y hβD2-M en el vector pCri-4a se evaluó mediante un ensayo de doble restricción con las enzimas NcoI y XhoI, a través de este ensayo se pudieron apreciar bandas 130 pb aproximadamente, las cuales corresponden con el peso teórico de los ORFs de los AMPs (**Figura 8A**). Lo anterior se corroboró mediante secuenciación de ADN, confirmando que no había cambios de ADN presentes en los ORFs de ambos AMPs (**Figuras 8B y C**).

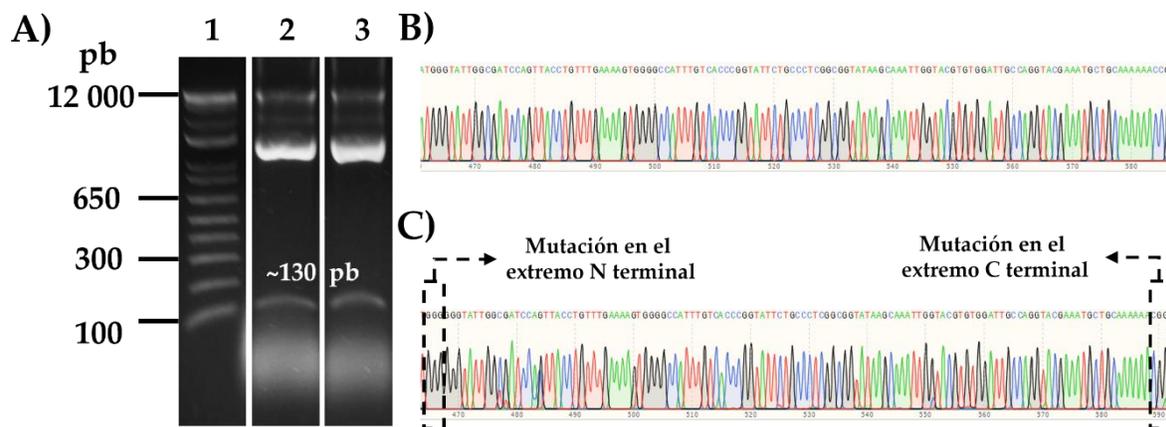


Figura 8. Análisis molecular de las construcciones. A) gel de agarosa al 1.5% de los productos del ensayo de doble restricción; carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: producto del ensayo de restricción de la construcción pCri-4a-hβD2 y carril 3: producto del ensayo de restricción de la construcción pCri-4a-hβD2-M, B) electroferograma del ORF de la hβD2 y C) electroferograma del ORF de la hβD2-M donde se señalan las mutaciones realizadas.

6.2. Expresión y purificación de los AMPs

Al analizar las diferentes fases obtenidas del lisado celular mediante Tricina-SDS-PAGE, se determinó que las proteínas de fusión TRX-h β D2 y TRX-h β D2-M se produjeron tanto en la fase soluble como insoluble. Sin embargo, como los cuerpos de inclusión (IBs) requieren de más procesos de purificación se descartó el uso de la fase insoluble. La proteína de fusión TRX-h β D2 tenía un peso molecular de 18 kDa el cual coincide con su peso teórico (**Tabla 6**). Después de la escisión por la proteasa TEV y el análisis de la fracción no unida del segundo proceso de Ni²⁺-IMAC, se observó una banda aproximadamente a 4,5 kDa la cual se asignó a h β D2. Sin embargo, también se observó una banda de 9 kDa. Se obtuvieron resultados similares para TRX-h β D2-M y h β D2-M, los procesos de purificación completos para ambos péptidos se resumen en las **Figuras 9A y B**. Estudios previos han informado que la h β D2 coexiste como una mezcla de péptidos agregados que son en su mayoría dímeros y su estado de multimerización depende de su concentración (a mayor concentración, mayor cantidad de homo-oligómeros formados), por lo que la banda de 9 kDa se puede atribuir al dímero de h β D2 (Hoover et al., 2000; Järvå et al., 2018). El dímero h β D2 se forma por la interacción de las cadenas β 1 de ambos monómeros, dando como resultado la formación de una hoja β de seis cadenas, sin embargo, esta interacción está limitada por dos puentes de hidrógeno entre His16 y el esqueleto de Cys15. Sin embargo, también involucra a los grupos hidroxilo de Tyr24, este dímero es estabilizado principalmente por fuerzas de van de Waals, con los residuos Pro5, Ala13, Ile14, Cys15, His16 y Pro17 responsables de la mayoría de estas interacciones (Hoover et al., 2000). Los rendimientos de las proteínas h β D2, h β D2-M y TRX-h β D2-M fueron de 1.23, 1.38 y 11.96 mg por litro de cultivo respectivamente, con más del 90% de pureza de acuerdo con un análisis densitométrico.

Tabla 6. Características fisicoquímicas de los AMPs.

AMP	Secuencia de aminoácidos	Peso teórico (kDa)	Punto isoeléctrico	Dimensiones (nm) ^a
hβD2	GAMGIGDPVTCLKSGAICHVPFCP RRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	4.6 kDa	9.3	2.3×3.45×2.45
TRX-hβD2-M	MKHHHHHHHPMSDKIIHLTDDSF TDVLKADGAILVDFWAEWCGPCK MIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNID QNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEV AATKVGALSKGQLKEFLDANLAGS GSGENLYFQGAMGGIGDPVTCLK SGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGT KCCKKR	18.9 kDa	8.1	3.97×7×3.08
hβD2-M	GAMGGIGDPVTCLKSGAICHVPFC PRRYKQIGTCGLPGTKCCKKR	4.7 kDa	9.5	2.74×3.25×2.28

^a Las mediciones de los AMPs se realizaron con el *software* Pymol.

6.3 Ensayos de actividad antimicrobiana contra *Cmm*

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los AMP contra *Cmm* tanto en condiciones de pH básico como ácido. Los controles negativos, CH₃COOH y Tris no mostraron actividad antimicrobiana contra la cepa en estudio. Por otro lado, ambos AMPs exhibieron halos de inhibición a los pH evaluados, las zonas de inhibición aumentaron a medida que se incrementó el volumen de la muestra (**Figuras 10A y B**).

Los AMPs que inhibieron el crecimiento de *Cmm* por el método de difusión en agar (hβD2, hβD2-M y TRX-hβD2-M) también exhibieron una fuerte actividad antimicrobiana en medio líquido; presentaron valores de IC₅₀ entre 1.5 y 20 µg/mL (**Tabla 7**). La actividad antimicrobiana de la hβD2-M fue mejor en comparación con la de hβD2 y TRX-hβD2-M tanto en condiciones de pH ácido como básico. Con base a la bibliografía consultada, el valor de IC₅₀ de la hβD2-M es inferior a lo que se encuentra reportado para inhibir a *Cmm* usando otros AMPs (Khazigaleeva et al., 2017; Laird et al., 2020; Yokoyama et al., 2008).

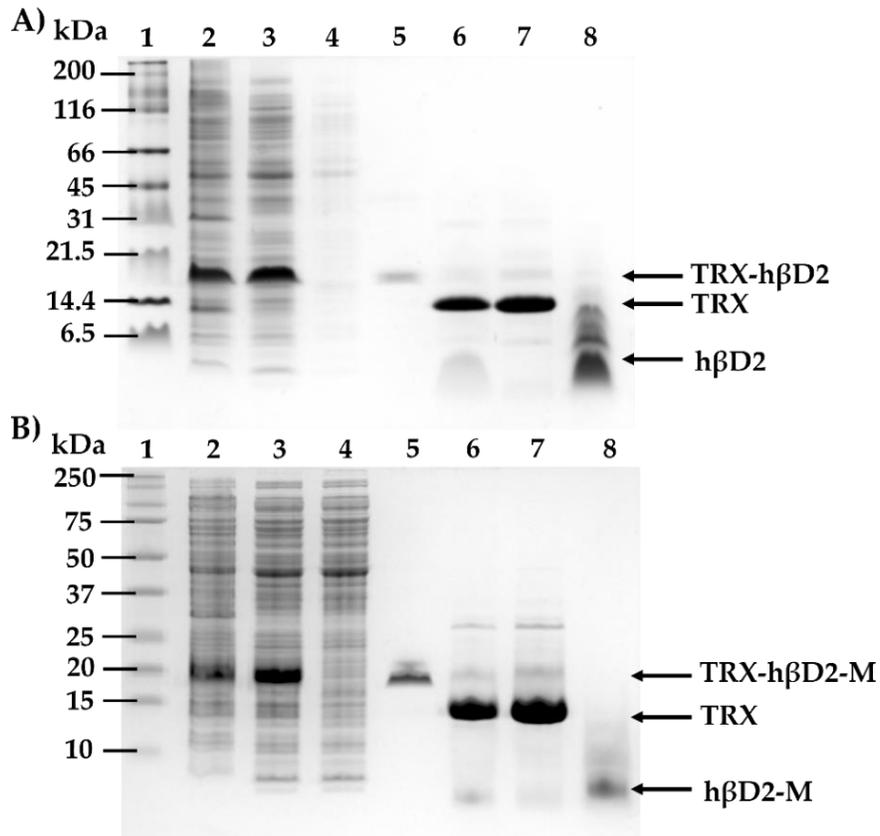


Figura 9. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes. A) expresión y purificación de la hβD2; carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: fase insoluble, carril 3: fase soluble, carril 4: fracción no unida al primer paso de purificación por Ni²⁺-IMAC, carril 5: fracción unida al primer paso de purificación por Ni²⁺-IMAC, carril 6: fracción después de la escisión por la proteasa TEV, carril 7: fracción unida al segundo paso de purificación por Ni²⁺-IMAC y carril 8: fracción no unida al segundo paso de purificación por Ni²⁺-IMAC y B) expresión y purificación de la hβD2-M; el plan de carga es el mismo que para hβD2.

La actividad antimicrobiana de los AMPs en estudio también se evaluó contra las cepas *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris*, sin embargo, los AMPs no inhibieron su crecimiento mediante el método de difusión en agar (AMPs a 50 μM). No obstante, cabe la posibilidad de que si se incrementa la concentración de los AMPs se pueda inhibir el crecimiento de estos microorganismos fitopatógenos.

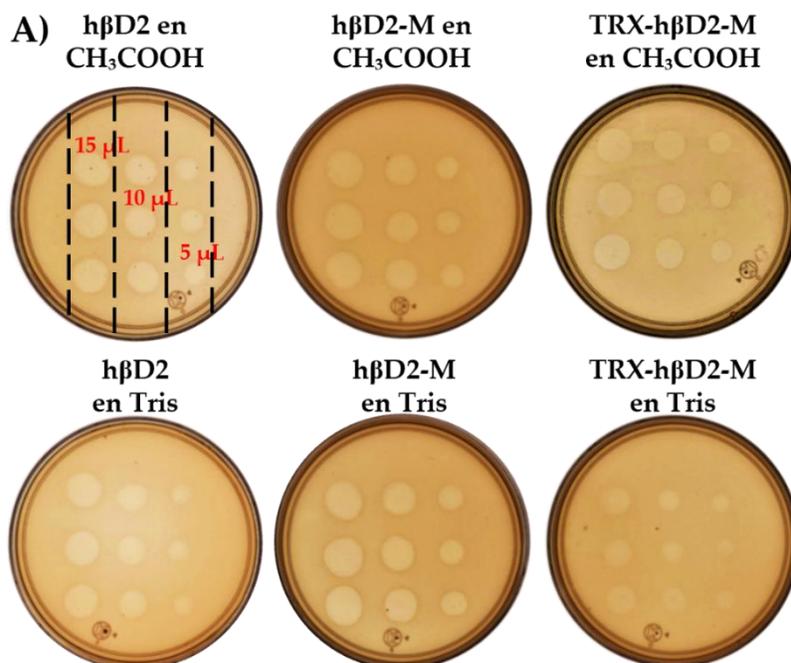


Figura 10. Evaluación de actividad antimicrobiana de los AMPs contra *Cmm* mediante el método de difusión en agar.

Tabla 7. IC₅₀ de los AMPs contra *Cmm*.

AMP	IC ₅₀ (μg/mL)
hβD2 en Tris	3.61±0.47
hβD2 en CH ₃ COOH	3.64±0.33
hβD2-M en Tris	1.75±0.13
hβD2-M en CH ₃ COOH	1.56±0.16
TRX-hβD2-M en Tris	19.99±3.55
TRX-hβD2-M en CH ₃ COOH	6.17±0.08

6.4. Caracterización de las MSN

En base a los diferentes tratamientos que se realizaron (**Tabla 5**), se encontraron las condiciones con las cuales es posible obtener MSN con tamaños inferiores a 150 nm. De acuerdo con el análisis de DLS, se determinó que las partículas obtenidas tenían una amplia distribución de tamaño con una moda de 220 nm cuando se resuspendieron en PBS (recuadro izquierdo y derecho de la **Figura 11A**), este resultado fue corroborado por SEM donde se apreciaron partículas de morfología esférica con tamaños de 80-140 nm aproximadamente (**Figura 11A**). Por

TEM fue posible apreciar partículas esféricas agregadas con tamaños similares a los obtenidos por SEM con mesoporos desordenados de tamaño variable (**Figura 11B**). Para determinar los grupos funcionales involucrados en la adsorción de los AMP, el material fue analizado por FT-IR. El espectro FT-IR obtenido (**Figura 11C**) presentó bandas centradas a los 3431, 1080, 960, 800 y 468 cm^{-1} atribuidas a vibraciones de estiramiento del grupo O-H de las moléculas de agua ligadas al hidrógeno (H-O-H-H), vibraciones de estiramiento del enlace covalente Si-O, vibraciones de estiramiento en el plano del enlace Si-O de los grupos silanol (Si-OH), vibraciones de tensión simétrica de los enlaces Si-O-Si y vibraciones de flexión simétricas de los enlaces Si-O-Si de los enlaces siloxano, respectivamente (Oliveira et al., 2020; Sahare et al., 2016). El espectro Raman obtenido exhibió picos centrados en 490 y 980 cm^{-1} asociados con la vibración del oxígeno en Si-O-Si y la vibración del grupo silanol (Si-O-H), respectivamente (**Figura 11C**). La amplitud relativa del último pico se atribuyó a una gran superficie específica (Alessi et al., 2013). Es importante recordar que estos resultados solo hacen referencia al material obtenido por el tratamiento 1.

Mediante el análisis de adsorción-desorción de N_2 , se determinó que las MSN5.4 y MSN4.8 presentaron una isoterma tipo IV con un inminente bucle de histéresis de tipo H1, estos patrones son característicos de mesoporos en forma de canales cilíndricos delgados independientes con una amplia distribución de tamaño (Kachbouri et al., 2018; Z. Luo et al., 2015). El tratamiento 1 (MSN5.4) exhibió las mejores características con tamaño de poro medio, volumen de poro (Modelo BJH) y área de superficie específica (modelo BET) de 5.4 nm, 1.77 cm^3/g y 1021.4 m^2/g , respectivamente (**Figura 11D y E**). Los resultados de este análisis para los demás tratamientos se resumen en la **Tabla 8**.

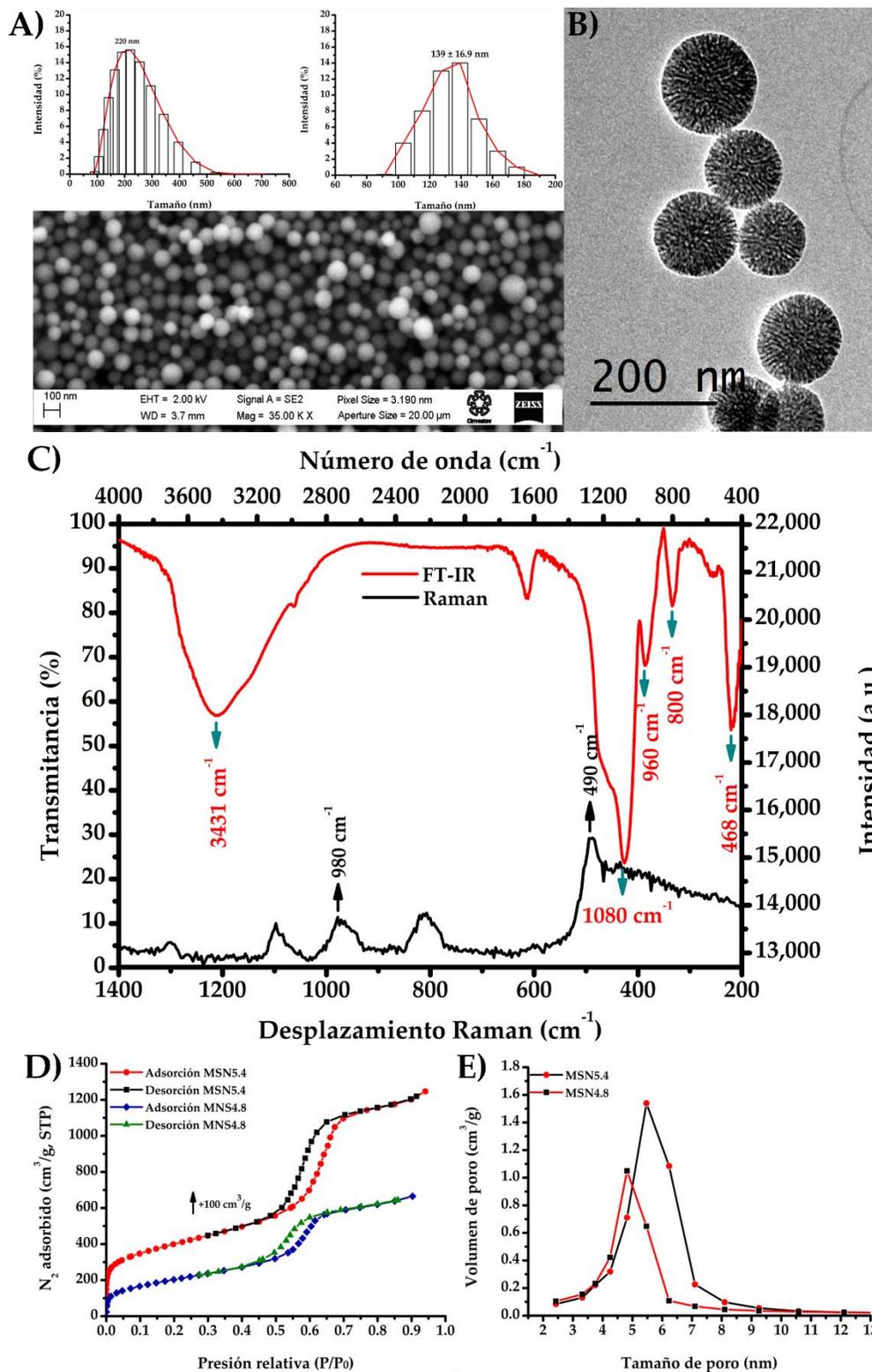


Figura 11. Caracterización de las MSN. A) micrografía de SEM, B) micrografía de TEM, C) espectros de FT-IR y Raman, D) isothermas de adsorción-desorción de N_2 y E) distribución de diámetro de poro (modelo BJH).

Las modificaciones realizadas a la metodología propuesta por Gu et al., (2013) tuvieron un efecto significativo en el tamaño de poro de las MSN ya que aumentaron de 4.6 a 4.8 y 5.4 para las MSN4.8 y las MSN5.4, respectivamente. Por otro lado, el aumento en la cantidad de DMHA acompañado de la disminución de TEOS en la síntesis de MSN0.9 y MSN0.9 'condujo a una disminución considerable en el diámetro de poro, volumen de poro y área superficial, por lo tanto ambos materiales presentaron un comportamiento característico de materiales microporosos con una isoterma de tipo I (<2 nm); esto podría atribuirse a que el TEOS en menor cantidad se incorporara directamente al área hidrofóbica de las micelas del CTAB, impidiendo que el DMHA cumpliera su función como mediador del tamaño de poro, además, el exceso de DMHA no se transfirió a las micelas de CTAB si no a las de F127 resultando en la obtención de materiales microporosos (Gu et al., 2013; Luo et al., 2017).

6.5 Adsorción y liberación de los AMPs

Utilizando diferentes técnicas complementarias, se determinó que el tamaño y diámetro de los poros de las MSN5.4 eran de 140 y 5.4 nm, respectivamente. Por otro lado, de acuerdo con mediciones realizadas en el *software* Pymol se observó que las dimensiones de los AMPs eran inferiores a 4 nm (**Figura 12**), por lo tanto, los AMPs en estudio pueden entrar fácilmente en los poros de las MSN5.4. Con respecto a la adsorción, el 99.14, 99.08 y 99.46% de la concentración evaluada de h β D2 y TRX-h β D2-M y h β D2-M fueron adsorbidas en las MSN, respectivamente. Esto significa que de los 500 mg de AMPs adicionados, más de 495 mg se adsorbieron en las MSN. Al analizar las MSN5.4 por FT-IR y Raman, se identificaron grupos silanol (hidrófilo) y siloxano (ligeramente hidrófobo). El proceso de adsorción de biomoléculas por matrices mesoporosas como las MSN 5.4 se rige principalmente por interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas de los grupos silanol y siloxano y las

regiones con la misma naturaleza de las biomoléculas, sin embargo, como los grupos silanol están más expuestos, se esperaría que predominaran las interacciones hidrofílicas (Flynn et al., 2019; Sahare et al., 2016).

Tabla 8. Propiedades de las matrices de sílice mesoporosa sintetizadas.

Silicatos mesoporosos	Diámetro de poro ^a (nm)	Volumen de poro (cm ³ /g)	Área de superficie BET (m ² /g)
MSN5.4	5.4	1.77	1021.4
MSN4.8	4.8	1.02	711.4
MSN0.9	0.9	0.31	653.2
MSN0.9'	0.9	0.30	688.5

^a Calculado utilizando el modelo BJH a partir de las isotermas de desorción.

En cuanto a los ensayos de desorción, la hβD2-M y TRX-hβD2-M mostraron una liberación proteica de 5 µg/mL a las 24 h, sin embargo, la concentración de proteína liberada disminuyó a las 48h, esto puede deberse a proteína fisisorbida en la superficie y no en los poros de las MSN y por lo tanto se liberó fácilmente durante las primeras 24 h (Gu et al., 2013). hβD2-M y TRX-hβD2-M liberaron un máximo de 41 µg/mL y 20 µg/mL a las 96 y 168 h, respectivamente. Por otro lado, la desorción de hβD2 se registró después de 120 h (2,8 µg/mL); sin embargo, después de ese tiempo su tasa de liberación se incrementó gradualmente, incluso sobrepasó a TRX-hβD2-M (**Figura 13A**). En la medida en que se controló este experimento, se determinó que aproximadamente 55, 81 y 229 µg de hβD2, TRX-hβD2-M y hβD2-M se liberaron de las MSN5.4, respectivamente (**Figura 13B**). La liberación de AMPs a partir de las MSN a pH neutro se lleva a cabo mediante un proceso de difusión a través de los poros que se controla mediante interacciones electrostáticas (Balas et al., 2006; Flynn et al., 2019).

6.6 Bioactividad de las MSN cargadas con los AMPs contra *Cmm*

La evaluación de la bioactividad de las MSN5.4 cargadas con los AMPs contra *Cmm* se realizó en medio sólido (cualitativo) y líquido (cuantitativo). La **Figura 13C** muestra el gráfico de barras correspondiente a las medidas de los halos de inhibición producidos por los AMPs y los complejos MSN/AMPs. En general, los tres AMPs adsorbidos por las MSN5.4 presentaron actividad antimicrobiana, esto fue proporcional al volumen de la muestra. Por el contrario, el control negativo MSN/PBS no mostró inhibición del crecimiento celular. La h β D2 sin la matriz mostró halos de inhibición más grandes en comparación con el complejo MNS/h β D2, lo anterior sugiere que el material en el medio MHB líquido presentó alteraciones en su superficie como el bloqueo de sus poros por compuestos del medio y como consecuencia el complejo tuvo una menor actividad antimicrobiana (Ding et al., 2015; Durack et al., 2019). Por su parte, la h β D2-M presentó un halo de inhibición menor al complejo MSN/h β D2-M cuando se manejó un volumen de 15 μ L.

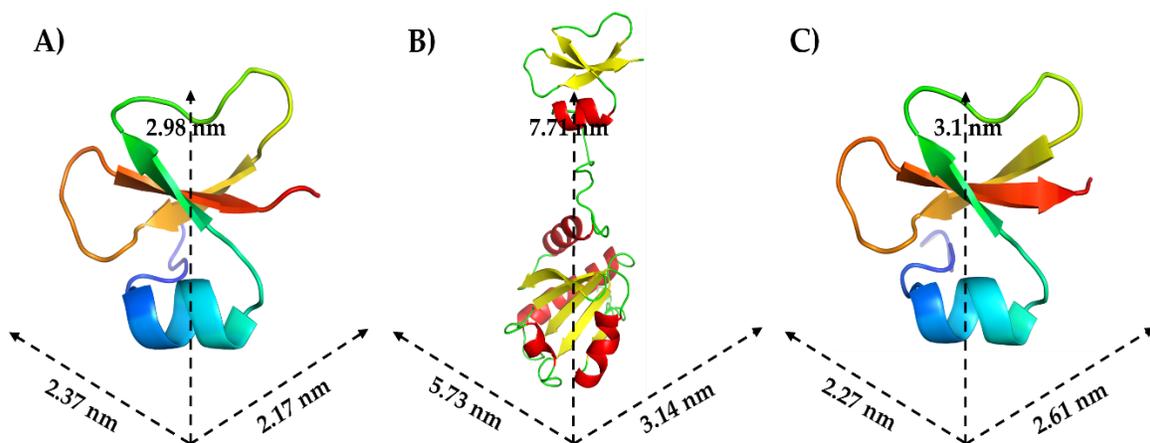


Figura 12. Mediciones de los AMPs con el *software* Pymol. A) h β D2, B) h β D2-M y C) TRX-h β D2-M. Modelos obtenidos por AlphaFold2 (Jumper et al., 2021).

En cuanto a las pruebas realizadas en medio líquido, los complejos MSN/h β D2, MSN/h β D2-M y MSN/TRX-h β D2-M inhibieron el crecimiento de *Cmm* en un 96, 47 y 94%, respectivamente, (**Figura 13D**). Las MSN5.4 en PBS (control) no

inhibieron el crecimiento de *Cmm*. Por otro lado, los AMPs sin la matriz mesoporosa inhibieron completamente el crecimiento de *Cmm*, esto se debe a que se superó considerablemente la concentración de IC₅₀ antes determinada (**Tabla 7**).

6.7. Efecto de la pepsina sobre los AMPs y los complejos MSN/AMPs

La adsorción y posterior liberación de múltiples AMPs se ha llevado a cabo en diferentes matrices mesoporosas, en general se ha determinado que la matriz confiere protección a los AMPs de múltiples factores y mejora su actividad antimicrobiana cuando se liberan (Diosa et al., 2019; Flynn et al., 2019; Oliveira et al., 2020). Para determinar si las MSN5.4 protegían a los AMPs de la degradación enzimática, se llevó a cabo un estudio de degradación proteolítica utilizando la peptidasa pepsina. Los resultados de este estudio preliminar indican que los AMPs sin la matriz mesoporosa no son tan susceptibles a la actividad catalítica de la pepsina ya que h β D2, TRX-h β D2-M y h β D2-M inhibieron el crecimiento de *Cmm* en 99.98, 99.92 y 97.57%, respectivamente (**Figura 13E**). Existe la posibilidad de que si se incrementa la concentración de la pepsina la actividad antimicrobiana de los AMPs se vea afectada debido a su degradación, por lo cual sería interesante evaluar concentraciones más altas de la peptidasa.

Por otro lado, los complejos MSN/h β D2 y MSN/h β D2-M tratados con la proteasa mostraron una mayor actividad antimicrobiana ya que inhibieron el crecimiento de *Cmm* en un 100 y 99.9%, respectivamente. Sin embargo, el AMP TRX-h β D2-M tratado con pepsina presentó una mayor actividad antimicrobiana en comparación con el complejo MSN/TRX-h β D2-M (inhibió el crecimiento de *Cmm* en un 96.53%), esto podría atribuirse a que la pepsina haya realizado alguna interacción con el material causando la obstrucción de los poros y siendo TRX-h β D2-M la proteína más grande tuvo un menor grado de liberación y por lo tanto el complejo presentó una menor actividad antimicrobiana contra *Cmm* (Ding et al., 2015).

Con base a los resultados de las secciones 6.5-6.7, los complejos MSN/AMPs podrían utilizarse como un bioplásticos para desinfectar semillas y plántulas jóvenes, así como para combatir a *Cmm* cuando está infectando plantas de *S. lycopersicum* en etapas avanzadas de desarrollo y de esta manera se podría reducir su propagación.

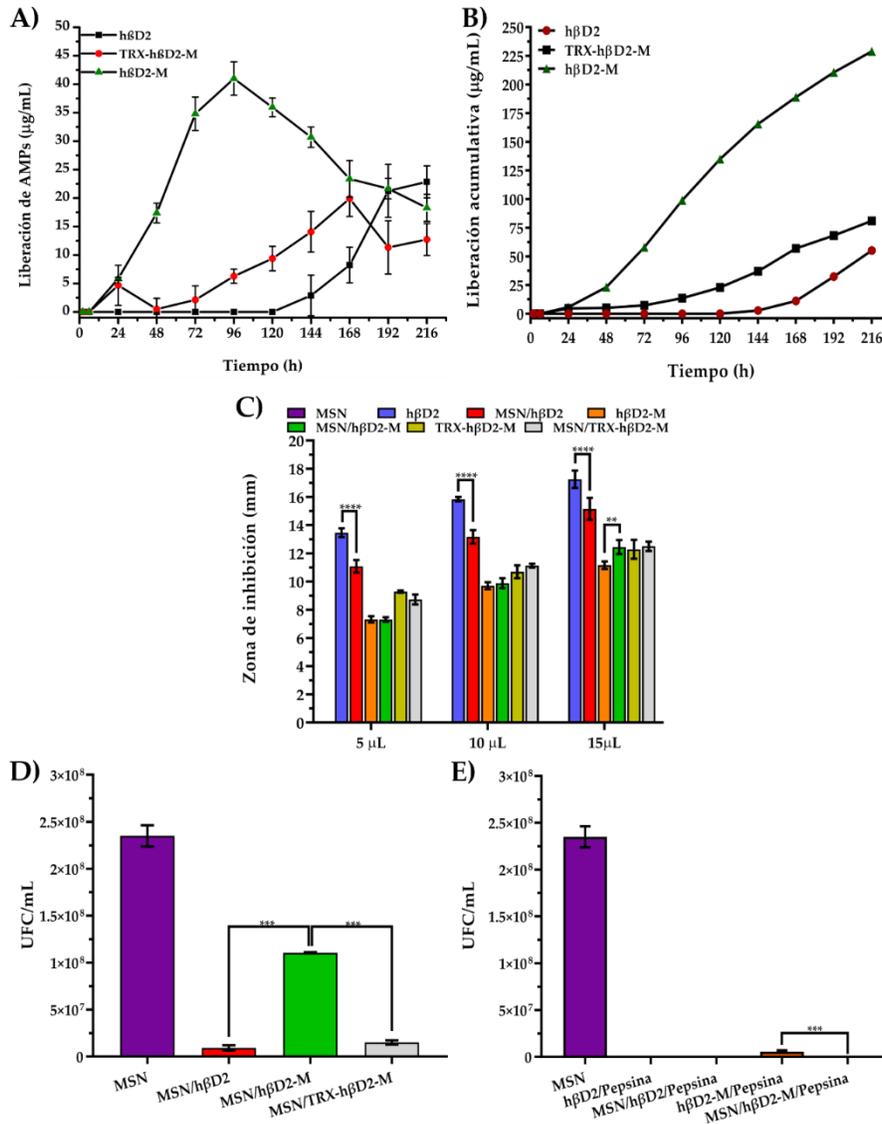


Figura 13. Caracterización de los complejos MSN/AMPs. A) concentración de AMP liberados, B) liberación acumulativa de los AMPs, C) evaluación de la actividad antimicrobiana por difusión en agar (**, $p \leq 0.0028$; ****, $p < 0.0001$), D) evaluación de la actividad antimicrobiana en medio líquido (***, $p \leq 0.0001$) y E) efecto de la pepsina sobre los AMPs y los complejos MSN/AMPs (***, $p \leq 0.0005$; ****, $p < 0.0001$).

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES

- Con base a la metodología planteada se sintetizaron NPs de sílice mesoporosa coloidales con un diámetro de poro sintonizable de hasta 5.4 nm (BJH) y tamaños de partícula promedio de 140 nm.
- Se lograron expresar tres péptidos antimicrobianos utilizando como sistema de expresión *E. coli* Rosetta (DE3), obteniendo rendimientos de 1.38, 1.23 y 11.96 mg por litro de cultivo de hβD2-M, hβD2 y TRX-hβD2-M, respectivamente.
- Con los dos AMPs recombinantes se inhibió el crecimiento de *Cmm* tanto en medio sólido como en líquido, siendo hβD2-M el AMP con mayor actividad cuando se encuentra en una solución acida.
- Mediante las pruebas realizadas en medio líquido, se determinó que los complejos MSN/hβD2, MSN/hβD2-M y MSN/TRX-hβD2-M inhiben el crecimiento de *Cmm* en un 96, 47 y 94%, respectivamente.
- Al exponer los complejos MSN/AMPs a la peptidasa pepsina estos presentaron mejor actividad antimicrobiana contra *Cmm* en comparación con los AMPs sin la matriz mesoporosa.

CAPÍTULO VIII. PERSPECTIVAS

- El sistema de expresión y purificación de los AMPs se podría optimizar para obtener mayores rendimientos y de esta forma utilizar los complejos MSN/AMPs para combatir el chancro bacteriano del tomate en cultivos a cielo abierto e invernadero.
- La actividad antimicrobiana de los AMPs podría aprovecharse para inhibir el desarrollo de otras cepas fitopatógenas del género *Clavibater* que afectan cultivos de interés agrícola, como por ejemplo la podredumbre anular en el cultivo de papa causado por *C. michiganensis ssp sepedonicum*.
- Con los complejos MSN/AMPs se podría formular un bio plaguicidas para desinfectar semillas, plántulas y plantas maduras de *S. lycopersicum* infectadas con *Cmm*.
- Sería interesante estudiar el efecto citotóxico de las MSN sobre la microbiota de *S. lycopersicum* a través de un análisis metagenómico.

CAPÍTULO IX. REFERENCIAS

- Alessi, A., Agnello, S., Buscarino, G., & Gelardi, F. M. (2013). Structural properties of core and surface of silica nanoparticles investigated by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(6), 810–816. <https://doi.org/10.1002/jrs.4292>
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Balas, F., Manzano, M., Horcajada, P., & Vallet-Regi, M. (2006). Confinement and controlled release of bisphosphonates on ordered mesoporous silica-based materials. *Journal of the American Chemical Society*, 128(25), 8116–8117. <https://doi.org/10.1021/ja062286z>
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., & Wilson, J. M. (1998). Human β -defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *Journal of Clinical Investigation*, 102(5), 874–880. <https://doi.org/10.1172/JCI2410>
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Capretti, G., Iametti, S., Manzoni, M., Piergiovanni, L., & Rollini, M. (2012). Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control*, 26(2), 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.046>
- Benezra, M., Penate-Medina, O., Zanzonico, P. B., Schaer, D., Ow, H., Burns, A., DeStanchina, E., Longo, V., Herz, E., Iyer, S., Wolchok, J., Larson, S. M., Wiesner, U., & Bradbury, M. S. (2011). Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2768–2780. <https://doi.org/10.1172/JCI45600>
- Bentley, R. (2009). Different roads to discovery; prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence β -lactams). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(6), 775–786. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0553-8>
- Bhushan, B. (2017). *Springer Handbook of Nanotechnology*.

Biswaro, L. S., Sousa, M. G. d. C., Rezende, T. M. B., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2018). Antimicrobial peptides and nanotechnology, recent advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00855>

Bouchoucha, M., C.-Gaudreault, R., Fortin, M.-A., & Kleitz, F. (2014). Mesoporous silica nanoparticles: selective surface functionalization for optimal relaxometric and drug loading performances. *Advanced Functional Materials*, 24(37), 5911–5923. <https://doi.org/10.1002/adfm.201400524>

Braun, K., Pochert, A., Lindén, M., Davoudi, M., Schmidtchen, A., Nordström, R., & Malmsten, M. (2016). Membrane interactions of mesoporous silica nanoparticles as carriers of antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 475, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.05.002>

Brogden, K. A., Ackermann, M., & Huttner, K. M. (1997). Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(7), 1615–1617. <https://doi.org/10.1128/aac.41.7.1615>

Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray, P. B., & Tack, B. F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(5), 465–478. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00180-8)

Cai, Z., Ye, Z., Yang, X., Chang, Y., Wang, H., Liu, Y., & Cao, A. (2011). Encapsulated enhanced green fluorescence protein in silica nanoparticle for cellular imaging. *Nanoscale*, 3(5), 1974–1976. <https://doi.org/10.1039/c0nr00956c>

Castillo, R. R., Lozano, D., & Vallet-Regí, M. (2020). Mesoporous silica nanoparticles as carriers for therapeutic biomolecules. *Pharmaceutics*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050432>

Chalupowicz, L., Barash, I., Reuven, M., Dror, O., Sharabani, G., Gartemann, K. H., Eichenlaub, R., Sessa, G., & Manulis-Sasson, S. (2017). Differential contribution of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. *Molecular Plant Pathology*, 18(3), 336–346. <https://doi.org/10.1111/mpp.12400>

Choi, J., Baek, K. H., & Moon, E. (2014). Antimicrobial effects of a hexapeptide KCM21 against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Pathology Journal*, 30(3), 245–253. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.02.2014.0011>

Conti, V., Romi, M., Parri, S., Aloisi, I., Marino, G., Cai, G., & Cantini, C. (2021). Morpho-physiological classification of italian tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.) According to drought tolerance during vegetative and reproductive growth. *Plants*, 10(9), 1-21. <https://doi.org/10.3390/plants10091826>

Cumplido-Nájera, C. F., González-Morales, S., Ortega-Ortíz, H., Cadenas-Pliego, G., Benavides-Mendoza, A., & Juárez-Maldonado, A. (2019). The application of copper nanoparticles and potassium silicate stimulate the tolerance to *Clavibacter michiganensis* in tomato plants. *Scientia Horticulturae*, 245(October 2018), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.007>

Dai, C., Guo, H., Lu, J., Shi, J., Wei, J., & Liu, C. (2011). Osteogenic evaluation of calcium/magnesium-doped mesoporous silica scaffold with incorporation of rhBMP-2 by synchrotron radiation-based μ CT. *Biomaterials*, 32(33), 8506–8517. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.090>

Davies, J. (2006). Where have all the antibiotics gone? *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17(5), 287–290. <https://doi.org/10.1155/2006/707296>

de León, L., Siverio, F., López, M. M., & Rodríguez, A. (2008). Comparative efficiency of chemical compounds for *in vitro* and *in vivo* activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection*, 27(9), 1277–1283. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.04.004>

Dey, R., & Raghuwanshi, R. (2020). Comprehensive assessment of growth parameters for screening endophytic bacterial strains in *Solanum lycopersicum* (Tomato). *Heliyon*, 6(10), e05325. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05325>

Ding, Y., Tang, S., Yu, B., Yan, Y., Li, H., Wei, J., & Su, J. (2015). *In vitro* degradability, bioactivity and primary cell responses to bone cements containing mesoporous magnesium-calcium silicate and calcium sulfate for bone regeneration. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(111). <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0779>

- Diosa, J., Guzman, F., Bernal, C., & Mesa, M. (2019). Formation mechanisms of chitosan-silica hybrid materials and its performance as solid support for KR-12 peptide adsorption : Impact on KR-12 antimicrobial activity and proteolytic stability. *Integrative Medicine Research*, 9(1), 890–901. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.11.029>
- Dubos, R. J. (1939a). Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity *in vitro*. *Journal of Experimental Medicine*, 70(1), 1–10. <https://doi.org/10.1084/jem.70.1.1>
- Dubos, R. J. (1939b). Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental pieuococcus infections in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 70(1), 11–18. <https://doi.org/10.1084/jem.70.1.11>
- Durack, E., Mallen, S., O'Connor, P. M., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., & Hudson, S. (2019). Protecting bactofencin A to enable its antimicrobial activity using mesoporous matrices. *International Journal of Pharmaceutics*, 558(2018), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.035>
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628–647. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>
- Fernandez de Caleyra, R., Gonzalez-Pascual, B., García-Olmedo, F., & Carbonero, P. (1972). Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*. *Applied Microbiology*, 23(5), 998–1000. <https://doi.org/10.1128/aem.23.5.998-1000.1972>
- Fleming, A. (1920). On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 93(653), 306-317. <https://doi.org/10.1098/rspb.1922.0023>
- Flynn, J., Mallen, S., Durack, E., O'Connor, P. M., & Hudson, S. P. (2019). Mesoporous matrices for the delivery of the broad spectrum bacteriocin, nisin A. *Journal of Colloid and Interface Science*, 537, 396–406. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.11.037>
- Food and agriculture organization. (2020). FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

- Franco, O. L. (2011). Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense. *FEBS Letters*, 585(7), 995–1000. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.008>
- Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., & Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106(2–3), 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.011>
- Gordon, Y. J., Romanowski, E. G., & McDermott, A. M. (2005). Mini review: a review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current Eye Research*, 30(7), 505–515. <https://doi.org/10.1080/02713680590968637>
- Gu, J., Huang, K., Zhu, X., Li, Y., Wei, J., Zhao, W., Liu, C., & Shi, J. (2013). Sub-150nm mesoporous silica nanoparticles with tunable pore sizes and well-ordered mesostructure for protein encapsulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 407, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.06.028>
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., & Schroder, J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin [6]. *Nature*, 387(6636), 861. <https://doi.org/10.1038/43088>
- Hoover, D. M., Rajashankar, K. R., Blumenthal, R., Puri, A., Oppenheim, J. J., Chertov, O., & Lubkowski, J. (2000). The structure of human β -defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32911–32918. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006098200>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in Microbiology*, 11(October), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Huang, M., Liu, L., Wang, S., Zhu, H., Wu, D., Yu, Z., & Zhou, S. (2017). Dendritic mesoporous silica nanospheres synthesized by a novel dual-templating micelle system for the preparation of functional nanomaterials. *Langmuir*, 33(2), 519–526. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03282>
- Huang, P. K., Lin, S. X., Tsai, M. J., Leong, M. K., Lin, S. R., Kankala, R. K., Lee, C. H., & Weng, C. F. (2017). Encapsulation of 16-hydroxycyclero-3,13-diene-16,15-olide in mesoporous silica nanoparticles as a natural dipeptidyl peptidase-4 inhibitor

potentiated hypoglycemia in diabetic mice. *Nanomaterials*, 7(5), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nano7050112>

Jafari, S. M. (2017). An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*, 1–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5.00001-X>

Järvå, M., Phan, T. K., Lay, F. T., Caria, S., Kvensakul, M., & Hulett, M. D. (2018). Human-defensin 2 kills *Candida albicans* through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-mediated membrane permeabilization. *Science Advances*, 4(7), 1–10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat0979>

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinsky, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Kachbouri, S., Mnasri, N., Elaloui, E., & Moussaoui, Y. (2018). Tuning particle morphology of mesoporous silica nanoparticles for adsorption of dyes from aqueous solution. *Journal of Saudi Chemical Society*, 22(4), 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2017.08.005>

Kalenik, B. M., Góra-Sochacka, A., & Sirko, A. (2018). B-defensins–underestimated peptides in influenza combat. *Virus Research*, 247(August 2017), 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.01.008>

Katiyar, A., Ji, L., Smirniotis, P. G., & Pinto, N. G. (2005). Adsorption of bovine serum albumin and lysozyme on siliceous MCM-41. *Microporous and Mesoporous Materials*, 80(1–3), 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2004.11.026>

Kaur, R., & Kaur, L. (2021). Encapsulated natural antimicrobials: a promising way to reduce microbial growth in different food systems. *Food Control*, 123(August 2020), 107678. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107678>

- Khazigaleeva, R. A., Vinogradova, S. V., Petrova, V. L., Fesenko, I. A., Arapidi, G. P., Kamionskaya, A. M., Govorun, V. M., & Ivanov, V. T. (2017). Antimicrobial activity of endogenous peptides of the moss *Physcomitrella patens*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 43(3), 248–254. <https://doi.org/10.1134/S1068162017030062>
- Knežević, N., & Durand, J. O. (2015). Large pore mesoporous silica nanomaterials for application in delivery of biomolecules. *Nanoscale*, 7(6), 2199–2209. <https://doi.org/10.1039/c4nr06114d>
- Küçükürkmen, B., & Rosenholm, J. M. (2021). *Mesoporous Silica Nanoparticles as Carriers for Biomolecules in Cancer Therapy* (F. Fontana & H. A. Santos (Eds.); pp. 99–120). Springer Nature Switzerland AG. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58174-9_5
- Lahiri, S., & Orr, D. (2018). Biological control in tomato production systems: theory and practice. In *Sustainable management of arthropod pests of tomato*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802441-6.00011-5>
- Laird, M., Piccoli, D., Weselowski, B., McDowell, T., Renaud, J., MacDonald, J., & Yuan, Z. C. (2020). Surfactin-producing bacillus velezensis 1B-23 and *Bacillus* sp. 1D-12 protect tomato against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Journal of Plant Pathology*, 102(2), 451–458. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00461-w>
- Lei, J., Sun, L. C., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., & He, Q. Y. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 11(7), 3919–3931.
- Li, L. li, & Wang, H. (2013). Enzyme-coated mesoporous silica nanoparticles as efficient antibacterial agents in vivo. *Advanced Healthcare Materials*, 2(10), 1351–1360. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300051>
- Liu, Z., Ma, P., Holtsmark, I., Skaugen, M., Eijsink, V. G. H., & Brurberg, M. B. (2013). New type of antimicrobial protein produced by the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5721–5727. <https://doi.org/10.1128/AEM.01065-13>

- Loos, M. (2015). Nanoscience and nanotechnology. In *Carbon Nanotube Reinforced Composites: CNR Polymer Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3195-4.00001-1>
- López Marín, L. M. (2016). Manual técnico del cultivo de tomate. In *Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA)*. <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf>
- Luo, L., Liang, Y., Erichsen, E. S., & Anwender, R. (2017). Monodisperse mesoporous silica nanoparticles of distinct topology. *Journal of Colloid and Interface Science*, 495, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.01.107>
- Luo, Z., Deng, Y., Zhang, R., Wang, M., Bai, Y., Zhao, Q., Lyu, Y., Wei, J., & Wei, S. (2015). Peptide-laden mesoporous silica nanoparticles with promoted bioactivity and osteo-differentiation ability for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 131, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.043>
- Martens, T. F., Remaut, K., Demeester, J., De Smedt, S. C., & Braeckmans, K. (2014). Intracellular delivery of nanomaterials: how to catch endosomal escape in the act. *Nano Today*, 9(3), 344–364. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.04.011>
- Meade, K. G., Cormican, P., Narciandi, F., Lloyd, A., & O'Farrelly, C. (2014). Bovine β -defensin gene family: opportunities to improve animal health? *Physiological Genomics*, 46(1), 17–28. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00085.2013>
- Meka, A. K., Abbaraju, P. L., Song, H., Xu, C., Zhang, J., Zhang, H., Yu, M., & Yu, C. (2016). A vesicle supra-assembly approach to synthesize amine-functionalized hollow dendritic mesoporous silica nanospheres for protein delivery. *Small*, 12(37), 5169–5177. <https://doi.org/10.1002/sml.201602052>
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Potocnik, I., Rekanovic, E., & Stepanovic, M. (2009). Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. *Pesticidi i Fitomedicina*, 24(1), 19–27. <https://doi.org/10.2298/pif0901019m>

- Mody, K. T., Popat, A., Mahony, D., Cavallaro, A. S., Yu, C., & Mitter, N. (2013). Mesoporous silica nanoparticles as antigen carriers and adjuvants for vaccine delivery. *Nanoscale*, 5(12), 5167–5179. <https://doi.org/10.1039/c3nr00357d>
- Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B., & Yuan, Z. C. (2018). *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), 2036–2050. <https://doi.org/10.1111/mpp.12678>
- Ohtani, K., Okada, T., Yoshizumi, H., & Kagamiyama, H. (1977). Complete primary structures of two subunits of purothionin A, a lethal protein for brewer's yeast from wheat flour. *Journal of Biochemistry*, 82(3), 753–767. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131752>
- Oliveira, L. F. A. D. M., Silva, L. V. D. A. T. ., Nascimento, T. G. ., Almeida, L., Calumby, R. J. N., Nunes, Á. M., Oliveira, L. M. T. D. M., & Fonseca, E. J. D. S. (2020). Antioxidant and antimicrobial activity of red propolis embedded mesoporous silica nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46(7), 1199–1208. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1782423>
- Ombiro, G. S. ombe, Sawai, T., Noutoshi, Y., Nishina, Y., Matsui, H., Yamamoto, M., Toyoda, K., & Ichinose, Y. (2018). Specific growth inhibitors of *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. campestris* pv. *campestris*, and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiological Research*, 215(4), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.06.005>
- Oppenheim, J. J., Biragyn, A., Kwak, L. W., & Yang, D. (2003). Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(2), 17–21. https://doi.org/10.1136/ard.62.suppl_2.ii17
- Palmero, P. (2021). Synthesis of ceramic powders by wet chemical routes. In M. B. T.-E. of M. T. C. and G. Pomeroy (Ed.), *Encyclopedia of Materials: Technical Ceramics and Glasses* (pp. 27–39). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818542-1.00035-7>
- Pang, J., Luan, Y., Yang, X., Jiang, Y., Zhao, L., Zong, Y., & Li, Z. (2012). Functionalized mesoporous silica particles for application in drug delivery system.

Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 12(8), 775–788.
<https://doi.org/10.2174/138955712801264855>

Parrotta, L., Aloisi, I., Faleri, C., Romi, M., Del Duca, S., & Cai, G. (2020). Chronic heat stress affects the photosynthetic apparatus of *Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom. *Plant Physiology and Biochemistry*, 154(July), 463–475.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.047>

Peritore-Galve, F. C., Tancos, M. A., & Smart, C. D. (2021). Bacterial canker of tomato: revisiting a global and economically damaging seedborne pathogen. *Plant Disease*, 105(6), 1–15. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1732-FE>

Rabert, C., Weinacker, D., Pessoa, A., & Fariás, J. G. (2013). Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 351–356. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000041>

Ramachandran, S., Dobhal, S., Alvarez, A. M., & Arif, M. (2021). Improved multiplex TaqMan qPCR assay with universal internal control offers reliable and accurate detection of *Clavibacter michiganensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 1–12. <https://doi.org/10.1111/jam.15017>

Romero, A. M., Vega, D., Pizzorno, R., Cordon, G., & Correa, O. S. (2018). Hydraulic and leaf reflectance alterations induced by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato plants. *European Journal of Plant Pathology*, 152(2), 567–572.
<https://doi.org/10.1007/s10658-018-1500-1>

Routsias, J. G., Karagounis, P., Parvulesku, G., Legakis, N. J., & Tsakris, A. (2010). *In vitro* bactericidal activity of human β -defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides*, 31(9), 1654–1660. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.010>

Sahare, P., Ayala, M., Vazquez-Duhalt, R., Pal, U., Loni, A., Canham, L. T., Osorio, I., & Agarwal, V. (2016). Enhancement of peroxidase stability against oxidative self-inactivation by co-immobilization with a redox-active protein in mesoporous silicon and silica microparticles. *Nanoscale Research Letters*, 11(1).
<https://doi.org/10.1186/s11671-016-1605-4>

Sánchez-López, E., Gomes, D., Esteruelas, G., Bonilla, L., Lopez-Machado, A. L., Galindo, R., Cano, A., Espina, M., Ettcheto, M., Camins, A., Silva, A. M., Durazzo,

A., Santini, A., Garcia, M. L., & Souto, E. B. (2020). Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: an overview. *Nanomaterials*, 10(2), 1–39. <https://doi.org/10.3390/nano10020292>

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>

Schröder, J. M., & Harder, J. (1999). Human beta-defensin-2. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(6), 645–651. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00013-8)

Schutte, B. C., Mitros, J. P., Bartlett, J. A., Walters, J. D., Jia, H. P., Welsh, M. J., Casavant, T. L., & McCray, P. B. (2002). Discovery of five conserved β -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2129–2133. <https://doi.org/10.1073/pnas.042692699>

Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J., Harwig, S. S., & Lehrer, R. I. (1985). Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 260(8), 4579–4584. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)89110-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)89110-4)

Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J., & Lehrer, R. I. (1983). Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 258(23), 14485–14489. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43888-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43888-9)

Selsted, M. E., Tang, Y. Q., Morris, W. L., McGuire, P. A., Novotny, M. J., Smith, W., Henschen, A. H., & Cullor, J. S. (1993). Purification, primary structures, and antibacterial activities of β -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6641–6648. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53298-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53298-1)

Semple, F., & Dorin, J. R. (2012). β -Defensins: Multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *Journal of Innate Immunity*, 4(4), 337–348. <https://doi.org/10.1159/000336619>

Seyfi, R., Kahaki, F. A., Ebrahimi, T., Montazersaheb, S., Eyvazi, S., Babaeipour, V., & Tarhriz, V. (2020). Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, functions and mechanism of action. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(3), 1451–1463. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09946-9>

Shamshiri, R. R., Jones, J. W., Thorp, K. R., Ahmad, D., Man, H. C., & Taheri, S. (2018). Review of optimum temperature, humidity, and vapour pressure deficit for microclimate evaluation and control in greenhouse cultivation of tomato: a review. *International Agrophysics*, 32(2), 287–302. <https://doi.org/10.1515/intag-2017-0005>

Sharabani, G., Manulis-Sasson, S., Chalupowicz, L., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Sofer, M., Frenkel, O., Dror, O., & Shtienberg, D. (2014). Temperature at the early stages of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection affects bacterial canker development and virulence gene expression. *Plant Pathology*, 63(5), 1119–1129. <https://doi.org/10.1111/ppa.12199>

Shi, H., Liu, S., Cheng, J., Yuan, S., Yang, Y., Fang, T., Cao, K., Wei, K., Zhang, Q., & Liu, Y. (2019). Charge-selective delivery of proteins using mesoporous silica nanoparticles fused with lipid bilayers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(4), 3645–3653. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b15390>

Shuvaev, V. V., & Muzykantov, V. R. (2014). Targeted modulation of reactive oxygen species in the vascular endothelium. *ACS Nano*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1021/nn2015453>. Targeted

Stec, B. (2006). Plant thionins - The structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(12), 1370–1385. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5574-5>

Swain, N., Pathak, J., & Hosalkar, R. M. (2018). Dyrk1a. In *Encyclopedia of Signaling Molecules*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_101613

Tancos, M. A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-sasson, S., & Smart, D. (2013). Tomato Fruit and Seed Colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through External and Internal Routes. <https://doi.org/10.1128/AEM.02495-13>

Tang, Y. Q., Yuan, J., Ösapay, G., Ösapay, K., Tran, D., Miller, C. J., Ouellette, A. J., & Selsted, M. E. (1999). A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. *Science*, 286(5439), 498–502. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.498>

Tay, D. K. S., Rajagopalan, G., Li, X., Chen, Y., Lua, L. H. L., & Leong, S. S. J. (2011). A new bioproduction route for a novel antimicrobial peptide. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(3), 572–581. <https://doi.org/10.1002/bit.22970>

Tenland, E., Pochert, A., Krishnan, N., Rao, K. U., Kalsum, S., Braun, K., Glegolamadejska, I., & Id, M. L. (2019). Effective delivery of the anti-mycobacterial peptide NZX in mesoporous silica nanoparticles. *PLoS One*, 14(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212858>

Tu, J., Boyle, A. L., Friedrich, H., Bomans, P. H. H., Bussmann, J., Sommerdijk, N. A. J. M., Jiskoot, W., & Kros, A. (2016). Mesoporous silica nanoparticles with large pores for the encapsulation and release of proteins. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(47), 32211–32219. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b11324>

Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., Nawaz, A., Cheema, S. A., Rehman, H. ur, Ashraf, I., & Sanaullah, M. (2020). Nanotechnology in agriculture: current status, challenges and future opportunities. *Science of the Total Environment*, 721, 137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>

Vega, D., & Romero, A. M. (2016). Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato debris under greenhouse conditions. *Plant Pathology*, 65(4), 545–550. <https://doi.org/10.1111/ppa.12444>

Waheed, K., Nawaz, H., Hanif, M. A., & Rehman, R. (2020). *Kinza Waheed, Haq Nawaz, Muhammad Asif Hanif, Rafia Rehman*. 631–644. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00046-X>

Wang, G. (2014). Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*, 7(5), 545–594. <https://doi.org/10.3390/ph7050545>

Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>

- Weiss, J., Takhistov, P., & McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71(9), 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x>
- Wibowo, D., & Zhao, C. X. (2019). Recent achievements and perspectives for large-scale recombinant production of antimicrobial peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 659–671. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9524-1>
- Wittmann, J., Brancato, C., Berendzen, K. W., & Dreiseikelmann, B. (2016). Development of a tomato plant resistant to *Clavibacter michiganensis* using the endolysin gene of bacteriophage CMP1 as a transgene. *Plant Pathology*, 65(3), 496–502. <https://doi.org/10.1111/ppa.12417>
- Wu, S. H., & Lin, H. P. (2013). Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3862–3875. <https://doi.org/10.1039/c3cs35405a>
- Xu, C., Lei, C., & Yu, C. (2019). Mesoporous silica nanoparticles for protein protection and delivery. *Frontiers in Chemistry*, 7(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00290>
- Xu, C., Yu, M., Noonan, O., Zhang, J., Song, H., Zhang, H., Lei, C., Niu, Y., Huang, X., Yang, Y., & Yu, C. (2015). Core-cone structured monodispersed mesoporous silica nanoparticles with ultra-large cavity for protein delivery. *Small*, 11(44), 5949–5955. <https://doi.org/10.1002/sml.201501449>
- Yan, Y., Li, Y., Zhang, Z., Wang, X., Niu, Y., Zhang, S., Xu, W., & Ren, C. (2021). Advances of peptides for antibacterial applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 202(8). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111682>
- Yokoyama, S., Kato, K., Koba, A., Minami, Y., Watanabe, K., & Yagi, F. (2008). Purification, characterization, and sequencing of antimicrobial peptides, Cy-AMP1, Cy-AMP2, and Cy-AMP3, from the Cycad (*Cycas revoluta*) seeds. *Peptides*, 29(12), 2110–2117. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.08.007>
- Zaffiri, L., Gardner, J., & Toledo-Pereyra, L. H. (2012). History of antibiotics. from salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*, 25(2), 67–77. <https://doi.org/10.3109/08941939.2012.664099>

Zeya, H. I., & Spitznagel, J. K. (1966). Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. II. Composition, properties, and mechanism of antibacterial action. *Journal of Bacteriology*, 91(2), 755–762. <https://doi.org/10.1128/jb.91.2.755-762.1966>

Zhou, Y., Quan, G., Wu, Q., Zhang, X., Niu, B., Wu, B., Huang, Y., Pan, X., & Wu, C. (2018). Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2), 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.007>

ANEXO 1. Transformación de células competentes

La transformación de células competentes se realizó por el método de choque térmico (Sambrook *et al.*,2001). Para ello, las células competentes (*E. coli* Mach1 T1 o *E. coli* Rosetta 2(DE3)) fueron llevadas a un baño de hielo donde se esperó hasta que se descongelaran completamente. De manera muy cuidadosa se adicionaron 1 μ L del DNAp a 100 ng/ μ L al microtubo y se mezcló golpeándolo ligeramente, inmediatamente se llevaron a un baño de hielo por 20 min. Culminado el periodo de incubación, los microtubos fueron colocados en un Thermoblock con una temperatura de 42 °C durante 45-50 s y rápidamente se regresaron al baño de hielo por 2 min. Después se agregaron 200 μ L de medio SOC (triptona al 2%, extracto de levadura al 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) al microtubo y se incubó a 37 °C por 90 min a 150 rpm. Al término de la incubación se tomaron 100 μ L y con ello se sembraron cajas Petri que contenían medio LB suplementado con el antibiótico de selección. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 16 h.

Las colonias que crecieron en la superficie de la placa fueron seleccionadas como las contenedoras del plásmido recombinante, las cuales fueron tomadas con un palillo estéril y sembradas en 5 mL de caldo LB suplementado con el antibiótico de resistencia. Los tubos fueron incubados a 37 °C por 8 h a150 rpm. Por último, la biomasa se concentró por centrifugación y se extrajo su ANDp utilizando el kit comercial ZR Plasmid Miniprep-Classic (Zymo Research, USA).



Article

Adsorption of Recombinant Human β -Defensin 2 and Two Mutants on Mesoporous Silica Nanoparticles and Its Effect against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Gabriel Marcelino-Pérez ¹, Roberto Ruiz-Medrano ², Salvador Gallardo-Hernández ^{3,*} and Beatriz Xoconostle-Cázares ^{2,*}

- ¹ Programa de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508, Ciudad de México 07360, Mexico; gabriel.marcelino@cinvestav.mx
 - ² Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508, Ciudad de México 07360, Mexico; rmedrano@cinvestav.mx
 - ³ Departamento de Física, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508, Ciudad de México 07360, Mexico
- * Correspondence: sgallardo@fis.cinvestav.mx (S.G.-H.); bxoconos@cinvestav.mx (B.X.-C.)



Citation: Marcelino-Pérez, G.; Ruiz-Medrano, R.; Gallardo-Hernández, S.; Xoconostle-Cázares, B. Adsorption of Recombinant Human β -Defensin 2 and Two Mutants on Mesoporous Silica Nanoparticles and Its Effect against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2144. <https://doi.org/10.3390/nano11082144>

Academic Editor: Daniela Iannazzo

Received: 17 July 2021

Accepted: 14 August 2021

Published: 23 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Solanum lycopersicum* L. is affected among other pests and diseases, by the actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), causing important economic losses worldwide. Antimicrobial peptides (AMPs) are amphipathic cationic oligopeptides with which the development of pathogenic microorganisms has been inhibited. Therefore, in this study, we evaluate antimicrobial activity of mesoporous silica nanoparticles (MSN5.4) loaded with human β -defensin-2 (h β D2) and two mutants (TRX-h β D2-M and h β D2-M) against *Cmm*. h β D2, TRX-h β D2-M and h β D2-M presented a half-maximum inhibitory concentration (IC₅₀) of 3.64, 1.56 and 6.17 μ g/mL, respectively. MSNs had average particle sizes of 140 nm (SEM) and a tunable pore diameter of 4.8 up to 5.4 nm (BJH). AMPs were adsorbed more than 99% into MSN and a first release after 24 h was observed. The MSN loaded with the AMPs inhibited the growth of *Cmm* in solid and liquid media. It was also determined that MSNs protect AMPs from enzymatic degradation when the MSN/AMPs complexes were exposed to a pepsin treatment. An improved AMP performance was registered when it was adsorbed in the mesoporous matrix. The present study could expand the applications of MSNs loaded with AMPs as a biological control and provide new tools for the management of phytopathogenic microorganisms.

Keywords: mesoporous silica nanoparticles; antimicrobial peptides; human β -defensin-2; peptide adsorption; peptide release

1. Introduction

One of the most important crops worldwide is tomato, the fruit of *S. lycopersicum* L., of which just in 2019 production exceeded 180 million tons [1]. Depending on the growth stage and environmental conditions, this crop can be negatively affected by stress, pests and diseases that not only cause damage to the stem and fruit, but also to the root system of the plant [2,3]. *Cmm* is a Gram-positive bacterium distributed worldwide that causes bacterial tomato canker disease, which can cause large economic losses to farmers if not treated properly and in a timely manner [4]. The use of contaminated seeds and asymptomatic transplants causes the propagation of the disease, detection methods are inefficient at differentiating *Cmm* from non-pathogenic *Clavibacter* strains [5]. However, the possibility exists to make detection methods more efficient by merging emerging and mature technologies. For example, the detection of pathogenic microorganisms by means of antibodies functionalized to nanomaterials [6]. The infection occurs in seeds at early stages or young seedlings. When infection occurs in adult plants it could be asymptomatic, eventually producing marketable fruits [4,7,8]. Depending on the climatic conditions and

Article

Recombinant Antigens Based on Non-Glycosylated Regions from RBD SARS-CoV-2 as Potential Vaccine Candidates against COVID-19

Leandro Núñez-Muñoz ^{1,†} , Gabriel Marcelino-Pérez ^{1,2,†} , Berenice Calderón-Pérez ¹ , Miriam Pérez-Saldívar ³, Karla Acosta-Virgen ³, Hugo González-Conchillos ³, Brenda Vargas-Hernández ¹, Ana Olivares-Martínez ¹, Roberto Ruiz-Medrano ¹, Daniela Roa-Velázquez ^{2,4}, Edgar Morales-Ríos ⁴ , Jorge Ramos-Flores ⁵, Gustavo Torres-Franco ⁵, Diana Peláez-González ⁵, Jorge Fernández-Hernández ⁵, Martha Espinosa-Cantellano ³, Diana Tapia-Sidas ¹, José Abrahan Ramírez-Pool ¹, América Padilla-Viveros ⁶ and Beatriz Xoconostle-Cázares ^{1,*}

¹ Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; leandro.nunez@cinvestav.mx (L.N.-M.); gabriel.marcelino@cinvestav.mx (G.M.-P.); berecalpe@yahoo.com.mx (B.C.-P.); byvargas@cinvestav.mx (B.V.-H.); olivaresmtz.ana@cinvestav.mx (A.O.-M.); rmedrano@cinvestav.mx (R.R.-M.); dianaa.tapia@cinvestav.mx (D.T.-S.); jramirezp@cinvestav.mx (J.A.R.-P.)

² Doctoral Program in Nanosciences and Nanotechnology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; daniela.roa@cinvestav.mx

³ Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; mperezs@cinvestav.mx (M.P.-S.); kbacosta@cinvestav.mx (K.A.-V.); hdgonzalez@cinvestav.mx (H.G.-C.); mespinosac@cinvestav.mx (M.E.-C.)

⁴ Department of Biochemistry, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; edgar.morales@cinvestav.mx

⁵ Laboratory Animal Production and Experimentation Unit, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; battousai_slayer@hotmail.com (J.R.-F.); franco308228727@gmail.com (G.T.-F.); dianapel94@hotmail.com (D.P.-G.); joferman@cinvestav.mx (J.F.-H.)

⁶ Transdisciplinary Doctoral Program in Scientific and Technological Development for Society, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; aviveros@cinvestav.mx

* Correspondence: bxoconos@cinvestav.mx; Tel.: +52-(55)-57473318

† These authors contributed equally as first authors.



Citation: Núñez-Muñoz, L.; Marcelino-Pérez, G.; Calderón-Pérez, B.; Pérez-Saldívar, M.; Acosta-Virgen, K.; González-Conchillos, H.; Vargas-Hernández, B.; Olivares-Martínez, A.; Ruiz-Medrano, R.; Roa-Velázquez, D.; et al. Recombinant Antigens Based on Non-Glycosylated Regions from RBD SARS-CoV-2 as Potential Vaccine Candidates against COVID-19. *Vaccines* **2021**, *9*, 928. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080928>

Academic Editor: Elena A. Govorkova

Received: 6 July 2021

Accepted: 18 August 2021

Published: 20 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The Receptor-Binding Domain (RBD) of the Spike (S) protein from Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has glycosylation sites which can limit the production of reliable antigens expressed in prokaryotic platforms, due to glycan-mediated evasion of the host immune response. However, protein regions without glycosylated residues capable of inducing neutralizing antibodies could be useful for antigen production in systems that do not carry the glycosylation machinery. To test this hypothesis, the potential antigens NG06 and NG19, located within the non-glycosylated S-RBD region, were selected and expressed in *Escherichia coli*, purified by FPLC and employed to determine their immunogenic potential through detection of antibodies in serum from immunized rabbits, mice, and COVID-19 patients. IgG antibodies from sera of COVID-19-recovered patients detected the recombinant antigens NG06 and NG19 ($A_{450\text{ nm}} = 0.80 \pm 0.33$; 1.13 ± 0.33 ; and 0.11 ± 0.08 for and negatives controls, respectively). Also, the purified antigens were able to raise polyclonal antibodies in animal models evoking a strong immune response with neutralizing activity in mice model. This research highlights the usefulness of antigens based on the non-N-glycosylated region of RBD from SARS-CoV-2 for candidate vaccine development.

Keywords: SARS-CoV-2; receptor binding domain; Spike protein; vaccine; viral glycosylation; prokaryotic expression



Citrus Genetic Transformation: An Overview of the Current Strategies and Insights on the New Emerging Technologies

Gabriela Conti^{1,2}, Beatriz Xoconostle-Cázares³, Gabriel Marcelino-Pérez³, Horacio Esteban Hopp^{1,4} and Carina A. Reyes^{5*}

¹ Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, UEDD INTA-CONICET, Hurlingham, Argentina, ² Cátedra de Genética, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, ³ Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico, ⁴ Laboratorio de Agrobiotecnología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular (FBMC), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, ⁵ Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata, CONICET-UNLP, Buenos Aires, Argentina

OPEN ACCESS

Edited by:

Vladimir Orbovic,
University of Florida, United States

Reviewed by:

Vicente Febres,
University of Florida, United States
Xiuping Zou,
Citrus Research Institute, Chinese
Academy of Agricultural Sciences
(CAAS), China

*Correspondence:

Carina A. Reyes
carinar@biol.unlp.edu.ar

Specialty section:

This article was submitted to
Technical Advances in Plant Science,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 31 August 2021

Accepted: 14 October 2021

Published: 30 November 2021

Citation:

Conti G, Xoconostle-Cázares B, Marcelino-Pérez G, Hopp HE and Reyes CA (2021) Citrus Genetic Transformation: An Overview of the Current Strategies and Insights on the New Emerging Technologies. *Front. Plant Sci.* 12:768197. doi: 10.3389/fpls.2021.768197

Citrus are among the most prevailing fruit crops produced worldwide. The implementation of effective and reliable breeding programs is essential for coping with the increasing demands of satisfactory yield and quality of the fruit as well as to deal with the negative impact of fast-spreading diseases. Conventional methods are time-consuming and of difficult application because of inherent factors of citrus biology, such as their prolonged juvenile period and a complex reproductive stage, sometimes presenting infertility, self-incompatibility, parthenocarpy, or polyembryony. Moreover, certain desirable traits are absent from cultivated or wild citrus genotypes. All these features are challenging for the incorporation of the desirable traits. In this regard, genetic engineering technologies offer a series of alternative approaches that allow overcoming the difficulties of conventional breeding programs. This review gives a detailed overview of the currently used strategies for the development of genetically modified citrus. We describe different aspects regarding genotype varieties used, including elite cultivars or extensively used scions and rootstocks. Furthermore, we discuss technical aspects of citrus genetic transformation procedures via *Agrobacterium*, regular physical methods, and magnetofection. Finally, we describe the selection of explants considering young and mature tissues, protoplast isolation, etc. We also address current protocols and novel approaches for improving the *in vitro* regeneration process, which is an important bottleneck for citrus genetic transformation. This review also explores alternative emerging transformation strategies applied to citrus species such as transient and tissue localized transformation. New breeding technologies, including cisgenesis, intragenesis, and genome editing by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR), are also discussed. Other

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

Latin American Protein Society
In collaboration with
Sociedad Mexicana de Bioquímica
certifie that

Gabriel Marcelino Pérez

presented the work

Nanoencapsulation lysozyme recombinantly produced in Escherichia coli in nanoparticles of mesoporous silica and chitosan

at

VI Latin American Protein Society Meeting and
VII Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas
20-23 October 2019, Mexico City



Dr. D. Alejandro Fernández Velasco
Organizing Committee