

**DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Registro Calificado según Resolución Número 10544 del Ministerio de Educación Nacional de Colombia (MEN) de Julio 14 20 de 2015.

			
SNIES: 54197	SNIES: 54197	SNIES: 54197	SNIES: 54197

Sin la publicación, la ciencia está muerta”

Gerard Piel, 1915-2004, ex-editor de *Scientific American*, quien contribuyó a la reinención de la revista y a la redefinición de la era moderna del periodismo científico, citado por Robert A. Day en “How to write and publish a scientific paper”, 1998, p. 8.

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL**

FECHA: OCTUBRE 21 DE 2020
ESTUDIANTE: **LILY JOHANNA TORO SEGOVIA**
DIRECTOR DEL TRABAJO: Doctor Germán Alberto Téllez

TITULO DEL TRABAJO:

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, EL EFECTO EN LA EXPRESIÓN DE TNF α INDUCIDA POR LPS Y LA CICATRIZACIÓN *IN VITRO* DE LAS OXYSTERLINAS 1, 2 Y 3 E IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES DE LA ESTABILIDAD EN SUERO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DERIVADOS”

EVALUACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN:

APLAZADO _____

APROBADO _____

MERITORIO ____X____

LAUREADO _____

Jurado 1:

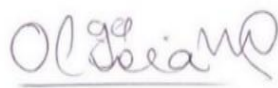
Doctor
OCTAVIO FRANCO, PhD.
Universidad de Católica Dom Bosco

Jurado 2

Doctor
JOSE RAFAEL DE ALMEIDA
Universidad regional amazónica Ikiam

Jurado 3:

Doctor
NESTOR IVAN CARDONA, PhD.
Universidad del Quindío
Armenia



Coordinadora del Doctorado:

Doctora
OLGA ALICIA NIETO CÁRDENAS PhD
Universidad del Quindío
Armenia



Evaluación de la actividad antimicrobiana, en la expresión de TNF α inducida por LPS, la cicatrización *in vitro* de las oxysterlinas 1, 2 y 3 e identificación de determinantes de la estabilidad en suero y de la actividad antimicrobiana de análogos sintéticos derivados.

Estudiante

Lily Johana Toro Segovia

Tutor

Germán Alberto Téllez Ramírez. MD. PhD

Cotutor

Jhon Carlos Castaño Osorio. MD. PhD

Tesis de Doctorado presentada como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas.

Universidad del Quindío

Octubre 23 del 2020



Agradecimientos:

Agradezco a los integrantes del comité tutorial, doctores Bruno Rivas Santiago. MD. PhD, Alejandra Ochoa. PhD y Cesar Rivas Santiago. PhD, por sus aportes, correcciones y apoyo durante estos cuatro años, al grupo de inmunología molecular (GYMOL), al centro de investigaciones biomédicas (CIBM), al parque de investigación biomédica de Barcelona (PRBB) y el co-tutor de la pasantía Dr David Andrew. PhD, por el apoyo en infraestructura, equipos y reactivos para el desarrollo de trabajo de investigación.

A mis padres (Amparo Segovia y Jesús Antonio) y amigos (Leidy Lorena, Diana Carolina Henao) por su compañía y apoyo durante estos años, a mi co-tutor y amigo Dr Jhon Carlos Castaño Osorio, por su tiempo de dedicación, colaboración y apoyo, finalmente quiero agradecer a mi compañero de vida, amigo y tutor Dr Germán Alberto Téllez Ramírez por su tiempo, dedicación y amor incondicional.

Financiación

Minciencias por el apoyo económico mediante la convocatoria 727 doctorados nacionales 2015 y el proyecto 1006 (Minciencias), 2019.

Resumen

El aumento de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos convencionales requiere acciones globales urgentes, incluido el desarrollo de nuevas terapias. Los péptidos de defensa del hospedero (HDP) representan alternativas potenciales en el tratamiento de infecciones multidrogo-resistentes (MDR). Los HDPs se estudiaron originalmente por sus actividades antimicrobianas directas contra bacterias infecciosas (Gram-positivas, Gram-negativas), virus y hongos. Además de estos efectos, también demuestran actividades inmunomoduladoras multifacéticas, que incluyen propiedades anti-inflamatorias selectivas, así como actividades de curación de heridas en modelos animales. Estas propiedades biológicas muestran un potencial en la aplicación clínica más allá del tratamiento de infecciones resistentes a los antibióticos. Las oxysterlinas 1, 2 y 3 son HDPs catiónicos identificados a partir del transcriptoma del escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum*. Sin embargo, no se conocen sus actividades y posibles aplicaciones biológicas. Por lo tanto, en este trabajo, propusimos caracterizar y evaluar las oxysterlinas 1, 2 y 3 sobre la actividad antimicrobiana, citotóxica, en el cierre de heridas *in vitro* y en la producción de TNF α en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) estimuladas con LPS. La actividad antimicrobiana se midió por microdilución en placa, y adicionalmente en condiciones de suero; así como, curvas tiempo-muerte para los tres péptidos. La actividad citotóxica se realizó mediante el método de microdilución en placa; la actividad en el cierre de heridas *in vitro*, se evaluó mediante un ensayo de curación de heridas por rasguño y el efecto sobre la producción de TNF α , se midió en PBMCs inducidas por LPS, además de



identificar determinantes de la estabilidad en suero y actividad antimicrobiana de análogos sintéticos derivados.

Este trabajo se dividió en tres fases. La fase 1, en donde se pudo caracterizar por bioinformática que estos HDPs muestran un péptido señal altamente conservado y un péptido maduro anfipático con una carga positiva (catiónica) (pI : 10,23–11,49) y una relación hidrofóbica (ΦH : 35–41). Las tres oxysterlinas tienen una estructura terciaria predicha de α -hélices confirmada por dicroísmo circular. También se clasificaron como nuevos miembros de la familia de las cecropinas de insectos. Tienen actividad antimicrobiana predominante contra bacterias Gram negativas, incluidas cepas resistentes a múltiples fármacos (MIC : 3,12–50 $\mu g / mL$). Estos HDPs tienen baja toxicidad contra los eritrocitos humanos (62,5–500 $\mu g/mL$), células Vero (250–500 $\mu g/mL$) y PBMCs (250–500 $\mu g/mL$). Además, inhiben la producción de $TNF\alpha$ en PBMCs estimuladas con LPS (6,25 $\mu g/mL$). La oxysterlina 1 (0,625 $\mu g/mL$) y 3 (0,312 $\mu g/mL$) inducen el cierre de heridas *in vitro*. A partir de estos resultados, se propuso una segunda fase midiendo su cinética antimicrobiana, en una curva tiempo-muerte, que mostró actividad bactericida dependiente de la concentración. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de las oxysterlinas 1 y 3 se vio afectada por las condiciones del suero. Se pudo inferir que la oxysterlina 3 posiblemente interactúa directamente con LPS, a través de un ensayo con diferentes momentos de interacción del péptido, las PBMCs, y el LPS, lo que podría explicar la inhibición de la producción de $TNF\alpha$ en PBMCs estimuladas con LPS. De acuerdo con la relación estructura/actividad, se diseñó el péptido [His18]ox1NH₂. En la última fase de este trabajo: el péptido modificado [His18]ox1NH₂ fue activo contra *E. coli* ATCC



25922, sin embargo, evidenciamos su degradación por suero humano después de 5 minutos de incubación identificando las fracciones principales, producto de su escisión. La fracción 2 se sintetizó y conservó su actividad antimicrobiana. Por lo tanto, la región amino-terminal de las oxysterlinas se identificó como un determinante para la actividad antibacteriana. En conclusión, las oxysterlinas 1, 2 y 3 hacen parte de la familia de las cecropinas, con MICs desde 3,12 a 50 $\mu\text{g/mL}$ con actividad principalmente contra bacterias Gram negativas, la oxysterlina 3 posiblemente interactuó con el lipopolisacárido y de esta forma module la expresión de la citoquina TNF alfa y la región amino terminal correspondiente a la secuencia FR2 (KRWRKFEKRVKKIFEHTKEA) es un determinante de la actividad de las oxysterlinas.

Abstract

The continuous increase of pathogenic microorganisms resistant to conventional antibiotics requires urgent global actions, including the development of new therapeutics. The Host Defense Peptides (HDPs) represent potential alternatives in the treatment of multidrug-resistant (MDR) infections. Cationic host defense (antimicrobial) peptides were originally studied for their direct antimicrobial activities against infectious bacteria (Gram-positive and Gram-negative), viruses, and fungi. In addition to these effects, they also demonstrate multifaceted immunomodulatory activities, including profound anti-infective and selective anti-inflammatory properties, as well as adjuvant and wound-healing activities in animal models. These biological properties show a clinical application potential beyond the treatment of antibiotic-resistant infections. Oxysterlins 1, 2, and 3 are putative cationic antimicrobial peptides identified from the transcriptome of the *Oxysternon conspicillatum* dung beetle. Therefore, in this work, we proposed initially to evaluate the Oxysterlins 1, 2, and 3 over the antimicrobial, cytotoxic, and *in vitro* wound healing activity; as well as the effect on the TNF α production of LPS stimulated PBMCs. Antimicrobial and cytotoxic activities were performed by plate microdilution method, *in vitro* wound healing activity was evaluated by scratch wound-healing assay and the effect on the TNF α production was measured on PBMCs induced by LPS. The antimicrobial activity also was measured in serum conditions and the time-killer curves were realized were performed the three peptides.

This work was divided into three phases. Phase 1: These HDP display a highly conserved signal peptide and a mature peptide, characterized by an overall positive charge (cationic) (pI: 10.23–11.49), a hydrophobic ratio (Φ H: 35–41), and amphipathicity. Oxysterlins 1, 2, and 3 have a linear α -helix structure using structure bioinformatics prediction and circular dichroism. Oxysterlins were classified as part new members of the insect cecropin family. They have predominant antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, including multidrug-resistant strains (3.12–50 μ g/mL) measured by plate microdilution. Furthermore, these HDP have low toxicity against human erythrocytes (62.5–500 μ g/mL), Vero (250–500 μ g/mL), and PBMCs (250–500 μ g/mL). Oxysterlin 1, 2, and 3 (6.25 μ g/mL) inhibit the TNF α production in PBMCs stimulated with LPS. Oxysterlin 1 (0.625 μ g/mL) and 3 (0.312 μ g/mL) induce *in vitro* wound closure. From these results, a second phase was proposed by measuring their kinetics, in a time-killing curve, which showed concentration-dependent bactericidal activity. Nevertheless, the antimicrobial activity of oxysterlins 1 and 3 was affected by serum conditions. The oxysterlin 3 possibly interacts directly with LPS, which explains the inhibition of TNF α production in PBMCs stimulated with LPS. According to the activity/structure relationship, a [His18]Ox1NH₂ peptide was designed. In the last phase of this work, the modified peptide [His18]Ox1NH₂ was active against *E. coli* ATCC 25922, however, we evidenced its degradation by human serum after 5 minutes of incubation identifying the main fractions, product of their cleavage. The fraction 2 was synthesized and conserved their antimicrobial activity. Therefore, the N-terminal region of the oxysterlins was identified as a determinant for the antibacterial activity.



Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	7
2. 1. OBJETIVO GENERAL	7
2. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3. 1. FASE 1	9
3. 1. 1. <i>Caracterización fisicoquímica, estructural in silico.</i>	9
3. 1. 2. <i>Síntesis química de los péptidos.</i>	10
3. 1. 3. <i>Evaluación de la actividad antibacteriana de los péptidos</i>	10
3. 1. 4. <i>Evaluación de la actividad citotóxica sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), células Vero y eritrocitos humanos.</i>	13
3. 1. 5. <i>Efecto de las oxysterlinas 1, 2 y 3 sobre la producción de TNFα inducido por lipopolisacárido (LPS) en PBMCs humanos.</i>	15
3. 1. 6. <i>Actividad de las oxysterlinas 1, 2 y 3 sobre la cicatrización in vitro en células HaCat.</i>	15
3. 2. FASE 2	17
3. 2. 1. <i>Curvas tiempo - muerte</i>	18
3. 2. 2. <i>Actividad antimicrobiana en presencia de suero</i>	19
3. 2. 3. <i>Análisis estructura/actividad de los péptidos oxysterlina 1 y 3.</i>	19
3. 2. 4. <i>Evaluación del efecto de la oxysterlina 3 en la producción de TNFα en PBMCs.</i>	20
3. 3. FASE 3	21
3. 3. 1. <i>Estabilidad en suero humano del péptido modificado [His18]Ox1NH₂</i>	21
3. 3. 2. <i>Síntesis química de las fracciones 1 y 2.</i>	23
3. 3. 3. <i>Análisis estructura actividad.</i>	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4. 1. FASE 1	25
4. 1. 1. <i>Las oxysterlinas 1, 2 y 3 son cecropinas de insectos catiónicas y con estructura α-hélice. Caracterización fisicoquímica y estructural.</i>	25
4. 1. 2. <i>Síntesis química de las oxysterlinas 1, 2 y 3.</i>	30
4. 1. 3. <i>Oxysterlinas, péptidos con actividad antimicrobiana contra bacterias de referencia Gram⁺, Candida parapsilosis y aislamientos clínicos MDR.</i>	31
4. 1. 4. <i>Las oxysterlinas presentan baja toxicidad sobre células de mamífero. Actividad citotóxica de las oxysterlinas sobre células Vero, PBMCs y eritrocitos humanos.</i>	35
4. 1. 5. <i>Las oxysterlinas disminuyen la producción de TNF-α inducida por lipopolisacárido en PBMCs humanos. Efecto de las oxysterlinas 1, 2 y 3 sobre la producción de TNF α inducida por lipopolisacárido en PBMCs humanos.</i>	38
4. 1. 6. <i>Las oxysterlinas 1 y 3 promueven el cierre de heridas in vitro en un modelo de queratinocitos humanos. Evaluación del cierre de heridas in vitro de células HaCaT bajo las oxysterlinas 1 y 3.</i>	44
4. 2. FASE 2:	3
4. 2. 1. <i>Las oxysterlinas 1, 2 y 3 tienen una actividad bactericida dependiente de la concentración. Curvas tiempo - muerte</i>	3
4. 2. 2. <i>Las oxysterlinas 1 y 3 pierden efectividad en medio de cultivo con suero fetal bovino. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las oxysterlinas 1 y 3 en presencia de suero.</i>	6



UNIVERSIDAD
DEL QUINDÍO



4. 2. 3. <i>Diseño y caracterización del péptido modificado [His18]Ox1NH₂, derivado de las oxysterlinas 1 y 3. Análisis estructura/actividad de las oxysterlinas 1 y 3, diseño del péptido modificado [His18]Ox1NH₂.</i>	8
4. 2. 3. <i>El péptido modificado [His18]Ox1NH₂ conserva la actividad contra E. coli ATCC 25922 y la inhibición del efecto del LPS sobre la producción de TNFα en PBMCs. Análisis físico-químico, estructural y evaluación de actividad del péptido modificado [His18]Ox1NH₂.</i>	9
4. 2. 4. <i>La inhibición del efecto del LPS sobre la producción de TNF α en PBMCs de la oxysterlina 3 se da probablemente por interacción directa con el LPS. Evaluación del efecto de la oxysterlinas 3 sobre la producción de TNF α en PBMCs estimulados con LPS en diferentes tiempos de adicción.</i>	11
4. 3. FASE 3:	14
4. 3. 1. <i>El péptido modificado [His18]Ox1NH₂ se corta a los 5 min de incubación en suero humano. Estabilidad del péptido modificado [His18]Ox1NH₂ en suero humano.</i>	14
4. 3. 2. <i>La fracción 2 (FR2) obtenida tras la incubación del péptido modificado [His18]Ox1NH₂ con suero humano es activa contra E. coli ATCC 25922. Actividad antibacteriana del péptido modificado [His18]Ox1NH₂ y las fracciones 1 y 2.</i>	18
5. CONCLUSIONES	20
6. PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA	21
7. RECOMENDACIONES	23
8. BIBLIOGRAFÍA	24

Lista de tablas:

Tabla 1. Péptidos de defensa del hospedero descritos para el orden coleóptera.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de las oxysterlinas.

Tabla 3. Actividad antibacteriana de las oxysterlinas 1, 2 y 3.

Tabla 4. Índices de selectividad de las oxysterlinas. Concentración mínima Inhibitoria de los péptidos contra *E. coli* ATCC 25922.

Tabla 5. Péptidos de la familia de las cecropinas con actividades inmunomoduladoras.

Tabla 6. Papel de diferentes péptidos antimicrobianos durante los eventos de cicatrización de heridas.

Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las tres oxysterlinas bajo condiciones de DMEM 1X y SFB al 2% comparadas con sus MICs sin SFB.

Tabla 8. Características fisicoquímicas de la oxysterlina 1 y 3.

Tabla 9. Secuencia de las fracciones 1 y 2 obtenidas a partir de la incubación del péptido modificado [His18]Ox1NH₂ en suero humano.

Lista de figuras:

Figura 1. Esquema general de la metodología.



Figura 2. Alineamiento múltiple para las oxysterlinas 1, 2 y 3.

Figura 3. Perfil de hidrofobicidad para las oxysterlinas 1, 2 y 3.

Figura 4. Predicción de la estructura terciaria de las oxysterlinas 1, 2 y 3 por RaptorX.

Figura 5. Espectro de dicroísmo circular de las oxysterlinas 1, 2 y 3.

Figura 6. Diagrama de rueda helicoidal realizado por Heliquest.

Figura 7. Citotoxicidad de las oxysterlinas 1, 2 y 3 a concentración de 1,95 - 500 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 8. Producción de $\text{TNF}\alpha$ (en veces) de PBMCs tratados con Lipopolisacárido de *E. coli*.

Figura 9. Cierre de heridas realizadas *in vitro* en células HaCat.

Figura 10. Curva tiempo/muerte de las oxysterlinas 1, 2 y 3.

Figura 11. Alineamiento múltiple realizado en QIAGEN CLC Genomics workbench, entre la oxysterlina 1 y 3.

Figura 12. Diagrama de rueda helicoidal y predicción estructural para el péptido [His18]Ox1NH₂.

Figura 13. Producción de $\text{TNF}\alpha$ (en veces) de PBMCs tratados con Lipopolisacárido de *E. coli* y oxysterlina 3.

Figura 14. Acción hipotética de la oxysterlina 3 en la modulación de la expresión de la citoquina $\text{TNF}\alpha$ por el lipopolisacárido en PBMCs humanos.

Figura 15. Perfil de disminución del péptido [His18]ox1NH₂ y aumento de las fracciones 1 y 2 (FR1, FR2) hasta los 60 minutos de incubación en suero humano.

Figura 16. Posibles sitios de corte del péptido modificado [His18]Ox1NH₂, durante 60 minutos de incubación en suero humano.

Figura 17. Alineamiento entre las secuencias oxysterlinas 1, 3, péptido modificado [His18]Ox1NH₂, FR1, FR2, análogoFR y coleocina.

Figura 18. Diagrama de hélice y predicción estructural de FR1 y FR2.



Lista de anexos:

Anexo S1. Perfil de resistencia a antibióticos y fichas técnicas de las cepas bacterianas.

Anexo S2. Datos de análisis estadístico entre las concentraciones citotóxicas versus el control de células.

Anexo S3. Cromatograma y espectro de masas de los péptidos sintetizados.

Lista de símbolos:

μM: micromolar.

μg: microgramos.

nm: nanomolar.

mL: mililitro.

Abreviaciones:

HDPs (Péptidos de Defensa del Hospedero).

AMPs (Péptidos Antimicrobianos).

ESBL (betalactamasa de espectro extendido).

ABR (antibiótico resistencia).

APD (Base de datos de péptidos antimicrobianos).

KDa (kilodaltons).

SFB (Suero Fetal Bovino).

EGF (Factor de crecimiento epidérmico).

ATCC (American Type Culture Collection).

TNFα (Factor de necrosis tumoral alfa).

PBMCs (Células mononucleares de sangre periférica).

aa (Aminoácidos).

APD (antimicrobial peptide database).

IC50 (The half maximal inhibitory concentration).

O. conspicillatum (*Oxystemon conspicillatum*).

TFE (alcohol trifluoroétilico).

PBS (fosfato buffer salino).

ED50 (Dosis efectiva 50).

TD50 (Dosis Toxica 50)

1. Introducción

La crisis de salud pública causada por la resistencia a los antibióticos (ABR) como la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, está superando rápidamente el desarrollo de tratamientos alternativos e influye en el aumento de enfermedades causadas por microorganismos como *E. coli* portador de betalactamasa de espectro extendido (ESBL) y resistente a las fluoroquinolonas; este fenómeno, afecta entre el 0,18 y 1,3% de la población adulta mayor [1]. Así mismo, las infecciones por *Klebsiella pneumoniae* resistente incrementan la mortalidad [2]. Estas infecciones causadas por bacterias resistentes generan 750.000 muertes al año a nivel mundial [3–6]. Por lo tanto, si no se instauran medidas de acción directas para prevenir, mitigar y contrarrestar el desarrollo de las bacterias multidrogo-resistentes, el número de muertes anuales por esta causa, podría alcanzar los 10 millones para 2050 [7]. Por lo que la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana es urgente, y constituye uno de los desafíos de la humanidad en el presente milenio.

La investigación en el desarrollo de nuevos antimicrobianos hace parte de las acciones para abordar este fenómeno global [7]. Los péptidos antimicrobianos (AMP) o péptidos de defensa del hospedero (HDPs) son una opción atractiva para desarrollar nuevos compuestos, debido a sus diversos mecanismos de acción antimicrobiana, actividad en múltiples fases de la inmunidad del hospedero y la poca capacidad de las bacterias para generar resistencia contra ellos [8]. Los HDPs son moléculas del sistema inmune innato que actúan como

primera línea de defensa contra las infecciones patógenas y se ha encontrado que son producidas por un amplio rango de especies, desde bacterias hasta mamíferos [9–11]. Estos péptidos desempeñan un papel esencial en los insectos, los cuales basan su defensa solo en la respuesta inmune innata [12]. Estas moléculas se han estudiado intensamente, no solo por su papel fisiológico en la inmunidad de los insectos, sino también como posibles alternativas para hacer frente a la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales [12–14]. Se les ha reportado efectividad contra bacterias (Gram-negativas, Gram-positivas e incluso cepas farmacorresistentes) [15–17], hongos (levaduras y filamentosos) [18,19], parásitos [20], algunos casos contra virus [21] e incluso, actividad anticancerígena [22,23]. Además, se han identificado actividades inmunomoduladoras multifacéticas, incluidas profundas propiedades anti-infecciosas y anti-inflamatorias selectivas [24–26], así como actividades en la curación de heridas, tanto *in vitro* como en modelos animales [26–28]. Estas propiedades biológicas sugieren que los HDPs de insectos y sus derivados sintéticos poseen un potencial clínico más allá del tratamiento de las infecciones resistentes a los antibióticos [8]. El desarrollo de fenómenos de resistencia por parte de las bacterias contra estos péptidos a corto plazo parece poco probable, sin embargo, se requiere mayor investigación [15,29].

Los insectos representan una fuente importante de HDPs ya que son la más grande y diversa clase de animales sobre la tierra, comprenden el 50% de todas las especies de animales conocidas, a partir de los cuales se han caracterizado 310 HDPs de los 3160 reportados en la base de datos APD (APD; <http://aps.unmc.edu/AP>) [30]. Los HDPs de insectos pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura y secuencia básica en tres grupos: 1) péptidos α -hélice,

los cuales carecen de residuos de cisteína (ej: cecropinas y moricinas); 2) péptidos ricos en cisteína con láminas beta (ej: defensinas y drosomicinas); y 3) péptidos lineales extendidos, a menudo caracterizados por una proporción alta de aminoácidos (aa), como prolina, arginina, triptófano, glicina e histidina, a este grupo pertenecen los péptidos ricos en prolina (ej: Apidaecinas, Drosomicinas y Lebocinas) y péptidos ricos en glicina (ej: Atacinas y Glovericinas) [12].

Dentro de este trabajo nos centramos en la familia de las cecropinas, que conforman una de las familias más abundantes de péptidos α -hélice en insectos. Dentro del orden coleóptera, se han descrito y caracterizado 19 HDPs a partir de 13 especies de escarabajos coprófagos (Scarabeidae) (**tabla 1**), principalmente coleopterinas y defensinas. Sin embargo, hasta la fecha solo hay 3 especies de coleoptera (*Acalolepta luxuriosa*, *Paederus dermatitis* y *Oxysternon conspicillatum* (*O. conspicillatum*)) con cecropinas descritas [12].

Tabla 1. Péptidos de defensa del hospedero descritos para el orden coleóptera.

	Nombre del péptido	Especie del escarabajo	Tipo de actividad	IC50	Familia de los péptido	Referencia
1	Péptido etanólico e isopropanólico	<i>Zophobas atratus</i>	Anticancerígena	0,8 mg/ml y 0,3 mg/ml respectivamente	Desconocida	[31]
2	CopA3	<i>Copris tripartitus</i>	Antibacteriana e inductor de apoptosis	4-8 μ g/mL (MIC - E. coli, S. aureus) 50 - 100 μ g/mL (dosis - dependiente)	Defensina	[32]

3	Tenecin 1, 3 y 4	<i>Tenebrio molitor</i>	Antibacteriana, anti, antifúngico y antibacteriano	6,25 y >100 µg/mL (MIC- <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>)	Defensina	[33,34]
4	Acaloleptina A1, A2 y A3	<i>Acalolepta Luxuriosa</i>	Antibacterianas	12,76 - 13,75 y 11,75 µg/mL (<i>E. coli</i>) y 1 µg/mL (<i>E. coli</i> K12 W3110).	Coleopterina y cecropina	[35,36]
5	Defensina de <i>A. dichotoma</i>	<i>Dichotomous dichotoma</i>	Antibacteriana	20 µg/mL (MRSA)	Defensina	[37]
6	Péptido/proteína antimicrobiana	<i>Onthophagus taurus</i>	Antibacteriana	1000 µg/mL (<i>E. coli</i>)	Desconocido	[38]
7	Defensina 1	<i>Tribolium castaneum</i> (flour beetle)	Antibacteriana	0,5 µg/mL (<i>S. aureus</i>)	Defensina	[39,40]
8	Col6	<i>Harmonia Axyridis</i>	Antibacteriana	64 µg/mL (<i>E. coli</i>)	Coleopterina	[41]
9	Defensina y coleopterina A y B	<i>Allomyrina dichotoma</i>	Antibacteriana y Antiinflamatoria	31,9 y 32 µg/mL 200 µg/mL	Defensina y coleopterinas	[37,42]
10	Clit-Def	<i>Calomera littoralis</i>	Antibacteriana	Predicción bioinformática	Defensina	[43]
11	Protainas 2	<i>Protaetia brevitarsis</i>	Antibacteriana	11, 12 - 4,52 µg/mL (<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i>).	Coleopterina	[44]
12	Holotricina	<i>Holotrichia diomphalia</i>	Antifúngica	Desconocido	Desconocido	[45]
13	Sarcotoxin Pd	<i>Paederus dermatitis</i>	Antibacteriana	6,12 µg/mL	Cecropina	[46]

Las cecropinas forman una de las familias más abundante de HDPs lineales α -helicoidales en insectos [13] y han mostrado una potente actividad antimicrobiana contra varios patógenos humanos de interés en salud, en bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus* o *S. epidermidis*) [47,48], cabe resaltar que esta actividad se ha reportado principalmente frente a bacterias Gram negativas incluidas cepas bacterianas MDR [49]. También pueden presentar una baja toxicidad contra células de mamíferos [24,50] y actividad anti-inflamatoria [48,51]. El uso de estos péptidos catiónicos (cecropinas) en la clínica se ha visto obstaculizada por la inestabilidad estructural, la degradación proteolítica, la toxicidad *in vivo* [55] y los altos costos de producción a gran escala [56]. Los altos costos de producción de familias de HDPs con secuencias muy largas comparado con las pequeñas estructuras de los antibióticos, también ha sido una limitante de la traslación de los péptidos en general al uso clínico [14]. Las cecropinas y sus análogos presentan ventajas con respecto a las demás familias de péptidos ya que generalmente tienen un bajo peso molecular (<4 KDa) y una estructura α -hélice, por lo que la síntesis química es una opción viable para su producción [56].

Dentro de los únicos tres coleópteros con cecropinas descritas está el escarabajo coprófago del neotrópico *Oxysternon conspicillatum*, el cual a nivel ecológico, es indicador biológico de perturbación antrópica [52], en su ciclo de vida, desde su estadio larval hasta el individuo adulto se alimenta de hongos, materia orgánica en descomposición y otros materiales orgánicos que se encuentren en las bolas de heces [53]. Estos escarabajos se han adaptado a estar constantemente expuestos a una gran cantidad y variedad de microorganismos y por lo tanto, en

un trabajo previo a este se realizó el secuenciamiento del transcriptoma completo a partir del ARN total extraído del cuerpo graso de una hembra adulta de *O. conspicillatum*, 16 horas después de ser inyectada con bacterias Gram-negativas fijadas en formalina al 10% [54], allí pudimos identificar 14 secuencias de HDPs pertenecientes a las familias de péptidos Defensinas, Attacinas, Coleopterinas y Cecropinas (datos no publicados). A partir de esta identificación, tres péptidos de la familia de las cecropinas fueron seleccionadas para el desarrollo de este proyecto de investigación; bajo la hipótesis de que estos péptidos podrían tener actividad antimicrobiana, además de su facilidad y menor costo para la obtención de los mismos por síntesis química, y por lo que nos cuestionamos: ¿Cuál es el potencial terapéutico y determinantes de la actividad de las oxysterlinas 1, 2 y 3?

2. Objetivos

2. 1. Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana, el efecto en la expresión de $TNF\alpha$ inducido por LPS, y la cicatrización *in vitro* de las oxysterlinas 1, 2 y 3 e identificar los determinantes tanto de la estabilidad en suero, como de la actividad antimicrobiana de análogos sintéticos derivados.

2. 2. Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antimicrobiana y citotóxica *in vitro* de las oxysterlinas 1, 2 y 3.
2. Evaluar el efecto en la modulación de la expresión de $TNF\alpha$ y en el cierre de heridas *in vitro* de las oxysterlinas 1, 2 y 3.
3. Determinar la estabilidad en suero humano de un péptido modificado a partir de la oxysterlina 1 y 3.
4. Identificar posibles determinantes de la actividad antimicrobiana de la oxysterlina 1 y 3.
5. Diseñar, sintetizar y evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los análogos a oxysterlinas 1 y 3.

3. Materiales y métodos

La metodología se dividió en tres fases así (figura 1): **Fase 1:** Caracterización fisicoquímica, estructural y evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana, citotóxica, en la producción de TNF α en PBMCs y en el cierre de heridas *in vitro*. **Fase 2:** Se profundizó en la actividad antimicrobiana realizando curvas tiempo-muerte y actividad antimicrobiana en condiciones de suero, se analizó la relación estructura/actividad y se profundizó en el efecto sobre la modulación de la expresión de TNF α de la oxysterlina 3, el cual se seleccionó de acuerdo al perfil de actividades evaluadas en la fase 1. Con estos resultados, se realizó el diseño y producción del péptido modificado [His18]Ox1NH2. **Fase 3:** Con el péptido modificado se evaluó la actividad antimicrobiana y su estabilidad en suero humano identificando las fracciones producto de la degradación por las proteasas del suero con su posterior síntesis química y evaluación antimicrobiana frente a *E. coli* ATCC 25922.

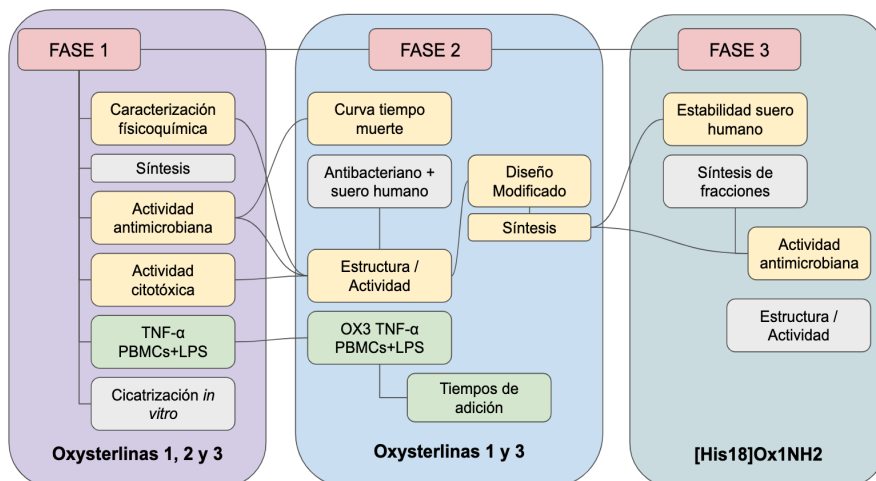


Figura 1. Esquema general de la metodología. El desarrollo de este trabajo se planteó en tres fases principales que involucran los objetivos del trabajo de forma transversal.

3. 1. Fase 1

3. 1. 1. Caracterización fisicoquímica, estructural *in silico*.

Se realizó un análisis *in silico* de las secuencias de los péptidos (oxysterlinas 1, 2 y 3). El péptido señal se identificó usando SIGNALP [55] (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), las características fisicoquímicas como peso molecular, punto isoeléctrico, número de aminoácidos, momento hidrofóbico fueron predichas con PROTPARAM [56] (<http://web.expasy.org/protparam/>) y bioedit [57]. El ángulo hidrofóbico fue calculado a partir del diagrama de rueda helicoidal realizado con Heliquest (<https://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>) [58]. La estructura secundaria fue predicha con PSIPRED [59] (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) y JPRED (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) y el modelamiento de la estructura terciaria fue realizado por RaptorX [62] y visualizado en CHIMERA [60].

El espectro de DC fue realizado para estimar el porcentaje de contenido de α -hélice y estabilidad de las secuencias. Los péptidos se prepararon en solución acuosa de alcohol trifluoroetílico (TFE) al 30% a una concentración de péptido de 100 μ M.

El espectro de dicroísmo circular fue medido en una celda de cuarzo en un espectrofotómetro termostato Jasco J-810 [61]. El espectro de dicroísmo circular resultó de un porcentaje de cuatro escáneres obtenido por datos colectados en intervalos de 0,1 nm desde 190 a 260 nm a temperatura ambiente.

3. 1. 2. Síntesis química de los péptidos.

Los péptidos fueron sintetizados de forma carboxiamida C-terminal utilizando el sintetizador *prelude peptide synthesizer* (Protein Technologies) a una escala de 0,1 mmol con la resina Fmoc-Rink-amide ChemMatrix, utilizando DIEA (N, N-Diisopropiletilamina) y/o DIC (N, N'-Diisopropylcarbodiimide) para la fase de acoplamiento y DMF (N,N-Dimethylformamide) como disolvente. Para eliminar el Fmoc se utilizó piperidina al 20%. Después del ensamblaje del péptido la desprotección y la escisión completa se realizó con ácido trifluoroacético/agua/Triisopropilsilano (TFA/H₂O/TIS) (95: 2,5: 2,5 v/v, 90 min a temperatura ambiente). La precipitación de los péptidos se hizo con dietil éter enfriado y después fueron liofilizados.

Todos los péptidos fueron diluidos en agua tipo 1 y se tomo una alícuota de 20 µL para analizarlos por RP-HPLC (del inglés Reverse Phase - High pressure liquid chromatography) en una Columna preparativa Luna C18 (2) 100Å (250 mm × 21.2 mm, 10 µm; H17-218793) y LC - MS (Liquid chromatography - Mass spectrometry) usando el equipo LC - MS 2010EV (Shimadzu) equipado con una columna XBridge C18 (4,6 mm × 150 mm, 3,5 µm, Waters, Cerdanyola del Vallès, España).

3. 1. 3. Evaluación de la actividad antibacteriana de los péptidos

Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* (ESBL) (aislamiento clínico), *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 105663, *Enterobacter cloacae* (aislamiento clínico), *Salmonella typhimurium* (aislamiento clínico), *Staphylococcus*

epidermidis (aislamiento clínico), *Staphylococcus saprophyticus* (aislamiento clínico), *Staphylococcus aureus* 02180344 (aislamiento clínico), *Candida parapsilosis* ATCC 22019, fichas técnicas de las bacterias (anexo S1).

La actividad antibacteriana de los péptidos fue evaluada por microdilución en placa como se describió previamente en el método clásico de National Committee of Laboratory Safety and Standards (NCLSS) [62], modificado respecto a la lectura de la placa, utilizando resazurina como un indicador metabólico para incrementar la sensibilidad de la prueba respecto al crecimiento de las bacterias [63–65]. Brevemente, las bacterias fueron sembradas e incubadas toda la noche en medio Müller Hinton y a partir de este inóculo se tomó una alícuota en medio fresco, se incubó por 2 horas más y se ajustó la absorbancia a 0,4 en 570 nm, con este OD se realizó una dilución 1:1000 (aproximadamente $2-5 \times 10^5$ UFC/mL). Se adicionaron 45 μ L de esta dilución bacteriana y 5 μ L de péptido a concentraciones finales desde 0,2 μ g/mL a 100 μ g/mL por pozo, utilizando placas de polipropileno de 96 pozos, cada concentración se evaluó por triplicado, se incubó a 37°C por 12 horas y se adicionaron 5 μ l de resazurina (concentración final 44 μ M); se incubó por 2 horas adicionales y se realizó la lectura de absorbancia en espectrofotómetro EPOCH (Biotek) o lectura de fluorescencia en fluorómetro Synergy HTX (Biotek); para analizar las medidas de absorbancia se tomaron a 570 y 603 nm. Se calculó el delta (A570nm-A603nm) y para calcular el porcentaje de crecimiento en un pozo dado “X”, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de crecimiento por pozo} = \frac{(\text{Delta de X}) - (\text{Delta blanco})}{(\text{Delta bacterias}) - (\text{Delta blanco})} * 100$$

Siendo, **X**: cada pozo

Delta del blanco: mediana de las absorbancias de los controles de medio.

Delta de las bacterias: mediana de las absorbancias de los controles de bacterias.

Por fluorescencia se tomaron en unidades relativas de fluorescencia (URF) con filtros excitación 565/10; emisión 600/40 con ganancia automática. Para calcular el porcentaje de crecimiento en un pozo dado “X”, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de crecimiento por pozo} = \frac{X \text{ URF} - \text{Blanco URF}}{\text{Bacterias URF} - \text{Blanco URF}} * 100$$

Siendo “X” el pozo en cuestión, el “blanco” es la mediana de los controles de medio o controles negativos y “bacterias” es la mediana de los controles de bacterias o controles positivos.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) fue definida como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible del microorganismo [66]. Para cada péptido se calculó además el índice de selectividad, que relaciona la concentración efectiva terapéutica que inhibe el 50% de crecimiento del microorganismo (ED50) y la concentración efectiva tóxica que induce el 50% de la toxicidad celular (TD50). Estas fueron calculadas a partir de un modelo de regresión no lineal de relación dosis-respuesta utilizando el programa Graphpad Prism 7.0, utilizando los datos de la microdilución en placa de las actividades antimicrobianas contra *E. coli* ATCC 25922 y citotóxicas.

Índice de selectividad = TD50/ED50

3. 1. 4. Evaluación de la actividad citotóxica sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), células Vero y eritrocitos humanos.

La actividad citotóxica de las oxysterlinas 1, 2 y 3 se realizó por microdilución en placa midiendo la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y células Vero ATCC®CCL-81™, utilizando resazurina como indicador de metabolismo celular activo. Los PBMCs se aislaron de un individuo sano, con el procedimiento basado en la sedimentación de las células a través de una barrera de densidad de 1,077 g/mL dejando en la interfase los PBMCs [67]. Posteriormente fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco 11875-093) sin suplementar. Se sembraron 250.000 células por pozo en una placa de 96 pozos y se incubaron por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂ previo a la adición de los péptidos a evaluar. Las células Vero se sembraron a 22.500 células por pozo en placas de cultivo celular de 96 pozos (ATCC:CCL-81), cultivadas en medio DMEM (Life Technologies 12100-046, New York, USA) suplementado con penicilina/estreptomicina (Sigma A5955) 10000 unidades/mL, L-glutamina 1X (200 mM) (gibco 25030-081), y suero fetal bovino al 2% v/v; mantenidas a 37°C y 5% CO₂.

Se adicionaron 10 µL/pozo de las oxysterlinas 1, 2 o 3 en diluciones seriadas, para un rango de concentraciones finales por pozo entre 500 a 1,95 µg/mL por triplicado, se incubó de 16 a 24 horas y se adicionó resazurina a una concentración final de 44µM a cada pozo y se incubó por 2 horas adicionales a 37°C y 5% CO₂. Al final se midió la absorbancia a 570 nm y 670 nm en

espectrofotómetro EPOCH (biotek, USA). Se utilizó como control de toxicidad tritón X100 al 0,5%, como control de crecimiento células en medio de cultivo correspondiente y como blanco medio solo. Se calculó el delta como se describió anteriormente. Al valor obtenido se le restó el valor de absorbancia del blanco y se calculó el porcentaje de actividad metabólica de acuerdo al control de crecimiento de las células como 100%.

La actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos fue evaluada para las oxysterlinas 1, 2 y 3 [68]. Se tomaron 4 mililitros de sangre de un individuo sano en tubo seco con EDTA al 1 mM (ácido Etilen diamino tetra acético) (Sigma-Aldrich. E6758. USA), se centrifugaron a 800 g por 10 min a temperatura ambiente. Los eritrocitos fueron lavados 3 veces con PBS 1X (NaCl 130mM; KCl 3mM; Na₂HPO₄ 8mM y K₂HPO₄ 1,5mM; pH 7,4) y a partir de estos se preparó una dilución a 1:250 en PBS 1X; se incubaron a 37°C por 15 min. Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas de los péptidos desde 1,95 a 500 µg/mL y en placas de polipropileno de 96 pozos se adicionaron por triplicado 10 µL del péptido a evaluar junto con 90 µL de eritrocitos por pozo; se incubó por 2 horas a 37°C y se centrifugó la placa a 2000 g por 15 min; se tomó el sobrenadante y se leyó su absorbancia a 540 nm, el porcentaje de hemólisis se calculó restando el blanco de eritrocitos en PBS 1X a todas las muestras y calculando el porcentaje de hemólisis respecto al control con tritón X100 al 0,5% v/v (100% de hemólisis).

3. 1. 5. Efecto de las oxysterlinas 1, 2 y 3 sobre la producción de TNF α inducido por lipopolisacárido (LPS) en PBMCs humanos.

Se midió el efecto de los péptidos sobre la expresión de TNF α en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs). Brevemente, se cultivaron 250.000 PBMCs por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos (Cellstar, greiner bio-one, cat-N°655180). Posteriormente, se trataron las células control con 10 ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, LPS 026:B6, Sigma Aldrich L2654) y medio de cultivo celular. Se evaluaron células con el péptido en la concentración mayor y células con los tratamientos con diferentes concentraciones del péptido con y sin LPS, con cada condición por triplicado. Se realizó una primera evaluación pre incubando cada péptido con LPS por 30 minutos, para posteriormente ser adicionados a las células al mismo tiempo que los controles antes mencionados. Se incubaron las células por 12 horas a 37°C y 5% de CO₂; se colectó el sobrenadante y se reemplazó con 100 μ L de medio de cultivo celular con 44 μ M de resazurina con el fin de evaluar la viabilidad celular al final del ensayo. Con los sobrenadantes colectados se midió la producción de TNF α por ELISA (Human TNF α ELISA MAX, BioLegend), siguiendo las instrucciones del fabricante [69,70].

3. 1. 6. Actividad de las oxysterlinas 1, 2 y 3 sobre la cicatrización *in vitro* en células HaCat.

El ensayo de herida o ruptura *in vitro* fue utilizado para medir migración celular con células de queratinocitos humanos (HaCaT, ATCC PCS200011) en medio de cultivo celular: DMEM 1X (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium, L-

glutamina 200 mM y piruvato de sodio al 1 mM) suplementado con SFB al 2% v/v.

El ensayo de migración celular se llevó a cabo siguiendo el protocolo adaptado de Carretero, 2008 [71] con algunas modificaciones [65]. Brevemente, primero se marcó el dorso de una placa de 24 pozos (Thermo scientific, Dinamarca) con líneas horizontales cada 0,5 cm. Posteriormente, se trataron con colágeno de piel de ternera (C8919, Sigma aldrich) a 1 mg/mL en PBS 1X durante 4 horas a 37°C, se retiró el contenido y se dejó secar por evaporación. Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células/mL con 1 mL por pozo. Estas células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂, durante 12-18 horas.

Después de observar la monocapa en cada uno de los pozos, las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X (NaCl 130 mM; KCl 3 mM; Na₂HPO₄ 8 mM y K₂HPO₄ 1,5 mM; pH 7,4). Posteriormente, se realizó la abrasión *in vitro* pasando una punta estéril de 200 µL en la mitad de cada pozo de arriba hacia abajo utilizando una punta nueva por cada pozo. De nuevo, se lavaron las células tres veces con PBS 1X. Se recubrieron con 200 µL de fibronectina (Bovine Plasma Fibronectin Ref PHE0023, Invitrogen) a una concentración final de 5 µg/mL por 1 hora a 37°C y 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se adicionaron 1 mL/pozo de controles y tratamientos por triplicado. Como controles se utilizó: Factor de crecimiento epidérmico (EGF) (AF-100-15, Prepotech) a una concentración final en el pozo de 40 ng/mL y medio de cultivo celular. Así como los péptidos a la concentración mínima inhibitoria y diez veces menos esta concentración; las células se

incubaron por 48 horas a 37°C y 5% de CO₂ y se realizó seguimiento fotográfico cada 12 horas (0, 12, 24, 36 y 48 horas), cada pozo fue fotografiado en los mismos cuatro segmentos cada vez siguiendo una marca realizada a la placa antes del ensayo y siguiendo el cierre de la herida campo por campo hasta su cierre.

Para el análisis de los datos se calculó el área de la herida para cada pozo en cada tiempo correspondiente con el Software ImageJ (versión 1.5) y posteriormente se realizó el cálculo del cierre de la herida para cada tiempo, se tomaron 4 campos por cada pozo a 40X en el microscopio de fluorescencia invertido EVOS FL. El porcentaje de cierre de la herida se obtuvo: La medida de la herida se comparó en cada campo específico, consigo mismo en el tiempo y posteriormente se sustrajeron las áreas para hallar el área migrada por cada campo a través del tiempo. Posteriormente, se hizo una relación con respecto al total de la herida para hallar el porcentaje de cierre por cada campo; obteniendo 4 medidas por pozo por triplicado, por lo tanto, 12 medidas por tratamiento por tiempo, y se utilizó la fórmula:

Porcentaje de cierre = ((área inicial - área X)/área inicial) * 100).

3. 2. Fase 2

A partir de los resultados obtenidos en la fase 1, se profundizó en la actividad antimicrobiana realizando curvas tiempo-muerte y analizando la relación estructura/actividad. Así mismo, se evaluó la actividad antimicrobiana en condiciones de suero y se profundizó sobre la modulación de la expresión de

TNF α por parte de uno de los péptidos, el cual se seleccionó de acuerdo al perfil de actividades evaluadas en la fase 1. Con estos resultados, se realizó el diseño y producción de un péptido modificado.

3. 2. 1. Curvas tiempo - muerte

Las curvas tiempo - muerte de las oxysterlinas 1, 2 y 3 se realizaron siguiendo el mismo protocolo descrito por Baranska [72], con algunas modificaciones, usando 0,5, 1, 2 y 4 veces la MIC de los péptidos con *Escherichia coli* ATCC 25922. La bacteria fue crecida y ajustada a una densidad óptica de 0,4 en 570 nm ($3-5 \times 10^8$ UFC/mL). Este inóculo fue diluido 1:20 ($6-10 \times 10^6$ UFC/mL) con medio Müller Hinton fresco y se adicionaron 45 μ L a los pozos junto con 5 μ L del péptido por diferentes tiempos de incubación (0, 30, 60, 120 y 180 minutos), después de los cuales, para cada tiempo correspondiente se adicionaron 5 μ L de resazurina a una concentración final de 44 μ M y se incubó por 2 horas adicionales para después medir la absorbancia a 570/603 nm [72].

La conversión de los datos de UFC/mL versus resorufina se obtuvo con una curva de control de crecimiento de la bacteria *E. coli* ATCC 25922, la cual se hizo a partir de la misma dilución de las bacterias que se utilizó para todo el ensayo. Los diferentes tiempos de la curva se midieron a través de dos métodos: 1. Por plateo y conteo de las UFC/mL en platos de 10 cm con agar Müller Hinton después de la incubación por 12 horas a 37°C y 2. Por adición de 10 μ L de resazurina a 44 μ M e incubación a 37°C por 2 horas y lectura por espectrofotometría a 570-603 nm para realizar la conversión de estos datos de

resazurina a resorufina. Se realizó una regresión con estos dos parámetros con el fin de obtener la ecuación de la curva de la conversión de resorufina versus UFC/mL. Con esta ecuación se extrapolaron los datos en UFC/mL de la curva tiempo-muerte de resazurina a resorufina (A570-603 nm).

3. 2. 2. Actividad antimicrobiana en presencia de suero

La actividad antimicrobiana de los péptidos se evaluó en las mismas condiciones en las que se realizó la evaluación citotóxica con el fin de observar que los suplementos del medio como L-glutamina y el Suero Fetal Bovino (SFB) no influyeran en la actividad antimicrobiana de los péptidos. Se evaluó la actividad antimicrobiana por microdilución en placa en condiciones de DMEM 1X y 10% de suero fetal bovino, bajo estas condiciones se utilizó la bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922.

3. 2. 3. Análisis estructura/actividad de los péptidos oxysterlina 1 y 3.

Se calcularon las características fisicoquímicas como carga neta y porcentaje de hidrofobicidad con la herramienta Antimicrobial Peptide Calculator and Predictory (APD3) y el ángulo hidrofóbico de las secuencias de interés se calculó a partir del diagrama de hélice realizado con la herramienta Heliquest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>), estas características se relacionaron con la actividad antimicrobiana, adicionalmente se construyó un alineamiento global de las secuencias por Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y

se identificaron los residuos más relevantes en las variaciones que fueran sinónimas y no sinónimas y que pudieran explicar las variaciones en la actividad y características fisicoquímicas. A partir de allí se realizó el diseño y producción por síntesis química de un péptido modificado.

3. 2. 4. Evaluación del efecto de la oxysterlina 3 en la producción de TNF α en PBMCs.

Se profundizó en el efecto de la oxysterlina 3 sobre la expresión de TNF α en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) como se describió en el ítem 3.1.5. **“Efecto de las oxysterlinas 1, 2 y 3 sobre la producción de TNF α inducido por lipopolisacárido (LPS) en PBMCs humanos”** de la fase 1, con modificaciones en los tiempos de adicción e inducción en caso del control de LPS. Brevemente, se cultivaron 250.000 PBMCs por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos (Cellstar, greiner bio-one, cat-N°655180). Las células control de inducción de la producción de TNF α fueron tratadas con 10 ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, LPS 026:B6, Sigma Aldrich L2654) y con medio de cultivo como control basal. Las células fueron tratadas con el péptido a 6,25 μ g/mL en presencia y ausencia de LPS siendo este último adicionado a en diferentes momentos:

1. Se pre-incubó la oxysterlina 3 a una concentración de 6,25 μ g/mL con 10 ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, LPS 026:B6, Sigma Aldrich L2654) por 30 minutos y posteriormente se adicionaron a los PBMCs.

2. Se adicionó LPS (*Escherichia coli*, LPS 026:B6, Sigma Aldrich L2654) en tres diferentes pozos que tenían previamente el cultivo de PBMCs, se incubó por 3 horas y posteriormente se adicionó la oxysterlina 3 a (6,25 µg/mL).
3. Se adicionó oxysterlina 3 a (6,25 µg/mL) en tres diferentes pozos que tenían previamente el cultivo de PBMCs, se incubó por 3 horas y posteriormente se adicionó LPS (*Escherichia coli*, LPS 026:B6, Sigma Aldrich L2654).
4. Se adicionó LPS (*Escherichia coli*, LPS 026:B6, Sigma Aldrich L2654) en pozos diferentes, se incubó por 3 horas, después se realizaron tres lavados con PBS 1X (NaCl 130mM; KCl 3mM; Na₂HPO₄ 8mM y K₂HPO₄ 1,5mM; pH 7,4) y posteriormente, se adicionó oxysterlina 3 a (6,25 µg/mL).
5. Se adicionó oxysterlina 3 a (6,25 µg/mL) en tres pozos diferentes, se incubó por 3 horas, después se realizaron tres lavados con PBS 1X (NaCl 130mM; KCl 3mM; Na₂HPO₄ 8mM y K₂HPO₄ 1,5mM; pH 7,4) y posteriormente, se adicionó LPS (*Escherichia coli*, LPS 026:B6, Sigma Aldrich L2654) .

Cada tratamiento se hizo por triplicado, se incubó toda la noche, con los sobrenadantes colectados se midió la producción de TNF α por ELISA (Human TNF α ELISA MAX, BioLegend), siguiendo las instrucciones del fabricante [69,70].

3. 3. Fase 3

3. 3. 1. Estabilidad en suero humano del péptido modificado [His18]Ox1NH₂

Para evaluar la estabilidad en suero humano del péptido [His18]Ox1NH₂ (GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKEALPVVQGVAVATAVGRR), se siguió el protocolo de Pérez y colaboradores [73]. Brevemente, Para el tiempo 0, se

tomaron 500 μL de suero humano y se mezclaron con 20 μL de ácido perclórico al 10% (v/v en agua) (agente precipitante, el cual no precipita el péptido (evaluado previamente)) y posteriormente 500 μL de péptido a una concentración final de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como control de detección del péptido en el ensayo.

Para los tiempos posteriores (5, 15, 30 y 60 minutos) se incubó 500 μL del péptido a una concentración final de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ junto con 500 μL de suero humano (Sigma, St Louis, Missouri; ref. H4522) y se tomaron alícuotas de 120 μL a los tiempos determinados. Inmediatamente posterior a la toma de la alícuota la reacción de proteólisis fue parada con 20 μL de ácido perclórico al 10% (v/v en agua) e incubó por 30 min a 4°C. Se incluyeron los controles de suero y péptido solos. Una vez recogidas las alícuotas, fueron centrifugadas a 13.000 g por 10 min, con el fin de separar el sobrenadante y la fracción insoluble. Los sobrenadantes fueron analizados por RP-HPLC, inyectando 20 μL en el equipo LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado con una columna Luna C18 (4.6 mm \times 50 mm, 3 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA) usando un gradiente lineal de solvente A (0,045% de TFA en agua) a solvente B (0,036% TFA en acetonitrilo [ACN]) por 15 minutos a un caudal de 1 mL / min y detección UV a 220 nm. Durante la recolección del gradiente se identificaron los picos más representativos a las fracciones producto de la degradación del péptido y se verificó su identidad molecular por espectrometría de masas.

El análisis de MS se realizó en un instrumento LC - MS 2010EV (Shimadzu) equipado con una columna XBridge C18 (4,6 mm \times 150 mm, 3,5 μm , Waters,

Cerdanyola del Valles, España), eluyendo con un gradiente lineal de C (0,1% de ácido fórmico en H₂O) a D (0,08% de ácido fórmico [FA] en ACN) durante 15 minutos a una velocidad de flujo de 1 mL / min. Las masas obtenidas por cada una de las fracciones se rastrearon en una librería de masas teóricas construida a partir de la secuencia del péptido completo identificando las posibles secuencias de las fracciones. El porcentaje de degradación se calculó de acuerdo a la relación de abundancia de absorbancia UV de cada fracción respecto al tiempo 0.

3. 3. 2. Síntesis química de las fracciones 1 y 2.

Los péptidos fueron sintetizados como se describió en el ítem 3.1.2. Síntesis de los péptidos, se obtuvieron mínimo 5 mg de cada péptido. La precipitación de los péptidos se hizo con dietil éter enfriado y después fueron liofilizados.

Todos los péptidos fueron diluidos en agua tipo 1 y analizados por RP-HPLC (del inglés Reverse Phase - High pressure liquid chromatography) en una Columna preparativa Luna C18 (2) 100Å (250 mm × 21.2 mm, 10 µm; H17-218793) y LC - MS (Liquid chromatography - Mass spectrometry) usando el equipo LC - MS 2010EV (Shimadzu) equipado con una columna XBridge C18 (4,6 mm × 150 mm, 3,5 µm, Waters, Cerdanyola del Vallès, España). Los cromatogramas y masas se ponen como anexo S3.



3. 3. 3. Análisis estructura actividad.

El análisis estructura función se realizó a partir de un alineamiento entre las secuencias de las oxysterlinas 1 y 3, el cual se realizó con la herramienta CLC Main Workbench. Además de la comparación entre las características fisicoquímicas y estructurales que se calcularon como se describe en el ítem 3.

1. 1. Caracterización fisicoquímica, estructural *in silico* y dicroísmo circular.

4. Resultados y discusión

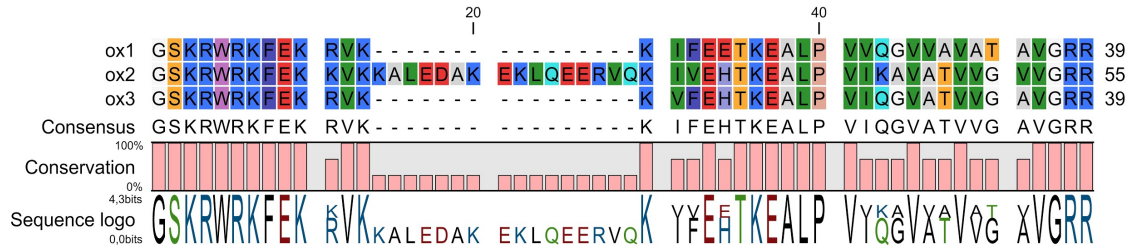
4. 1. Fase 1

4. 1. 1. Las oxysterlinas 1, 2 y 3 son cecropinas de insectos catiónicas y con estructura α -hélice. *Caracterización fisicoquímica y estructural.*

El primer HDP de la familia de las cecropinas fue aislado en la hemolinfa del lepidóptero *Hyalophora cecropia*, y se caracterizó su actividad antimicrobiana contra varias bacterias Gram-negativas y Gram-positivas [74,75]. Estos péptidos han sido identificados en insectos de los órdenes, Hexapoda, Coleoptera, Dípteros y en otras especies de lepidópteros [13,76]. Las oxysterlinas estudiadas en el presente trabajo son secuencias putativas de HDP identificadas en el transcriptoma del cuerpo graso de un escarabajo coprófago de la especie *Oxysternon conspicillatum* [77]. De acuerdo a la predicción de las características fisicoquímicas de las secuencias maduras, las tres oxysterlinas son péptidos catiónicos con puntos isoeléctricos altos y proporciones de hidrofobicidad alrededor del 40% (**tabla 2**). En el alineamiento múltiple entre la oxysterlina 1 y 3 se observó una identidad del 82% con cambios en las posiciones 15-18-26-30-31-33 y 34. Además, una secuencia consenso N-terminal (G-S-K-R-W-R-K-F-E-K-[KR]-V-K) caracterizada por una alta frecuencia de residuos cargados positivamente (**tabla 2 y figura 2A**).

En otro trabajo en proceso de publicación, las secuencias de las oxysterlinas sirvieron como plantilla para identificar 188 secuencias diferentes relacionadas con familias de HDPs en la base de datos Interpro (Cecropinas: IPR020400; Defensinas: IPR017982; Coleopterinas: IPR009382 y attacinas: IPR005520190 IPR005521), a partir de las cuales se realizó una búsqueda multi-TBLASTn y las secuencias resultantes se filtraron de acuerdo con el puntaje $E \leq 0.01$ y se identificó el marco de lectura abierto (ORF) para cada secuencia [78].

En Scarabaeidae, se encontraron 18 secuencias de cecropinas con longitudes de péptidos maduros que van desde 37 a 55 residuos, con pesos moleculares alrededor de 4 kDa. El alineamiento entre las secuencias muestra un péptido señal altamente conservado, el péptido maduro tiene un dominio catiónico N-terminal [GR]-[SW]-K[RKG]-[WLF]-RK-[FIL]-E-[KR] [RKA]-[VSG]-[KR]-[KR] con alta frecuencia de residuos de KR y ángulo hidrofóbico desde 120 a 180°. El dominio C-terminal tiene un mayor grado de variabilidad con una región rica en residuos ácidos y una región hidrofoba alifática. Las estructuras secundarias y terciarias predichas muestran una α -hélice altamente conservada con una puntuación de TM de 0,51 en la alineación estructural, lo que sugiere que pueden clasificarse como una sola familia estructural (datos en proceso de publicación) [79].



Péptido	Secuencia del péptido maduro	aa	M (Da)	ΦH	°H	H2 (A*kT/e)	pl	Carga neta
Oxysterlina 1	GSKRWRKFEKRVKKIFEETKEA LPVVQGVAVAVGRR	39	4455,2	41	120	35,862	11,04	+7
Oxysterlina 2	GSKRWRKFEKKVKKALEDAKE KLQEERVQKIVEHTKEALPVIKA VATVVGAVGRR	55	6327,5	38	120	N/A	10,23	+9
Oxysterlina 3	GSKRWRKFEKRVKKVFEHTKE ALPVIQGVATVVGAVGRR	39	4449,2	38	120	37,688	11,49	+9

Figura y tabla 2. Alineamiento múltiple y características fisicoquímicas de las oxysterlinas 1, 2 y 3. Figura 2. Alineamiento múltiple realizado por ClustalW de las secuencias del péptido maduro de las oxysterlinas 1, 2 y 3 coloreado por rasmol. Características fisicoquímicas de las oxysterlinas. aa: número de aminoácidos, M(Da): masa en daltons, ΦH: radio hidrofóbico, °H: ángulo hidrofóbico, pl: punto isoeléctrico. **Tabla 2.** Características fisicoquímicas de las oxysterlinas. aa: número de aminoácidos, M(Da): masa en daltons, ΦH: radio hidrofóbico, °H: ángulo hidrofóbico, pl: punto isoeléctrico.

Respecto a la hidrofobicidad en la **figura 3** se pudo observar que las oxysterlinas presentan un dominio N-terminal más hidrofílico y un segmento C-terminal más hidrofóbico, estas características son similares a las encontradas para la familia de cecropinas en general [80]. Sin embargo, la oxysterlina 2 es la más diferente, dado que, tiene un segmento entre los residuos K14-Q29, que la hace ser un

péptido menos catiónico (pl: 10,23) (**tabla 2**), lo cual podría estar influyendo en la actividad antimicrobiana del péptido.

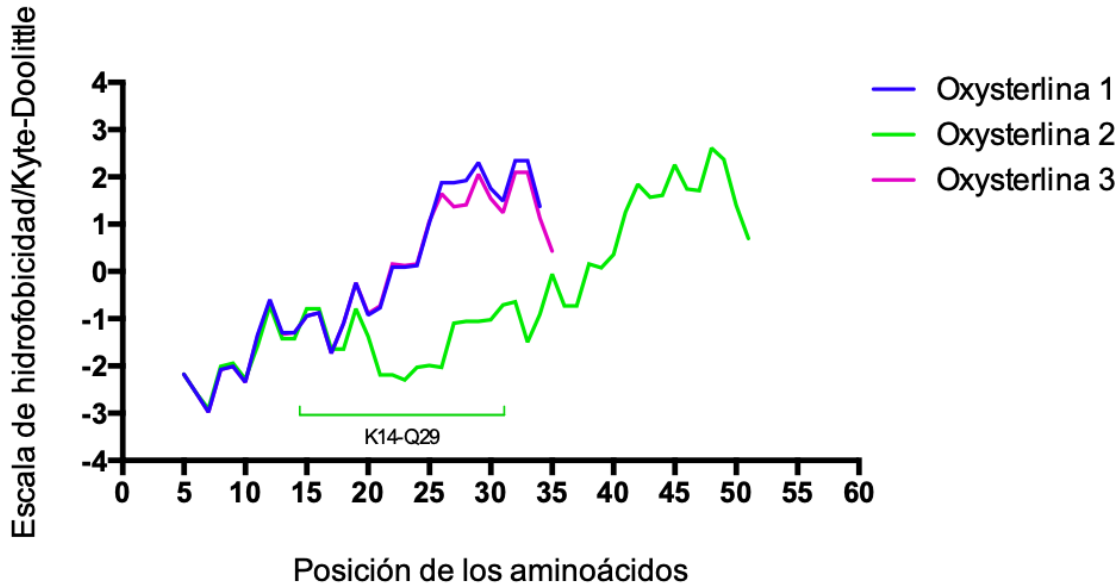


Figura 3. Alineamiento múltiple y perfil de hidrofobicidad para las oxysterlinas 1, 2 y 3. A.
B. Perfil de hidrofobicidad de las oxysterlinas 1, 2 y 3 en escala de Kyte-Doolittle, en el que se marca el segmento K14-Q29 de la oxysterlina 2.

El análisis de la estructura terciaria de las secuencias de las oxysterlinas maduras, predijo una estructura de alfa hélice (**figura 4**), con el 100% de los residuos en regiones permisibles de acuerdo al gráfico de Ramachandran. Para las oxysterlinas 1 y 3 se predijo una hélice continua. Sin embargo, la oxysterlina 2 mostró dos dominios α -hélices dividido por una región bisagra en el residuo 27 (R27). Estos resultados concordaron con el espectro obtenido en el análisis de dicroísmo circular (CD), con las mínimas absorbancias a 208 y 222 nm (**figura 5**), lo cual es característico de estructuras α -hélices [81].

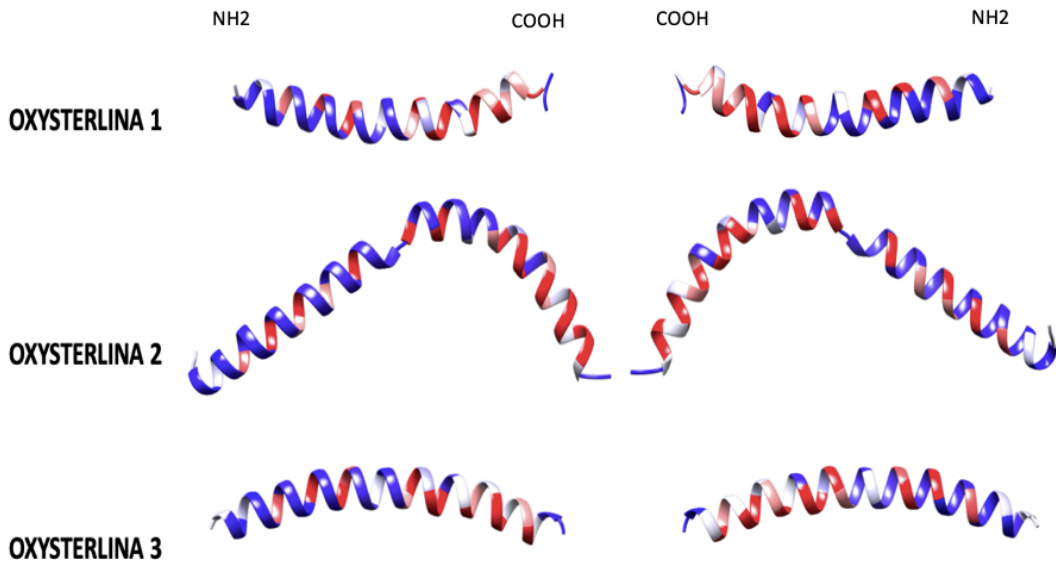


Figura 4. Predicción de la estructura terciaria de las oxysterlinas 1, 2 y 3 por RaptorX. Se realizó la predicción de una estructura de α -hélice, con una región amino terminal antipática correspondiente al dominio oxysterlina y una región carboxilo terminal hidrofóbica (rojo: hidrofóbico, blanco: neutro y azul: hidrofílico).

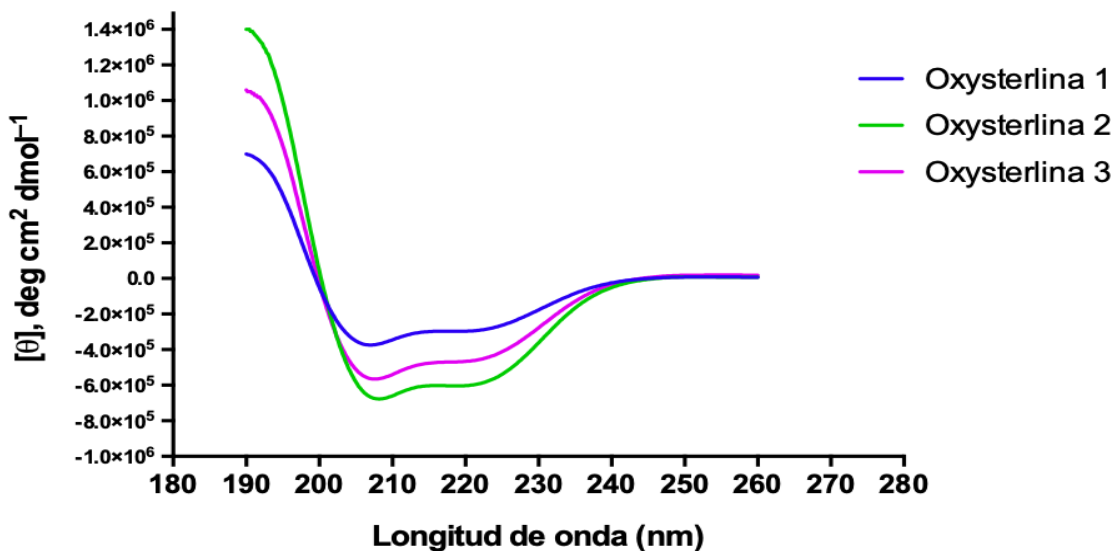


Figura 5. Espectro de dicroísmo circular de las oxysterlinas 1, 2 y 3. Los péptidos fueron disueltos en PBS con 30% de TFE; el espectro fue realizado en el espectrómetro JASCO. En el eje X se muestra la longitud de onda en nm y en el eje Y la elipticidad molar por residuo ($[\theta]$, deg cm² dmol⁻¹).

El dominio N-terminal de las oxysterlinas visualizados en un diagrama de hélice, se encuentra un patrón anfipático, con una superficie de residuos polares/cargados positivamente (azul/rojo) y una superficie hidrofóbica (amarillo) con un ángulo de 120° para las tres oxysterlinas (**figura 6**). Esta característica es propia de la familia de las cecropinas que presentan estructura α -hélice, donde incluso se ha relacionado con la posible toxicidad y actividad de los péptidos [82].

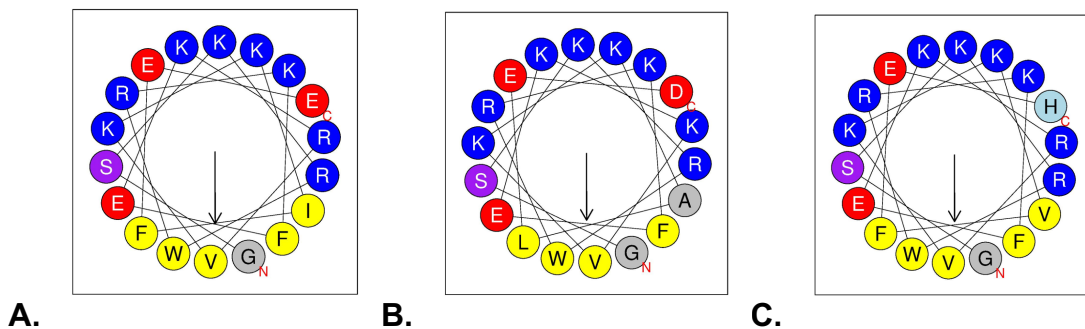


Figura 6. Diagrama de rueda helicoidal realizado por Heliquet (<https://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>), realizado en un giro de 18 aminoácidos G1-[E/D/H]18, mostrando un ángulo hidrofóbico de (amarillo) 120° para las tres oxysterlinas. **A.** Oxysterlina 1. **B.** Oxysterlina 2. **C.** Oxysterlina 3.

4. 1. 2. Síntesis química de las oxysterlinas 1, 2 y 3.

De cada péptido se obtuvo aproximadamente 5 mg con una pureza $>88\%$. Las soluciones madre de los péptidos fueron diluidas en agua destilada estéril a una concentración de 5 mg/mL y almacenadas en alícuotas a -80°C hasta su posterior uso. Los espectros de masa confirmaron la obtención correcta de los péptidos.

4. 1. 3. Oxysterlinas, péptidos con actividad antimicrobiana contra bacterias de referencia Gram^{-/+}, *Candida parapsilosis* y aislamientos clínicos MDR.

Las oxysterlinas 1, 2 y 3 presentaron actividad antibacteriana con concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) en rangos entre 3,12 - 50 µg/mL frente a bacterias Gram negativas, Gram positivas y *Candida parapsilosis* (**tabla 3**). El perfil de resistencia a antibióticos de las cepas bacterianas utilizadas fue evaluado previamente, lo cual se muestra en el **anexo S1**. Las tres oxysterlinas mostraron actividad principalmente contra bacterias Gram negativas con rangos de MICs entre 3,12 - 25 µg/mL, lo cual concuerda con lo encontrado en para esta familia de péptidos [74,83]. Actividades similares contra bacterias Gram-negativas están referenciadas para cecropinas identificadas en órdenes como dípteros, lepidópteros y dos coleópteros [12,84], entre los que están la cecropina Cec identificada en *Acalolepta luxuriosa* con valor de MIC de 1 µg/mL [36] y el péptido Sarcotoxin Pd de *Paederus dermatitis* con valor de MIC de 6,12 µg/mL [46]. Esta característica de tener actividad principalmente contra bacterias Gram-negativas, la atribuyen a que estas bacterias tienen una mayor carga negativa en la membrana en comparación con las Gram-positivas [88], además de que las membranas de bacterias Gram-negativas tienen el lipopolisacárido más expuesto en la membrana externa, mientras que en las Gram-positivas el peptidoglicano está anclado a la membrana citoplasmática (menos expuesto) por ácidos teicoicos [89]. Según nuestros resultados podríamos inferir que la oxysterlina 2 al tener una región entre la K14-Q29 y visto desde un diagrama de hélice de toda la secuencia pierde la anfipaticidad, pierde la característica

hidrofóbica de la región C-terminal, lo que podría estar influyendo en la actividad antimicrobiana del péptido.

Tabla 3. Actividad antibacteriana de las oxysterlinas 1, 2 y 3. Se muestra la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en $\mu\text{g/mL}$ y μM .

Microorganismos	Oxysterlina 1		Oxysterlina 2		Oxysterlina 3	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6,25	5,6	50	7,9	3,12	0,7
<i>Escherichia coli</i> clinical isolate (ESBL)	6,25	1,42	50	7,9	3,12	0,7
<i>Enterobacter cloacae</i> clinical isolate	12,5	2,84	>200	>31	3,12	0,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 1705	>200	>45	25	3,9	3,12	0,7
<i>Salmonella typhimurium</i> clinical isolate	6,25	1,42	>200	>31	6,25	1,39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 105663	25	5,6	>200	>31	12,5	2,8
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> clinical isolate	50	11,2	>200	>31	12,5	2,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> clinical isolate	>200	>31	>200	>31	>200	>45
<i>Staphylococcus aureus</i> clinical isolate	>200	>45	>200	>31	>200	>45
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	50	11,2	>200	>31	>200	>45

La actividad sobre bacterias Gram positivas se pudo evidenciar solo contra un aislamiento clínico de *Staphylococcus saprophyticus* de las oxysterlinas 1 y 3 con MICs de 50 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (**tabla 3**). El único péptido activo contra *C. parapsilosis* fue la oxysterlina 1 con un valor de MIC de 50 $\mu\text{g/mL}$, cabe resaltar que esta familia de péptidos ó similares a cecropinas han tenido la particularidad de ser generalmente menos activos contra bacterias Gram positivas, incluida *S. aureus* [12]. La cual, pertenece al grupo de alta prioridad en la lista de la OMS [49,85]; entre las cecropinas que han sido activas contra esta

bacteria están la cecropina del tábano TY1 [85], el péptido SibaCec (50-150 $\mu\text{g/mL}$) [86] y un péptido híbrido quimérico entre el fragmento N-terminal de la cecropina A de *Hyalophora cecropia* y un fragmento de la magainina de *Xenopus laevis* (2 $\mu\text{g/mL}$) [87].

Las tres oxysterlinas también presentaron actividad eficiente contra cepas multidrogo resistentes (MDR), incluidas *E. coli* ESBL, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella typhi* con valores de MICs entre 3,12 y 50 $\mu\text{g/mL}$ (**tabla 3**). Otras cecropinas como Mdc, SibaCec, CecA, Papiliocina, cecropina B y lucilina [47–49,51,88], han presentado actividad contra diferentes cepas MDR de *P. aeruginosa* y diferentes *Enterobacteriaceae* spp (incluyendo *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*), en rangos de MICs entre 3 - 17 $\mu\text{g/mL}$, estas especies de bacterias representan una amenaza particular en hospitales y hogares de ancianos, particularmente en pacientes con ventilación mecánica y catéteres [89].

Se observó que la oxysterlina 2 fue el péptido menos activo con valores de MIC mayores (25 y 50 $\mu\text{g/mL}$) en comparación con los otros dos péptidos y menos número de bacterias susceptibles a su actividad, lo que concuerda con que la idea de que la presencia de la inserción en la posición K14-Q29 disminuye la actividad del péptido contra los microorganismos evaluados, dada su menor cationicidad y afectación del perfil de hidrofobicidad. Es de destacar que las oxysterlinas 2 y 3 fueron activas contra *Klebsiella pneumoniae* (MIC 3,12 y 25 $\mu\text{g/mL}$) la cual es una importante causa de infecciones nosocomiales, como neumonía, sepsis e infecciones en recién nacidos y pacientes ingresados en

unidades de cuidados intensivos, además puede causar infecciones potencialmente mortales y para la cual actualmente se utilizan los antibióticos carbapenémicos (tratamiento de último recurso) [90]. Las oxysterlinas 1 y 3 fueron activas contra *P. aeruginosa* (MIC 25 y 12,5 µg/mL), la cual hace parte del grupo crítico en la lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos de la OMS [89].

De acuerdo al mecanismo de acción, actualmente es aceptado que esta familia de péptidos no interactúa con receptores específicos, sino que inicialmente se asocian con la membrana bacteriana a lo largo de los ejes de los dominios α -helicoidales paralelos a la superficie de la bicapa lipídica. En este nivel, los residuos polares del péptido interactúan con los fosfatos lipídicos, mientras que las cadenas laterales no polares se entierran en el núcleo hidrofóbico de la membrana [91]. Teniendo en cuenta que las oxysterlinas son péptidos catiónicos con estructura α -hélice activos contra bacterias Gram negativas; posiblemente podrían estar interactuando inicialmente a través de interacciones electrostáticas entre las membranas bacterianas cargadas negativamente (lipopolisacárido y peptidoglicano) y la porción N-terminal de las oxysterlinas cargadas positivamente, lo cual explicaría un mayor espectro de actividad y valores menores de concentraciones mínimas inhibitoria (MICs) para las oxysterlinas 1 y 3 que para la oxysterlina 2, ya que las dos primeras tienen una porción N-terminal más catiónica en comparación con la oxysterlina 2 que al tener una superficie de aminoácidos ácidos más grande, es menos catiónica y posiblemente menos activa, después podría existir una interacción entre la cara

hidrofóbica de los péptidos y la porción con carga neutra de la membrana bacteriana.

4. 1. 4. Las oxysterlinas presentan baja toxicidad sobre células de mamífero. *Actividad citotóxica de las oxysterlinas sobre células Vero, PBMCs y eritrocitos humanos.*

Las oxysterlinas 1 y 3 disminuyeron la viabilidad de las células Vero entre 20-30% (aproximadamente) después de 24 horas de incubación en las concentraciones más altas evaluadas (500–250 $\mu\text{g/mL}$). Estos efectos fueron similares a lo reportado para las magaininas, con citotoxicidad sobre las células Vero a 500 $\mu\text{g/mL}$ [92]. Algunos autores sugieren que el colesterol de membrana en las células de mamíferos es la base para la selectividad de péptidos antimicrobianos [92,93]. La oxysterlina 2 no mostró actividad citotóxica sobre células Vero en ninguna de las concentraciones evaluadas (**figura 7A**).

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) después de 24 horas de incubación con la oxysterlina 3 muestran una actividad metabólica del 80% en todas las concentraciones evaluadas (1,95 - 500 $\mu\text{g/mL}$). Para la oxysterlina 2 en concentraciones desde 62,5 - 500 $\mu\text{g/mL}$ hubo una actividad metabólica del 80% y para la oxysterlina 1 en el rango de 125 a 500 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 7B**).

Se observó una actividad hemolítica de la oxysterlina 1 a una concentración de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ y la oxysterlina 3 a 250 $\mu\text{g/mL}$ valores que presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar, las medias de estas concentraciones y la media del control de células (**figura 7C**).

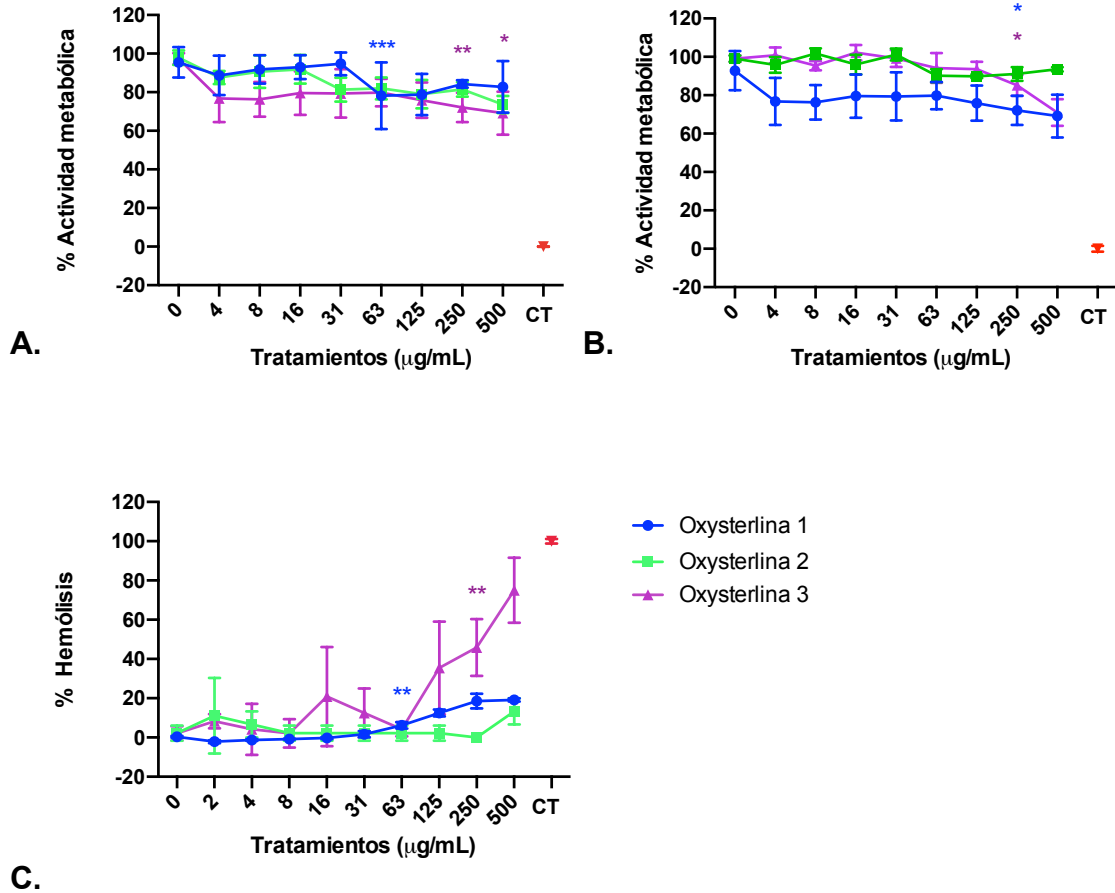


Figura 7. Citotoxicidad de las oxysterinas 1, 2 y 3 a concentración de 1,95 - 500 µg/mL. CT: tritón X100 al 0,1% v/v. Se realizó una prueba de comparaciones múltiples por el método de Dunnett con una n=6 por concentración evaluada, comparando el promedio de las diferentes concentraciones evaluadas contra el control de células (0.00 µg/mL de péptido). **A.** Sobre células Vero (ATCC:CCL-81). **B.** Sobre células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMCs). **C.** Sobre eritrocitos humanos. En el **anexo S2** de información suplementaria se muestran los valores de p, el promedio significativo y el intervalo de confianza de las concentraciones en las que se encontró diferencias versus el control de células.

En la **tabla 4** se resumen las concentraciones a las cuales estos péptidos mostraron actividad tóxica en las diferentes líneas celulares evaluadas, también

se calculó el índice de selectividad, ya que el potencial terapéutico de los HDPs y otros compuestos como antimicrobianos, radica en su selectividad al eliminar células bacterianas de manera efectiva sin exhibir una citotoxicidad significativa hacia las células de mamíferos. Un alto índice de selectividad relativa, incorpora dos características de actividad del péptido: alta concentración mínima hemolítica o citotóxica (MHC) y una baja concentración inhibitoria mínima (MIC) [88].

Tabla 4. Índices de selectividad de las oxysterlinas. Concentración mínima Inhibitoria de los péptidos contra *E. coli* ATCC 25922.

Péptido (ED50 µg/mL)	Eritrocitos humanos (TD50 µg/mL / TI)	Células Vero (TD50 µg/mL / TI)	PBMCs (TD50 µg/mL / TI)
OX 1 (3,87)	>500 / >129	>500/>129	>500/>129
OX 2 (43)	>500/>11,62	>500/>11,62	>500/>11,62
OX 3 (1,72)	558 / 324	>500/>290	>500/>290

Se obtuvo un índice de selectividad de 10 para la oxysterlina 1, de 76,92 para la oxysterlina 3 y >1,25 para la oxysterlina 2. Estos índices de selectividad nos permiten inferir que estos péptidos podrían estar mostrando una mayor afinidad por las membranas bacterianas que por las membranas de células eucariotas, lo cual se ha atribuido a la diferencia en la composición de membranas entre bacterias y células eucariotas. Las membranas bacterianas están compuestas principalmente de compuestos cargados negativamente (por ejemplo, fosfatidilglicerol, cardiolipina y fosfatidilserina), más específicamente, las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa rica en

lipopolisacáridos cargados negativamente (LPS) [94]. Mientras que la capa externa de la membrana citoplasmática de las células de mamíferos, por otro lado, es neutra y se compone principalmente de fosfolípidos zwitteriónicos y colesterol, este último se ha sugerido que estabiliza las membranas a la acción de los HDPs [95].

Varios HDPs naturales y sintéticamente mejorados también muestran la capacidad de alterar las células de mamíferos, ejerciendo así una toxicidad colateral no deseada, a pesar de la diferencia en la composición de la membrana celular [96–98]. Algunos péptidos catiónicos como protegrina-1 (PG-1) [99] (110 - 340 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LL-37 (260 $\mu\text{g}/\text{mL}$), SMAP-29 (IT 2,3 - 2,6 veces) [151,152] y PGLa [100] mostraron que rompen más fácilmente las monocapas de películas aniónicas, compuestas de PG o lípido A, en comparación a los zwitteriónicos. Además, la capacidad de los péptidos catiónicos de unión a la membrana puede depender de la agrupación preferencial de lípidos aniónicos lejos de los zwitteriónicos para fines de equilibrio de carga [101,102].

4. 1. 5. Las oxysterlinas disminuyen la producción de TNF- α inducida por lipopolisacárido en PBMCs humanos. Efecto de las oxysterlinas 1, 2 y 3 sobre la producción de TNF α inducida por lipopolisacárido en PBMCs humanos.

Durante una infección con bacterias Gram negativas la liberación de LPS puede sobre estimular la respuesta inmune innata llevando a un choque séptico [103], por lo que sería deseable contar con una molécula que module a la baja esta

respuesta inflamatoria desencadenada por los LPS bacterianos. Otros péptidos como la cecropina A, han exhibido propiedades anti-inflamatorias mediadas por la supresión de la producción de mTNF- α (TNF- α de origen murino) y otras citoquinas pro-inflamatorias [52,54,85,99,100]. Estos efectos hacen más interesantes a este tipo de compuestos para su aplicación a nivel biomédico, al presentar una actividad dual, antimicrobiana y anti-inflamatoria.

Las concentraciones a las cuales se evaluó el efecto de las oxysterlinas 1, 2 y 3 sobre la producción de TNF- α , se seleccionaron de acuerdo con las menores MICs, es decir, 3,12 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$ para las tres oxysterlinas. Cuando se incubaron las oxysterlinas en ausencia de LPS no se observó inducción de la expresión de TNF α a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (**figura 8**), por lo tanto, los péptidos por sí solos en las concentraciones evaluadas son incapaces de inducir una respuesta de producción de TNF α de forma directa sobre las PBMCs en cultivo. La presencia de LPS por sí solo, como es de esperarse, induce la expresión de TNF α en el modelo celular planteado. La preincubación del péptido con el LPS por 30 minutos antes de entrar en contacto con los PBMCs bloquea de forma parcial y dependiente de la concentración el efecto del LPS sobre los PBMCs, las oxysterlinas 2 y 3 presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control positivo de inducción (LPS a 10 ng/mL), mientras que la oxysterlina 1 a pesar de mostrar la misma tendencia no fue significativa dada la amplia dispersión de los datos del grupo control de LPS sobre el cual se construyó la comparación estadística y el bajo número de datos por grupo. Cabe resaltar que el efecto de la oxysterlina 2 en la disminución de la producción de TNF α fue menor al observado con oxysterlinas 1 y 3.

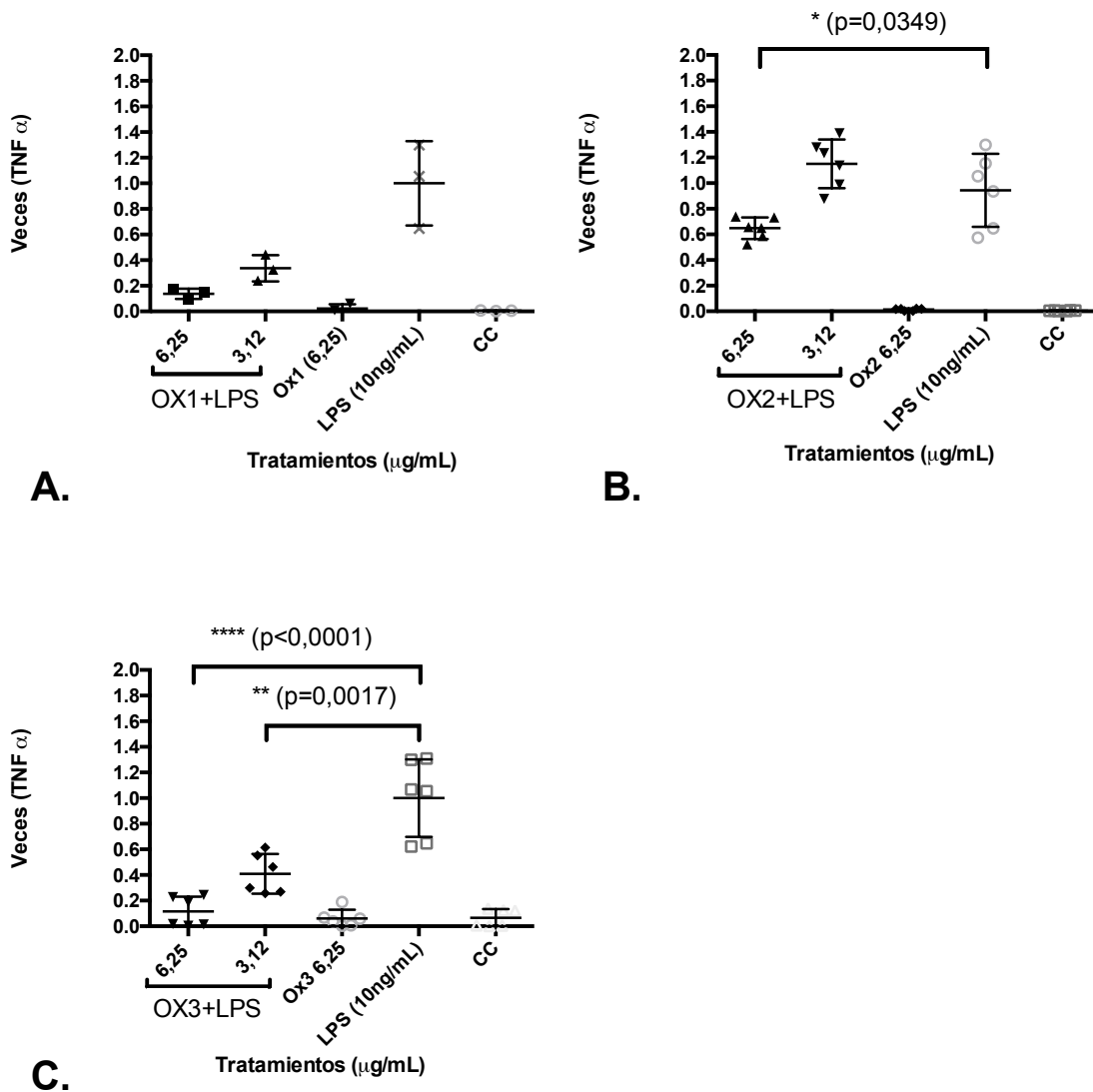


Figura 8. Producción de $\text{TNF}\alpha$ (en veces) de PBMCs tratados con Lipopolisacárido de *E. coli*. **A.** Oxysterlina 1: 3,12 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Se realizó un ANOVA con prueba de comparaciones múltiples por el método de Dunne't sin diferencias estadísticamente significativas (n=3). **B.** Oxysterlina 2: 3,12 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$. (n=6). **C.** Oxysterlina 3: 3,12 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Se realizó una prueba de normalidad Kolmogorov Smirnov y una prueba t para datos paramétricos comparando el tratamiento con respecto al LPS (n=6).

Las tres oxysterlinas afectan la producción de $\text{TNF}\alpha$ en PBMCs estimulados con LPS, de forma similar a lo observado con la catelicidina humana LL-37, la cual

suprimió la producción de citocinas proinflamatorias inducida por LPS tanto en monocitos THP-1 como en las células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMCs) [104], las PBMCs, son centinelas del sistema inmune innato [105] e incluyen monocitos, células asesinas naturales (NK), así como, linfocitos T y B [106]. Para PBMCs a diferencia de lo que se ha encontrado para macrófagos diferenciados, se describe de forma general que el lipopolisacárido (LPS) actúa como una señal de peligro reconocida por las PBMCs a través de TLR4 que es el receptor especializado para la detección de LPS extracelular, presentes en la superficie de varias células, este reconocimiento requiere la acción de varias proteínas, incluidas la proteína de unión a LPS (LBP), CD14 y MD-2 [107,108]. Después de este reconocimiento se producen respuestas transcripcionales que implican la expresión de genes inmunológicos y relacionados con la inflamación que sirven para eliminar la infección [109]. Hasta ahora se sabe que PBMCs (precursoras de macrófagos) estimuladas pueden contribuir a la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF α , CXCL8, IL-6, entre otras [141]; las cuales pueden conducir a una inflamación sistémica [110].

En cuanto al mecanismo por el cual el LPS induce a la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos, se ha estudiado mejor, encontrado que su reconocimiento se da a través de la proteína de unión a LPS (LBP), una proteína de fase aguda que está presente en la sangre. Esta proteína se une al LPS formando el complejo LPS-LBP, el cual interactúa con el receptor CD14, una proteína que existe de forma soluble en la sangre y como una molécula ligada a GPI (glicosilfosfatidilinositol) en la superficie de monocitos y macrófagos. Se cree

que los complejos LPS-LBP-CD14 inician reacciones de señalización intracelular uniéndose a receptores tipo Toll (TLR) en macrófagos y otras células [111]. Parece que se requiere TLR4 para que el LPS inicie la señalización e induzca respuestas inflamatorias. Las cepas endogámicas de ratones con mutaciones de pérdida de función en TLR4 no responden al LPS [112]. Los complejos LPS-CD14 activan el factor de transcripción NF- κ B, así como la quinasa regulada por señal extracelular, quinasa N-terminal c-Jun y las proteínas quinasas activadas por el mitógeno p38, todas estas, median la producción de citocinas inflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF α [111,113]. En general, la capacidad relativa de los diferentes péptidos para bloquear la unión de LPS a LBP *in vitro* se ha correlacionado con su capacidad para bloquear la producción de TNF α inducida por LPS en macrófagos [118]. De acuerdo a esto y sabiendo que las oxysterlinas son péptidos catiónicos que tienen efecto en la producción de esta citoquina pro-inflamatoria, podríamos suponer este mismo mecanismo de acción para estos péptidos. Hasta la fecha se han reportado algunas cecropinas y sus análogos con capacidad de unirse al LPS, demostrando propiedades anti-inflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo* [12].

También se han reportado otros mecanismos por los cuales algunos péptidos de la familia de las cecropinas podrían estar ejerciendo una actividad anti-inflamatoria, tal es el caso de péptidos derivados de Lepidópteros como la cecropina CecA de *Hyalophora cecropia* [49], la papiolicina de *Papilio xuthus* [51,83,119], la cecropina B de *Bombyx mori* [120] y un péptido sintético análogo de *A. pernyi* [121], los cuales fueron capaces de inhibir la producción de óxido nítrico y la transcripción de varios genes pro-inflamatorios en células murinas

tratadas con LPS, *in vitro*. Adicionalmente *in vivo*, la cecropina A y B, además de un análogo de la papiolicina administrados vía intraperitoneal reducen la concentración de bacterias, niveles de endotoxina en plasma y la mortalidad en un modelo de roedores infectados con *E. coli* [119,122].

El TNF α tanto *in vitro* como *in vivo* sobre bacterias Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) sensibles puede inducir su crecimiento; esto en situaciones de neutropenia como neumonía en pacientes inmunocomprometidos y neumonía en ratones neutropénicos se asoció con una mayor carga infecciosa en el pulmón [123]. Por lo tanto, en ratones neutropénicos, la citoquina endógena TNF α promueve el crecimiento de bacterias sensibles y empeora la carga infecciosa en los pulmones [124]. En este contexto y sabiendo que las oxysterlinas en presencia de LPS inhiben la producción del TNF α , además de que inhibe el crecimiento bacteriano de *E. coli in vitro*, a futuro se podría pensar que estos péptidos podrían ser una opción en el tratamiento de la inflamación generada por TNF α .

Algunos péptidos antimicrobianos de insectos de la familia de las cecropinas han sido estudiados en su potencial actividad anti-inflamatoria (**tabla 5**), los cuales han sido activos en concentraciones que varían de 3, 8 - 40 $\mu\text{g/mL}$, lo cual sitúa a las oxysterlinas en el rango de concentración encontrado para esta familia de péptidos.

Tabla 5. Péptidos de la familia de las cecropinas con actividades inmunomoduladoras.

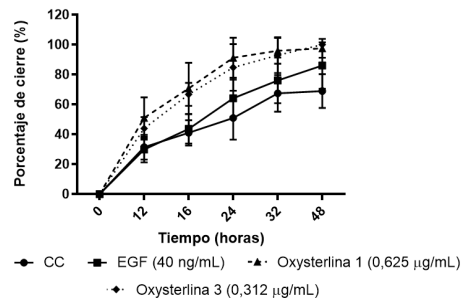
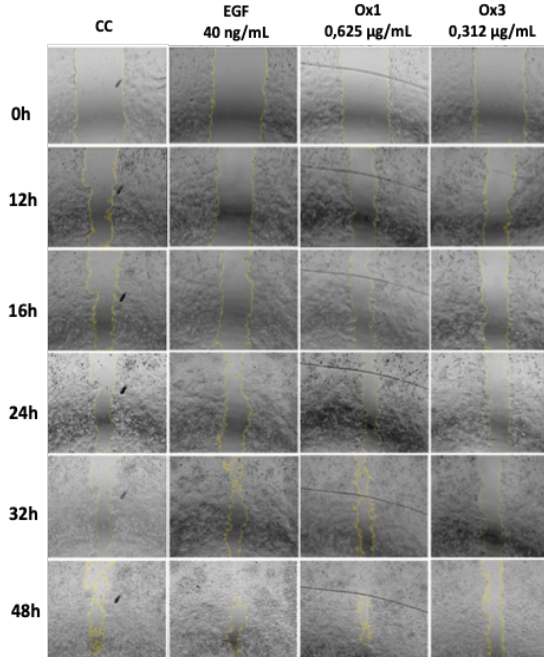
Péptido	Orden	Actividad inmunomoduladora	Concentración (µg/mL)	Referencia
CecA	Lepidoptera	Inhiben la producción de NO y la transcripción de genes pro-inflamatorios en células murinas tratadas con LPS (<i>in vitro</i>).	20	[49]
Papiolicina			3,8 - 40	[51,83]
Cec B Análogo sintético de (<i>A. pernyi</i>).			38	[120]
Cec TY	Dípteros	Reducen la concentración bacteriana y niveles de endotoxinas en plasma en modelo murino.	20	[48]
SibaCec			20	[86]
AeaeCec 1			20	[125]

4. 1. 6. Las oxysterlinas 1 y 3 promueven el cierre de heridas *in vitro* en un modelo de queratinocitos humanos. Evaluación del cierre de heridas *in vitro* de células HaCaT bajo las oxysterlinas 1 y 3.

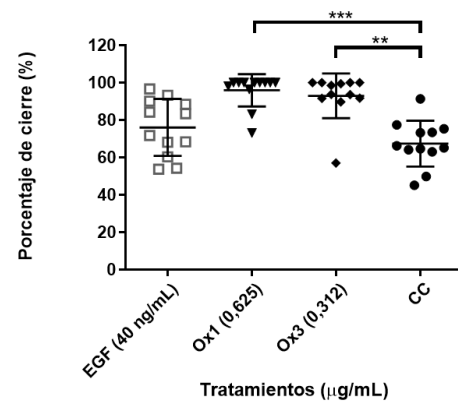
Además de la actividad antimicrobiana y la posible actividad anti-inflamatoria de los HDPs, también se ha descrito que algunos HDPs humanos promueven la cicatrización de heridas en la piel [106], por múltiples medios, incluida la modulación de la producción de citoquinas, la migración y la proliferación celular. Nosotros evaluamos el efecto de las oxysterlinas 1 y 3 sobre el cierre de heridas *in vitro* en queratinocitos humanos (HaCaT), usando un décimo de la concentración mínima inhibitoria (MIC) (1/10), así: Oxysterlina 1 (0,625 µg/mL) y oxysterlina 3 (0,312 µg/mL), el seguimiento del cierre de las heridas se realizó de forma fotográfica a los diferentes tiempos evaluados hasta las 48 horas

(figura 9A). Obteniendo que la oxysterlina 1 y 3 a una concentración de 0,312 y 0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, inducen el cierre del área de forma significativa después de 16, 24, 32 y 48 horas de tratamiento (figura 9B). Esta diferencia de cierre entre el tratamiento con las oxysterlinas y el control de células, fue más evidente a las 24 horas de incubación para las oxysterlinas 1 y 3 (figura 9C).

A.



B.



C.

Figura 9. Cierre de heridas realizadas *in vitro* en células HaCat. **A.** Representación fotográfica de la cicatrización de heridas *in vitro* en células HaCat en 0, 12, 16, 24, 32 y 48 horas con diferentes tratamientos. **B.** Porcentaje de cierre bajo estímulo de la oxysterlina 1 (Ox1) (0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y oxysterlina 3 (Ox3) (0,312 $\mu\text{g}/\text{mL}$), factor de crecimiento epidérmico (EGF) a 40 ng/mL y control de células (CC) durante 0, 12, 16, 24, 32 y 48 horas de incubación. **C.** Porcentaje de cierre a las 24 horas después de adicionados los tratamientos. Las barras de error representan la media y la desviación estándar (n=12). Un ANOVA con prueba de comparaciones múltiples por el método de Dunnett (**: $p \leq 0,01$).



Teniendo en cuenta que las oxysterlinas 1 y 3 inducen el cierre de heridas generadas en queratinocitos *in vitro* y que son péptidos cortos, catiónicos y con estructura α -hélice, similares a la cecropina B (HB-107) y la tylotoina (**tabla 6**), los cuales también inducen el cierre de heridas a nivel *in vitro*, sería interesante evaluar si posiblemente las oxysterlinas al igual que estos péptidos podrían estar induciendo liberación de quimioquinas y citoquinas como IL-6 a través de señalización mediada por proteína G o la vía de señalización PLC, TGF- β 1 y activación de factores de transcripción como EGFR, STAT1 y STAT3, [126–128], ó si pudieran estar induciendo infiltración de células y la expresión de citoquinas *in vitro*, como la IL-8 como sucede con el péptido HB-107 (**tabla 6**) [126].

Tabla 6. Papel de diferentes péptidos antimicrobianos durante los eventos de cicatrización de heridas.

Péptido	Origen	Mecanismo de acción	Referencia
Tylotoina	Piel de salamandra <i>Tylotriton verrucosus</i>	Fase de inflamación y proliferación Aumenta la motilidad y proliferación de queratinocitos, células endoteliales vasculares y fibroblastos, reepitelización y la formación de tejido de granulación. Promueve la liberación del factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) y la interleucina 6 (IL-6).	[127]
HB-107	Derivado de cecropina B (<i>H. cecropia</i>)	Fase Inflamación Induce la infiltración de células y secreción de citoquinas <i>in vitro</i> . expresión de citoquinas anti-inflamatorias y factores de crecimiento. Estimula el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos.	[129]



4. 2. Fase 2:

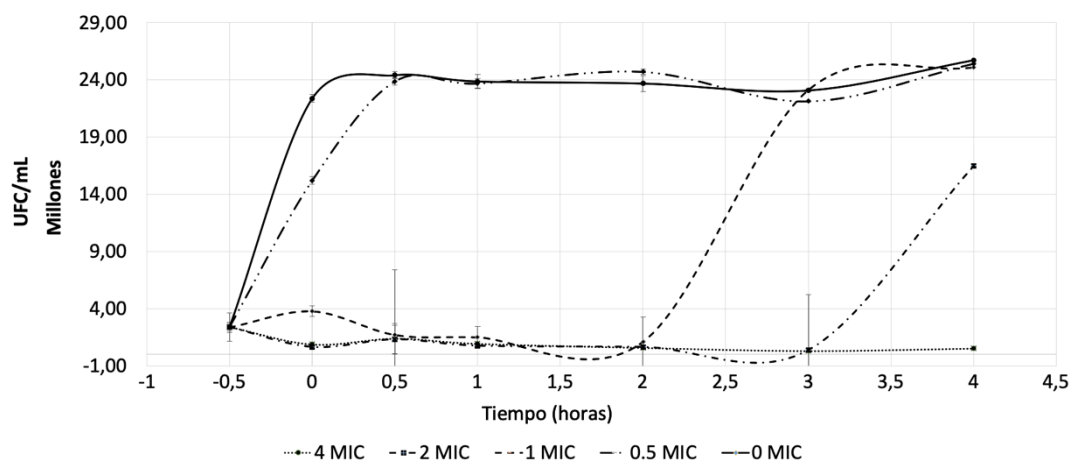
En esta fase se profundizó en la actividad antimicrobiana, realizando curvas tiempo/muerte y evaluando esta actividad antimicrobiana en presencia de suero para las tres oxysterlinas. Además, se profundizó sobre el efecto en la expresión de TNF α por la oxysterlina 3. Con estos resultados y realizando un análisis estructura/función, se diseñó y se produjo el péptido modificado [His18]Ox1NH₂.

4. 2. 1. Las oxysterlinas 1, 2 y 3 tienen una actividad bactericida dependiente de la concentración. *Curvas tiempo - muerte*

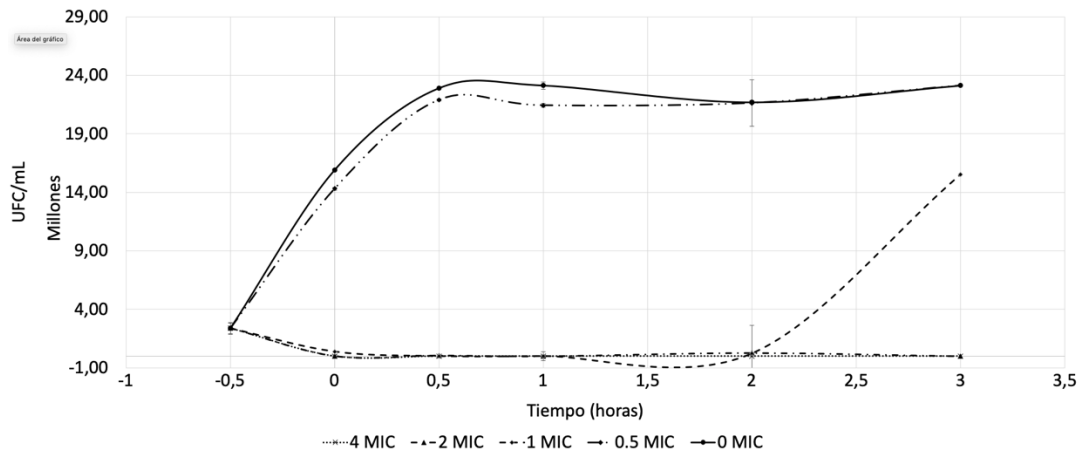
Las oxysterlinas 1, 2 y 3 mostraron una cinética de actividad antibacteriana *in vitro* contra *E. coli* ATCC 25922 bactericida dependiente de la concentración, eliminando la *E. coli* ATCC 25922 en menos de 20 minutos (**figura 10**). Esta actividad comparada con antibióticos convencionales como la ampicilina, la cual es bactericida a 2 veces la MIC después de 2 horas de incubación es más rápida y similar a la actividad de la temporina A y citropin 1.1, los cuales mostraron una actividad bactericida, con una dependencia del tiempo notablemente menor en comparación con antibióticos como Vancomicina [72,130–132].

La oxysterlina 1 a 1 MIC inhibió el crecimiento de *E. coli* por debajo de 4 UFC/mL durante los primeros 20 minutos hasta 120 minutos de incubación, la concentración por debajo de 1 MIC no inhibió el crecimiento bacteriano, mientras que concentraciones por encima de la MIC (2 y 4 veces la MIC) inhibieron completamente el crecimiento bacteriano durante los 180 minutos del ensayo (**figura 10A**). Las oxysterlinas 2 y 3 mostraron un comportamiento bacteriostático a 1 MIC, pero a concentraciones mayores (2 y 4 veces la MIC) mostraron un comportamiento bactericida con una reducción completa de las UFC/mL a los 180 minutos. El efecto bactericida se observó rápidamente a 4 veces la MIC con reducción antes de los 30 minutos de incubación (**figura 10B y C**). El efecto del crecimiento bacteriano a 1 MIC después de 2 y 3 horas de incubación para la oxysterlina 1 podría estar mostrando una actividad bacteriostática o mixta bactericida inicial y posteriormente bacteriostática, degradación del péptido después de ejercer la actividad y/o adaptación de las bacterias.

A.



B.



C.

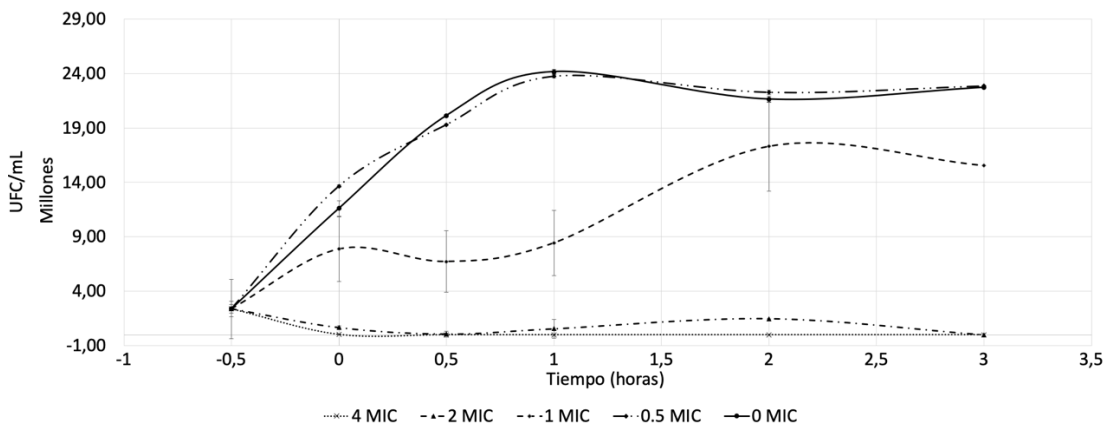


Figura 10. Curvas tiempo/muerte de las oxysterlinas 1, 2 y 3 frente a *E. coli* ATCC 25922. **A.** Oxysterlina 1, 1X MIC = 6,25 µg/mL. **B.** Oxysterlina 2, 1X MIC = 50 µg/mL. **C.** Oxysterlina 3, 1X MIC = 3,12 µg/mL.

Esta actividad dependiente de la concentración puede indicar que las oxysterlinas podrían estar ejerciendo actividad similar a la postulada para otros péptidos antimicrobianos en los que alcanzar un umbral alto de concentración de HDP en la membrana es crítico para la formación de poros, tal es el caso del mecanismo de “alfombra”, el cual se da después



de la acumulación continua del péptido sobre la bicapa lipídica de las bacterias; esta estructura que se forma, posee propiedades líticas intrínsecas, las cuales desintegran la membrana [91], según la evidencia experimental, la cecropina P1 (Cec P1) del intestino del cerdo [133] y la cecropina de *H. cecropia* (Cecs) administradas a altas concentraciones (Cec P1 > 25 μM y Cecs > 5 μM), parecen actuar bajo este mecanismo [91,134].

4. 2. 2. Las oxysterlinas 1 y 3 pierden efectividad en medio de cultivo con suero fetal bovino. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las oxysterlinas 1 y 3 en presencia de suero.

Para el desarrollo de los péptidos antimicrobianos hasta el uso terapéutico, algunos se han administrado sistemáticamente de forma *in vivo* [135], para lo cual es clave que estos péptidos sean estables en diferentes condiciones, además de ser un requisito para el uso de estos como fármacos [136,137]. De acuerdo a esta idea, nosotros quisimos verificar la actividad antimicrobiana de las oxysterlinas bajo diferentes condiciones, evaluamos su actividad contra *E. coli* en DMEM y SFB al 2%.

Las concentraciones mínimas inhibitorias de las oxysterlinas 1 y 3 frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, aumentaron a 25 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente en presencia de DMEM 1X y Suero Fetal Bovino (SFB) al 2% (**tabla 7**).



Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las oxysterlinas 1 y 3 bajo condiciones de DMEM 1X y SFB al 2% comparadas con sus MICs sin SFB.

Microorganismo	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en $\mu\text{g/mL}$	
	Oxysterlina 1	Oxysterlina 3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6,25	3,12
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en DMEM 1X y SFB al 2%.	25	12,5

Como se ha observado en otros péptidos catiónicos como el RI18 diseñado a partir de la catelicidina meloide porcina 36 (PMAP-36), la presencia de suero en este caso disminuye la eficacia en la inhibición del crecimiento de *C. albicans* [18]. El aumento de la MIC para las oxysterlinas 1 y 3, demuestran una posible degradación de estos péptidos por los suplementos encontrados en el medio de cultivo, posiblemente por las proteasas del SFB. La degradación, inestabilidad, altos costos de producción y eliminación eficiente de los péptidos en un sistema circulatorio dinámico en el cual se verán expuestos a diferentes proteasas, incluido el suero humano hacen parte de las problemáticas en el desarrollo de los péptidos para uso clínico [138,139]. Teniendo en cuenta esto y sumado a que las oxysterlinas 1 y 3 a pesar de tener una identidad del 82% varían en su actividad, nos llevó a realizar un análisis estructura/función de estos dos péptidos.



4. 2. 3. Diseño y caracterización del péptido modificado [His18]Ox1NH2, derivado de las oxysterlinas 1 y 3. Análisis estructura/actividad de las oxysterlinas 1 y 3, diseño del péptido modificado [His18]Ox1NH2.

Las oxysterlinas 1 y 3 presentan una identidad del 82 % con siete variaciones en sus secuencias, en las posiciones 15-18-26-30-31-33 y 34, llama la atención el cambio de la histidina en la posición 18 (H18) de la oxysterlina 3 por un ácido glutámico (E18) en la oxysterlina 1 debido al cambio a nivel de la carga (**figura 11**). Este cambio hace que la oxysterlina 3 sea un péptido más catiónico y posiblemente esta sea una de las características que influye en su actividad. Además, presentaron variaciones en la masa teórica, carga neta y punto isoeléctrico; a nivel experimental tienen diferentes MICs contra *E. coli* ATCC 25922 y en la concentración tóxica sobre células eucariotas, lo que llevó a obtener diferentes índices de selectividad (IS) (**tabla 8**). Basados en esta hipótesis decidimos hacer una modificación de la secuencia de la oxysterlina 1 en la posición 18 (E18/H18), con esto surgió el péptido [His18]Ox1NH2 (GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKEALPVVQGVVAVATAVGRR, el cual fue obtenido de forma sintética y usado para la fase 3 de este estudio.

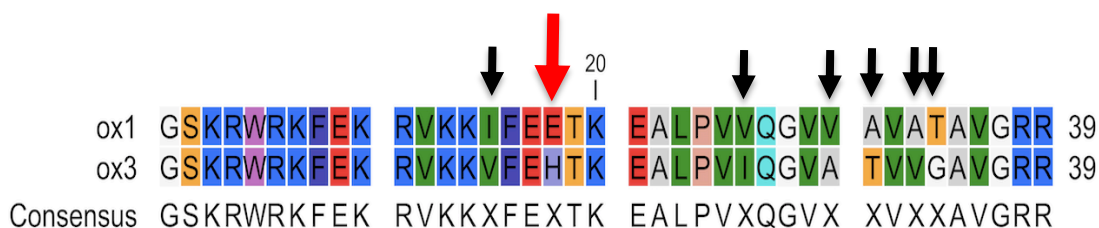




Figura 11. Alineamiento múltiple realizado en QIAGEN CLC Genomics workbench, entre la oxysterlina 1 y 3. Observando 7 cambios entre las secuencias, entre los cuales la H18 es la más relevante.

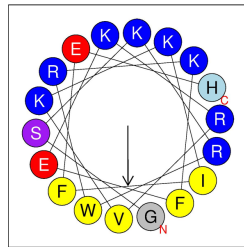
4. 2. 3. El péptido modificado [His18]Ox1NH2 conserva la actividad contra *E. coli* ATCC 25922 y la inhibición del efecto del LPS sobre la producción de TNF α en PBMCs. Análisis físico-químico, estructural y evaluación de actividad del péptido modificado [His18]Ox1NH2.

El péptido modificado [His18]Ox1NH2 (**tabla 8**), tiene una carga neta teórica (+8,25) que se encuentra intermedia entre las oxysterlinas 1 y 3; conserva el mismo punto isoeléctrico teórico de la oxysterlina 3 así como el ángulo hidrofóbico (120°) de la fracción N-terminal (**figura 12A**). La predicción de la estructura secundaria y terciaria predicha del péptido modificado [His18]Ox1NH2 mostró una estructura similar a la de las oxysterlinas 1 y 3, alfa hélice con una región N-terminal anfipática (una superficie hidrofóbica y otra hidrofílica) y una región C-terminal mayoritariamente hidrofóbica (**figura 12B**).

Tabla 8. Características fisicoquímicas de la oxysterlina 1 y 3. pI: punto isoeléctrico. MIC: Concentración Mínima Inhibitoria. IS: Índice de selectividad.

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Masa teórica (Da)	pI	Carga neta	Φ H	MIC (μ g/mL)	IS
Oxysterlina 1	GSKRWRKFEKRVKKIFEE TKEALPVVQGVAVATAV GRR	4455,2	11,04	+ 7	41	6,25	10

Oxysterlina 3	GSKRWRKFEKRVKVFEE HTKEALPVIQGVATVVGA VGRR	4449,2	11,49	+ 9	38	3,12	76,92
[His18]Ox1N H2	GSKRWRKFEKRVKKIFE HTKEALPVVQGVAVATA VGRR	4463,29	11,49	+8,25	41	3,12	N/A



A.

B.

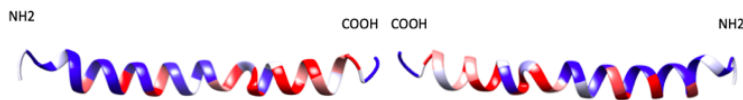


Figura 12. Diagrama de rueda helicoidal y predicción estructural para el péptido [His18]Ox1NH₂. **A.** Diagrama de rueda helicoidal para el péptido [His18]Ox1NH₂ realizado por Heliquest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>), realizado en un giro de 18 aminoácidos G1-[E/D/H]18, mostrando un ángulo hidrofóbico de (amarillo) 120°. **B.** Predicción de la estructura terciaria del péptido [His18]Ox1NH₂ por RaptorX (rojo: hidrofóbico, blanco: neutro y azul: hidrofílico).

El péptido modificado conservó la actividad antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922 con una MIC de 3,12 µg/mL, igual a la oxysterlina 3 y una dilución por debajo respecto a la oxysterlina 1 (**tabla 8**). Por lo tanto, la sustitución del E18H en la oxysterlina 1 mejoró la cationicidad y la actividad antimicrobiana. Esto concuerda con lo publicado por Yeaman y Yount en el 2003 [95], en donde la cationicidad es un parámetro clave para la



actividad antimicrobiana e importante para la atracción electrostática inicial del péptido hacia los fosfolípidos de membrana cargados negativamente de las bacterias y otros microorganismos [95].

4. 2. 4. La inhibición del efecto del LPS sobre la producción de TNF α en PBMCs de la oxysterlina 3 se da probablemente por interacción directa con el LPS. Evaluación del efecto de la oxysterlinas 3 sobre la producción de TNF α en PBMCs estimulados con LPS en diferentes tiempos de adicción.

También se profundizó en el efecto de la oxysterlina 3 sobre la expresión de TNF α en PBMCs, pero evaluando diferentes momentos de adición del péptido (**figura 13**). La oxysterlina 3 fue seleccionada debido a la menor MIC, mayor espectro de acción y la capacidad de inhibir la expresión del TNF- α a menor concentración. Encontrando que:

1. La oxysterlina 3 por sí sola no induce a la expresión de la citoquina TNF- α , corroborando los resultados obtenidos en el ensayo previo (**figura 8C**), además,
2. Cuando se pre-incuba la oxysterlina 3 con el LPS no hay una inducción de la expresión del TNF - α .
3. Cuando se induce la expresión del TNF - α con el LPS por tres horas y posteriormente se adiciona la oxysterlina 3, se observa una expresión elevada del TNF - α similar al grupo control de LPS.

4. Al realizar un pretratamiento de las células con la oxysterlina 3 por tres horas y sin retirar el péptido se adiciona el LPS, así como, cuando se adicionan las dos moléculas (oxysterlina 3 y LPS) al tiempo a las células, no hay expresión del TNF α .
5. Cuando se incuba por 3 horas ya sea con oxysterlina 3, LPS o medio y se lavan estas y posteriormente se adiciona la segunda (oxysterlina 3 o LPS), en todos los casos se genera una inducción de la expresión de la citoquina.

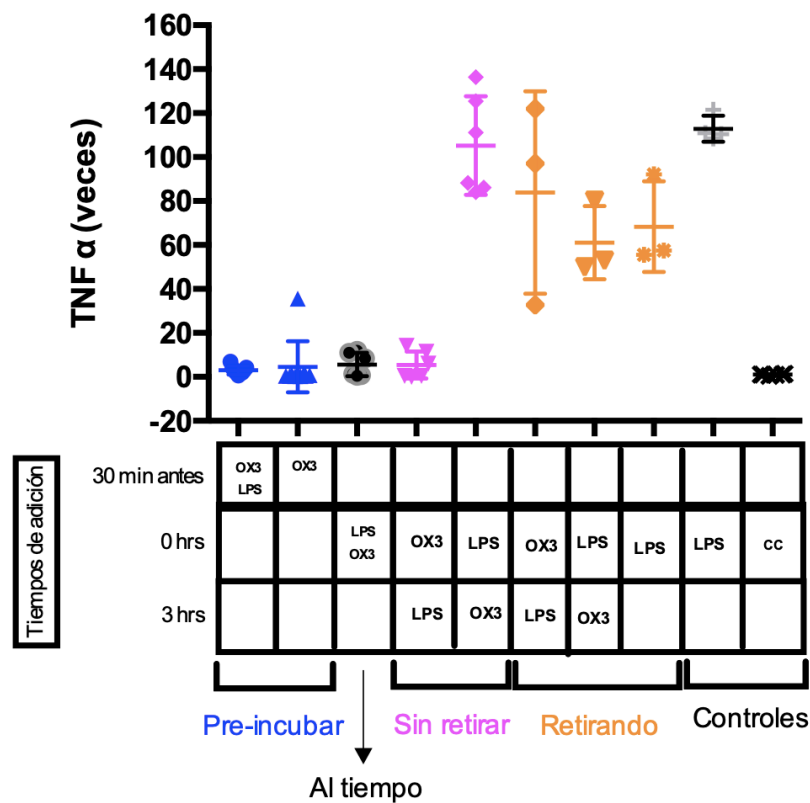


Figura 13. Producción de TNF α (en veces) de PBMCs tratados con Lipopolisacárido de *E. coli* y oxysterlina 3: 6,25 μ g/mL en diferentes tiempos de adición. 1. Pre-incubando (30 min) (azul). 2. Sin retirar la primera molécula adicionada (fucsia). 3. Retirando la primera molécula y adicionando la siguiente (amarillo). 4. Control de LPS y células con



medio (negro).

De acuerdo con estos resultados se sabe que el péptido es incapaz de detener la inducción del TNF α una vez ha sido estimulada por el LPS sobre un cultivo ex vivo de PBMCs. Este efecto de inhibición de la producción de TNF α por la oxysterlina 3 en las PBMCs bajo la condición de que el péptido ya esté en contacto con el LPS (pre-incubación o adición simultánea) sugiere que el péptido podría estar teniendo una interacción directa con el LPS o con el sistema de reconocimiento del LPS (LBP / CD14 - TLR4) (**figura 14**).

Esta hipótesis a partir de los resultados obtenidos concuerda con lo reportado por Monisha y colaboradores en el 2000, quienes demostraron que péptidos α -hélices como el péptido CP29, tuvo la mejor capacidad para inhibir tanto la interacción LPS-LBP como la secreción de TNF α inducida por LPS en macrófagos [118]. Tal como se ha descrito en otro modelo celular como macrófagos, donde se ha visto que algunos péptidos antimicrobianos catiónicos pueden bloquear la activación de estas células inducida por LPS al unirse a este [83,114–117].

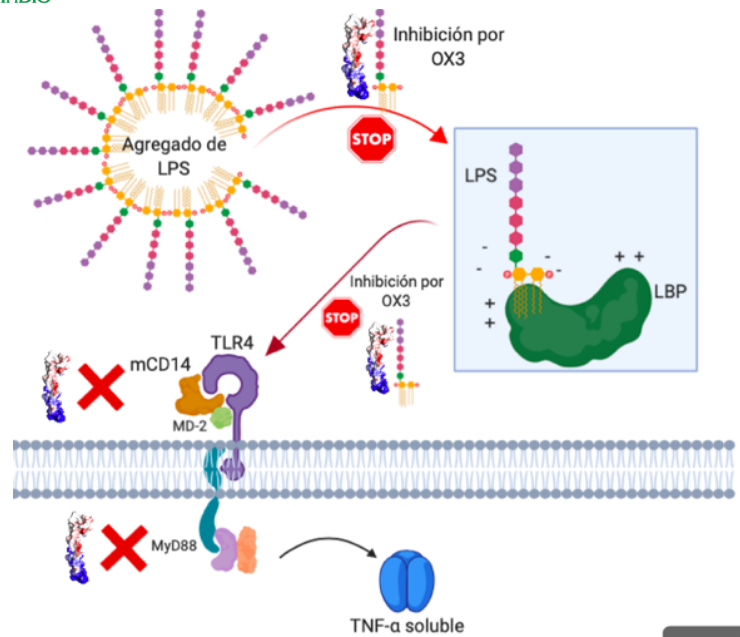


Figura 14. Acción hipotética de la oxysterlina 3 en la modulación de la expresión de la citoquina TNF α por el lipopolisacárido en PBMCs humanos. OX: oxysterlina 3. LPS: lipopolisacárido. TLR4: receptor de transmembrana tipo 4. mCD14: cluster de diferenciación 14 anclado a la membrana por una cola de glicosilfosfatidilinositol. MD2: proteína asociada al TLR4. MyD88: Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88.

4. 3. Fase 3:

4. 3. 1. El péptido modificado [His18]Ox1NH2 se corta a los 5 min de incubación en suero humano. Estabilidad del péptido modificado [His18]Ox1NH2 en suero humano.

El desarrollo de péptidos antimicrobianos para uso clínico se ha limitado principalmente a aplicaciones tópicas [140]. La aplicación a nivel sistémico se ha visto limitada por la degradación proteolítica y la rápida eliminación de estos péptidos de la circulación sistémica. Adicionalmente, este



problema se agrava por los altos costos de producción de péptidos sintéticos, por lo cual se buscan candidatos peptídicos más cortos [138,139]. Por estas razones es importante evaluar la susceptibilidad proteolítica de un HDP en las primeras etapas de desarrollo. Cualquier secuencia de péptidos es a priori vulnerable a un tipo u otro de las diversas exo y / o endoproteasas del suero [73]. En esta búsqueda de péptidos lineales y con potencial terapéutico nos centramos en el péptido modificado [His18]Ox1NH₂, que conserva actividad antibacteriana de la oxysterlinas 3, para evaluar su estabilidad y vida media en suero humano.

Para evaluar la estabilidad de este péptido [His18]Ox1NH₂, fue necesario identificar las condiciones de recuperación en suero humano, lo cual se logró en un tiempo de retención de 5,4 min bajo las condiciones cromatográficas utilizadas y se observó una susceptibilidad proteolítica desde los primeros 5 minutos de incubación con el suero humano (**figura 15A**). Así mismo, se observa la aparición y progresivo aumento de tres fracciones principalmente, denominadas FR1, FR2 y FR3 con tiempos de retención de 5,2, 5,3 y 5,7 min, respectivamente. Estos picos representativos de los fragmentos producto de la degradación proteolítica del péptido [His18]Ox1NH₂ fueron incrementado en su intensidad a medida que avanzaba el tiempo, principalmente para las FR 1 y 2, hasta una ventana de observación de 60 minutos de incubación (**figura 15B**).

Estabilidad en suero humano

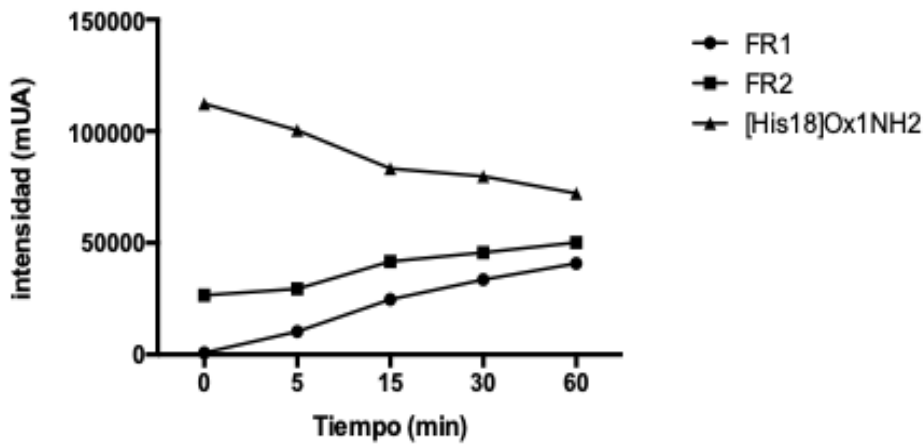
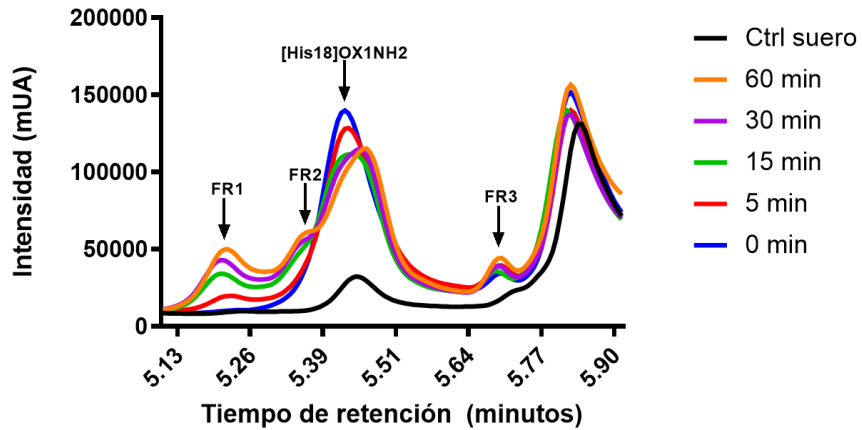


Figura 15. Perfil de disminución del péptido [His18]ox1NH2 y aumento de las fracciones 1 y 2 (FR1, FR2) hasta los 60 minutos de incubación en suero humano. **A.** Cromatogramas de los tiempos de retención entre los 5 y 6 minutos del suero humano y el péptido [His18]ox1NH2 en presencia de suero en diferentes tiempos (0, 5, 15, 30 y 60 min), usando un gradiente de 0 a 95% de acetonitrilo (ACN) durante 15 minutos. FR1, FR2 y FR3 (fracción 1, 2 y 3). **B.** intensidad en mUA para cada uno de los tiempos específicos de retención para el péptido [His18]ox1NH2, la FR1 y FR2 en los distintos tiempos de incubación (0 a 60 min).

Estos fragmentos (FR1, FR2 y FR3) presentaron masas teóricas de 2647, 2646 y 3692,42 Da, lo que corresponde a las secuencias FR1 (KRVKKIFEHTKEALPVVQGVVAVA), FR2 (KRWRKFEKRVKKIFEHTKEA) y FR3 (RKFEKRVKKIFEHTKEALPVVQGVVAVATAVGR). De acuerdo a esto se identifican 6 sitios de corte (**figura 16**) en el péptido [His18]Ox1NH₂; posterior al sitio de corte en el extremo N-terminal se encontraron alrededor de residuos básicos (entre S2-K3, W5-R6 y E9-K10) mientras que en la porción C-terminal el corte se vio en los residuos de A22 - L23, A33 - T34 y R38 - R39. Podemos deducir que el 66% de los sitios de corte corresponden a residuos K y R. Las características fisicoquímicas de las secuencias producto de la degradación se describen en la **tabla 9**.

Tabla 9. Secuencia de las fracciones 1 y 2 obtenidas a partir de la incubación del péptido modificado [His18]Ox1NH₂ en suero humano.

Péptido	Secuencia asignada	Masa teórica (Da)	aa	Carga neta	pi	MIC (µg/mL)
Oxysterlina 1	GSKRWRKFEKRVKKIFE E TKEALPVVQGVVAVA TAVGRR	4455,2	39	+ 7	11,04	12,5
Oxysterlina 3	GSKRWRKFEKRVKKVFE H TKEALPVIQGVATVV GAVGRR	4449,2	39	+ 9	11,49	6,25
His18OX1NH ₂	GSKRWRKFEKRVKKIFE H TKEALPVVQGVVAVATA VGRR	4463,31	39	+ 8,25	11,49	6,25
FR1	KRVKKIFEHTKEALPVVQGVVAVA	2647	24	+3,25	10	>100
FR2	KRWRKFEKRVKKIFEHTKEA	2646	20	+6,25	10,64	12,5
Análogo	KRVKKIFEHTKEA	1613,91	13	+3,25	10	>100

Coleocin	GSKRWRKFE	1193,36	9	+3	11	>100
----------	-----------	---------	---	----	----	------

[His18]Ox1NH2

GS[^]KRW[^]ARKFE[^]KRVKKIFEHTKEA[^]LPVVQGVVAVA[^]TAVGR[^]R

FR1

KRVKKIFEHTKEALPVVQGVVAVA

FR2

KRWRKFEKRVKKIFEHTKEA

FR3

RKFEKRVKKIFEHTKEALPVVQGVVAVATAVGR

Figura 16. Posibles sitios de corte del péptido modificado [His18]Ox1NH2, durante 60 minutos de incubación en suero humano.

4. 3. 2. La fracción 2 (FR2) obtenida tras la incubación del péptido modificado [His18]Ox1NH2 con suero humano es activa contra *E. coli* ATCC 25922. Actividad antibacteriana del péptido modificado [His18]Ox1NH2 y las fracciones 1 y 2.

A pesar de que el péptido modificado [His18]OX1NH2 es cortado por las proteasas del suero humano, las fracciones 1 y 2 que se generan durante la incubación, aumentan y se mantienen estables durante los 60 minutos de incubación con el suero. Por lo que en esta fase se obtuvieron sintéticamente la fracción 1 (FR1) (KRVKKIFEHTKEALPVVQGVVAVA) y 2 (FR2) (KRWRKFEKRVKKIFEHTKEA), así como la secuencia conservada

entre ellas, denominado análogo[His18] (KRVKKIFEHTKEA) y la secuencia conservada entre las tres oxysterlinas “coleocin” (GSKRWRKFE) con el fin de analizar y comparar las características fisicoquímicas *in silico* y su actividad antimicrobiana frente a *E. coli* ATCC 25922 *in vitro* (**tabla 9 y figura 17**) entre ellas y también en comparación con los péptidos molde (oxysterlinas 1 y 3) evaluados en las fases 1 y 2 de este trabajo. El péptido modificado [His18]Ox1NH2 y la FR2 tuvieron la misma MIC contra *E. coli* ATCC 25922, lo que demuestra que el extremo N-terminal que corresponde a los aminoácidos FR2 (KRWRKFEKRVKKIFEHTKEA) son esenciales para la actividad antimicrobiana de las oxysterlinas y sus análogos.

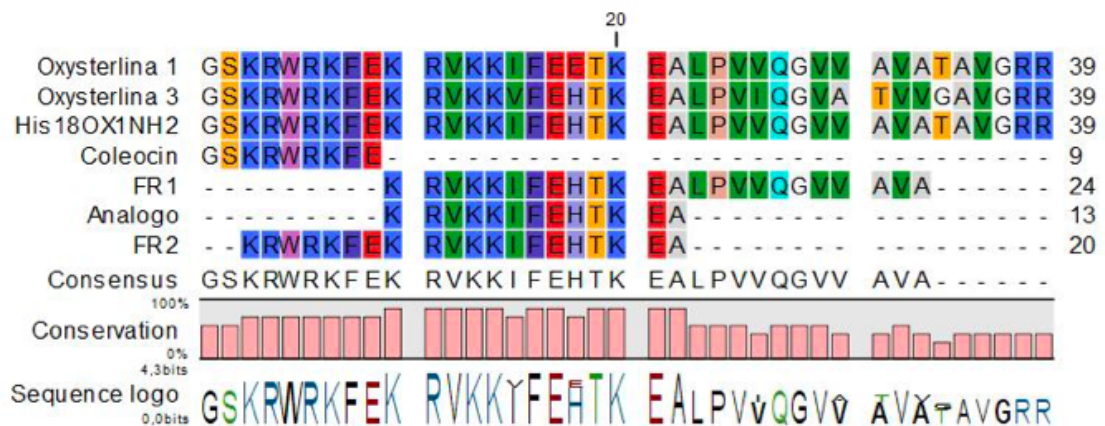


Figura 17. Alineamiento entre las secuencias oxysterlinas 1, 3, péptido modificado [His18]Ox1NH2, FR1, FR2, análogoFR y coleocina.

La actividad diferencial entre FR1 y FR2 podría estar atribuida a la diferencia en la superficie hidrofílica entre la FR1 y FR2, la cual es más amplia en la FR2 y se puede observar tanto en el diagrama de hélice como en la predicción estructural (residuos en azul) en comparación con la FR1 que no tiene una superficie hidrofílica tan marcada (**figura 18**).

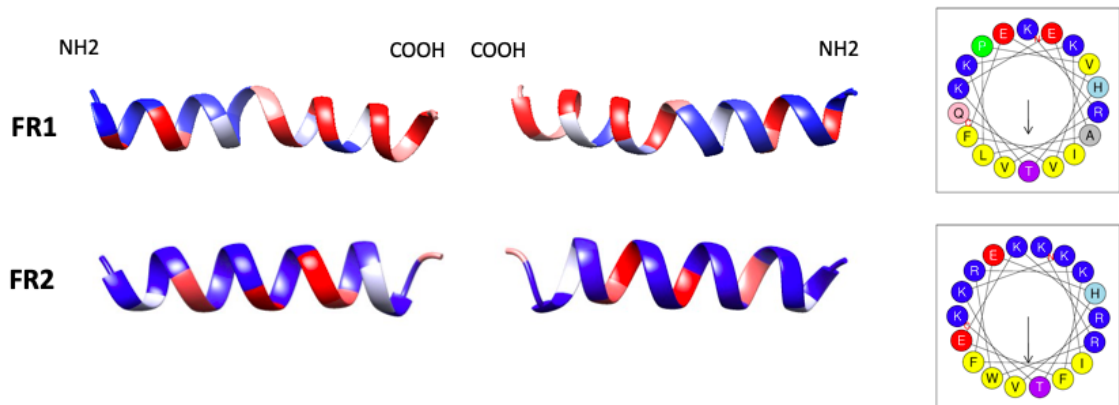


Figura 18. Diagrama de hélice y predicción estructural de FR1 y FR2. **A.** Fracción 1 (FR1) (KRVKKIFEHTKEALPVVQGVVAVA). **B.** Fracción 2 (FR2) (KRWRKFEKRVKKIFEHTKEA).

5. Conclusiones

- Las oxysterlinas 1, 2 y 3 son péptidos catiónicos, con estructura alfa hélice, de la familia de las cecropinas.
- Se determinó que las oxysterlinas 1, 2 y 3 son activas frente a bacterias Gram negativas con MICs entre 3,12 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y Gram positivas a MICs entre 12,5 y 50 $\mu\text{g/mL}$.
- Se determinó que oxysterlinas 1, 2 y 3 tienen una actividad citotóxica en células Vero, PBMCs y eritrocitos humanos en concentraciones entre 62,5 y 500 $\mu\text{g/mL}$.
- Las oxysterlinas 1 y 3 inducen el cierre de heridas *in vitro* en un modelo de queratinocitos humanos.
- Se determinó que la oxysterlina 3 inhibe la producción de $\text{TNF}\alpha$ en PBMCs estimulados con LPS.



- La presencia del residuo H18 es uno de los determinantes de la actividad antimicrobiana de las oxysterlinas.
- El extremo N-terminal (KRWRKFEKRVKKIFEHTKEA) de las oxysterlinas es determinante para la actividad antimicrobiana de los péptidos.

6. Producción bibliográfica

A partir del presente proyecto surgieron dos trabajos de pregrado titulados “EVALUACIÓN IN VITRO DE LOS PÉPTIDOS LUCILINA, OXYSTERLINA 1 Y 3 EN LOS PROCESOS DE MIGRACIÓN CELULAR Y ANGIOGÉNESIS” desarrollado por la estudiante Jessica Alejandra Palacio y el trabajo “OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO EN MICROVOLUMENES Y SU IMPLEMENTACIÓN PARA EVALUAR DOS PÉPTIDOS DE DEFENSA DEL HOSPEDERO”, desarrollado por la estudiante Juliana Franco Castrillón, ambos trabajos dirigidos por la estudiante de doctorado de esta propuesta de investigación Lily Johana Toro Segovia.

Parte de los resultados de la presente investigación se encuentran publicados en la revista PlosOne con el artículo titulado “Identification and characterization of novel cecropins from the *Oxysternon conspicillatum* neotropic dung beetle” [77] y se desarrolló el preprint Identification of new insect Host Defense Peptides (HDP) from Dung Beetles (Coleoptera:



Scarabaeidae) transcriptomes [79].

Además, a partir de los resultados de este proyecto surgieron propuestas de investigación de proyectos actualmente activos y financiados por Minciencias con los títulos “Bioprospección de péptidos antimicrobianos en escarabajos coprófagos del paisaje cultural cafetero” convocatoria 744-2016 y código 111374455390 y el proyecto “Desarrollo de nuevos péptidos antimicrobianos a partir de péptidos de defensa del hospedero (HDPs) de coleópteros de la familia Scarabaeidae y su evaluación frente a microorganismos causantes de infecciones asociadas a la atención en salud” convocatoria 844-2019 y código 111384466847.

Segundo lugar en el concurso de trabajos completos en el marco del XII encuentro nacional de investigación en enfermedades infecciosas y el II encuentro andino de enfermedades infecciosas. Llevado a cabo el 25 y 26 de septiembre del presente año (anexo S4).



7. Recomendaciones

- Profundizar en la actividad antimicrobiana y mecanismo de acción por microscopía electrónica (tratando de visualizar cambios estructurales en superficie), por microscopía confocal (marcar el péptido), tratar de ver interacción del péptido con componentes de las membranas bacterianas y/o eucariotas.
- Evaluación en modelo de infección animal. Continuar la evaluación de la oxysterlina 3 y FR2 en un modelo de infección animal de *E. coli* y de heridas *in vivo*.
- Evaluar la interacción LPS-OX3 por medio de un ensayo de neutralización de LPS. Evaluar la actividad inmunomoduladora de las oxysterlinas por medio de la cuantificación de diferentes citoquinas que permitan caracterizar la modulación de la respuesta inmune de estos péptidos.
- Realizar modificación de residuos en las secuencia de los péptidos (oxysterlina 3 y FR2) para lograr péptidos más catiónicos que vayan direccionados a mejorar la actividad antimicrobiana.
- Evaluar la susceptibilidad de bacterias resistentes a otros péptidos catiónicos frente a la oxysterlinas 1, 2 y 3.
- Evaluar la interacción de las oxysterlinas con antibióticos convencionales en la actividad antimicrobiana por medio de ensayos como checkboard.



- Profundizar en la actividad cicatrizante de los péptidos por medio de la medición de genes involucrados en los procesos de migración tales como EGF-R, FPRL-1, entre otros.
- Optimizar un método de producción de estos péptidos de forma recombinante.
- Desarrollar un anticuerpo policlonal de estos péptidos para adelantar estudios de farmacocinética en un modelo animal.
 - Realizar un diseño de péptidos direccionados para mejorar la estabilidad en el suero humano, como el uso de D-aminoácidos, ciclación y conjugación en nanopartículas.

8. Bibliografía

1. De Kraker MEA, Davey PG, Grundmann H, on behalf of the BURDEN study group. Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. Opal SM, editor. PLoS Med. 2011;8: e1001104. doi: 10.1371/journal.pmed.1001104
2. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2017;41: 252–275. doi:10.1093/femsre/fux013
3. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); 2019



Nov. doi:10.15620/cdc:82532

4. Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten, editor. The bacterial challenge, time to react: a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Stockholm: ECDC; 2009.
5. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 2013;13: 1057–1098. doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9
6. Holmberg SD, Solomon SL, Blake PA. Health and Economic Impacts of Antimicrobial Resistance. *Clin Infect Dis.* 1987;9: 1065–1078. doi:10.1093/clinids/9.6.1065
7. Mohammed MA. NO TIME TO WAIT: SECURING THE FUTURE FROM DRUG-RESISTANT INFECTIONS. INTERAGENCY COORDINATION GROUP (IACG) ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE; 2019. Available: https://www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7_6
8. Hilchie AL, Wuerth K, Hancock REW. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol.* 2013;9: 761–768. doi:10.1038/nchembio.1393
9. Zhang L, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Curr Biol.* 2016;26: R14–R19. doi: 10.1016/j.cub.2015.11.017
10. Kumar P, Kizhakkedathu J, Straus S. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules.* 2018;8: 4. doi:10.3390/biom8010004
11. Haney EF, Mansour SC, Hancock REW. Antimicrobial Peptides: An Introduction. In: Hansen PR, editor. *Antimicrobial Peptides.* New York, NY: Springer New York; 2017. pp. 3–22. doi:10.1007/978-1-4939-6737-7_1
12. Brady D, Grapputo A, Romoli O, Sandrelli F. Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci.* 2019;20: 5862.



UNIVERSIDAD
DEL QUINDÍO

doi:10.3390/ijms20235862



UNIVERSIDAD DE CALDAS
LUMINA SPARGO



Universidad Tecnológica
de Pereira



Universidad
del Tolima

13. Yi H-Y, Chowdhury M, Huang Y-D, Yu X-Q. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98: 5807–5822. doi:10.1007/s00253-014-5792-6
14. Tonk M, Vilcinskas A. The Medical Potential of Antimicrobial Peptides from Insects. *Curr Top Med Chem.* 2016;17: 554–575. doi:10.2174/1568026616666160713123654
15. Anaya-López JL, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Crit Rev Microbiol.* 2013;39: 180–195. doi:10.3109/1040841X.2012.699025
16. Moghaddam MM, Aghamollaei H, Kooshki H, Barjini KA, Mirnejad R, Choopani A. The development of antimicrobial peptides as an approach to prevention of antibiotic resistance: *Rev Med Microbiol.* 2015;26: 98–110. doi:10.1097/MRM.0000000000000032
17. Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol.* 2017;133: 117–138. doi:10.1016/j.bcp.2016.09.018
18. Lyu Y, Yang Y, Lyu X, Dong N, Shan A. Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and *Candida*. *Sci Rep.* 2016;6: 27258. doi:10.1038/srep27258
19. Stensen W, Turner R, Brown M, Kondori N, Svendsen JS, Svenson J. Short Cationic Antimicrobial Peptides Display Superior Antifungal Activities toward Candidiasis and Onychomycosis in Comparison with Terbinafine and Amorolfine. *Mol Pharm.* 2016;13: 3595–3600. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00654
20. Fieck A, Hurwitz I, Kang AS, Durvasula R. *Trypanosoma cruzi*: Synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts. *Exp Parasitol.* 2010;125: 342–347. doi:10.1016/j.exppara.2010.02.016
21. Gwyer Findlay E, Currie SM, Davidson DJ. Cationic Host Defence Peptides:



- Potential as Antiviral Therapeutics. *BioDrugs*. 2013;27: 479–493. doi:10.1007/s40259-013-0039-0
22. Kuzmin DV, Emel'yanova AA, Kalashnikova MB, Panteleev PV, Ovchinnikova TV. In Vitro Study of Antitumor Effect of Antimicrobial Peptide Tachyplesin I in Combination with Cisplatin. *Bull Exp Biol Med*. 2018;165: 220–224. doi:10.1007/s10517-018-4134-6
23. Felício MR, Silva ON, Gonçalves S, Santos NC, Franco OL. Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Front Chem*. 2017;5. doi:10.3389/fchem.2017.00005
24. Lee J, Seo CH, Luchian T, Park Y. Antimicrobial Peptide CMA3 Derived from the CA-MA Hybrid Peptide: Antibacterial and Anti-inflammatory Activities with Low Cytotoxicity and Mechanism of Action in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60: 495–506. doi:10.1128/AAC.01998-15
25. Bezzerri V, Avitabile C, Dehecchi MC, Lampronti I, Borgatti M, Montagner G, et al. Antibacterial and anti-inflammatory activity of a temporin B peptide analogue on an *in vitro* model of cystic fibrosis: ANTIMICROBIAL PEPTIDES. *J Pept Sci*. 2014;20: 822–830. doi:10.1002/psc.2674
26. Kim EY, Rajasekaran G, Shin SY. LL-37-derived short antimicrobial peptide KR-12-a5 and its d-amino acid substituted analogs with cell selectivity, anti-biofilm activity, synergistic effect with conventional antibiotics, and anti-inflammatory activity. *Eur J Med Chem*. 2017;136: 428–441. doi:10.1016/j.ejmech.2017.05.028
27. Saporito P, Vang Mouritzen M, Løbner-Olesen A, Jenssen H. LL-37 fragments have antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis* biofilms and wound healing potential in HaCaT cell line. *J Pept Sci*. 2018;24: e3080. doi:10.1002/psc.3080
28. Otvos L, Ostorhazi E. Therapeutic utility of antibacterial peptides in wound healing. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13: 871–881. doi:10.1586/14787210.2015.1033402.
29. Saugar JM, Rodríguez-Hernández MJ, de la Torre BG, Pachón-Ibañez ME,



- Fernández-Reyes M, Andreu D, et al. Activity of Cecropin A-Melittin Hybrid Peptides against Colistin-Resistant Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*: Molecular Basis for the Differential Mechanisms of Action. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50: 1251–1256. doi:10.1128/AAC.50.4.1251-1256.2006
30. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: D1087–D1093. doi:10.1093/nar/gkv1278
 31. Yusof. Anticancer peptides derived from supermeal worm (*Zophobas morio*) larvae. *International Food Research Journal*; 2017. Available: [http://www.ifrj.upm.edu.my/24%20\(07\)%202017%20supplementary/\(29\)%20R1.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/24%20(07)%202017%20supplementary/(29)%20R1.pdf)
 32. Kang B-R, Kim H, Nam S-H, Yun E-Y, Kim S-R, Ahn M-Y, et al. CopA3 peptide from *Copris tripartitus* induces apoptosis in human leukemia cells via a caspase-independent pathway. *BMB Rep.* 2012;45: 85–90. doi:10.5483/BMBRep.2012.45.2.85
 33. Yang Y-T, Lee MR, Lee SJ, Kim S, Nai Y-S, Kim JS. *Tenebrio molitor* Gram-negative-binding protein 3 (*TmGNBP3*) is essential for inducing downstream antifungal *Tenecin 1* gene expression against infection with *Beauveria bassiana* JEF-007: Mealworm immune response against fungal infection. *Insect Sci.* 2018;25: 969–977. doi:10.1111/1744-7917.12482
 34. Kim D. Bacterial Expression of Tenecin 3, an Insect Antifungal Protein Isolated from *Tenebrio molitor*, and Its Efficient Purification. *Molecules and Cells*; 1998. Available: <file:///Users/user/Downloads/molcells-8-6-786.pdf>
 35. Morikazu I. Acaloleptins A: Inducible Antibacterial Peptides From Larvae of the Beetle, *Acalolepta luxuriosa*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*; 1999. Available: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1999\)40:2<88::AID-ARCH3>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1999)40:2<88::AID-ARCH3>3.0.CO;2-B)
 36. Saito A, Ueda K, Imamura M, Atsumi S, Tabunoki H, Miura N, et al. Purification and cDNA cloning of a cecropin from the longicorn beetle, *Acalolepta luxuriosa*. *Comp*



- Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2005;142: 317–323.
doi:10.1016/j.cbpb.2005.08.001
37. Miyanoshita A, Hara S, Sugiyama M, Asaoka A, Taniai K, Yukuhiro F, et al. Isolation and Characterization of a New Member of the Insect Defensin Family from a Beetle, *Allomyrina dichotoma*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;220: 526–531. doi:10.1006/bbrc.1996.0438
38. Vasanth P, Sathish K. ISOLATION AND PARTIAL PURIFICATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES/PROTEINS FROM DUNG BEETLE, *ONTHOPHAGUS TAURUS* IMMUNE HEMOLYMPH. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*; 2013. Available: <http://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2013/05/jmbfs-0359-vasanth.pdf>
39. Rajamuthiah R, Jayamani E, Conery AL, Fuchs BB, Kim W, Johnston T, et al. A Defensin from the Model Beetle *Tribolium castaneum* Acts Synergistically with Telavancin and Daptomycin against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*. *Bhattacharjya S, editor. PLOS ONE*. 2015;10: e0128576. doi:10.1371/journal.pone.0128576
40. Tonk M, Knorr E, Cabezas-Cruz A, Valdés JJ, Kollwe C, Vilcinskis A. *Tribolium castaneum* defensins are primarily active against Gram-positive bacteria. *J Invertebr Pathol*. 2015;132: 208–215. doi:10.1016/j.jip.2015.10.009
41. Hirsch R, Wiesner J, Marker A, Bauer A, Hammann PE, Vilcinskis A. Biological Profiling of Coleoptericins and Coleoptericin-Like Antimicrobial Peptides from the Invasive Harlequin Ladybird *Harmonia axyridis*. In: Donelli G, editor. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*. Cham: Springer International Publishing; 2018. pp. 43–59. doi:10.1007/5584_2018_276
42. Sagisaka A, Miyanoshita A, Ishibashi J, Yamakawa M. Purification, characterization and gene expression of a glycine and proline-rich antibacterial protein family from larvae of a beetle, *Allomyrina dichotoma*: Antibacterial proteins from *A. dichotoma*. *Insect Mol Biol*. 2001;10: 293–302. doi:10.1046/j.0962-1075.2001.00261.x
43. Rodríguez-García MJ, García-Reina A, Machado V, Galián J. Identification,



- structural characterisation and expression analysis of a defensin gene from the tiger beetle *Calomera littoralis* (Coleoptera: Cicindelidae). *Gene*. 2016;589: 56–62. doi:10.1016/j.gene.2016.05.030
44. Yoon, HS, Lee CS, Lee SY, Choi CS, Lee IH, Yeo SM, et al. Purification and cDNA cloning of inducible antibacterial peptides from *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera). *Arch Insect Biochem Physiol*. 2003;52: 92–103. doi:10.1002/arch.10072
 45. Lee S, Moon H, Kurata S, Natori S, Lee B. Purification and cDNA Cloning of an Antifungal Protein from the Hemolymph of *Holotrichia diomphalia* Larvae. *Biol Pharm Bull*. 1995;18: 1049–1052. doi:10.1248/bpb.18.1049
 46. Memarpoor-Yazdi M, Zare-Zardini H, Asoodeh A. A Novel Antimicrobial Peptide Derived from the Insect *Paederus dermatitis*. *Int J Pept Res Ther*. 2013;19: 99–108. doi:10.1007/s10989-012-9320-1
 47. Lu X, Shen J, Jin X, Ma Y, Huang Y, Mei H, et al. Bactericidal activity of *Musca domestica* cecropin (Mdc) on multidrug-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;95: 939–945. doi:10.1007/s00253-011-3793-2
 48. Wei L, Huang C, Yang H, Li M, Yang J, Qiao X, et al. A potent anti-inflammatory peptide from the salivary glands of horsefly. *Parasit Vectors*. 2015;8: 556. doi:10.1186/s13071-015-1149-y
 49. Lee E, Shin A, Kim Y. ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF CECROPIN A AND ITS MECHANISM OF ACTION: Anti-Inflammatory Activities of Cecropin A. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2015;88: 31–44. doi:10.1002/arch.21193
 50. Hilchie AL, Hoskin DW, Power Coombs MR. Anticancer Activities of Natural and Synthetic Peptides. In: Matsuzaki K, editor. *Antimicrobial Peptides*. Singapore: Springer Singapore; 2019. pp. 131–147. doi:10.1007/978-981-13-3588-4_9
 51. Lee E, Kim J-K, Jeon D, Jeong K-W, Shin A, Kim Y. Functional Roles of Aromatic Residues and Helices of Papiliocin in its Antimicrobial and Anti-inflammatory Activities. *Sci Rep*. 2015;5: 12048. doi:10.1038/srep12048
 52. Martínez-Quintero BG. distribución Potencial de *Oxysternon conspicillatum* (Weber, 1801) en diferentes escenarios de Cambio Climático en Colombia.



BOLETIN CIENTIFICO Centro de Museos Museo de Historia natural; 2017.

Available: <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v21n2/0123-3068-bccm-21-02-00190.pdf>

53. Cultid C, Medina C, Constantino LM, Bedir Martinez, Escobar AF. Escarabajos coprófagos (Scarabaeinae) del eje cafetero: Guia para el estudio ecológico (Field Guide). Cenicafé, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia and Wild life Conservation Society; 2012. doi:10.13140/RG.2.1.1013.9049
54. Toro Segovia LJ. Identificación y evaluación de la actividad antibacteriana de un péptido antimicrobiano del escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum*. Trabajo de grado maestría, Universidad del Quindío. 2014.
55. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011;8: 785–786. doi:10.1038/nmeth.1701
56. Peng J, Xu J. Raptorx: Exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2011;79: 161–171. doi:10.1002/prot.23175
57. Tom H, Ibis biosciences, Carlsbad. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*; 2011. Available: <file:///Users/user/Downloads/Bioeditsoftwarereview.pdf>
58. Gautier R, Douguet D, Antony B, Drin G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*. 2008;24: 2101–2102. doi:10.1093/bioinformatics/btn392
59. Cole C, Barber JD, Barton GJ. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res*. 2008;36: W197–W201. doi:10.1093/nar/gkn238
60. Chen JE, Huang CC, Ferrin TE. RRDistMaps: a UCSF Chimera tool for viewing and comparing protein distance maps. *Bioinformatics*. 2015;31: 1484–1486. doi:10.1093/bioinformatics/btu841
61. Provencher SW, Gloeckner J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*. 1981;20: 33–37. doi:10.1021/bi00504a006



62. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis*. 2009;49: 1749–1755. doi:10.1086/647952
63. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity: Resazurin as a cytotoxicity assay. *Eur J Biochem*. 2000;267: 5421–5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
64. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3: 163–175. doi:10.1038/nprot.2007.521
65. Tellez G, Johanna L, Franco J, Carolina D, Carlos J, de G. MICRO-DILUCIÓN EN PLACA PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN 50 uL v3 (protocols.io.8xmhxk6). doi: 10.17504/protocols.io.8xmhxk6
66. Weinstein MP, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 2018.
67. Graham JM, Rickwood D. Isolation of Mononuclear Cells from Human Blood (Density Barrier Sedimentation). In: John Wiley & Sons, Ltd, editor. *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2004. p. a0003801. doi: 10.1038/npg.els.0003801
68. Shin SY, Kang JH, Hahm K-S. Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J Pept Res*. 1999;53: 82–90. doi:10.1111/j.1399-3011.1999.tb01620.x
69. Murugan RN, Jacob B, Ahn M, Hwang E, Sohn H, Park H-N, et al. De Novo Design and Synthesis of Ultra-Short Peptidomimetic Antibiotics Having Dual Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activities. Lee KS, editor. *PLoS ONE*. 2013;8: e80025. doi: 10.1371/journal.pone.0080025
70. Toro L, Téllez G, Henao D, Carlos J. Evaluación la producción de TNF alfa por PBMCs estimulados con LPS tratados con péptidos v2. doi: 10.17504/protocols.io.kdkcs4w



71. Carretero M, Escámez MJ, García M, Duarte B, Holguín A, Retamosa L, et al. In vitro and In vivo Wound Healing-Promoting Activities of Human Cathelicidin LL-37. *J Invest Dermatol.* 2008;128: 223–236. doi:10.1038/sj.jid.5701043
72. Baranska-Rybak W. Colorimetric Evaluation of the Time-Killing Assay for Citropin 1.1, Lipopeptide Palm-KK-NH₂, and Temporin A. *J Microbiol Biotechnol.* 2011;21: 536–539. doi:10.4014/jmb.1010.10008
73. Pérez-Peinado C, Dias SA, Mendonça DA, Castanho MARB, Veiga AS, Andreu D. Structural determinants conferring unusual long life in human serum to rattlesnake-derived antimicrobial peptide Ctn[15-34]. *J Pept Sci.* 2019;25. doi:10.1002/psc.3195
74. Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. Insect Immunity. Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem.* 2005;106: 7–16. doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x
75. Steiner H, Hultmark D, Engström Å, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature.* 1981;292: 246–248. doi:10.1038/292246a0
76. Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, Vilcinskis A. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2016;371: 20150290. doi:10.1098/rstb.2015.0290
77. Toro Segovia LJ, Téllez Ramírez GA, Henao Arias DC, Rivera Duran JD, Bedoya JP, Castaño Osorio JC. Identification and characterization of novel cecropins from the *Oxysternon conspiciatum* neotropic dung beetle. van Raaij MJ, editor. *PLOS ONE.* 2017;12: e0187914. doi:10.1371/journal.pone.0187914
78. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215: 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
79. Ramirez GAT, Osorio-Méndez JF, Arias DCH, Toro S LJ, Castrillón JF, Rojas-Montoya M, et al. Identification of new insect Host Defense Peptides (HDP) from Dung Beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) transcriptomes. *Molecular Biology*; 2020 Jun. doi:10.1101/2020.06.15.152363



80. Tamang DG, Saier, Jr. MH. The Cecropin Superfamily of Toxic Peptides. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2006;11: 94–103. doi:10.1159/000092821
81. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc.* 2006;1: 2876–2890. doi:10.1038/nprot.2006.202
82. Kiyota T, Lee S, Sugihara G. Design and Synthesis of Amphiphilic α -Helical Model Peptides with Systematically Varied Hydrophobic–Hydrophilic Balance and Their Interaction with Lipid- and Bio-Membranes [†]. *Biochemistry.* 1996;35: 13196–13204. doi:10.1021/bi961289t
83. Kim J-K, Lee E, Shin S, Jeong K, Lee J-Y, Bae S-Y, et al. Structure and Function of Papiliocin with Antimicrobial and Anti-inflammatory Activities Isolated from the Swallowtail Butterfly, *Papilio xuthus*. *J Biol Chem.* 2011;286: 41296–41311. doi:10.1074/jbc.M111.269225
84. Wang L, Lai C, Wu Q, Liu J, Zhou M, Ren Z, et al. Production and characterization of a novel antimicrobial peptide HKABF by *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* 2008;43: 1124–1131. doi: 10.1016/j.procbio.2008.06.009
85. Xu X, Yang H, Ma D, Wu J, Wang Y, Song Y, et al. Toward an Understanding of the Molecular Mechanism for Successful Blood Feeding by Coupling Proteomics Analysis with Pharmacological Testing of Horsefly Salivary Glands. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7: 582–590. doi:10.1074/mcp.M700497-MCP200
86. Wu J, Mu L, Zhuang L, Han Y, Liu T, Li J, et al. A cecropin-like antimicrobial peptide with anti-inflammatory activity from the black fly salivary glands. *Parasit Vectors.* 2015;8: 561. doi:10.1186/s13071-015-1176-8
87. Ryu S, Choi S-Y, Acharya S, Chun Y-J, Gurley C, Park Y, et al. Antimicrobial and Anti-Inflammatory Effects of Cecropin A(1-8)–Magainin2(1-12) Hybrid Peptide Analog P5 against *Malassezia furfur* Infection in Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2011;131: 1677–1683. doi:10.1038/jid.2011.112
88. Téllez GA, Castaño-Osorio JC. Expression and purification of an active cecropin-like recombinant protein against multidrug resistance *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2014;100: 48–53. doi:10.1016/j.pep.2014.05.004



89. WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. In: WHO [Internet]. [cited 7 Sep 2020]. Available: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
90. WHO. Resistencia a los antimicrobianos. 9 Sep 2020 [cited 9 Sep 2020]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
91. Sato H, Feix JB. Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2006;1758: 1245–1256. doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.021
92. Matsuzaki K, Harada M, Handa T, Funakoshi S, Fujii N, Yajima H, et al. Magainin 1-induced leakage of entrapped calcein out of negatively-charged lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1989;981: 130–134. doi:10.1016/0005-2736(89)90090-4
93. Tytler EM, Anantharamaiah GM, Walker DE, Mishra VK, Palgunachari MN, Segrest JP. Molecular Basis for Prokaryotic Specificity of Magainin-Induced Lysis. *Biochemistry.* 1995;34: 4393–4401. doi:10.1021/bi00013a031
94. HANCOCK RE, CHAPPLE DS. Peptide Antibiotics. 1999. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89271/pdf/ac001317.pdf>
95. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev.* 2003;55: 27–55. doi:10.1124/pr.55.1.2
96. Haug BE, Stensen W, Kalaaji M, Rekdal Ø, Svendsen JS. Synthetic Antimicrobial Peptidomimetics with Therapeutic Potential. *J Med Chem.* 2008;51: 4306–4314. doi:10.1021/jm701600a
97. Matsuzaki K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2009;1788: 1687–1692. doi:10.1016/j.bbamem.2008.09.013
98. Haug BE, Camilio KA, Eliassen LT, Stensen W, Svendsen JS, Berg K, et al. Discovery of a 9-mer Cationic Peptide (LTX-315) as a Potential First in Class Oncolytic Peptide. *J Med Chem.* 2016;59: 2918–2927.



doi:10.1021/acs.jmedchem.5b02025

99. Ishitsuka Y, Pham DS, Waring AJ, Lehrer RI, Lee KYC. Insertion selectivity of antimicrobial peptide protegrin-1 into lipid monolayers: Effect of head group electrostatics and tail group packing. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2006;1758: 1450–1460. doi:10.1016/j.bbamem.2006.08.001
100. Konovalov O, Myagkov I, Struth B, Lohner K. Lipid discrimination in phospholipid monolayers by the antimicrobial frog skin peptide PGLa. A synchrotron X-ray grazing incidence and reflectivity study. *Eur Biophys J.* 2002;31: 428–437. doi:10.1007/s00249-002-0233-3
101. Epanand RF, Maloy WL, Ramamoorthy A, Epanand RM. Probing the “Charge Cluster Mechanism” in Amphipathic Helical Cationic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry.* 2010;49: 4076–4084. doi:10.1021/bi100378m
102. Oreopoulos J, Epanand RF, Epanand RM, Yip CM. Peptide-Induced Domain Formation in Supported Lipid Bilayers: Direct Evidence by Combined Atomic Force and Polarized Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Biophys J.* 2010;98: 815–823. doi:10.1016/j.bpj.2009.12.4327
103. Kell DB, Pretorius E. On the translocation of bacteria and their lipopolysaccharides between blood and peripheral locations in chronic, inflammatory diseases: the central roles of LPS and LPS-induced cell death. *Integr Biol.* 2015;7: 1339–1377. doi:10.1039/c5ib00158g
104. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DME, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, et al. Modulation of the TLR-Mediated Inflammatory Response by the Endogenous Human Host Defense Peptide LL-37. *J Immunol.* 2006;176: 2455–2464. doi:10.4049/jimmunol.176.4.2455
105. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3: 36–46. doi:10.1038/nrmicro1068
106. Luna AL, Acosta-Saavedra LC, Lopez-Carrillo L, Conde P, Vera E, De Vizcaya-Ruiz A, et al. Arsenic alters monocyte superoxide anion and nitric oxide production in environmentally exposed children. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;245: 244–251.



doi:10.1016/j.taap.2010.03.006

107. Wright S, Ramos R, Tobias P, Ulevitch R, Mathison J. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249: 1431–1433. doi:10.1126/science.1698311
108. Kobayashi M, Saitoh S, Tanimura N, Takahashi K, Kawasaki K, Nishijima M, et al. Regulatory Roles for MD-2 and TLR4 in Ligand-Induced Receptor Clustering. *J Immunol*. 2006;176: 6211–6218. doi:10.4049/jimmunol.176.10.6211
109. Wong HR, Odoms K, Sakthivel B. Divergence of canonical danger signals: The genome-level expression patterns of human mononuclear cells subjected to heat shock or lipopolysaccharide. *BMC Immunol*. 2008;9: 24. doi:10.1186/1471-2172-9-24
110. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased Toll-Like Receptor (TLR) Activation and TLR Ligands in Recently Diagnosed Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care*. 2010;33: 861–868. doi:10.2337/dc09-1799
111. Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol*. 1999;11: 19–22. doi:10.1016/S0952-7915(99)80004-1
112. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999;162: 3749–3752.
113. Ding L, Weiss T, Waring AJ, Lehrer RI, Huang H. Interaction of Antimicrobial Peptides with Lipopolysaccharides. *Biochemistry*; 2003. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14567687/>
114. Gough M, Hancock RE, Kelly NM. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect Immun*. 1996;64: 4922–4927.
115. Hirata M, Shimomura Y, Yoshida M, Wright SC, Larrick JW. Endotoxin-binding synthetic peptides with endotoxin-neutralizing, antibacterial and anticoagulant activities. *Prog Clin Biol Res*. 1994;388: 147–159.



116. Ooi CE, Weiss J, Doerfler ME, Elsbach P. Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils. *J Exp Med.* 1991;174: 649–655. doi:10.1084/jem.174.3.649
117. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun.* 1995;63: 1291–1297.
118. Scott MG, Vreugdenhil ACE, Buurman WA, Hancock REW, Gold MR. Cutting Edge: Cationic Antimicrobial Peptides Block the Binding of Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Protein. *J Immunol.* 2000;164: 549–553. doi:10.4049/jimmunol.164.2.549
119. Kim J, Jacob B, Jang M, Kwak C, Lee Y, Son K, et al. Development of a novel short 12-meric papiliocin-derived peptide that is effective against Gram-negative sepsis. *Sci Rep.* 2019;9: 3817. doi:10.1038/s41598-019-40577-8
120. Wang J, Ma K, Ruan M, Wang Y, Li Y, Fu YV, et al. A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties. *PeerJ.* 2018. doi:10.7717/peerj.5369
121. Fang S-L, Wang L, Fang Q, Chen C, Zhao X-S, Qian C, et al. Characterization and functional study of a Cecropin-like peptide from the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*: Fang et al. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2017;94: e21368. doi:10.1002/arch.21368
122. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Viticchi C, Mocchegiani F, Riva A, et al. Effect of mono-dose intraperitoneal cecropins in experimental septic shock: *Crit Care Med.* 2001;29: 1666–1669. doi:10.1097/00003246-200109000-00002
123. Lee J-H, Del Sorbo L, Khine AA, de Azavedo J, Low DE, Bell D, et al. Modulation of Bacterial Growth by Tumor Necrosis Factor- α *In Vitro* and *In Vivo*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168: 1462–1470. doi:10.1164/rccm.200302-303OC
124. Mizgerd JP. Competing Benefits of Tumor Necrosis Factor- α for Bacteria and for Host Defense. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168: 1410–1411.



UNIVERSIDAD
DEL QUINDÍO

doi:10.1164/rccm.2310002



UNIVERSIDAD DE CALDAS
LUMINA SPARGO



Universidad Tecnológica
de Pereira



Universidad
del Tolima

125. Wei L, Yang Y, Zhou Y, Li M, Yang H, Mu L, et al. Anti-inflammatory activities of *Aedes aegypti* cecropins and their protection against murine endotoxin shock. *Parasit Vectors*. 2018;11: 470. doi:10.1186/s13071-018-3000-8
126. Mangoni ML, McDermott AM, Zasloff M. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. *Exp Dermatol*. 2016;25: 167–173. doi:10.1111/exd.12929
127. Mu L, Tang J, Liu H, Shen C, Rong M, Zhang Z, et al. A potential wound-healing-promoting peptide from salamander skin. *FASEB J*. 2014;28: 3919–3929. doi:10.1096/fj.13-248476
128. Sheng Q, Lv Z, Cai W, Song H, Qian L, Mu H, et al. Human β -defensin-3 promotes intestinal epithelial cell migration and reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatr Res*. 2014;76: 269–279. doi:10.1038/pr.2014.93
129. Lee PHA, Rudisill JA, Lin KH, Zhang L, Harris SM, Falla TJ, et al. HB-107, a nonbacteriostatic fragment of the antimicrobial peptide cecropin B, accelerates murine wound repair. *Wound Repair Regen*. 2004;12: 351–358. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.012303.x
130. Soudeiha MAH, Dahdouh EA, Azar E, Sarkis DK, Daoud Z. In vitro Evaluation of the Colistin-Carbapenem Combination in Clinical Isolates of *A. baumannii* Using the Checkerboard, Etest, and Time-Kill Curve Techniques. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7: 209. doi:10.3389/fcimb.2017.00209
131. Doymaz MZ, Karaaslan E. Comparison of antibacterial activities of polymyxin B and colistin against multidrug resistant Gram negative bacteria. *Infect Dis*. 2019;51: 676–682. doi:10.1080/23744235.2019.1640386
132. Martínez M, Polizzotto A, Flores N, Semorile L, Maffia PC. Antibacterial, anti-biofilm and in vivo activities of the antimicrobial peptides P5 and P6.2. *Microb Pathog*. 2020;139: 103886. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103886
133. Lee JY, Boman A, Sun CX, Andersson M, Jornvall H, Mutt V, et al. Antibacterial



- peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc Natl Acad Sci.* 1989;86: 9159–9162. doi:10.1073/pnas.86.23.9159
134. Efimova SS, Schagina LV, Ostroumova OS. Channel-Forming Activity of Cecropins in Lipid Bilayers: Effect of Agents Modifying the Membrane Dipole Potential. *Langmuir.* 2014;30: 7884–7892. doi:10.1021/la501549v
135. Darveau RP, Cunningham MD, Seachord CL, Cassiano-Clough L, Cosand WL, Blake J, et al. Beta-lactam antibiotics potentiate magainin 2 antimicrobial activity in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35: 1153–1159. doi:10.1128/AAC.35.6.1153
136. Hamamoto K, Kida Y, Zhang Y, Shimizu T, Kuwano K. Antimicrobial Activity and Stability to Proteolysis of Small Linear Cationic Peptides with D-Amino Acid Substitutions. *Microbiol Immunol.* 2002;46: 741–749. doi:10.1111/j.1348-0421.2002.tb02759.x
137. Wang J, Yadav V, Smart AL, Tajiri S, Basit AW. Stability of peptide drugs in the colon. *Eur J Pharm Sci.* 2015;78: 31–36. doi:10.1016/j.ejps.2015.06.018
138. Hunter HN, Jing W, Schibli DJ, Trinh T, Park IY, Kim SC, et al. The interactions of antimicrobial peptides derived from lysozyme with model membrane systems. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2005;1668: 175–189. doi:10.1016/j.bbamem.2004.12.004
139. Hilpert K, Volkmer-Engert R, Walter T, Hancock REW. High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nat Biotechnol.* 2005;23: 1008–1012. doi:10.1038/nbt1113
140. Hancock REW, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006;24: 1551–1557. doi:10.1038/nbt1267
141. Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, Adcock I, Kirkham PA. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and Gi-alpha dependent PI-3kinase signalling. *J Inflamm.* 2012;9: 1. doi:10.1186/1476-9255-9-1



Grupo de inmunología molecular.



Centro de investigaciones biomédicas

FICHA DE BANCO DE CELULAS

Responsable: Lily Johanna Toro Segovia

Fecha de elaboración: 20/08/2014

Ficha de banco de células.
<i>ESCHERICHIA COLI ATCC 25922</i>
Fecha
20/08/2014
Nombre científico
<i>Escherichia coli</i> Serotype O6, Biotype 1
Referencia catalogo
ATCC: 25922
Ubicación dentro del laboratorio
Freezer viejo caja cepario
Origen de la célula. (aislado clínico, banco de células, donación)
Donación Hospital San Juan De Dios
Características morfológicas.
Bacilo Gram negativo
características genéticas
AX110212 Sequence 945 from Patent WO0123604; AX110242 Sequence 975 from Patent WO0123604. AX111547 Sequence 2280 from Patent WO0123604. X80724 E. coli (ATCC 25922) gene for 16S rRNA. AF038431 Escherichia coli DNA gyrase A (gyrA) gene, partial cds.
condiciones óptimas de cultivo y replicación
Raspar la superficie del hielo del cultivo con asa estéril y plaquearlo en caja de Petri con medio tripticasa de soya e incubar 37°C. (ATCC® Medium 18: Trypticase Soy Agar/Broth).
antibiograma si es necesario
Utilizada como control para la sensibilidad a los antibióticos.
pase número del primer aislado guardado en el laboratorio
Desconocido
Técnicas estandarizadas en el laboratorio con las cuales se usa esta célula
Evaluación de actividad antimicrobiana.
Precauciones específicas de uso
convencionales.
Riesgos y nivel de bioseguridad
I (NO patógeno).
Medidas de protección personal ambiental.
Bata, tapabocas, guantes
En caso de accidente que se debe hacer.
Lave con abundante agua, no induzca vómito, no contiene productos tóxicos.



Grupo de inmunología molecular.



Centro de investigaciones biomédicas

Responsable: Lily Johanna Toro Segovia

Fecha de elaboración: 20/08/2014

Ficha de banco de células.
<i>KLEBSIELLA KPC</i>
Fecha
20/08/2014
Identificación
Tubo 1.1- 1.2- 1.3- 1.4
Nombre científico
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Referencia catalogo
ATCC: BAA1705
Ubicación dentro del laboratorio
Freezer viejo caja cepario
Origen de la célula. (aislado clínico, banco de células, donación)
Donación Hospital San Juan De Dios
Características morfológicas.
Bacilo Gram negativo
características genéticas
carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase (blaKPC-2) gene (<i>bla_{KPC+}/bla_{NDM-}</i>)
condiciones óptimas de cultivo y replicación
Raspar la superficie del hielo del cultivo con asa estéril y plaquearlo en caja de Petri con medio tripticasa de soya e incubar 37°C. (ATCC® Medium 18: Trypticase Soy Agar/Broth).
antibiograma si es necesario
Resistente a los carbapenems (Imipenem and Ertapenem)
pase número del primer aislado guardado en el laboratorio
Desconocido
Técnicas estandarizadas en el laboratorio con las cuales se usa esta célula
Evaluación de actividad antimicrobiana.
Precauciones específicas de uso
Doble guante y bata de bioseguridad no usar objetos corto punzantes para manipular, manipular en cabina de bioseguridad nivel II.
Riesgos y nivel de bioseguridad
II (patógeno).
Medidas de protección personal ambiental.
Bata, tapabocas, doble guante
En caso de accidente que se debe hacer.
Lave con abundante agua, no induzca vómito, no contiene productos tóxicos.



Grupo de inmunología molecular.



Centro de investigaciones biomédicas

Responsable: Diana Carolina Henao

Fecha de elaboración: 03/03/2015

Ficha de banco de células.
<i>STAPHYLOCOCCUS SAPROPHYTICUS</i>
Fecha
25/02/2015
Identificación
Tubo 9
Nombre científico
Staphylococcus saprophyticus
Referencia catalogo
--
Ubicación dentro del laboratorio
Freezer viejo caja cepario
Origen de la célula. (aislado clínico, banco de células, donación)
Aislado clínico donado por Hospital San Juan de Dios
Características morfológicas.
Bacteria Gram positiva
características genéticas
Productor de betalactamasa
condiciones óptimas de cultivo y replicación
Raspar la superficie del hielo del cultivo con asa estéril y plaquearlo en caja de Petri con medio Mueller Hinton e incubar 37°C.
antibiograma si es necesario
Resistente a meticilina, Ampicilina R R, Clindamicina >2 R >2 R, daptomicina >4 N <=1 S, Eritromicina > 4 R > 4 R, Linezolid >4 N >4 N, Minociclina >8 R >8 R, oxacilina >2 R 0,5 R, penicilina G R R, Rifampicina >2 R <=5 S, tetraciclina >8 R >8 R, trimetroprim-sulfametoxazol <=0,5/9,5 S <=0,5/9,5 S.
pase número del primer aislado guardado en el laboratorio
Desconocido
Técnicas estandarizadas en el laboratorio con las cuales se usa esta célula
Evaluación de actividad antibacteriana
Precauciones específicas de uso
Doble guante y bata de bioseguridad no usar objetos corto punzantes para manipular
Riesgos y nivel de bioseguridad
II (patógeno).
Medidas de protección personal ambiental.
Bata, tapabocas, doble guante.



Grupo de inmunología molecular.



Centro de investigaciones biomédicas

En caso de accidente que se debe hacer.

Lave con abundante agua, no induzca vómito, no contiene productos tóxicos.

Responsable: Diana Carolina Henao

Fecha de elaboración: 03/03/2015

Ficha de banco de células.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS 02180344

Fecha

25/02/2015

Identificación

Tubo 10

Nombre científico

Staphylococcus aureus

Referencia catalogo

--

Ubicación dentro del laboratorio

Freezer viejo cepario

Origen de la célula. (aislado clínico, banco de células, donación)

Aislado clínico donado por Hospital San Juan de Dios

Características morfológicas.

Bacteria Gram positiva

características genéticas

Productor de betalactamasa

condiciones óptimas de cultivo y replicación

Raspar la superficie del hielo del cultivo con asa estéril y plaquearlo en caja de Petri con medio Mueller Hinton e incubar 37°C

antibiograma si es necesario

Cefazolina <=2 S, clindamicina <=0,5 S, Daptomicina <=1 S, Eritromicina <=0,5 S, linezolid <= 1 S, minociclina <=1 S, oxacilina <=0,25 S, penicilina G > 1 R, quinupristina-dalfopristina <= 0,5 S, rifampicina <=0,5 S, tetraciclina > 8 R, trimetoprim-sulfametoxazol >2/38 R, vancomicina 1 S.

pase número del primer aislado guardado en el laboratorio

Desconocido

Técnicas estandarizadas en el laboratorio con las cuales se usa esta célula

Evaluación de actividad antibacteriana

Precauciones específicas de uso

Doble guante y bata de bioseguridad no usar objetos corto punzantes para manipular

Riesgos y nivel de bioseguridad

II (patógeno).



Grupo de inmunología molecular.



Centro de investigaciones biomédicas

Medidas de protección personal ambiental.
Bata, tapabocas, doble guante.
En caso de accidente que se debe hacer.
Lave con abundante agua, no induzca vómito, no contiene productos tóxicos.

Responsable: Diana Carolina Henao

Fecha de elaboración: 03/03/2015

Ficha de banco de células.
<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS 02180345</i>
Fecha
25/02/2015
Identificación
Tubo 11
Nombre científico
<i>Staphylococcus aureus</i>
Referencia catalogo
--
Ubicación dentro del laboratorio
Freezer viejo, caja cepario
Origen de la célula. (aislado clínico, banco de células, donación)
Aislado clínico donación hospital san juan de Dios
Características morfológicas.
Gram positivo
características genéticas
Productor de betalactamasa
condiciones óptimas de cultivo y replicación
Raspar la superficie del hielo del cultivo con asa estéril y plaquearlo en caja de Petri con medio Mueller Hinton e incubar 37°C
antibiograma si es necesario
Cefazolina <=2 S, clindamicina <=0,5 S, Daptomicina <=1S, Eritromicina <=0,5 S, linezolidina <= 1 S, minociclina <=1 S, oxacilina <=0,25 S, penicilina G > 1 R, quinupristina-dalfopristina <= 0,5 S, rifampicina <=0,5 S, tetraciclina <=0,5 S, trimetoprim-sulfametoxazol <0,5/9,5 S, vancomicina 1 S.
pase número del primer aislado guardado en el laboratorio
Desconocido
Técnicas estandarizadas en el laboratorio con las cuales se usa esta célula
Evaluación ensayo de actividad antibacteriana
Precauciones específicas de uso
Doble guante y bata de bioseguridad no usar objetos corto punzantes para manipular



Grupo de inmunología molecular.



Centro de investigaciones biomédicas

Riesgos y nivel de bioseguridad
II (patógeno).
Medidas de protección personal ambiental.
Bata, tapabocas, doble guante.
En caso de accidente que se debe hacer.
Lave con abundante agua, no induzca vómito, no contiene productos tóxicos.

Responsable: Lily Johanna Toro Segovia

Fecha de elaboración: 22/08/2014

Ficha de banco de células.
<i>Pseudomona aeruginosa PA 105663</i>
Fecha
22/08/2014
Identificación
Nombre científico
Referencia catalogo
--
Ubicación dentro del laboratorio
Origen de la célula. (aislado clínico, banco de células, donación)
Características morfológicas.
características genéticas
condiciones óptimas de cultivo y replicación
Raspar la superficie del hielo del cultivo con asa estéril y plaquearlo en caja de Petri como medio LB+ampicilina 50-75µg/ml e incubar 37°C.
antibiograma si es necesario
pase número del primer aislado guardado en el laboratorio
Técnicas estandarizadas en el laboratorio con las cuales se usa esta célula
Precauciones específicas de uso
Riesgos y nivel de bioseguridad



Grupo de inmunología molecular.



Centro de investigaciones biomédicas

Medidas de protección personal ambiental.
En caso de accidente que se debe hacer.
Lave con abundante agua, no induzca vómito, no contiene productos tóxicos.

Responsable: Lily Johanna Toro

Fecha de elaboración: 22/08/2014

Ficha de banco de células.
<i>ESCHERICHIA COLI BL21 PLÁSMIDO OXYSFENSINA1</i>
Fecha
22/08/2014
Identificación
C1,C2,C3,C4,C5,C6, referente a colonia 1, 2, 3, 4, 5 y 6.
Nombre científico
Escherichia coli BL21 con plásmido Oxysfensina1.
Referencia catalogo
--
Ubicación dentro del laboratorio
Freezer caja blanca marcada con escarabajos
Origen de la célula. (aislado clínico, banco de células, donación)
Proyecto 579 (escarabajos UQ convocatoria interna)
Características morfológicas.
Bacilo Gram negativo
características genéticas
<i>E. coli B F⁻, ompT, hsdS (r_B⁻, m_B⁻), gal, plásmido pEXP5-ct TOPO TA -OXYSFENSINA1.</i>
condiciones óptimas de cultivo y replicación
Raspar la superficie del hielo del cultivo con asa estéril y plaquearlo en caja de Petri con medio LB+ampicilina 50-75µg/ml e incubar 37°C.
antibiograma si es necesario
Resistente a la ampicilina
pase número del primer aislado guardado en el laboratorio
1
Técnicas estandarizadas en el laboratorio con las cuales se usa esta célula
Producción de proteína recombinante Oxysfensina1 con cola de histidinas
Precauciones específicas de uso
Básicas.



Grupo de inmunología molecular.



Centro de investigaciones biomédicas

Riesgos y nivel de bioseguridad
I (NO patógeno)
Medidas de protección personal ambiental.
Básicas (bata, guantes, gafas) inactivar con hipoclorito.
En caso de accidente que se debe hacer.
Lave con abundante agua, no induzca vómito, no contiene productos tóxicos.

Tabla S2. P-valores obtenidos tras la comparación estadística de las oxysterlinas versus el control de células frente a células Vero, PBMCs humanos y eritrocitos humanos.

Células Vero	Oxysterlina 1	p-valor	Mean Diff	IC (95%)
	0.00 vs 250 µg/mL	0,0100	13,79	(2,723 to 24,86)
	Oxysterlina 3			
	0.00 vs 250µg/mL	0,0406	13,92	0,4465 to 27,39.
PBMCs	Oxysterlina 3:			
	0.00 vs 250 µg/mL	0,0057	25,22	2,197 to 48,24.
	0.00 vs 500 µg/mL;	0,0132	28,18	5,165 to 51,20.
	Oxysterlina 1:			
	0.00 vs 62,5µg/mL;	0,0009	-5,804	-9,436 to - 2,172.
	Oxysterlina 3:			
	0.00 Vs 500µg/mL;	<0,0001	-51,30	-71,04 to - 31,55.

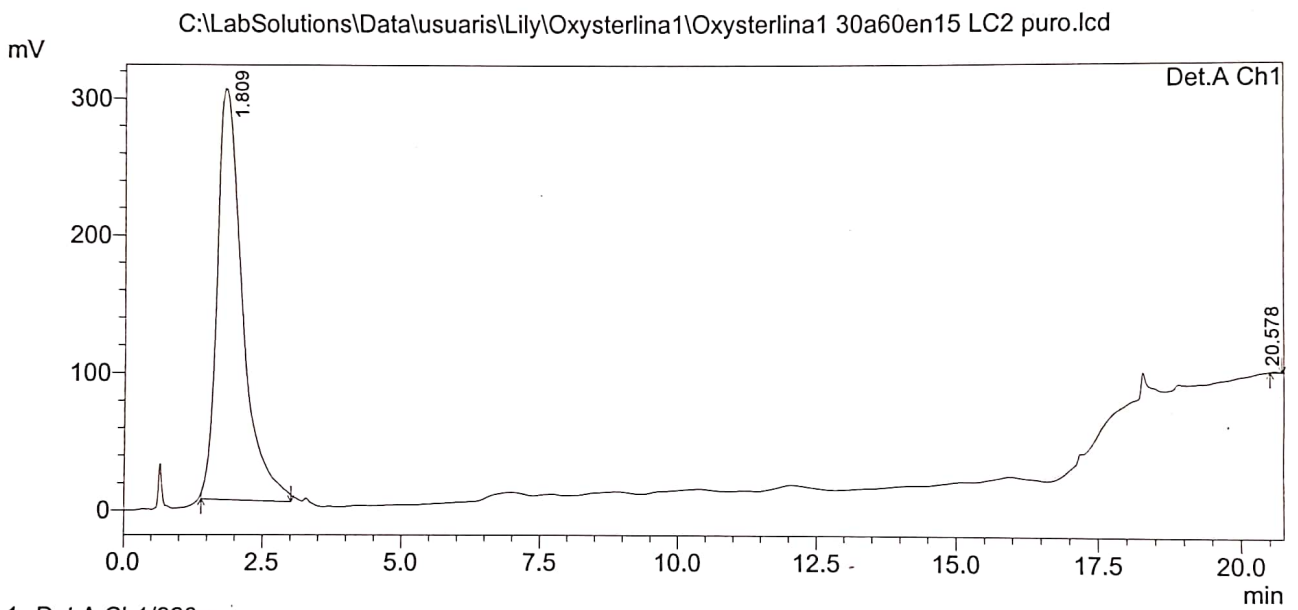
Eritrocitos humanos	Oxysterlina 1			
	0.00 Vs 62,5 µg/mL	(p-valor = 0,0009)		
	Oxysterlina 3			
	0.00 Vs 250 µg/mL	(p-valor = 0,0406)		

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\usuaris\Lily\Oxysterlina1\Oxysterlina1 30a60en15 LC2 puro.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : Oxysterlina1
Sample ID : Oxysterlina1
Tray# : 1
Vail # : 91
Injection Volume : 15 uL
Data File Name : Oxysterlina1 30a60en15 LC2 puro.lcd
Method File Name : 30a60en15.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 21/11/2018 16:55:21
Data Processed : 21/11/2018 17:16:11

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/220nm

Sequence: Oxysterlina1

File origin: New sequence Pos: 0

Average mass (Da): 4454,2942

Monoisotopic mass (Da): 4451,5870

Molar ext. coeff. (280nm): 5690

Molar absorbance (280nm): 1,277

Theoretical pI (SS/SH): (1) 11,55 /11,55 (2) 11,62 /11,62 (3) 11,44 /11,44

Number of residues: 39 Number of chains: 1

Number of cross-links: 0 Underlined residues: 0 [0,0%]

Sequence Offset: 0

Positively charged ion series

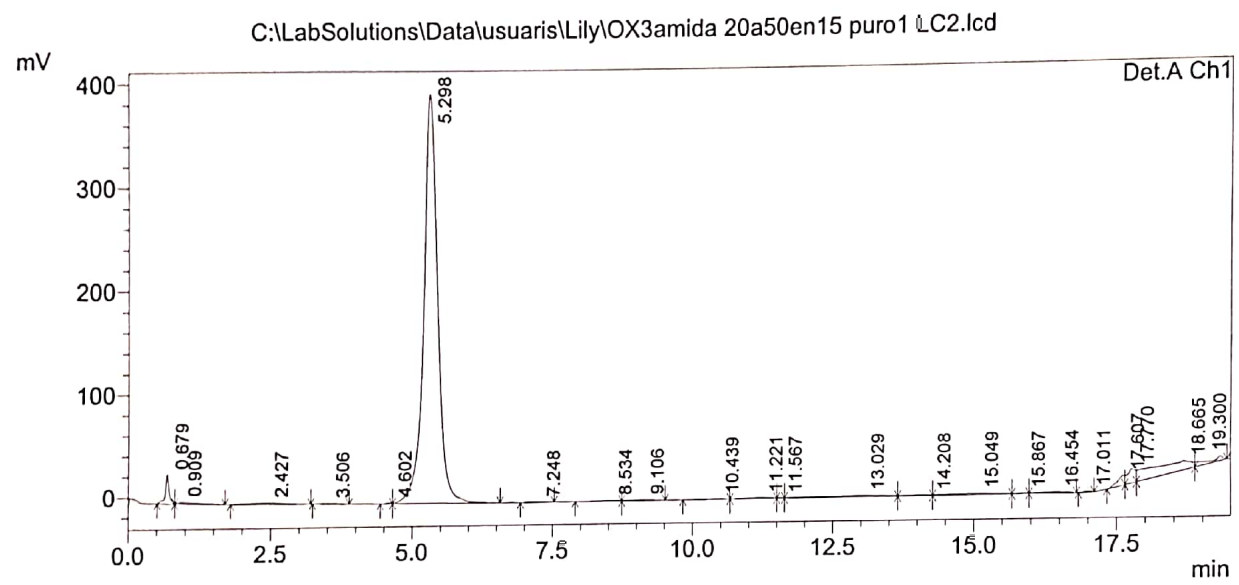
Ch.	Average	Monoliso.	Ch.	Average	Monoliso.
MH1+	4455.3014	4452.5943	MH21+	213.1165	212.9876
MH2+	2228.1544	2226.8008	MH22+	203.4752	203.3521
MH3+	1485.7720	1484.8696	MH23+	194.6722	194.5545
MH4+	1114.5808	1113.9040	MH24+	186.6029	186.4901
MH5+	891.8661	891.3247	MH25+	179.1790	179.0708
MH6+	743.3896	742.9384	MH26+	172.3263	172.2222
MH7+	637.3350	636.9483	MH27+	165.9811	165.8809
MH8+	557.7940	557.4557	MH28+	160.0892	159.9925
MH9+	495.9288	495.6281	MH29+	154.6036	154.5103
MH10+	446.4367	446.1660	MH30+	149.4837	149.3935
MH11+	405.9431	405.6970	MH31+	144.6942	144.6069
MH12+	372.1985	371.9729	MH32+	140.2040	140.1194
MH13+	343.6453	343.4370	MH33+	135.9859	135.9039
MH14+	319.1711	318.9778	MH34+	132.0159	131.9363
MH15+	297.9602	297.7797	MH35+	128.2728	128.1955
MH16+	279.4007	279.2315	MH36+	124.7377	124.6625
MH17+	263.0246	262.8653	MH37+	121.3936	121.3204
MH18+	248.4681	248.3177	MH38+	118.2255	118.1543
MH19+	235.4438	235.3013	MH39+	115.2199	115.1505
MH20+	223.7220	223.5866	MH40+	112.3646	112.2970

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\usuaris\Lily\OX3amida 20a50en15 puro1 LC2.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : ox3amida
Sample ID : ox3amida
Tray# : 1
Vail # : 61
Injection Volume : 10 uL
Data File Name : OX3amida 20a50en15 puro1 LC2.lcd
Method File Name : 20a50en15.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 30/10/2018 13:22:52
Data Processed : 30/10/2018 13:42:25

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/220nm

Sequence: Ox3 amida

File origin: New sequence Pos: 0

Average mass (Da): 4448,2929

Monoisotopic mass (Da): 4445,5877

Molar ext. coeff. (280nm): 5690

Molar absorbance (280nm) : 1,279

Theoretical pI (SS/SH): (1) 12,00 /12,00 (2) 12,01 /12,01 (3) 11,96 /11,96

Number of residues: 39 Number of chains: 1

Number of cross-links: 0 Underlined residues: 0 [0,0%]

Sequence Offset: 0

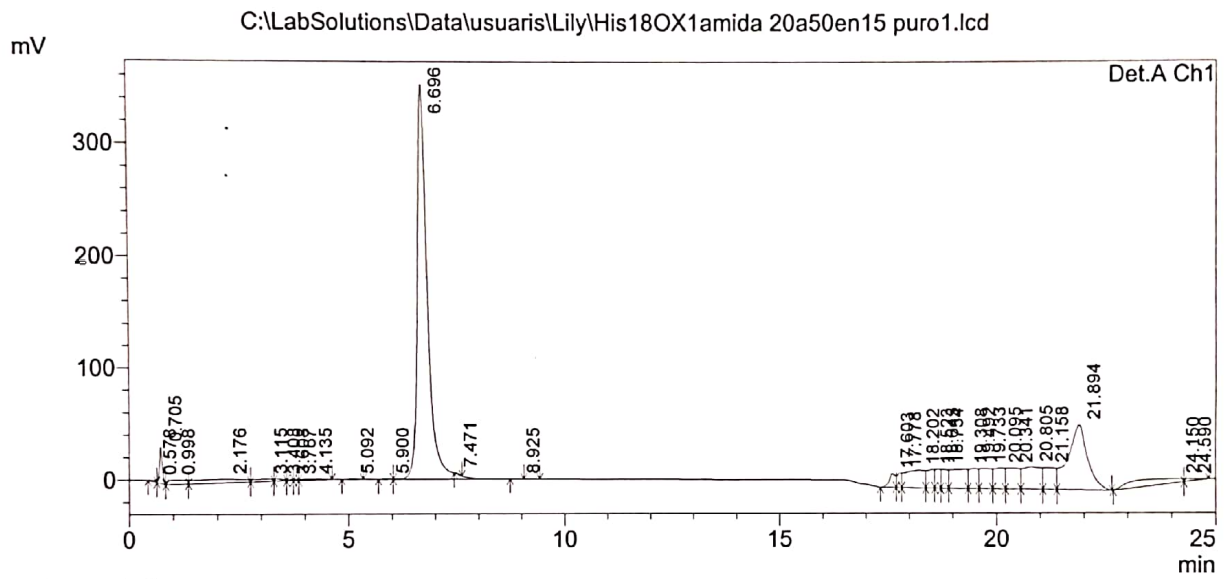
Positively charged ion series

Ch.	Average	Monoliso.	Ch.	Average	Monoliso.
MH1+	4449.3002	4446.5949	MH21+	212.8307	212.7019
MH2+	2225.1537	2223.8011	MH22+	203.2024	203.0794
MH3+	1483.7716	1482.8698	MH23+	194.4113	194.2937
MH4+	1113.0805	1112.4042	MH24+	186.3528	186.2401
MH5+	890.6659	890.1248	MH25+	178.9390	178.8308
MH6+	742.3894	741.9386	MH26+	172.0955	171.9914
MH7+	636.4777	636.0912	MH27+	165.7589	165.6587
MH8+	557.0439	556.7057	MH28+	159.8749	159.7783
MH9+	495.2620	494.9615	MH29+	154.3967	154.3034
MH10+	445.8366	445.5660	MH30+	149.2837	149.1935
MH11+	405.3975	405.1516	MH31+	144.5006	144.4133
MH12+	371.6983	371.4729	MH32+	140.0164	139.9319
MH13+	343.1837	342.9756	MH33+	135.8040	135.7221
MH14+	318.7425	318.5493	MH34+	131.8394	131.7599
MH15+	297.5601	297.3798	MH35+	128.1014	128.0241
MH16+	279.0256	278.8565	MH36+	124.5710	124.4958
MH17+	262.6716	262.5124	MH37+	121.2314	121.1583
MH18+	248.1347	247.9844	MH38+	118.0676	117.9964
MH19+	235.1280	234.9856	MH39+	115.0661	114.9967
MH20+	223.4219	223.2867	MH40+	112.2146	112.1470

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : His18OX1amida
Sample ID : His18OX1amida
Tray# : 1
Vial # : 47
Injection Volume : 10 uL
Data File Name : His18OX1amida 20a50en15 puro1.lcd
Method File Name : 20a50en15.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 26/10/2018 12:29:12
Data Processed : 26/10/2018 12:55:15

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/220nm

Sequence: his18 ox1 amida

File origin: New sequence Pos: 0

Average mass (Da): 4462,3198

Monoisotopic mass (Da): 4459,6033

Molar ext. coeff. (280nm): 5690

Molar absorbance (280nm) : 1,275

Theoretical pI (SS/SH): (1) 12,00 /12,00 (2) 12,01 /12,01 (3) 11,96 /11,96

Number of residues: 39 Number of chains: 1

Number of cross-links: 0 Underlined residues: 0 [0,0%]

Sequence Offset: 0

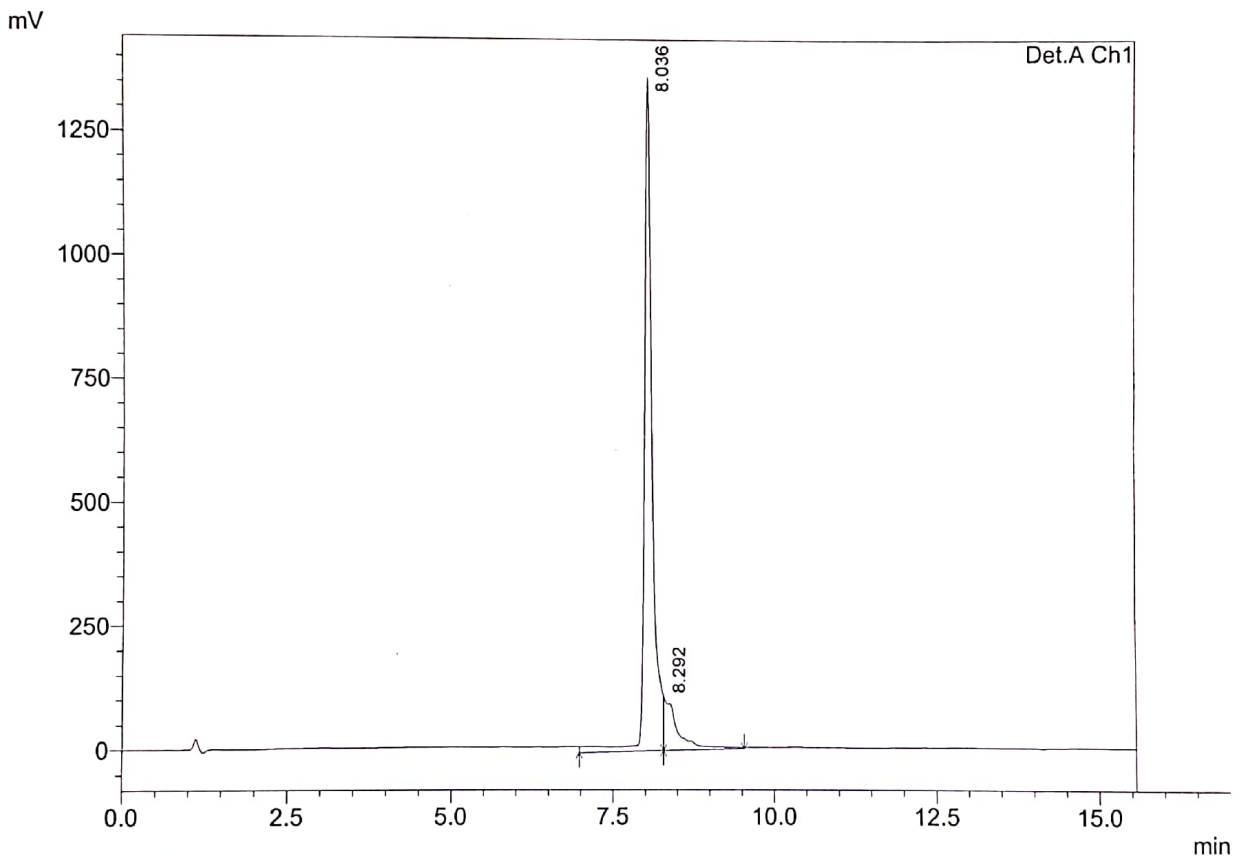
Positively charged ion series

Ch.	Average	Monoliso.	Ch.	Average	Monoliso.
MH1+	4463.3270	4460.6106	MH21+	213.4987	213.3693
MH2+	2232.1672	2230.8089	MH22+	203.8400	203.7165
MH3+	1488.4472	1487.5417	MH23+	195.0212	194.9031
MH4+	1116.5872	1115.9081	MH24+	186.9373	186.8241
MH5+	893.4712	892.9279	MH25+	179.5001	179.3914
MH6+	744.7272	744.2745	MH26+	172.6350	172.5305
MH7+	638.4815	638.0935	MH27+	166.2784	166.1778
MH8+	558.7972	558.4577	MH28+	160.3758	160.2788
MH9+	496.8206	496.5188	MH29+	154.8804	154.7867
MH10+	447.2393	446.9676	MH30+	149.7513	149.6607
MH11+	406.6727	406.4258	MH31+	144.9531	144.8654
MH12+	372.8673	372.6409	MH32+	140.4548	140.3699
MH13+	344.2626	344.0537	MH33+	136.2291	136.1468
MH14+	319.7444	319.5504	MH34+	132.2520	132.1721
MH15+	298.4953	298.3142	MH35+	128.5021	128.4245
MH16+	279.9023	279.7325	MH36+	124.9606	124.8851
MH17+	263.4967	263.3369	MH37+	121.6105	121.5371
MH18+	248.9139	248.7630	MH38+	118.4367	118.3653
MH19+	235.8662	235.7232	MH39+	115.4257	115.3561
MH20+	224.1233	223.9874	MH40+	112.5653	112.4974

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\usuaris\Lily\His18Ox1NH2\analogos\2-His18Ox1NH2\2-His18Ox1NH2 puro.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : 2-His18Ox1NH2 puro
 Sample ID : 2-His18Ox1NH2 puro
 Tray# : 1
 Vail # : 61
 Injection Volume : 10 uL
 Data File Name : 2-His18Ox1NH2 puro.lcd
 Method File Name : 5a40en15.lcm
 Batch File Name :
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 11/02/2019 14:25:19
 Data Processed : 11/02/2019 14:40:57

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/220nm

PeakTable

Detector A Ch1 220nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	8.036	11544972	1367122	87.897
2	8.292	1589757	105565	12.103
Total		13134729	1472688	100.000

Sequence: 2-His18Ox1NH2

File origin: New sequence Pos: 0

Average mass (Da): 2644,1672

Monoisotopic mass (Da): 2642,5398

Molar ext. coeff. (280nm): 5690

Molar absorbance (280nm) : 2,152

Theoretical pI (SS/SH): (1) 11,14 /11,14 (2) 11,28 /11,28 (3) 10,96 /10,96

Number of residues: 20 Number of chains: 1

Number of cross-links: 0 Underlined residues: 0 [0,0%]

Sequence Offset: 0

Positively charged ion series

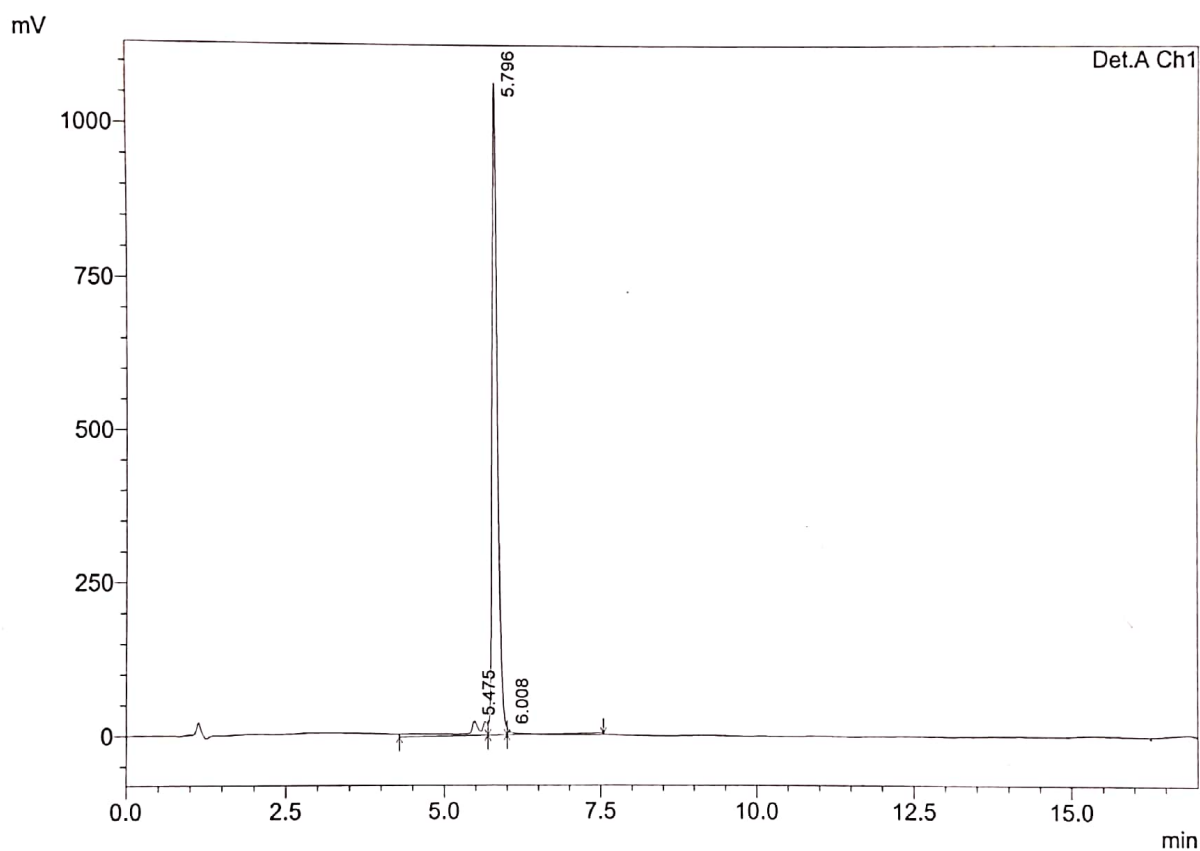
Ch.	Average	Monoliso.	Ch.	Average	Monoliso.
MH1+	2645.1744	2643.5470	MH21+	126.9200	126.8425
MH2+	1323.0909	1322.2772	MH22+	121.1967	121.1227
MH3+	882.3963	881.8539	MH23+	115.9711	115.9003
MH4+	662.0491	661.6422	MH24+	111.1809	111.1131
MH5+	529.8407	529.5152	MH25+	106.7740	106.7089
MH6+	441.7018	441.4306	MH26+	102.7060	102.6434
MH7+	378.7454	378.5130	MH27+	98.9394	98.8791
MH8+	331.5282	331.3247	MH28+	95.4418	95.3837
MH9+	294.8036	294.6228	MH29+	92.1855	92.1293
MH10+	265.4240	265.2613	MH30+	89.1462	89.0919
MH11+	241.3861	241.2382	MH31+	86.3030	86.2505
MH12+	221.3545	221.2189	MH32+	83.6375	83.5866
MH13+	204.4048	204.2796	MH33+	81.1336	81.0842
MH14+	189.8764	189.7601	MH34+	78.7769	78.7290
MH15+	177.2851	177.1766	MH35+	76.5549	76.5084
MH16+	166.2677	166.1660	MH36+	74.4564	74.4112
MH17+	156.5465	156.4508	MH37+	72.4713	72.4273
MH18+	147.9055	147.8150	MH38+	70.5906	70.5478
MH19+	140.1740	140.0883	MH39+	68.8064	68.7647
MH20+	133.2156	133.1343	MH40+	67.1115	67.0708

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\usuaris\Lily\coleocin1 pura.lcd

Acquired by : Admin
 Sample Name : coleocin1 pura
 Sample ID : coleocin1 pura
 Tray# : 1
 Vail # : 61
 Injection Volume : 10 uL
 Data File Name : coleocin1 pura.lcd
 Method File Name : 5a40en15.lcm
 Batch File Name :
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 12/02/2019 15:46:56
 Data Processed : 13/02/2019 11:01:08

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/220nm

PeakTable

Detector A Ch1 220nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	5.475	521991	23910	7.859
2	5.796	6181250	1069088	93.065
3	6.008	-61354	9481	-0.924
Total		6641887	1102478	100.000

Sequence: coleocin

File origin: New sequence Pos: 0

Average mass (Da): 1192,3890

Monoisotopic mass (Da): 1191,6625

Molar ext. coeff. (280nm): 5690

Molar absorbance (280nm) : 4,772

Theoretical pI (SS/SH): (1) 11,52 /11,52 (2) 11,59 /11,59 (3) 11,40 /11,40

Number of residues: 9 Number of chains: 1

Number of cross-links: 0 Underlined residues: 0 [0,0%]

Sequence Offset: 0

Positively charged ion series

Ch.	Average	Monoliso.	Ch.	Average	Monoliso.
MH1+	1193.3963 •	1192.6698	MH21+	57.7877	57.7531
MH2+	597.2018 •	596.8385	MH22+	55.2068	55.1738
MH3+	398.4703 •	398.2281	MH23+	52.8503	52.8187
MH4+	299.1045 •	298.9229	MH24+	50.6902	50.6599
MH5+	239.4851	239.3398	MH25+	48.7028	48.6738
MH6+	199.7388	199.6177	MH26+	46.8684	46.8404
MH7+	171.3486	171.2448	MH27+	45.1698	45.1429
MH8+	150.0559	149.9651	MH28+	43.5926	43.5667
MH9+	133.4949	133.4142	MH29+	42.1241	42.0991
MH10+	120.2462	120.1735	MH30+	40.7536	40.7294
MH11+	109.4063	109.3402	MH31+	39.4714	39.4480
MH12+	100.3730	100.3125	MH32+	38.2694	38.2467
MH13+	92.7295	92.6736	MH33+	37.1403	37.1183
MH14+	86.1779	86.1260	MH34+	36.0775	36.0562
MH15+	80.4999	80.4514	MH35+	35.0755	35.0548
MH16+	75.5316	75.4862	MH36+	34.1292	34.1090
MH17+	71.1478	71.1051	MH37+	33.2340	33.2144
MH18+	67.2511	67.2107	MH38+	32.3859	32.3668
MH19+	63.7646	63.7264	MH39+	31.5814	31.5627
MH20+	60.6267	60.5904	MH40+	30.8170	30.7988



SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGIA

Otorga el presente

CONSTANCIA

a

Lily Johanna Toro Segovia

Por la presentación del trabajo en forma oral y cartel

«Oxysterlinas: Nuevos péptidos antimicrobianos de la familia de las cecropinas en el
escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum* (Weber 1801)»

En el XXII Congreso Nacional de Inmunología, celebrado del 19 al 23 de abril

en Zacatecas de 2016

Dr. Constantino III Roberto López Macías
PRESIDENTE SMI (2014-16)

Dra. Laura Bonifaz Alfonso
SECRETARIA-TESORERA SMI (2014-16)



La Asociación Colombiana de Infectología - ACIN

Certifica que:
El trabajo:

***Evaluación de la actividad antimicrobiana, el efecto en
la expresión de TNF α inducida por LPS
Lily Toro***

*Obtuvo el segundo lugar en el concurso de trabajos completos
EN EL MARCO DEL:*

*XII ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS y el II
ENCUENTRO ANDINO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS*

José Oñate G.

JOSÉ MILLÁN OÑATE
Presidente ACIN

RESEARCH ARTICLE

Identification and characterization of novel cecropins from the *Oxysternon conspicillatum* neotropic dung beetle

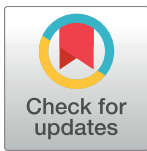
Lily Johanna Toro Segovia[☉], Germán Alberto Téllez Ramírez[☉], Diana Carolina Henao Arias[‡], Juan David Rivera Duran[‡], Juan Pablo Bedoya[‡], Jhon Carlos Castaño Osorio^{*}

Center of Biomedical Research. Group of Molecular Immunology. Universidad del Quindío, Armenia, Quindío–Colombia

☉ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* gymol@uniquindio.edu.co



OPEN ACCESS

Citation: Toro Segovia LJ, Téllez Ramírez GA, Henao Arias DC, Rivera Duran JD, Bedoya JP, Castaño Osorio JC (2017) Identification and characterization of novel cecropins from the *Oxysternon conspicillatum* neotropic dung beetle. PLoS ONE 12(11): e0187914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914>

Editor: Mark J. van Raaij, Centro Nacional de Biotecnología, SPAIN

Received: May 25, 2017

Accepted: October 27, 2017

Published: November 29, 2017

Copyright: © 2017 Toro Segovia et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper, its Supporting Information files, and the sequences have accession number in the GenBank with codes: Oxysterlin 1: GenBank code: GEXM01019095. Oxysterlin 2: GenBank code: GEXM01014653.1. Oxysterlin 3: GenBank code: GEXM01014652.1. Oxysterlin 4: GenBank code: GEXM01014651.1.

Funding: This work was supported by Colombia's Administrative Department of Science Technology

Abstract

Dung beetles are exposed to a complex microbiological ecosystem during their life cycle. Characterization of novel host-defense peptides (HDP) is essential to understanding the host innate immune response in insects. It constitutes a promising alternative to look for new therapeutic agents against pathogenic microbes. We identified four new HDP, Oxysterlins 1, 2, 3, and 4 from the transcriptome of the *Oxysternon conspicillatum* dung beetle. These HDP display a highly conserved signal peptide and a mature peptide, characterized by an overall positive charge (cationic) (pI: 10.23–11.49), a hydrophobic ratio (Φ H: 35–41), and amphipathicity. Oxysterlins 1, 2, and 3 have a linear α -helix structure, whilst Oxysterlin 4 has a mixture of both α -helix and β -sheet structures without disulfide bonds through bioinformatics prediction and circular dichroism. Oxysterlins are part of the cecropin family group in an exclusive clade related to beetle cecropins. They have predominant antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, including multidrug resistant strains (3.12–50 μ g/mL) measured by plate microdilution. Their kinetics, in a time-killing curve showed concentration-dependent bactericidal activity. Furthermore, these HDP have low toxicity against human erythrocytes (62.5–500 μ g/mL) and Vero cells (250–500 μ g/mL). This article describes new HDP of the cecropin family from the *Oxysternon conspicillatum* dung beetle, with antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria and low toxicity.

Introduction

There is an urgent need to search for new antimicrobial agents; indiscriminate use of antibiotic therapy, as well as decreased research and development of new active antibiotics against resistant organisms are leading to a public health crisis [1]. The emergence of resistance to last-resort drugs, like third-generation cephalosporins, is fast outpacing the development of alternative treatments and will influence on the burden of disease, like *E. coli* (ESBL and fluoroquinolone-resistant), which is a growing global concern with a reported two-fold increase in all-cause

and Innovation (COLCIENCIAS), through grant number 727-2015 for doctorate study in Colombia (to LJT) and project number: 111356933173, grant number: 569-201 (to GAT); ALMA MATER - Universidad del Quindío, through grant number 579 (to JCC).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: HDP, (Host Defense Peptides); ATCC, (American-Type Culture Collection); ESBL, (Extended-spectrum β -lactamase); *O. conspicillatum*, (*Oxysternon conspicillatum*); MICs, (minimum inhibitory concentrations).

mortality. For *Klebsiella pneumoniae* infections with third-generation cephalosporin resistance, there is a significant increase in bacterium-attributable mortality [2].

Antimicrobial cationic peptides are innate host defense molecules effective against bacteria (Gram-positive, Gram-negative), fungi (yeasts and filamentous), parasites, and—in some cases—enveloped viruses [3]. In insects, a diversity of broad-spectrum antimicrobial peptides are rapidly synthesized and secreted by the fat body and hemocytes upon contact with different microorganisms [4–6]. The genes encoding them are mainly activated in the fat body and hemocytes [7]. Within this diversity of peptides, cecropins are a family of 3–4 kDa, cationic, alpha helix, amphipathic peptides [8–10]. These molecules are devoid of cysteine residues and contain two distinctive helical segments: a strongly basic N-terminal domain and a long hydrophobic C-terminal helix, linked by a short hinge [11].

Invertebrates have become an important target group to look for these effector molecules. Among the Coleoptera family, seven HDP of different families have been isolated from five species, *Zophobas atratus* [12,13]; *Tenebrio molitor* (Cucujoidea) [14–16]; *Holotrichia diomphalia* [17]; *Dichotomus dichotoma* (Scarabaeoidea) [18]; and *Tribolium castaneum* (flour beetle) [19]. Other studies have identified three HDP from *T. molitor*; Tenecin 1, 2, and 3 [16,20]. Defensins, Coleopterins, Cecropins, and antifungal peptides have been isolated and biochemically characterized from beetles [21,22].

Oxysternon conspicillatum is a neotropical dung beetle with a life cycle where the larvae feed on fungi, decaying organic matter and other organic materials found in dung balls. They are closely exposed to a wide range of microorganisms coevolving with them; therefore, it is likely that *O. conspicillatum* may defend itself against invading pathogens by developing strong antimicrobial compounds, among them HDP. Only a few HDP have been identified from a limited number of Coleopteran dung species, which include *Copris tripartitus*, with the CopA3 peptide [23] and *Onthophagus taurus* [24]. Therefore, the purpose of this study was to identify and functionally characterize new HDP from the *O. conspicillatum* dung beetle.

Materials and methods

Ethics statement

This work was approved by the bioethics committee at Universidad del Quindío (Foundation act 0600, October 29, 2001) under the act number 29 of May 23, 2011. The contract of access to genetic resources was drawn through resolution N° 2073 of Oct 10, 2017.

Capture and identification of *Oxysternon conspicillatum*

The beetles were captured with pitfall traps in “Pueblo Tapao”, Quindío, at coordinates 4° 30'39.0"N and 75° 47'12.0"W in decimal format 4.510833–75.786667. The beetles captured were identified as *O. conspicillatum*, according to the Weber taxonomic key [25] modified by Medina and Lopera, 2001 [26].

Induction of immune response and fat body extraction

Induction of the immune response was performed by inoculating 10 μ L of *E. coli* DH10B at 3 McFarland scale diluted in PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, NaHPO₄ 10.1 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM). The bacteria was inoculated into an adult *O. conspicillatum* beetle and, after 18 h, the bacterial challenged specimen was dissected and the fat body extracted and stored at -80°C until use.

Total RNA extraction, construction, sequencing, and *de novo* assembling of transcriptome

The total RNA from the fat body was extracted by using RNA PureLink[®] RNA Mini Kit (catalog numbers: 12183018A, Ambion, Life Technologies), according to manufacturer's instructions. The RNA extracted was quantified by using an Agilent 2100 bio-analyzer for quality and quantified with an RNA integration number (RIN). The RNA library was prepared by using Illumina[®] TruSeq[™] RNA Sample Preparation Kit and the transcriptome was sequenced in a HiSeq 2000 sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) by using paired-end sequencing with 100 bp read length. *De novo* reconstruction of transcriptome from RNA-seq data was constructed with the Trinity platform [27].

Oxysterlin identification

To identify HDP from the transcriptome, Blastx [28] and Blast2GO [29] was performed looking for the Cecropin family domains Pfam: PF00272, Prosite: PDOC00241, UNIPROTKB|P84021, InterPro:IPR000875, Pfam:PF00272, PROSITE:PS00268, EMBL:CM000364, InterPro:IPR020400, ProDom:PD001670, OrthoDB:E0G4F4QV0, EMBL:AB047055, EMBL:AB047056.

Structure prediction of oxysterlin peptides

For the bio-informatic analysis of oxysterlin peptides, the signal peptide was identified by using SIGNALP [30] (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The secondary structure was found with PSIPRED [31] (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) and JPRED [32] (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) and the tertiary structures were confirmed with RAPTORX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) [33] and visualized in CHIMERA [34]. The physico-chemical characteristics, molecular weight, isoelectric point, amino acid number, and hydrophobic moment were predicted with PROTPARAM [35] (<http://web.expasy.org/protparam/>) and BIOEDIT [36].

Circular dichroism of oxysterlin peptides

Circular dichroism (CD) spectra was made to estimate α -helix content percentage and stability. Peptides were prepared in aqueous 30% TFE solution at 100 μ M concentration. The CD spectra was measured on a 1-cm-long quartz cell on a Jasco J-810 thermostat spectrophotometer [37]. Circular dichroism spectra resulted from the average of four scans obtained by collecting data at 0.1 nm intervals from 260 to 190 nm at room temperature. The deconvolution analysis was performed in SELCON3, CDSSTR, and CONTINL with SMP56-protein reference set.

Dendrogram for the cecropins family

To generate a group of sequences, Blastp and tBlastx were used with the oxysterlins as query and HDP sequences with higher identity were selected. The signal peptide was identified and eliminated; with the group of mature peptide sequences, alignment was achieved by using the Clustal Omega program [38] (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and from this alignment, a phylogenetic tree was generated by using the neighbor-joining method in MEGA 7 [39,40]. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (10,000 replicates) was calculated and shown next to the branches [41]. The evolutionary distances were computed through the Poisson correction method [42].

Chemical synthesis of oxysterlins

The sequences of oxysterlin mature peptides were sent to obtain chemical synthesis by hiring the services of the Company Peptides 2.0, with the following conditions:

Approximately 5 mg were obtained from each oxysterlin 1, 2, 3, and 4 mature peptide; these were synthesized through solid-phase chemical synthesis and purified via RP-HPLC and obtained with a purity of 95.11%, 96.19%, 95.54%, and 95.53%, respectively. The molecular mass was determined through mass spectroscopy.

Antimicrobial activity assay

Antimicrobial activity of oxysterlins 1, 2, 3, and 4 was tested by the broth microdilution assay, as described with some modifications [43]. The *E. coli* (ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC BAA 1705 UPC (+)), *P. aeruginosa* (ATCC 105663), and the clinical isolates of *Salmonella typhi*, *E. coli* (ESBL), *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, and *Staphylococcus epidermidis* were used as test bacteria, while *Candida parapsilosis* was used to test antifungal activity.

The bacteria were grown overnight in Mueller Hinton agar (MHA) medium (Scharlau 02-136-500, Barcelona, Spain) and adjusted to an absorbance of 0.4 (A₅₇₀ nm) (3×10^8 CFU/mL). The bacteria inoculum were adjusted to a final dilution of 1:1000 in M.H (3×10^5 CFU/mL); 90 μ L of bacteria, and 10 μ L of each peptide were mixed to a final peptide concentration between 200–0.37 μ g/mL. The solution was incubated at 37°C for 12 h and resazurin was added to a final concentration of 44 μ M (Acros Organics 418900050, Geel, Belgium); the plate was incubated for an additional 2 h and the absorbance values at 570 and 603 nm were measured. A delta value (*i.e.*, A₅₇₀—A₆₀₃) was calculated for each well; the average value of the blanks was subtracted from each sample and the growth percentage was calculated relative to a control. Each concentration was measured in triplicate. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the concentration (in μ g/mL) that inhibited the visible growth of bacterium [43].

Time-killing test

The time-killing curves for oxysterlins 1, 2, 3, and 4 were constructed at 0.5, 1, 2, and 4 MICs and tested against *E. coli* ATCC 35218. The bacteria were grown and adjusted to an optical density of 0.4 (at 570 nm) (3×10^8 CFU/mL). This inoculum was adjusted to a final dilution of 1:20 (6×10^6 CFU/mL), 45 μ L of this bacterium were mixed with 5 μ L of peptide and at different times (0, 30, 60, 120, and 180 min). Resazurin was added to a final concentration of 44 μ M. Absorbance was measured at $\lambda_1 = 570$ nm and $\lambda_2 = 600$ nm after further incubation (2 h, 37°C) [44].

The CFU/mL-versus-resorufin conversion was obtained from an *E. coli* ATCC 35218 control growth curve from the same dilution of the time-killing test; different times from this growth curve were measured through two methods; by plating and counting the CFU/mL in 10 Cm M.H agar plates after incubation for 12 h at 37°C and by adding resazurin at 44 μ M and incubating at 37°C for 2 h and reading the A₅₇₀-603 nm for the conversion of resazurin sodium salt into resorufin. These two parameters were graphed and a regression was performed to find the equation of the resorufin conversion versus CFU/mL. From this equation, the data from the time-killing curve measured in resazurin-to-resorufin conversion (A₅₇₀-603 nm) was extrapolated in CFU/mL units.

Cytotoxic activity of oxysterlin peptides

Vero cells (ATCC:CCL-81) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)—(Life Technologies 12100–046, New York, USA) supplemented with 10,000 units/ml penicillin and streptomycin, 20 mM L-glutamine and 2% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) heat inactivated (Eurobio, Les Ulis, France). Cells were cultured in polystyrene 96-well microplates (Costar 3590, New York, USA) at 22,500 cells per well and treated with peptide concentrations ranging from 500 to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and incubated for 24 h at 37°C and 5% CO₂ humidity. At the end of this incubation period, resazurin was added to each well at a final concentration of 44 μM and the cells were incubated for 2 h at 37°C with 5% CO₂. Absorbance was measured at 603 and 570 nm. A delta value was calculated (*i.e.*, A570—A603) and the average of the controls was subtracted from each well value. Cell viability percentage was calculated in comparison to the untreated control cells [45].

Human erythrocyte hemolytic activity

Two milliliters of human heparinized blood were centrifuged at 800 g for 10 min at room temperature. The erythrocytes were washed three times with a 1X PBS stock solution (130 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM K₂HPO₄, pH 7.4). An erythrocyte dilution at 1:250 was performed from the erythrocyte stock solution and incubated at 37°C for 15 min (work solution). In polypropylene 96-well microplates, the different peptides were added to a final concentration from 1000 to 1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 90 μL of the erythrocyte work solution was added to these wells. The erythrocytes were then incubated for 1 h at 37°C and centrifuged at 2000 g for 15 min. The supernatants were taken and the absorbance measured at 540 nm. The absorbance of the hemoglobin from the erythrocytes incubated with 1% (v/v) Triton-X100 was taken as 100% hemolysis control and the hemolysis percentage was calculated as $(\text{XiA410} - \text{A410 nm blank}) * 100 / (\text{control Triton A410} - \text{A410 nm blank})$ [46].

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and plotted as dispersion graph with the mean value error bars as the standard deviation. To calculate the statistical significant difference, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed with Dunnett's multiple comparison test with a single-pool variance comparing the treated groups against the control group; a significant critical value of 0.05 was chosen.

Results

The *Oxysternon conspicillatum* dung beetle transcriptome had sequences related to the cecropin family

Oxysternon conspicillatum adult beetles were inoculated with *E. coli* and dissected, as described in the methods section. A total of 200 mg of fat body was extracted per beetle and 10.1 μg of total RNA at 380.1 ng/ μL were obtained with an RNA integration number of 7.9 for transcriptome sequencing.

For transcriptome sequencing, a total of 30,787,530 raw reads were obtained by HiSeq 2000 (Illumina) paired-end sequencing with a 101-bp average read length (Sequence read archive: SRP082407). We used the Trinity platform software to perform a paired-end joining *de novo* assembly of the valid reads, 27,603 contigs were obtained with a read length from 201 to 12,138 bp and an N50 of 2,159 bp with version: GEXM00000000.1 and code TSA: [GEXM01000001-GEXM01027567](#) in the NCBI GenBank.

Oxysterlin 1 (contig: comp10536_c0_seq 1; GenBank code: GEXM01019095) was identified with the Pfam PF00272, using the Blast2GO strategy; from this sequence, we performed a stand-alone Blast search with the signal peptide of oxysterlin 1 as query and the assembled transcriptome as database. With the BlastX search, three more cecropins were identified: oxysterlins 2, 3, and 4 (contigs: comp6984_c0_seq 3 (GenBank code: GEXM01014653.1); comp6984_c0_seq 2 (GenBank code: GEXM01014652.1); comp6984_c0_seq 1 (GenBank code: GEXM01014651.1) (S1 File).

Oxysterlins have a conserved domain and prediction of their physicochemical characteristics

The open reading frame and the signal peptide of oxysterlin peptides were found for each sequence. Their signal peptide was identified in the A23 amino acid position with high similarity among the four peptides with a consensus sequence MNFRIF (I/V) F (V/A) (I/L) (V/I) V (L/V) AL (I/M) C (D/G) Q (A/T) DA. The mature peptides had an amino terminal consensus sequence (GSKRWRKFEK (K/R) VK) (Fig 1); high isoelectric point and hydrophobic ratio, ranging from 35% to 41% and an α -helix structure, except for oxysterlin 4, which shows a predicted β -sheet and α -helix structure similar to the defensins, but without disulfide bridges and with a high hydrophobic C-terminal domain (Table 1).

The oxysterlin tertiary structure prediction was made with RaptorX, by modelling 100% of the mature peptide sequences. The Ramachandran plot of the models showed the percentage of amino acids within permissible regions and angles (S2 File), with 93.7% for oxysterlin 4 and 100% for oxysterlins 2 and 3. The model assessment scores had a good alignment and residues in favored regions, but relatively low scores in the uGDT and p-value; this may be due to the length (<100 residues) of the peptides (Table 2).

Oxysterlins 1 and 3 showed a continuous α -helix structure. Oxysterlin 2 had two α -helix domains divided by a hinge region in the R27 residue. Oxysterlin 4 shows a predicted β -sheet and α -helix structure without disulfide bonds and with a high hydrophobic C-terminal domain. The hydrophobicity percent and the tertiary predicted structure (Fig 2) showed the amphipathic nature of α -helices, as well as the opposite localization of their hydrophobic and

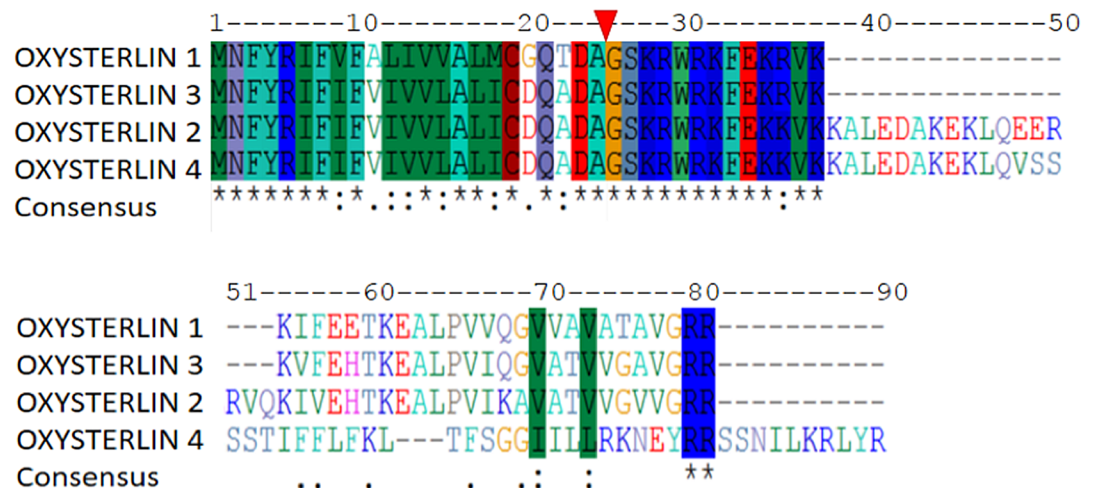


Fig 1. Multiple oxysterlin peptide sequence alignment. The signal peptide was found up to the A23 position. Oxysterlins 1 and 3 have greater similarity. All cecropins have a high identity of the signal peptide and the amine terminal oxysterlin domain of the mature peptide. Oxysterlin 2 had a middle K36-Q54 region that may be the result of alternative splicing.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914.g001>

Table 1. Predicted physicochemical properties of oxysterlin peptides.

Oxysterlin	Mature peptide sequence	aa	M(Da)	ΦH	PI
1	GSKRWRKFEKRVKKIFEETKEALPVVQGVVAVATAVGRR	39	4455.2	41	11.04
2	GSKRWRKFEKKVKKALEDAKEKLEERVQKIVEHTKEALPVIKAVATVVGVVGRR	55	6327.5	38	10.23
3	GSKRWRKFEKRVKKVFEHTKEALPVIQGVATVVGAVGRR	39	4449.2	38	11.49
4	GSKRWRKFEKKVKKALEDAKEKLQVSSSTIFFLFKLTFSGGIILLRKNEYRRSSNILKRLYR	62	7438.8	35	10.89

aa: amino acids, M (Da): Molar mass in Dalton (Da), ΦH: Hydrophobic ratio, and PI: Isoelectric point.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914.t001>

hydrophilic residues through the α-helix structure, with a 120° hydrophobic angle. The tertiary structure was an amphipathic N-terminal helix in which polar/charged residues were segregated on one side of the helix and hydrophobic residues on the other side.

Circular dichroism

The CD spectrum of oxysterlin peptides 1 to 3, dissolved in PBS with 30% TFE, displayed two minimum adsorptions at 208 and 222 nm, which is characteristic of α-helix (Fig 3 - black, blue, and red lines) [47]. The CD spectra of oxysterlin 4 showed a significant difference in the positive band at 190 nm (Fig 3 - green line); The deconvolution results (Table 3) reflect this difference.

Oxysterlins represent a new diversity of cecropins in beetles

A cecropin family dendrogram was constructed (Fig 4). Cecropins can be divided into three groups: cecropins from Lepidopteran insects belong to the first group, Dipteran cecropins from the second group, and cecropin-2 from coleoptera *Tribolium castaneum*, *Tenebrio molitor*, *Holotrichia sp.* are in the third group. Oxysterlin 3 had 47% identity for cecropin-C from the *Nicrophorus vespilloides* dung beetle (Accession number: XP_017770017.1).

The relation of the aligned sequences shows the *O. conspicillatum* peptides in a different root from mosquitoes, flies, and moths; oxysterlins 1 and 3 had the highest similarity amongst them and are more closely related to the *N. vespilloides* dung beetle cecropin. This suggests that cecropins occurred in the insects before the divergence of the flies, mosquitoes, and moths. The result also supports that the cecropin molecules have evolved independently among these insect taxa [48].

The oxysterlins are active antimicrobial peptides against multidrug resistant bacteria

The MIC of oxysterlins against Gram negative, Gram positive, and *Candida parapsilopsis* was measured, as listed in Table 4. The antibiotic resistant profile of the bacterial strains was tested

Table 2. Model assessment of oxysterlin peptide tertiary structure prediction.

Characteristics	Oxysterlin 1	Oxysterlin 2	Oxysterlin 3	Oxysterlin 4
Template (PDB code)	1zvuA	5mtvA	1zvuA	3be5A
Alignment Score	32	46	29	34
uGDT (GDT)	31 (79)	35(64)	30 (77)	32(51)
P-Value	5.95x10 ⁻²	4.45x10 ⁻²	5.13x10 ⁻²	2.77x10 ⁻²
Residues in most favored regions (Ramachandran plot)	97.1%	100%	100%	93.7%

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914.t002>

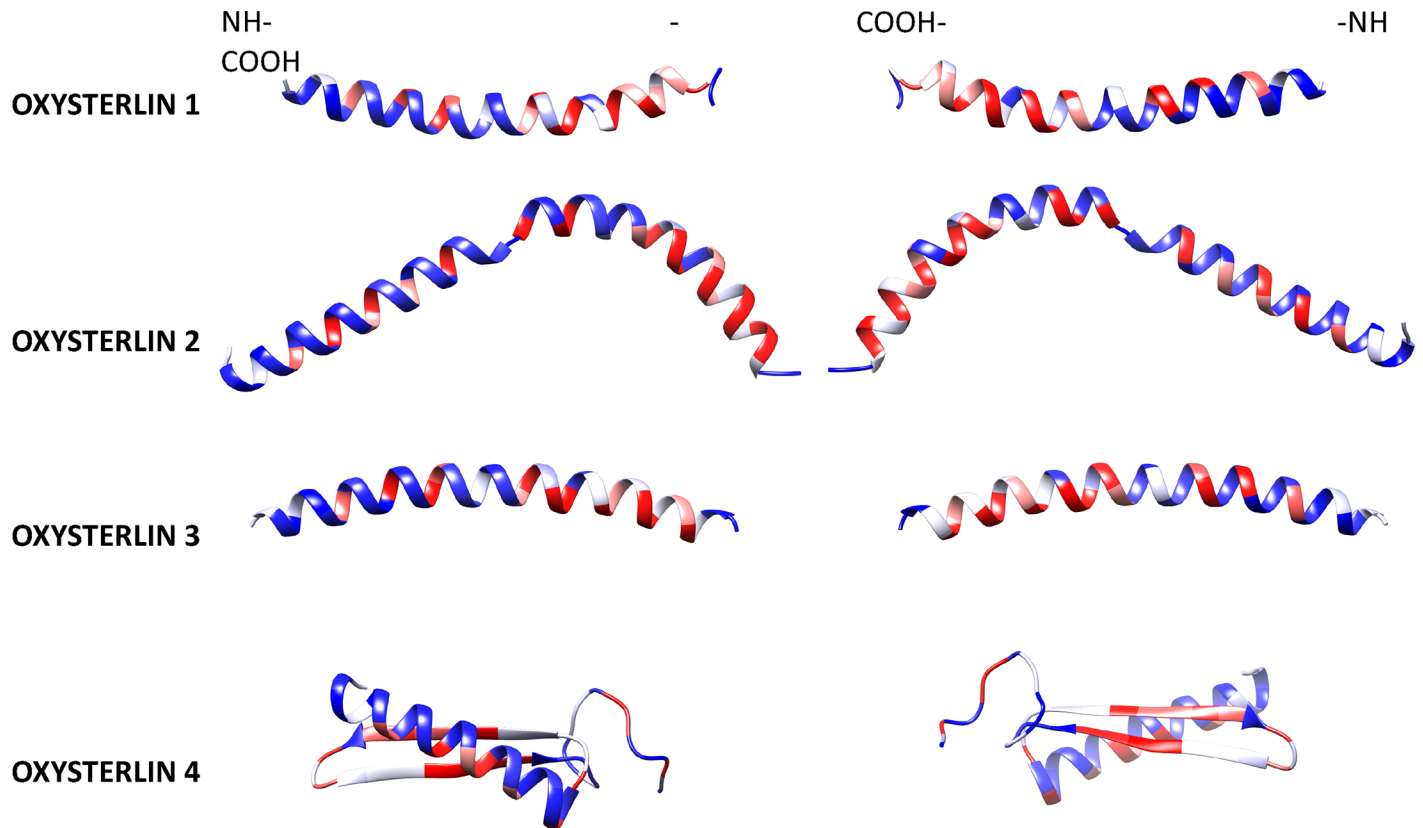


Fig 2. Oxysterlin mature peptide structures. Structures of oxysterlins 1 to 3 had predicted α -helix structure; with an amino terminal region with an amphipathic region corresponding to the oxysterlin domain with a 120° hydrophobic angle and a more hydrophobic carboxyl terminal region. Oxysterlin 4 has an α -helix amino-terminal domain and a β -sheet carboxyl terminal structure. All the structures show an amphipathic amino terminal and a hydrophobic carboxyl-terminal domain (red: hydrophobic, white: neutral, and blue: hydrophilic).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914.g002>

previously and the results are listed in **S1 Table**. Oxysterlins 1, 2, and 3 were mostly active against Gram-negative bacteria with MIC ranging from 3.12 to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For Gram-positive

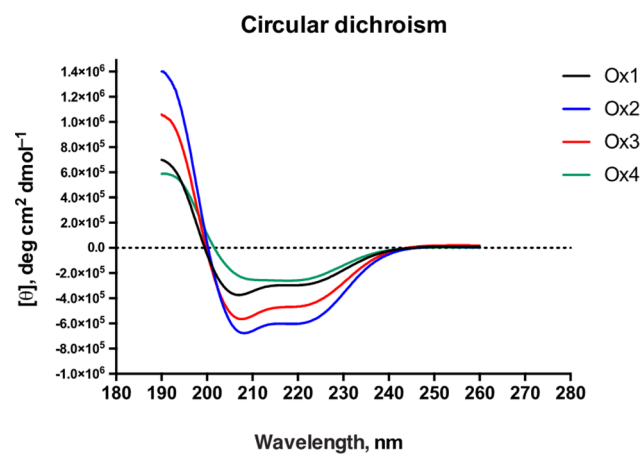


Fig 3. Circular dichroism predicted of oxysterlin peptides. Oxysterlin 1 (black), oxysterlin 2 (blue), oxysterlin 3 (red), and oxysterlin 4 (green). The peptides were dissolved in PBS with 30% TFE; the spectra were made on a JASCO spectrometer. The X axis shows wavelength in nm and the Y axis shows molar ellipticity per residue ($[\theta]$, $\text{deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914.g003>

Table 3. Circular dichroism deconvolution analysis for oxysterlin 4.

Method	H (r)	H (d)	S (r)	S (d)	Turns	Unordered
SELCON3	0.634	0.229	-0.003	-0.001	0.054	0.157
CDSSTR	0.354	0.214	0.072	0.128	0.099	0.141
CONTINL	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

H(r): α -helix regular. H(d): α -helix distorted. S(r): β -strand regular. S(d): β -strand distorted

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914.t003>

bacteria, only oxysterlins 1 and 3 were active against *Staphylococcus saprophyticus* with MIC of 50 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Only oxysterlin 1 was active against *C. parapsilopsis* and oxysterlin 4 was not active against the microorganisms tested.

The oxysterlins displayed fast-bactericidal activity against *E. coli*

We studied the kinetics of the *in-vitro* antibacterial activity exhibited by oxysterlins 1, 2, and 3 through their time-killing curves against *E. coli*. Oxysterlin 1 had a MIC of 6.25 $\mu\text{g/mL}$,

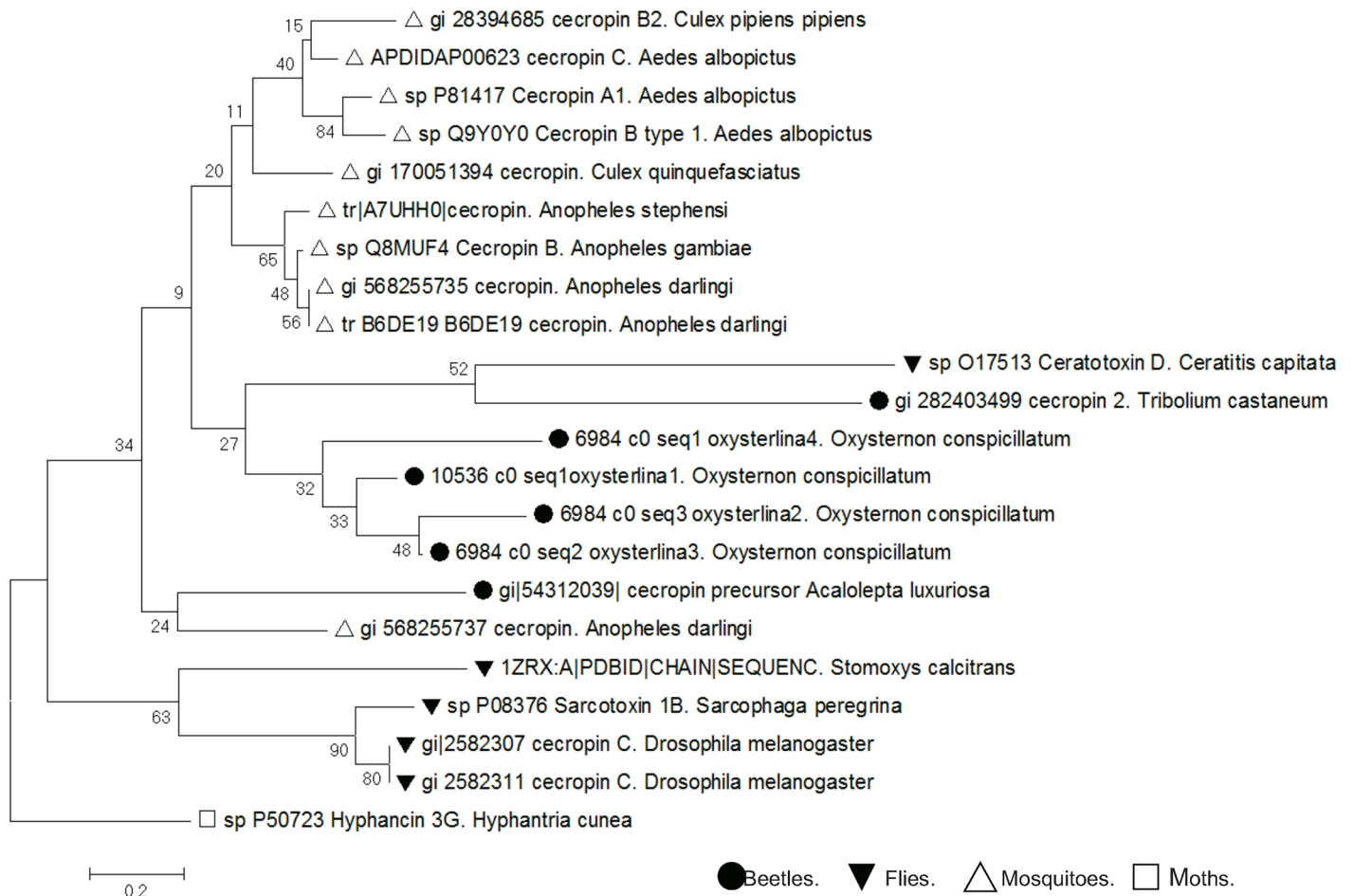


Fig 4. Dendrogram of the cecropin family. The optimal tree with branch length sum = 11.21941379 is shown. The percentage of replicate trees in which associated taxa clustered together in the bootstrap test (10,000 replicates) is shown next to the branches. The tree was drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the dendrogram. The units of the evolutionary distance are the number of amino acid substitutions per site. The analysis involved 21 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. The final dataset had 29 positions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914.g004>

Table 4. Antimicrobial activity of oxysterlin peptides. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in $\mu\text{g/mL}$ of oxysterlin peptides.

Microorganisms	Oxysterlin 1	Oxysterlin 2	Oxysterlin 3	Oxysterlin 4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	6.25	50	3.12	>200
<i>Escherichia coli</i> clinical isolate (ESBL)	6.25	50	3.12	>200
<i>Enterobacter cloacae</i> clinical isolate	12.5	>200	3.12	>200
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 1705	>200	25	3.12	>200
<i>Salmonella typhimurium</i> clinical isolate	6.25	>200	6.25	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 105663	25	>200	12.5	>200
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> clinical isolate	50	>200	12.5	>200
<i>Staphylococcus epidermidis</i> clinical isolate	>200	>200	>200	>200
<i>Staphylococcus aureus</i> clinical isolate	>200	>200	>200	>200
<i>Candida parapsilopsis</i> ATCC 22019	50	>200	>200	>200

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914.t004>

oxysterlin 2 (50 $\mu\text{g/mL}$), and oxysterlin 3 (3.12 $\mu\text{g/mL}$) against *E. coli* ATCC 35218. For these peptides, a concentration-dependent bactericidal activity was found against *E. coli* ATCC 35218.

Oxysterlin 1, from 1 MIC, reduced growth below 1.5 log in CFU/mL during the first 20 min until 120 min of incubation (Fig 5A). Concentrations <0.5 MIC did not inhibit bacterial growth, while concentrations above (2 and 4 MIC) reduced bacterial growth completely during 180 min of the assay, reaching a 2-log reduction. Oxysterlins 2 and 3 partially reduced bacterial growth at 1 MIC with a bacteriostatic-like behavior at this concentration, but at higher

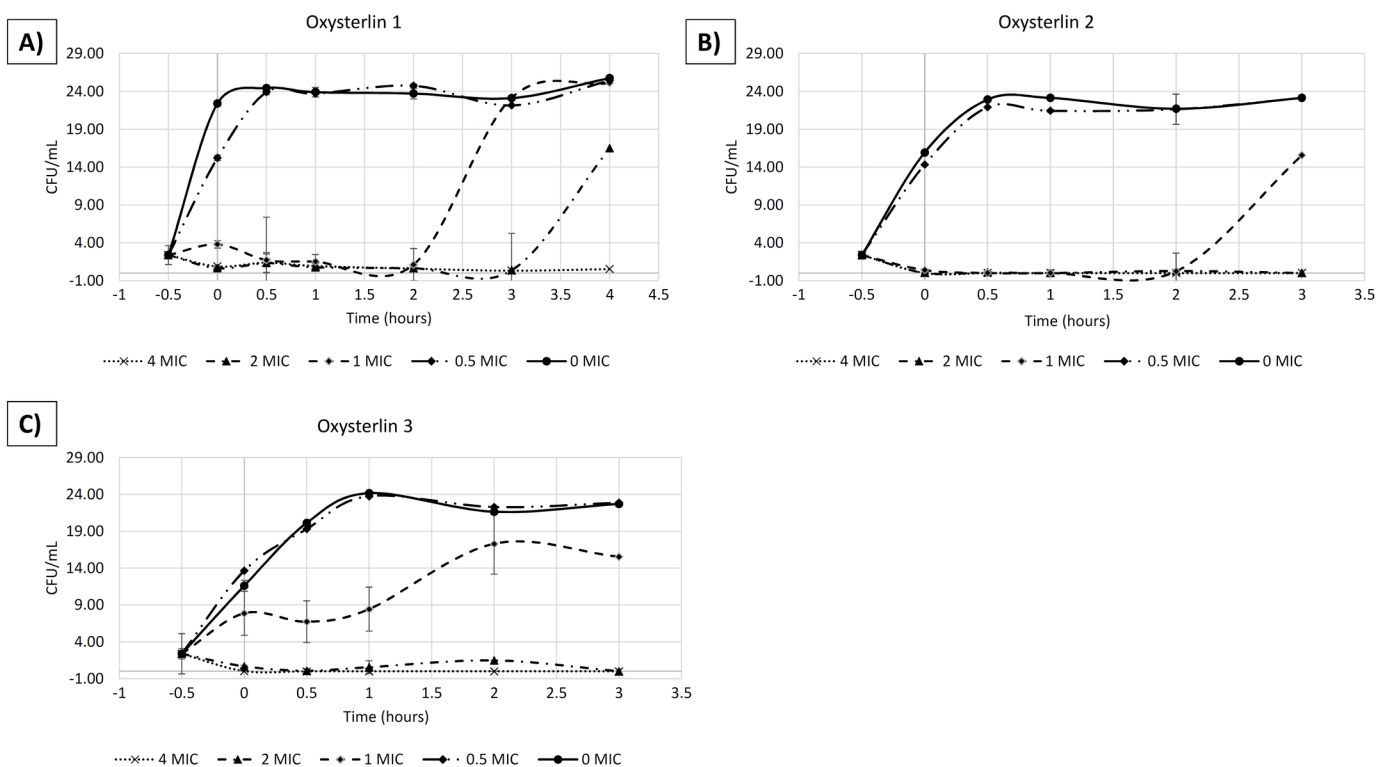


Fig 5. Time-kill curve of oxysterlins 1, 2, and 3 against *E. coli* ATCC 35218. (A) Oxysterlin 1, 1X MIC = 6.25 $\mu\text{g/mL}$. (B) Oxysterlin 2, 1X MIC = 50 $\mu\text{g/mL}$. (C) Oxysterlin 3, 1X MIC = 3.12 $\mu\text{g/mL}$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914.g005>

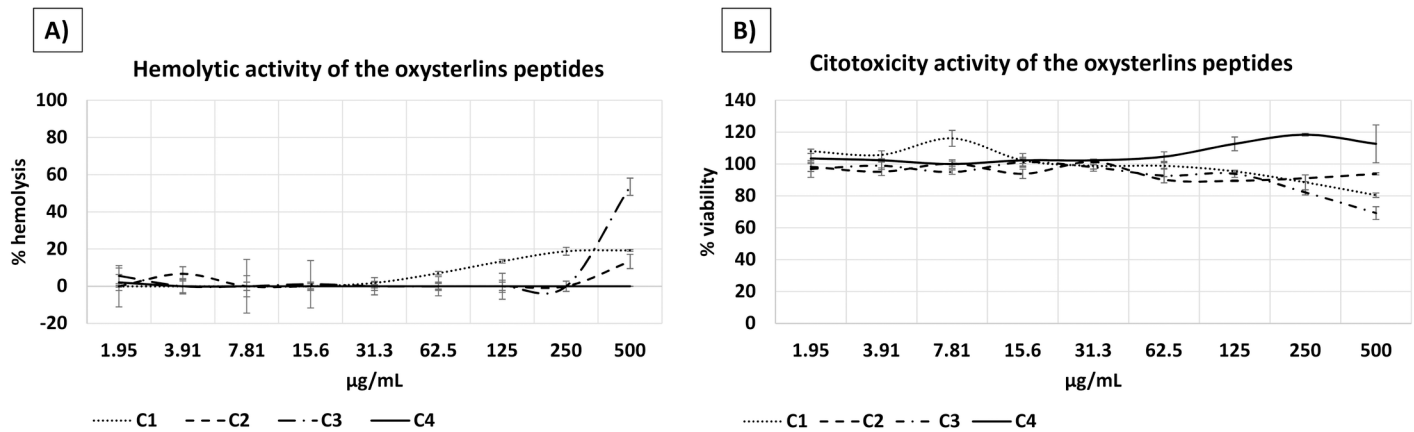


Fig 6. Hemolytic and cytotoxic activity of oxysterlin peptides. (A) Hemolytic activity towards human erythrocytes. (B) Cytotoxicity activity on Vero cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914.g006>

concentrations had bactericidal activity with (2 and 4 MIC) with a complete reduction of the CFU/mL at 3 h (Fig 5B and 5C). Bactericidal effect was seen rapidly in the 4 MIC concentration with reduction before 30 min of incubation.

The oxysterlins had a low toxic profile

Oxysterlin 1 showed hemolytic activity against human erythrocytes from 500 to 125 µg/mL with 17% to 13% hemolysis, respectively. Oxysterlins 2 and 3 showed hemolytic activity at a concentration of 500 µg/mL with 20% and 50% hemolysis, respectively, while oxysterlin 4 did not show activity against human erythrocytes (Fig 6A).

Cytotoxic activity of oxysterlins 1 and 3 on Vero cells after 24-h incubation showed decreased cell viability over 20% in the highest concentrations (500–250 µg/mL) for both, while oxysterlins 2 and 4 did not show cytotoxicity activity on Vero cells (Fig 6B).

The antibacterial activity of oxysterlin peptides is retained in the conditions of cytotoxic assay (DMEM 1X with 2% Fetal Bovine Serum (FBS)); however, the MIC increases four times under these conditions for the three oxysterlins (Table 5).

Discussion

Coleopterans comprise 40% of the 360,000 currently known insect species and are the largest and most diverse order of eukaryotic organisms [49]. Dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) have a complex life cycle, during which they interact with different microorganisms and environments [50,51]. With over 6,200 species in 267 genera and an estimated 30%–50% of the species still undescribed, dung beetles exhibit diversity comparable to Aves [51]. The *O. conspicillatum* dung beetle is a neotropic member of this highly diverse order. Adaptation to their

Table 5. MIC of the three oxysterlins under DMEM 1X and 2% FBS conditions. Minimum Inhibitory Concentration in µg/mL of oxysterlin peptides under DMEM 1X and 2% FBS conditions.

Microorganisms	Oxysterlin 1	Oxysterlin 2	Oxysterlin 3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	25	25	12.5

The therapeutic index (TI) was calculated by dividing the minimum hemolytic concentration by the MIC against *E. coli* ATCC 35218; for oxysterlins 1, 2, and 3, the TI were 20, 10, and 160, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187914.t005>

complex life cycle and evolution of their innate immune system in this diverse group of insects makes them an attractive target in the search for new HDP, given that they are the main effector molecules of their immune system. This is corroborated by our work in which we found four new cecropins, three were active against Gram-negative bacteria. By examining their sequence, we can hypothesize that they are the result of genetic duplication and alternative splicing.

Development of high throughput techniques, like next-generation sequencing and transcriptome analysis, is helping to find new antimicrobial peptides in different organisms and coleoptera species. In addition, different strategies of *in silico* analysis are used to predict peptides of therapeutic interest and enrich the search for antimicrobial peptides based on physicochemical properties and nucleotide sequence similarity [52–54]. Nevertheless, the number of host defense peptides in the cecropin family is low, finding mostly defensins and coleopterins [55]. The new group of cecropins, described in this work, were found by using a gene ontology enrichment strategy based on the blast of the signal peptide of the initial cecropin found by GO against a constructed *O. conspicillatum* transcriptome database and bio-informatic validation of the physicochemical properties of the putative sequences (size, net charge, hydrophobic momentum, and structure). With this group of sequences, the *O. conspicillatum* cecropin domain was built (GSKRWRKFEK (K/R)VK), corresponding to the amino terminal domain of the mature peptides. The description of this new cecropin domain may help to find new antimicrobial peptides in this highly diverse group of insects.

In insects, cecropins form a large family of cationic α -helical peptides. Few cecropins have been described in dung beetles. This may be explained—in part—because they are a highly diverse superfamily of antimicrobial peptides and a low number exists of available genetic sequences of neotropical beetles; therefore, the homology-based strategy by gene ontology to find new cecropins is limited. This situation was seen in our dendrogram where oxysterlins were grouped into a different clade and relatively far from other cecropins, even from the *Tribolium castaneum* beetle, confirming the high diversity of the cecropin superfamily [56]. In spite of the sequence diversity, the physicochemical and structural characteristics of the cecropin superfamily were conserved with a hydrophobic momentum, isoelectric point, amphipathicity, and α -helical structure characteristic of this family, except for oxysterlin 4, which had an α -helical and β -sheet structure similar to the defensins, but without disulfide bridges.

The tertiary structure modelled for the oxysterlins showed the α -helix characteristic of the cecropin family. These models had good scores with respect to the alignment with the template and percentage of amino acids in favored regions, but relatively low scores for global assessment. Nevertheless, these models agreed with the CD experimental data, where oxysterlins 1 to 3 had a characteristic pattern for α -helix, and oxysterlin 4 had a mixture of helix and β -strand.

Cecropins are mainly active against Gram-negative bacteria [8,57]. Oxysterlins 1, 2, and 3, similar to Cecropin A, Aedesin, Lucilin and HKABF [58], were found selective for Gram-negative bacteria and efficiently kill multidrug resistant (MDR) strains, including *E. coli* ESBL, *E. cloacae*, *Salmonella typhi*, and *E. coli* with MIC values between 3.12 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Oxysterlins 2 and 3 were active against *Klebsiella pneumoniae* (MIC 3.12 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and oxysterlins 1 and 3 were active against *P. aeruginosa* (MIC 25 and 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). These MIC are similar to the activity reported for other cecropins, like Cecropin B and Lucilin, ranging from 6.5 to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [45]. Other cecropins are active against Gram-positive bacteria [59]; in our work, oxysterlins 1 and 3 were active against *Staphylococcus saprophyticus* with MIC of 50 and 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, but not against *S. aureus* nor *S. epidermidis*. Oxysterlin 4 was not active against the microorganisms tested; this finding is likely related to the different sizes, conformational structure, and higher hydrophobicity of the peptide limiting its solubility.

Infections caused by MDR bacteria strains have become a serious global problem and HDP have gained considerable interest as a possible alternative to combat MDR bacteria over the past decade because of their particular action mechanisms and diversity of sequences. The antimicrobial activity of oxysterlins revealed a wide spectrum of activity against pathogenic microorganisms, such as Gram-positive, Gram-negative bacteria and yeasts, like *C. parapsilopsis*.

According to the dynamics of oxysterlins 1, 2, and 3 in the time-killing curves, these eliminate *E. coli* within less than 20 min at 2 MIC with a concentration-dependent bactericidal effect. This activity is faster than standard antibiotic drugs, like ampicillin, killing bacteria at 2 MIC in 2 h and similar to other antimicrobial peptides [44,60,61]. This concentration-dependent activity may be explained by the mechanisms where reaching a threshold concentration in the membrane is critical for the formation of pores and carpet-like mechanisms that rapidly kill bacteria. Nevertheless, other studies may help to reveal the specific mechanisms of oxysterlin activity.

The therapeutic potential of peptide antibiotic drugs lies in their ability to effectively kill bacterial cells effectively without exhibiting significant cytotoxicity toward mammalian cells. This potential is conveyed by the concept of the relative selectivity index. A high relative selectivity index, thus, incorporates two preferred characteristics of the peptide: high minimum hemolytic or cytotoxic concentration (MHC) and a low Minimum Inhibitory Concentration (MIC) [62]. We found that oxysterlin 2 has a low selectivity index [10]. Oxysterlins 1 and 3 have high selectivity index of 20 and 160, respectively; these indexes could indicate greater specificity of antimicrobial peptides for bacterial cells. Other biophysical and biological properties, like number of hydrophobic interactions, reduced hydrophobicity on the non-polar face, prevented peptide self-association in aqueous conditions, discriminate between eukaryotic and prokaryotic cell membranes. Thereby, this study identified that oxysterlins 2 and 3 may have some desired properties to explore further their potential use against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Oxysterlins 1 and 3, from *O. conspicillatum*, have shown the same effects as magainins or cecropins, with cytotoxicity against Vero cells only at higher concentrations, like 500 µg/mL [63]. Some authors suggest that membrane cholesterol in mammalian cells is the base of antimicrobial peptide selectivity [63,64]. However, further studies will be necessary on these effects and their influence on oxysterlin activity.

This study described and determined the antimicrobial capacity of four new HDP, denominated oxysterlins 1, 2, 3, and 4, cecropin-like peptides derived from the fat body of the *O. conspicillatum* dung beetle. Their synthetic peptide analogs were evaluated against pathogenic clinical bacteria isolates with MDR profiles, like *E. coli* ESBL, *E. cloacae*, *Salmonella typhi*, *C. albicans*, and *S. epidermidis*, providing new insights on the possible use of these molecules to develop new therapeutic alternatives.

Supporting information

S1 File. Oxysterlins genetic sequences. The genetic sequences of the Oxysterlins with the codes reported in the NCBI database.
(DOCX)

S2 File. Ramachandran plots of the oxysterlins. Ramachandran plots for the structural models of the Oxysterlins 1 to 4 in the figures A-D.
(DOCX)

S1 Table. Antibiotic resistance profile. The antibiotic resistant profile of the bacterial strains. (DOCX)

Acknowledgments

The authors thank Dr. Bruno Rivas Santiago from the Mexican Institute of Social Health for reading the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Germán Alberto Téllez Ramírez, Jhon Carlos Castaño Osorio.

Formal analysis: Germán Alberto Téllez Ramírez.

Funding acquisition: Germán Alberto Téllez Ramírez.

Investigation: Lily Johanna Toro Segovia, Germán Alberto Téllez Ramírez, Diana Carolina Henao Arias, Juan David Rivera Duran, Juan Pablo Bedoya.

Methodology: Lily Johanna Toro Segovia, Germán Alberto Téllez Ramírez, Diana Carolina Henao Arias, Juan David Rivera Duran, Juan Pablo Bedoya.

Project administration: Lily Johanna Toro Segovia, Germán Alberto Téllez Ramírez, Jhon Carlos Castaño Osorio.

Supervision: Germán Alberto Téllez Ramírez, Jhon Carlos Castaño Osorio.

Validation: Lily Johanna Toro Segovia.

Writing – original draft: Lily Johanna Toro Segovia, Germán Alberto Téllez Ramírez, Diana Carolina Henao Arias, Jhon Carlos Castaño Osorio.

Writing – review & editing: Lily Johanna Toro Segovia, Germán Alberto Téllez Ramírez.

References

1. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance. *Nature reviews Microbiology*. 2010; 8: 260–271. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2319> PMID: 20208551
2. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. 2008; 3: 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521> PMID: 18274517
3. Imler J-L, Bulet P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chemical immunology and allergy*. 2005; 86: 1–21. <https://doi.org/10.1159/000086648> PMID: 15976485
4. Cociancich S, Bulet P, Hetru C, Hoffmann JA. The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitology Today*. 1994. pp. 132–139. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90260-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90260-7) PMID: 15275477
5. Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology*. 1995. pp. 4–10. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80022-0](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80022-0) PMID: 7772280
6. Hoffmann JA, Reichhart JM, Hetru C. Innate immunity in higher insects. *Current Opinion in Immunology*. 1996. pp. 8–13. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(96\)80098-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(96)80098-7) PMID: 8729440
7. Kaneko Y, Furukawa S, Tanaka H, Yamakawa M. Expression of antimicrobial peptide genes encoding Enbocin and Gloverin isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2007; 71: 2233–2241. <https://doi.org/10.1271/bbb.70212> PMID: 17827677
8. Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1980; 106: 7–16. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x>
9. Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers—Peptide Science Section*. 1998. pp. 415–433. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1998\)47:6<415::AID-BIP2>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<415::AID-BIP2>3.0.CO;2-D)

10. Boman HG. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: An update review. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1998; 48: 15–25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1998.00343.x> PMID: 9714406
11. Marshall SH, Arenas G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2003. pp. 96–109. <https://doi.org/10.2225/vol6-issue3-fulltext-1>
12. Bulet P, Cociancich S, Dimarcq JL, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D, et al. Insect Immunity: Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; 266: 24520–24525. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2009.07.008> PMID: 1761552
13. Bulet P, Cociancich S, Reuland M, Sauber F, Bischoff R, Hegy G, et al. A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata). *European Journal of Biochemistry*. 1992; 209: 977–984. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17371> PMID: 1425705
14. Moon HJ, Lee SY, Kurata S, Natori S, Lee BL, Dong JJ, et al. Purification Antibacterial molitor I and Molecular Protein from Cloning Larvae of cDNA for an Inducible of the Coleopteran, *Tenebrio molitor*. *J Biochem*. 1994; 116: 53–58. PMID: 7798186
15. Lee YJ, Chung TJ, Park CW, Hahn Y, Chung JH, Lee BL, et al. Structure and expression of the tenecin 3 gene in *Tenebrio molitor*. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996; 218: 6–11. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0002> PMID: 8573176
16. Chae JH, Kurokawa K, So YI, Hwang HO, Kim MS, Park JW, et al. Purification and characterization of tenecin 4, a new anti-Gram-negative bacterial peptide, from the beetle *Tenebrio molitor*. *Developmental and Comparative Immunology*. Elsevier Ltd; 2012; 36: 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.09.010> PMID: 22001126
17. Lee SY, Moon HJ, Kurata S, Kurama T, Natori S, Lee BL. Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein of larvae of a coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia*. *Journal of biochemistry*. 1994; 115: 82–86. PMID: 8188641
18. Miyanoshita A, Hara S, Sugiyama M, Asaoka A, Taniai K, Yukuhiro F, et al. Isolation and characterization of a new member of the insect defensin family from a beetle, *Allomyrina dichotoma*. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996; 220: 526–531. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0438> PMID: 8607799
19. Altincicek B, Knorr E, Vilcinskas A. Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Developmental and Comparative Immunology*. 2008; 32: 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.09.005> PMID: 17981328
20. Roh KB, Kim CH, Lee H, Kwon HM, Park JW, Ryu JH, et al. Proteolytic cascade for the activation of the insect toll pathway induced by the fungal cell wall component. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284: 19474–19481. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007419> PMID: 19473968
21. Barbault F, Landon C, Guenneugues M, Meyer JP, Schott V, Dimarcq JL, et al. Solution Structure of Alo-3: A New Knottin-Type Antifungal Peptide from the Insect *Acrocinus longimanus*. *Biochemistry*. 2003; 42: 14434–14442. <https://doi.org/10.1021/bi035400o> PMID: 14661954
22. Lowenberger C, Bulet P, Charlet M, Hetru C, Hodgeman B, Christensen BM, et al. Insect immunity: Isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1995; 25: 867–873. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(95\)00043-U](https://doi.org/10.1016/0965-1748(95)00043-U) PMID: 7633471
23. Nam HJ, Oh AR, Nam ST, Kang JK, Chang JS, Kim DH, et al. The insect peptide CopA3 inhibits lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *Journal of Peptide Science*. 2012; 18: 650–656. <https://doi.org/10.1002/psc.2437> PMID: 22969062
24. Vasanth PH., Sathish KBY. Isolation and Partial Purification of Antimicrobial Peptides / Proteins From Dung Beetle, *Onthophagus Taurus* Immune Hemolymph. 2013; 2: 2414–2418.
25. Weber F. *Observationes entomologicae, continentis novorum quae condidit generum characteres, et nuper detectarum specierum descriptiones*. Kiliae: Universit Buchh. 1801; pp: 116.
26. Medina-U, Alejandra C, Pulido-H AL. Escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) de la Orinoquia colombiana. *Biota Colombiana*. 2009; 10: 55–62.
27. Haas BJ, Zody MC. Advancing RNA-Seq analysis. *Nature Biotechnology*. 2010; 28: 421–423. <https://doi.org/10.1038/nbt0510-421> PMID: 20458303
28. Altschul SF. BLAST Algorithm. *ELS*. 2014; 1–4. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0005253.pub2>
29. Conesa A, Götz S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*. 2008; 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/619832> PMID: 18483572

30. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from trans-membrane regions. *Nature Methods*. 2011; pp. 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701> PMID: [21959131](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21959131/)
31. Buchan DWA, Minnici F, Nugent TCO, Bryson K, Jones DT. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic acids research*. 2013; 41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt381> PMID: [23748958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23748958/)
32. Cole C, Barber JD, Barton GJ. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic acids research*. 2008; 36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn238> PMID: [18463136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18463136/)
33. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. 2005; pp. 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
34. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41: 95–98. doi:citeulike-article-id:691774.
35. Peng J, Xu J. Raptorx: Exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2011; 79: 161–171. <https://doi.org/10.1002/prot.23175> PMID: [21987485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21987485/)
36. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem*. 2004; 25: 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084> PMID: [15264254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15264254/)
37. Provencher SW, Glöckner J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*. 1981; 20: 33–37. <https://doi.org/10.1021/bi00504a006> PMID: [7470476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7470476/)
38. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2014; pp. 1–16. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48> PMID: [25501942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25501942/)
39. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013; 30: 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197> PMID: [24132122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132122/)
40. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 1987; 4: 406–425. doi:citeulike-article-id:93683. PMID: [3447015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3447015/)
41. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39: 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x> PMID: [28561359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28561359/)
42. Zuckerkandl E, Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. *Evolving Genes and Proteins*. 1965; pp. 97–166. <https://doi.org/10.1209/epl/i1998-00224-x>
43. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. 2008; 3: 163–75. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521> PMID: [18274517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18274517/)
44. Wioletta BR, Dawgul M, Bielinska S, Kraska B, Piechowicz L, Kamysz W. Colorimetric evaluation of the time-killing assay for citropin 1.1, lipopeptide Palm-KK-NH₂, and Temporin A. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011; 21: 536–539. <https://doi.org/10.4014/jmb.1010.10008> PMID: [21617353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21617353/)
45. Téllez GA, Castaño-Osorio JC. Expression and purification of an active cecropin-like recombinant protein against multidrug resistance *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2014; 100: 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.05.004> PMID: [24859674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24859674/)
46. Shin SY, Kang JH, Hahm KS. Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J Pept Res*. 1999; 53: 82–90. PMID: [10195445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10195445/)
47. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*. 2006; 1: 2876–90. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202> PMID: [17406547](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406547/)
48. Tassanakajon A, Somboonwiwat K, Amparyup P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Developmental and Comparative Immunology*. Elsevier Ltd; 2015; 48: 324–341. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.05.020> PMID: [24950415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24950415/)
49. Tautz D. Insects on the rise. *Trends in Genetics*. 2002; pp. 179–180. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02634-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02634-8) PMID: [11932012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11932012/)
50. Hull R, Alaouina M, Khanyile L, Byrne M, Ntwasa M. Lifestyle and host defense mechanisms of the dung beetle, *Euoniticellus intermedius*: the toll signaling pathway. *Journal of insect science (Online)*. 2013; 13: 108. <https://doi.org/10.1673/031.013.10801> PMID: [24735102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24735102/)
51. Tarasov S, Génier F. Innovative bayesian and parsimony phylogeny of dung beetles (coleoptera, scarabaeidae, scarabaeinae) enhanced by ontology-based partitioning of morphological characters. *PLoS ONE*. 2015; 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116671> PMID: [25781019](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25781019/)

52. Lata S, Sharma BK, Raghava GPS. Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC bioinformatics*. 2007; 8: 263. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-263> PMID: 17645800
53. Amaral AC, Silva ON, Mundim NCCR, De Carvalho MJA, Migliolo L, Leite JRSA, et al. Predicting antimicrobial peptides from eukaryotic genomes: In silico strategies to develop antibiotics. *Peptides*. 2012; 37: 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.021> PMID: 22884922
54. Slavokhotova AA, Shelenkov AA, Odintsova TI. Prediction of *Leymus arenarius* (L.) antimicrobial peptides based on de novo transcriptome assembly. *Plant Molecular Biology*. Springer Netherlands; 2015; 89: 203–214. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0346-6> PMID: 26369913
55. Bang K, Hwang S, Lee J, Cho S, Barribeau S. Identification of immunity-related genes in the larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis* (Coleoptera: Cetoniidae) by a next-generation sequencing-based transcriptome analysis. *Journal of Insect Science*. 2015; 15. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev120> PMID: 26450592
56. Tamang DG, Saier MH. The cecropin superfamily of toxic peptides. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2006; 11: 94–103. <https://doi.org/10.1159/000092821> PMID: 16825792
57. Kim JK, Lee E, Shin S, Jeong KW, Lee JY, Bae SY, et al. Structure and function of papiliocin with antimicrobial and anti-inflammatory activities isolated from the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286: 41296–41311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.269225> PMID: 21965682
58. Wang L, Lai C, Wu Q, Liu J, Zhou M, Ren Z, et al. Production and characterization of a novel antimicrobial peptide HKABF by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*. 2008; 43: 1124–1131. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.009>
59. Lee E, Shin A, Kim Y. Anti-inflammatory activities of cecropin A and its mechanism of action. *Archives of insect biochemistry and physiology*. 2015; 88: 31–44. <https://doi.org/10.1002/arch.21193> PMID: 25319409
60. Yourassowsky E, Van der Linden MP, Lismont MJ, Crokaert F, Glupczynski Y. Effect on growth curves and killing curves of brief exposure of *Escherichia coli* to imipenem and piperacillin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1986; 18 Suppl E: 61–5.
61. Hyatt JM, Nix DE, Schentag JJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic activities of ciprofloxacin against strains of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* for which MICs are similar. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994; 38: 2730–2737. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.12.2730> PMID: 7695254
62. Lee E, Kim JK, Shin S, Jeong KW, Shin A, Lee J, et al. Insight into the antimicrobial activities of coprisin isolated from the dung beetle, *Copris tripartitus*, revealed by structure-activity relationships. *Biochimica et Biophysica Acta—Biomembranes*. 2013; 1828: 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.028> PMID: 23137439
63. Matsuzaki K, Harada M, Handa T, Funakoshi S, Fujii N, Yajima H, et al. Magainin 1-induced leakage of entrapped calcein out of negatively-charged lipid vesicles. *BBA—Biomembranes*. 1989; 981: 130–134. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90090-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90090-4) PMID: 2719968
64. Tytler EM, Anantharamaiah GM, Walker DE, Mishra VK, Palgunachari MN, Segrest JP. Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry*. 1995; 34: 4393–401. <https://doi.org/10.1021/BI00013A031> PMID: 7703253

1 **Identification of new insect Host Defense Peptides (HDP) from Dung Beetles**
2 **(Coleoptera: Scarabaeidae) transcriptomes**

3

4 **New insect Host Defense Peptides from Dung Beetles**

5

6 **Author's names and affiliations:**

7 **Germán Alberto Téllez Ramirez^{1*}**

8 <https://orcid.org/0000-0002-3057-9290>

9 Center of Biomedical Research. Group of Molecular Immunology. Universidad del
10 Quindío. Cra. 15 calle 12 norte. Armenia, Quindío – Colombia.

11 Author Contributions: Conceptualization, Data Curation, Formal Analysis,
12 Investigation, Methodology, Project Administration, Visualization, Writing – Original
13 Draft Preparation, Writing – Review & Editing.

14 **Juan Felipe Osorio-Méndez¹**

15 <https://orcid.org/0000-0002-7326-8871>

16 Center of Biomedical Research. Group of Molecular Immunology. Universidad del
17 Quindío. Cra. 15 calle 12 norte. Armenia, Quindío – Colombia.

18 Author Contributions: Visualization, Writing – Original Draft Preparation, Writing –
19 Review & Editing

20 **Diana Carolina Henao Arias¹,**

21 <https://orcid.org/0000-0001-8136-1059>

22 Center of Biomedical Research. Group of Molecular Immunology. Universidad del
23 Quindío. Cra. 15 calle 12 norte. Armenia, Quindío – Colombia.

24 Author Contributions: Investigation, Methodology, Visualization, Writing – Original
25 Draft Preparation.

26 **Lily Johanna Toro S¹,**

27 <http://orcid.org/0000-0001-7906-1997>

28 Center of Biomedical Research. Group of Molecular Immunology. Universidad del

29 Quindío. Cra. 15 calle 12 norte. Armenia, Quindío – Colombia.

30 Author Contributions: Conceptualization, Investigation, Methodology, Project

31 Administration, Writing – Original Draft Preparation, Writing – Review & Editing.

32 **Juliana Franco Castrillón¹**

33 <https://orcid.org/0000-0003-4942-5096>

34 Center of Biomedical Research. Group of Molecular Immunology. Universidad del

35 Quindío. Cra. 15 calle 12 norte. Armenia, Quindío – Colombia.

36 Author Contributions: Writing – Original Draft Preparation.

37 **Maribel Rojas-Montoya¹,**

38 <https://orcid.org/0000-0002-0966-7165>

39 Center of Biomedical Research. Group of Molecular Immunology. Universidad del

40 Quindío. Cra. 15 calle 12 norte. Armenia, Quindío – Colombia.

41 Author Contributions: Visualization, Writing – Original Draft Preparation.

42 **Jhon Carlos Castaño Osorio¹**

43 <https://orcid.org/0000-0002-7639-3053>

44 Center of Biomedical Research. Group of Molecular Immunology. Universidad del

45 Quindío. Cra. 15 calle 12 norte. Armenia, Quindío – Colombia.

46 Author Contributions: Conceptualization, Project Administration, Writing – Original

47 Draft Preparation, Writing – Review & Editing.

48 **E-mail address:** gymol@uniquindio.edu.co

49 ***corresponding author: Email address:** gatellez@uniquindio.edu.co

50

51 **Abstract**

52 **Introduction:** The Coleoptera Scarabaeidae family is one of the most diverse groups
53 of insects on the planet, living in complex microbiological environments. Their immune
54 systems have evolved with the generation of host defense peptides but only a small
55 number of these peptides have been characterized.

56 **Methods:** In this work two sources of information were retrieved: 1) *De novo*
57 transcriptomic data from two species of neotropical Scarabidae (*Dichotomius satanas*
58 and *Ontophagus curvicornis*); 2) Sequence data deposited in available databases. A
59 BLAST-based search against the transcriptomes with a subset of sequences
60 representative of the Host Defense Peptides (HDP). The HDP were described with the
61 cecropin, defensin, attacin, and coleopteracin families; their physical/chemical and
62 structural properties were described.

63 **Results:** This work reports 155 novel sequences of HDP identified in 9 transcriptomes
64 from seven species from the Coleoptera order: *D. satanas* (n= 76; 49.03%), *O.*
65 *curvicornis* (n= 23; 14.83%), *T. dichotomus* (n= 18; 11.61%), *O. nigriventris* (n= 10;
66 6.45%), *Heterochelus sp* (n= 6; 3.87%), *O. conspicillatum* (n= 18; 11.61%) and *P.*
67 *japonica* (n= 4; 2.58%). These sequences were identified based on similarity to known
68 HDP insect families. New members of defensins (n= 58; 37.42%), cecropins (n= 18;
69 11.61%), attancins (n= 41; 26.45%) and coleopteracins (n= 38; 24.52%), with their
70 physicochemical, structural characteristics, and sequence relationship to other insect
71 HDP were analyzed.

72 **Conclusions:**
73 155 new HDP could be identified, based on similarity to known HDP insect families on
74 nine transcriptome sequences of seven beetle species.

75 **Keywords:**

76 Antimicrobial cationic peptides, insect proteins, computational biology, RNA-Seq,
77 cecropins, defensins, attacin, coleoptericin.

78

79 **Highlights**

80

- 81 • This work identified 155 novel sequences of HDP found in nine transcriptomes
82 from seven Coleoptera species.
- 83 • *De novo* transcriptomic data from two species of neotropical Scarabaeidae
84 (*Dichotomius satanas* and *Ontophagus curvicornis*).
- 85 • *In silico* prediction of physicochemical properties, structural features, sequence
86 similarity, and antimicrobial activity of Scarabaeidae HDP.

87

88 **Introduction**

89 One of the main effectors of the insect immune response is the production of Host
90 Defense Peptides (HDP) or antimicrobial peptides. Families of these peptides have
91 been identified in all taxonomic groups, thus representing an ancient and efficient
92 defense mechanism against pathogens. In insects, most HDP are synthesized as
93 precursors or pro-proteins in the fat body and hemocytes [1–3]. Host Defense Peptides
94 are cationic, amphipathic polypeptides, produced in all known genera of living
95 organisms, and represent an ancient innate defense mechanism [4–6]. Once activated
96 by post-translational proteolysis [1,7–9], they act as effector molecules against
97 pathogens in a broad spectrum of antimicrobial activity against Gram-positive and
98 Gram-negative bacteria, protozoa, fungi, and viruses. They also have low propensity

99 for developing resistance. This efficiency is thought to be one of the biological
100 attributes that would explain the evolutionary success of insects [10,11]. Therefore,
101 they have received attention for the development of new antimicrobials with clinical
102 applications in recent years [12,13].

103

104 Insect HDP have been classified according to their sequence, physicochemical and
105 structural properties, in cecropin, defensin, attacin, and coleoptericin families. Other
106 families, such as moricin and gloverin have been identified only in Lepidoptera
107 [2,14,15]. Cecropins are a family of 3–4 kDa, cationic, alpha helix, amphipathic
108 peptides devoid of cysteine residues [16,17]. Mature active cecropins are generated
109 after removal of the signal peptide and form two α -helices connected by a hinge. A
110 long hydrophobic C-terminal and a strongly basic N-terminal domain is presumptively
111 required for the biological activity and they are most active against Gram-negative
112 bacteria [18–22].

113

114 Defensins are the largest family of HDP and are ubiquitous in almost all forms of life,
115 including animals, fungi, and plants [23]. They have broad-spectrum antimicrobial
116 activity against bacteria, fungi, and viruses [24]. The majority of mature defensins are
117 cationic peptides composed of 24 to 42 amino acid residues, characterized by six
118 cysteines [25]. The structure of insect defensins is composed of an α -helix, followed
119 by an antiparallel β -sheet linked by three intramolecular disulfide bonds, forming a
120 “Cysteine-Stabilized alpha Beta (CS $\alpha\beta$)” or “loop-helix-beta-sheet” structure [26,27].

121

122 Attacins are larger peptides with basic (~ 8.3) or acidic (~ 5.7) isoelectric points, and
123 molecular weights of 20–23 kDa; we can find two isoforms, basic and acids attacins

124 [28]. Their secondary structure is composed of a hydrophobic alpha helix similar to
125 glycine-rich peptides [29]. They can inhibit growth of Gram-negative bacteria, and the
126 synthesis of bacterial proteins like OmpC, OmpF, OmpA and LamB [30,31].

127

128 Coleoptericsins contain approximately 70 amino acid residues and are characterized
129 as glycine and proline-rich antimicrobial peptides that are bactericidal against Gram-
130 positive and Gram-negative bacteria [32]. There are two subgroups, one positively and
131 other negatively charged, and their C-terminus has a basic nature [32,33].

132

133 With approximately one-million characterized species, insects represent the largest
134 class within the animal kingdom and Coleoptera are the most diverse order and is the
135 most diverse in insects [34–36]. Nevertheless, only 305 of the 3070 HDP sequences
136 deposited in the Antimicrobial Peptide Database (APD) are derived from insects [37].
137 To date some HDP have been described in the Coleoptera order, as is the case of
138 *Allomyrina dichotoma* [38], *Octodonta nipae* [39], *Hylobius abietis* [40], *Nicrophorus*
139 *vespilloides* [41], *Tenebrio molitor* [42], *Calomera littoralis* [43], *Protaetia brevitarsis*
140 *seulensis* [44], *Tribolium castaneum* [45–47], *Holotrichia diomphalia* [48], *Zophobas*
141 *atratus* [33], *Allomyrina dichotoma* [32], *Acalolepta luxuriosa* [49], and *Sitophilus*
142 *oryzae* [50]. The HDP reported in the Scarabaeidae family are scarce compared with
143 their wide diversity of species consisting of over 30.000 globally. The sequence and
144 function of only a few of these peptides have been characterized, including those of
145 the Coprisin, Oxysterlin, and Scarabaeicin families [51–57]. Therefore, we propose to
146 identify and describe new putative HDP in publicly available assembled transcript
147 sequences from the NCBI Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) database of seven
148 different species of Scarabaeidae and two new transcriptomes from the neotropical

149 beetles *Dichotomius satanas* and *Ontophagus curvicornis*, both species widely
150 distributed inhabiting the Andean region of Colombia [58–61].

151

152 **Materials and Methods**

153 **Collection and maintenance of beetles**

154 Neotropical dung beetles used in this research were obtained in the municipality of
155 Filandia, Quindío-Colombia (4.686998° N and -75.614500° W; datum=WGS84) 1.923
156 m.a.s.l. The beetles captured were identified as *Dichotomius satanas* and *Ontophagus*
157 *curvicornis* with the Cultid-Medina, 2012 taxonomic key [58]. Once collected, they
158 were maintained in a terrarium with organic soil and human feces bait for 12 h. Then,
159 they were separated into two groups of five individuals each. One group was
160 inoculated in the ventral lateral abdomen with 10 µL of a pool of 1X10⁶ UFC/mL
161 formalin-fixed bacteria (*E.coli* and *Staphylococcus aureus*) and fungi (*Candida*
162 *albicans*). The other group was used as an untreated control. Finally, the fat body and
163 part of the hindgut were dissected 12 h post-inoculation.

164

165 **Total RNA extraction, transcriptome sequencing, and *de*** 166 ***novo* assembly**

167 Total RNA was extracted by using Ambion total RNA extraction kit (Invitrogen cat
168 PureLink® RNA Mini Kit, life technologies 12183025). Total RNA was prepared by
169 using bead clean up and library preparation with Illumina RNA poly-A selection. The
170 transcriptome was sequenced with Illumina Hiseq and pair-end read with 150bd
171 length. The FASTAq files were checked by FastQC [62], the trimming was done by

172 Trimmomatic V0.36 [63], the data from each species were merged and the
173 transcriptome was *de novo* assembled by using Trinity V2.5. on Indiana University
174 National center for genome analysis support (<https://galaxy.ncgas-trinity.indiana.edu/>)
175 [64].

176

177 **Transcriptome shotgun assemblies**

178 Transcriptome shotgun assemblies (TSA) from Scarabaeidae species: *Trypoxylus*
179 *dichotomus*, *Onthophagus nigriventris*, *Onthophagus curvicornis*, *Popillia japonica*,
180 *Heterochelus sp*, *Dichotomius satanas*, and *Oxysternon conspicillatum* were
181 downloaded from the sequence set browser
182 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/>). The fasta files of the assembled
183 transcriptomes were converted into BLAST databases with CLC main workbench
184 software 7.9.1.

185

186 **Homology identification of HDP**

187 The queries from the Cecropin family were constructed from Oxysterlins [53] and
188 different sequences related to the HDP InterPro families (Cecropin: IPR020400;
189 Defensin: IPR017982; Coleopteracin: IPR009382, and Attacin: IPR005520
190 IPR005521) and a multi-TBLASTn search was constructed and the result sequences
191 were filtered according to the E-score ≤ 0.01 and the open reading frame (ORF) was
192 identified for each sequence [65]. The list of sequence codes identified in the tBLASTn
193 was extracted from the different transcriptomes and the related amino-acid sequence

194 was identified by using the ORF finder tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)
195 [66].

196

197 **Workflow to analyze putative HDP sequences**

198 The presence and location of signal peptides in the deduced HDP amino acid
199 sequences were predicted with SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)
200 [67]. The physicochemical characteristics of the peptides (molecular mass, isoelectric
201 point, and Kyte-Doolittle hydrophobic profile) were calculated with the protein report
202 tool from the CLC main workbench V7.9.1. The total net charge was calculated with
203 the APD3 (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) calculation and prediction tool [37].
204 Prediction of the antimicrobial function was conducted with the SVMC, RFC, and DAC
205 algorithms available in Camp3 [68], Classamp [69], and iAmpred tools [37].

206

207 **Structural analysis**

208

209 The secondary structure prediction was done with the Psipred
210 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) server [70]. Prediction of functional domains was
211 done with Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) [71]. The tertiary structure was
212 predicted with RAPTOR X (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/>)
213 [72], and structural alignments were done with the 3Dcomb V1.18 tool [73]. All the
214 models were visualized in UCSF Chimera V1.13.1. [74]. The protein-protein
215 interactions of the sequences modeled were constructed by using the Cluspro server
216 [75]. Illustration of the general structural properties for each family was made by DOG
217 V1.0 [76].

218

219 **Similarity dendrogram**

220 The sequences of InterPro families (cecropin: IPR020400; insect Defensin:
221 IPR017982; Coleopteracin: IPR009382 Attacin: IPR005520 IPR005521) and the
222 taxonomic key corresponding to each sequence were downloaded from the PIR batch
223 server (<https://pir.georgetown.edu/pirwww/search/batch.shtml>). The signal and
224 propeptide were identified and removed and the mature peptides were aligned with
225 the HDP from the Scarabaeidae with Clustal Omega
226 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) or MUSCLE [77]. Dendrograms were
227 generated by Neighbor-joining with Jukes-Cantor protein distance and bootstrap with
228 10000 replicates in CLC main workbench V7.9.1.

229

230 **Ethics statement**

231 This work was approved by the Universidad del Quindío bioethics committee under
232 act number 8 of 06 May 2016. The contract of access to genetic resources was drawn
233 through resolution N° 120 of 22 October 2015 with the Colombian Ministry of
234 Environment and Sustainable Development.

235

236 **Results and Discussion**

237 **Transcriptome shotgun assemblies (TSA)**

238 Traditional strategies for HPD identification and characterization involve biochemical
239 purification methods with RP-HPLC (reverse-phase high-pressure liquid

240 chromatography) coupled with mass spectrometry and functional assays. Other
241 strategies use highly conserved positions of some HDP families to identify potential
242 HDP by similarity searches or molecular biology approaches with RACE-PCR (rapid
243 amplification of cDNA ends) [78]. Artificial neural network algorithms have also been
244 trained with information about structural and physicochemical characteristics to
245 identify novel HDP sequences with proteomic and genomic methodologies [79].
246 Recent developments in high-throughput sequencing technologies have represented
247 a novel and efficient method for gene identification [80]. Transcriptome-based
248 approaches using next-generation sequencing are particularly useful because they
249 focus on the expressed (*i.e.* exomic) portion of the genome. This information can be
250 exploited by using bioinformatic tools to search for target genes/proteins using a step-
251 by-step selection strategy [81]. In this work, the transcriptomes of two Scarabaeidae
252 species (*O. curvicornis* and *D. satanas*) were sequenced, assembled and submitted
253 to the DDB/EMBL/GenBank database under the accession codes GHMD000000000 -
254 GHMA000000000, bio-sample: SAMN10614998 - SAMN10614917 and bio-project:
255 PRJNA510790 - PRJNA510790, respectively. The transcriptome characteristics used
256 for this work are shown in **Table 1**.

257

258 **Table 1. TSA from Scarabaeidae.**

Prefix (TSA code)	Organism	Bio project code	Biosample code	Source	Contigs number
-------------------	----------	------------------	----------------	--------	----------------

GAQV01	<i>Trypoxylus dichotomus</i>	PRJNA231720	SAMN02444008 SAMN02444009 SAMN02444010 SAMN02444011 SAMN02444012 SAMN02444013 SAMN02444014 SAMN02444015 SAMN02444016 SAMN02444017 SAMN02444018 SAMN02444019	3rd instar larval and prepupal	34455
IABQ01	<i>Trypoxylus dichotomus tunobosonis</i>	PRJDB4830	SAMD00051587	3rd larvae	30157
GAQW01	<i>Onthophagus nigriventris</i>	PRJNA231725	SAMN02444020 SAMN02444021 SAMN02444022 SAMN02444023	3rd instar larval and prepupal	59302
GARJ01	<i>Popillia japonica</i>	PRJNA233626	SAMN02569976	Antenna	698
GARK01	<i>Popillia japonica</i>	PRJNA198730	SAMN02055564	Grub	1916
GDNJ01	<i>Heterochelus</i> sp. AD-2015	PRJNA286531	SAMN03799575	Tissue	50435
GEXM01	<i>Oxysternon conspicillatum</i>	PRJNA339294	SAMN05589108	Adult fat body	27567
GHMA01	<i>Dichotomius satanas</i>	PRJNA510790	SAMN10614917	Adult fat body and intestine	463430

	<i>Onthophagus</i>			Adult fat body	
GHMD01	<i>curvicornis</i>	PRJNA510790	SAMN10614998	and intestine	172518

259

260 A tBLASTn search on the nine assembled transcriptomes was done with the
261 constructed HDP sequence queries, the result contigs were retrieved and only those
262 containing complete ORF were considered for further analysis. In total, 155 contigs
263 encoding for potential HDP were identified. The number of HDP identified correlated
264 with the size of the transcriptome and the condition of the sample (**Fig 1A**). These
265 three species, *O. curvicornis*, *D. satanas*, and *O. conspiciatum*, have most of the
266 HDP. This may be explained by the fact that these three specimens had been obtained
267 from the fat body of adult specimens previously subjected to stimulation to boost the
268 insect immune response; these results agree with the different expression patterns of
269 HDP with basal and inducible forms in different tissues and conditions [2,82].

270

271 **Fig 1.** Percentage of contigs in nine Scarabaeidae TSA and percentage of HDP
272 identified by sequence homology. **A.** Percentage of contigs and HDP per species. **B.**
273 Percentage of Scarabaeidae HDP families by dung beetle species.

274 Four HDP family distribution also varied according to species (**Fig 1B**) with members
275 from these families identified in all species, with two exceptions *Popillia japonica* with
276 only defensin peptides and *Onthophagus nigriventris* where the cecropin family was
277 missing. *Heterochelus* sp and *O. nigriventris* have less number of defensins in contrast
278 with *O. conspiciatum*, *O. curvicornis*, *T. dichotomus*, and *D. satanas* wich have more
279 attacins. The defensin HDP family has the majority of peptides representing 37.42 %
280 (**Fig 1B**). The difference in the number of HDP found among species and type of HDP

281 may be explained by the different tissues sampled, size of the transcriptome, and life
282 cycle stage of the individual sample, according to these differences, it has been
283 described that the expression of HDP is influenced by context-specific characteristics,
284 where sex, presence of offspring, and carcass affect their expression in a complex
285 system of transcriptional reprogramming, reflecting adaptations to specific ecological
286 niches [82].

287

288 This article, Identified 155 new putative HDP sequences from nine transcriptomes (**S1**
289 **appendix**), while another work with a similar approach using tBLASTn and BLASTp
290 searches in newly sequenced arthropod genomes and expressed sequence tags
291 (EST) derived from the red flour beetle (*Tribolium castaneum*), monarch butterfly
292 (*Danaus plexippus*) and human body louse (*Pediculus humanus humanus*) identified
293 six HDP [83]. One difference in the results may be explained by the use of the TSA
294 database where the sequences may be more refined in the context of genome
295 complexity with different introns and gene arrangements; another difference was the
296 query construction, where sequences reported in APD were used and our work used
297 a greater query search according to the InterPro related sequences.

298

299 **Cecropin family description**

300 Cecropins are the most abundant family of linear α -helical HDP in insects [84]. They
301 have been identified in Hexapoda orders like Coleoptera, Diptera, and Lepidoptera
302 [26]. Insect and non-insect cecropins are encoded by non-homologous genes.
303 However, in holometabolous orders they have evolved only once [85]. Genes from this
304 family frequently encode for tryptophans at the first or second position of the mature

305 peptide and lack cysteines. They are basic amphipathic peptides rich in cationic amino
306 acids, with an N-terminal hydrophilic domain and a C-terminal hydrophobic domain.
307 Structurally, they are characterized by two distinctive alpha-helical segments linked by
308 a short hinge. In the post-translational level, they have a signal peptide and a frequent
309 C-terminal amidation [16,17,19,26,86].

310 In Scarabaeidae, 18 cecropin sequences were found with mature peptide lengths
311 ranging from 37 to 55 residues, with molecular weights around 4 kDa. The sequence
312 alignment shows a highly conserved signal peptide, the mature peptide has an N-
313 terminal cationic domain [GR]-[SW]-K-[RKG]-[WLF]-R-K-[FIL]-E-[KR]-[RKA]-[VSG]-
314 [KR]-[KR] with high frequency of K-R residues and hydrophobic angle from 120° to
315 180°. The C-terminal domain has a higher degree of variability with a region rich in
316 acid residues and an aliphatic hydrophobic region (**Fig 2**). The predicted secondary
317 and tertiary structures show highly conserved alpha-helix with a TM score of 0.51 in
318 the structural alignment, suggesting that they can be classified as a single structural
319 family (**Fig 3**) [73,87,88]. We found that only GEXM01014653.1 and
320 GEXM01014651.1 sequences have an additional segment in the N-terminal domain,
321 probably because of alternative splicing or a transcriptome assembly error.

322 **Fig 2.** Multiple-sequence alignment of cecropin HDP found in Scarabaeidae. Position
323 40 in the alignment represents the cleavage site of the signal peptide predicted with
324 SignalP.

325

326 **Fig 3. Structure of Scarabaeidae mature cecropins. A.** Structural superposition
327 constructed in DeepAlign. TMscore: 0.517 with Alpha helical conserved tertiary
328 conformation. **B.** Ramachandran plot of the superimposed structures.

329

330 The insect cecropin dendrogram shows that the majority of sequences are from
331 Diptera and Lepidoptera orders as already described [85]. The dendrogram structure
332 has four main clades that are well related to the phylogenetic orders, a highly
333 conserved Diptera clade representing flies, Lepidoptera, Ascaridida, and a distant
334 share clade of Coleoptera and mosquitoes (**Fig 4**). Compared to other orders like
335 Diptera and Lepidoptera, cecropins from Scarabaeidae show more variation and
336 divergence among the sequences within the same order.

337

338 **Fig 4.** Neighbor-joining similarity dendrogram of invertebrate cecropins. Sequences
339 from the mature peptides were aligned by MUSCLE. The taxonomic distribution of the
340 sequences is indicated in the presented color code. Confidence values of the branches
341 were calculated with 10.000 bootstrap replicates. Thicker lines show branches with
342 bootstrap threshold value > 70.

343

344 According to the previously described cecropins in Coleoptera, there are few
345 representatives with Oxysterlins (1, 2, and 3) (*O. conspicillatum*), Cec (*Acalolepta*
346 *luxuriosa*), and Sarcotoxin Pd (*Paederus dermatitis*) [53,89,90]. Interestingly, the
347 Interpro data set, also has low representation of Coleopteran cecropins, with only two
348 representative sequences, *Acalolepta luxuriosa* (Q5W8G6) and *Agrilus planipennis*
349 (A0A1W4XF49). Additionally, the InterPro search fails to classify the Scarabaeidae
350 cecropin sequences as insect cecropins, indicating that, these sequences are different
351 from the InterPro signatures; nevertheless, as described, these new peptides had the
352 same physicochemical and structural characteristics of the insect cecropins [84].

353

354 **Defensin family description**

355 Insect defensins are inducible antibacterial peptides with a spectrum of activity
356 focused mainly against Gram-positive bacteria, although activity against fungi and
357 parasites has also been reported [91,92]. They are extensively distributed in nearly all
358 life forms [24]. In insects, they have been found in Diptera, Hymenoptera, Coleoptera,
359 Trichoptera, Hemiptera, and Odonata orders [14,91]. Defensins are 18 - 45 amino
360 acids long with 6 - 8 conserved cysteine residues stabilized by three or four disulfide
361 bonds [92,93]. Typically, insect defensins have the same cysteine pairing: Cys1-Cys4,
362 Cys2-Cys5, and Cys3-Cys6. Two disulfide bonds connect the C-terminal β -sheet and
363 the α -helix; and the third connects the N-terminal loop with the second β -sheet. This
364 structural topology is known as cysteine-stabilized $\alpha\beta$ motif (CS $\alpha\beta$) and is common
365 among defensin peptides across different organisms [34,94–96]. Once synthesized,
366 pre-pro-defensins are proteolytically processed. First is the removal of the signal
367 peptide to produce an inactive prodefensin; then, it suffers an additional cut of the
368 propeptide by a furin-like enzyme in an R-X-[RK]-R conserved site to produce an active
369 mature peptide [14,97].

370 This work identified 58 new defensin sequences in Scarabaeidae. As described for
371 other insect defensins, those encoded by Scarabaeidae encode for a signal peptide
372 followed by a propeptide (position 51-80 **Fig 5**) characterized by acid residues and an
373 R-X-[RK]-R furin-like cleavage site (**Fig 5**). These sequences were classified into three
374 groups (Group A, B, and C), according to their sequence, structural, and
375 physicochemical properties.

376

377 **Fig 5.** Multiple-sequence alignment of defensin HDP found in Scarabaeidae. The

378 Scarabaeidae defensin groups are annotated in the left keys. The predicted signal
379 peptide cleavage site is in position 50. Position 72-75 indicates the propeptide furin-
380 like cleavage site.

381 Defensin group A with 31 sequences show a classical defensin pattern of helix beta-
382 sheet structure with three disulfide bridges between cysteine pairs Cys1-Cys4, Cys2-
383 Cys5, and Cys3-Cys6 (20 sequences). For 10 sequences the first cysteine pairing
384 seems to be lost, but they keep the Cys2-Cys5 and Cys3-Cys6 binding pattern. There
385 is only one sequence (GHMA01_94621) with no predicted disulfide bridges.
386 Structurally, there is one subgroup within Group A that can be distinguished by the
387 absence of the N-terminal hydrophobic loop (six sequences) (**Fig 6**).

388

389 **Fig 6.** Structural superposition of the mature Scarabaeidae Defensins and
390 Ramachandran plot, constructed in DeepAlign. **A** Group A with a helix beta-sheet
391 structure (TM-score: 0.569). **B.** Group B with left-handed helix. and high frequency of
392 residues in the left-handed helix region lying between 30° and 130° in the Φ angle and
393 -50° and 100° in the ψ angle in the Ramachandran plot (TM-score: 0.571). **C.** Group
394 C with helix beta-sheet structure (TM-score: 0.425).

395 Defensins group B is represented by 14 sequences. One key feature in this subgroup
396 is the left-handed helix 6 to 8 residues long, related to a P-F-[YVI] motif in position 11.
397 They encode for 6 or 8 cysteine residues (nine sequences) that form two predicted
398 disulfide bridges between pairs Cys2-Cys4 and Cys3-Cys5 (six sequences); or Cys2-
399 Cys5 and Cys3-Cys6 (six sequences). Two sequences (GHMA01_21200;
400 GHMD01_63103) have one pair Cys1-Cys6 and loss predicted helix of the tertiary
401 structure prediction. A hydrophobic random coil region was found in the C-terminal

402 end of the sequences (**Fig 6**). The left-handed helix is a rare structural motif found in
403 peptides and proteins. It has been found in regions related to protein stability, ligand
404 binding, or as part of an enzyme's active site. Thus, a significant structural or functional
405 role for this secondary structure element has been suggested. The motif related to this
406 particular structure agrees with the described propensity of amino acids to form such
407 structure, preferring aromatic and large aliphatic amino acids [99,100]. To our
408 knowledge, this kind of structure has not been described in the defensin family but its
409 appearance may indicate functional importance due to its unique structural
410 parameters.

411 Defensins group C with 13 sequences contains the classic three disulfide bridges of
412 the insect defensins between cysteine pairs Cys1-Cys4, Cys2-Cys5, and Cys3-Cys6.
413 Interestingly, they lost the R-X-[RK]-R cleavage site conserved for the other defensins,
414 thus adding 15 N-terminal negatively charged residues to the mature peptide. In
415 addition, there are two highly conserved acidic residues [DE] in 45 and 64 positions
416 located at the beginning of the alpha-helix and beta-sheet loop (**Fig 6**). These acid
417 residues explain the negative charge of this group (**Fig 7**). These types of anionic
418 antimicrobial peptides have been shown to kill the human B-defensin-resistant Gram-
419 positive bacterium *Staphylococcus aureus*, which escapes attacks from cationic
420 peptides probably by incorporating positive charges on the membrane surface by
421 adding Lys to lipids [98]. The anionic antimicrobial peptides, although rarely
422 documented appear to complement the cationic antimicrobial peptides, offering a
423 complete spectrum of antimicrobial peptides [99,100].

424

425 **Fig 7.** The net charge of the Scarabaeidae defensins predicted by APD. Statistical

426 differences were evaluated by ANOVA test with Tukey's multiple comparisons (p-
427 value: ****<0.0001).

428

429 To evaluate the relationships of the Scarabaeidae defensins identified, a dendrogram
430 was constructed with the retrieved insect defensins reported under the Interpro
431 IPR017982. The sequences analyzed are distributed in the six major orders of insects
432 (**Fig 8**). The distribution shows four main clades, two related to the Hymenoptera order,
433 and one distinctive clade for Diptera and Hemiptera. Orders, like Coleoptera,
434 Phthiraptera, and Archaeogastropoda were not grouped in a single clade, representing
435 a more diverse distribution throughout the diversity of sequences. The defensins group
436 A from Scarabaeidae was related to the Coleopteran defensin described from the
437 Interpro. Group B of Scarabaeidae defensins were exclusively found in Scarabaeidae
438 in a closer relationship with the clade corresponding to Hymenoptera. Group C seems
439 to be related to a single defensin encoded by Hymenoptera (VespidaeXP_014602557)
440 and other Coleoptera species. These results are compatible with the idea that groups
441 B and C are Scarabaeidae-specific groups of defensins with novel structural and
442 physicochemical properties.

443

444 **Fig 8.** Neighbor-joining similarity dendrogram of invertebrate defensins. Sequences
445 from the mature peptides were aligned by MUSCLE. The taxonomic distribution of the
446 sequences and the corresponding defensin group is indicated in the color code
447 presented. The confidence values of the branches were calculated with 10,000
448 bootstrap replicates. Thicker lines show branches with bootstrap threshold value > 70.

449

450 **Attacin family description**

451 Attacins are peptides with molecular masses of 20-23 kDa with a wide spectrum of
452 antimicrobial activities, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi,
453 and protozoan parasites. As described for defensins, attacins are synthesized as pre-
454 pro-proteins containing a signal peptide, and a conserved R-X-[RK]-R motif, which can
455 be recognized by furin-like enzymes. The mature peptide is composed of an N-
456 terminal attacin domain, followed by a glycine-rich segment. Attacins may be further
457 divided according to basic and acid attacins [28,101–103].

458

459 In this study, we identified 41 new Scarabaeidae attacin sequences that fulfill the
460 characteristics described (**Fig 9**). They are also recognized as sequences from this
461 family by the Pfam signature Attacin-C (PF03769) [104,105]. The predicted mature
462 sequences of the identified attacins can be further divided into two groups (named
463 group A or B) according to the net charge (**Fig 10**). Compared to group B attacins,
464 those belonging to group A are more cationic as they are highly enriched in positively
465 charged residues. Additionally, group A attacins contain significantly more GNTS polar
466 residues.

467

468 **Fig 9.** Multiple-sequence alignment of attacin HDP found in Scarabaeidae. Position
469 19 in the alignment represents the cleavage site of the signal peptide predicted with
470 SignalP. The propeptide comprises positions 20 to 60. Position 80 indicates the
471 propeptide furin-like cleavage site.

472

473 **Fig 10.** Physicochemical characteristics of the Scarabaeidae attacins. **A.** Net charge
474 and **B.** GNTS composition. Statistical differences were evaluated by ANOVA test with
475 Tukey's multiple comparisons (p-value: ****<0.0001).

476

477 The secondary and tertiary structures predicted for Scarabaeidae attacins were
478 characterized by a predominant antiparallel eight string beta-sheet configuration (**Fig**
479 **11**). The structural similarity was higher for group A attacins, as evidenced by higher
480 TM scores (Group A= 0,73 and Group B= 0,58). The tertiary structure partially
481 resembles those adopted by barrel channels. Interestingly, their structure was
482 modeled by using the *E. coli* TamA barrel domain (PBD:4N74) as template by the
483 automatic server predictor RaptorX. TamA forms a barrel channel with 16
484 transmembrane beta-sheets that translocates protein substrates across bacterial
485 membranes [106].

486

487

488 **Fig 11.** Structural superposition (left) and Ramachandran plot (right) of the mature
489 attacins. **A.** Analysis of group A, TMscore=0.7366. **B.** Analysis of group B,
490 TMscore=0.5844. The analysis was conducted in DeepAlign.

491

492 Based on these observations we hypothesized that attacin antimicrobial activity may
493 be related to the formation of similar configurations in the bacterial membranes. To
494 evaluate this possibility further, a protein-protein interaction modeling was conducted.
495 This analysis predicts homodimers of attacins with barrel-like structures containing an
496 outward hydrophobic face, conserved acidic residues facing inward and glycine-rich
497 regions corresponding to the beta loops (**Fig 12**). These findings are compatible with
498 the experimental results of attacin E of *Hyalophora cecropia*, which is targeted to the
499 outer membrane of *E. coli* and facilitates the penetration of cations such as sodium
500 and potassium [106]. The tertiary structure of attacins has not been experimentally

501 determined in the PDB. The structural information available was obtained by circular
502 dichroism (CD) on a recombinant attacin encoded by *Hyalophora cecropia*. An α -
503 helical structure for this protein was deduced based on the presence of a single peak
504 at 222 nm in CD [101]. However, the distinctive feature of α -helical proteins in CD are
505 negative bands at 208 and 222 nm [107], so the structure of this protein family remains
506 an open question.

507

508 **Fig 12.** Attacin structural protein-protein interaction prediction. **A.** and **B.** Attacin A
509 (GHMA01_13033). **C.** and **D.** Attacin B (GHMA01_106752). **A.** and **C.** Monomer
510 electrostatic potential, according to Coulomb's law surface coloring (red -10, white 0,
511 blue 10 Kcal/(mole^e)). **B.** and **D.** Dimer protein-protein interaction prediction in
512 ribbons chain coloring.

513

514 Dendrogram for insect attacins shows a clear overrepresentation of sequences from
515 Diptera, especially flies representing 59% of the sequences. This group of diptera
516 sequences representing flies forms a single clade, as well as Lepidoptera, for
517 Coleoptera attacins; the group in a distant clade in close proximity to a second diptera
518 group representing mosquitoes. The Coleoptera attacins had a clear differentiation in
519 the A and B groups described. Only two sequences of Coleoptera attacins were
520 previously annotated in the Interpro (Oryctes A0A0T6BE25; Oryctes A0A0T6BFF4)
521 and were grouped into the B Scarabaeidae attacins (**Fig 13**).

522

523 **Fig 13.** Neighbor-joining similarity dendrogram of insect attacins. Sequences from the
524 mature peptides were aligned by MUSCLE. The taxonomic distribution of the
525 sequences and the corresponding attacin group is indicated in the color code

526 presented. The confidence values of the branches were calculated with 10.000
527 bootstrap replicates. Thicker lines show branches with bootstrap threshold value > 70.
528
529

530 **Coleoptericin family description**

531

532 Coleoptericins are a group of antimicrobial peptides found exclusively in the
533 Coleoptera order. The first coleoptericin was described in the tenebrionid beetle,
534 *Zophobas atratus* [33]. This family is characterized by a signal peptide and a furin-like
535 cleavage site with a mature peptide of 71 to 75 residues [108]. This group of HDP
536 shows antimicrobial activity to Gram-positive and Gram-negative bacteria, with
537 bacteriostatic and bactericidal activity at low and high concentrations respectively.
538 Their action mechanism is unclear, but liposome leaking experiments suggest that it
539 does not involve the formation of pores. Instead, they elicit the formation of an
540 elongated and chain formation morphology in the bacteria [32]. A coleoptericin has
541 recently been shown to play a central role in host-symbiont interactions in the weevil
542 *S. zeamais* [50].

543

544 Coleoptericins encoded by Scarabaeidae (37 sequences) were identified as pre-pro-
545 proteins with a furin-like cleavage site, they share the motif G-P-[GNS]-[KR]-[GSA]-K-
546 P from position 97 to 103 (**Fig 14**). They were classified according to their amino acid
547 sequence conservation into three major groups: 1. Group A (18 sequences) with
548 approximately 73 amino acid residues in length, a cationic character with a mean net
549 charge of 5.63, and a relative disorder structure with a random coil-beta sheet structure
550 (TM score: 0.27) (**Figs 15-16**); 2. Group B is a small group in Scarabaeidae (three
551 sequences), but shows high similarity with already reported coleoptericins (**Fig 17**).
552 They are typically 72 residues in length, with a mean net charge of 5 and a coil-beta
553 sheet-helix-coil configuration in the tertiary structure (**Fig 16**); 3. Group C (17
554 sequences) is 57 to 59 amino acids in length and is enriched in acidic residues that

555 provide an mean positive net charge of 1.41. They have a relatively disordered
556 structure with a coil-beta sheet-helix-coil configuration (**Figs 14-17**). In general, the
557 conserved coleopteracin motif is structurally preceded by an alpha helix or related to
558 the third beta loop in the structural conformation.

559

560 **Fig 14.** Multiple sequence alignment of Coleopteracin HDP found in Scarabaeidae.
561 Position 23 in the alignment represents the cleavage site of the signal peptide
562 predicted with SignalP. Positions 94 to 97 furin-like cleavage site.

563

564 **Fig 15.** The net charge of the Scarabaeidae Coleopteracins. Statistical differences
565 were evaluated by ANOVA test with Tukey's multiple comparisons (p-value:
566 ****<0.0001).

567

568 **Fig 16.** Structural superposition (left) and Ramachandran plot (right) of the mature
569 coleopteracins. **A.** Analysis of group A, TMscore=0.2753. **B.** Analysis of group B,
570 TMscore=0.6248, **C.** Analysis of group C, TMscore=0.3925. The analysis was
571 conducted in DeepAlign.

572

573 **Fig 17.** Neighbor-joining similarity dendrogram of Coleopteracins. The taxonomic
574 distribution of the sequences and the corresponding coleopteracin group is indicated
575 in the color code presented. A sequence from *Carausius* (Phasmatodea order) was
576 used as the root node. The remaining sequences belong to the Coleoptera order. The
577 confidence values of the branches were calculated with 10,000 bootstrap replicates.
578 Thicker lines show branches with bootstrap threshold value > 70.

579

580 Coleopterics A, B, and C identified form three separate groups exclusive of the
581 Scarabaeidae family. This work, reports two new groups, A and C coleopterics,
582 which are a group in a different clade and are exclusive of Scarabaeidae (**Fig 17**).

583

584 **Distinct physicochemical properties characterize the HDP** 585 **families of Scarabaeidae**

586 Families of insect antimicrobial peptides have distinct physicochemical properties,
587 amino acid composition, and structural features. This has allowed the classification of
588 HDP according to them [13]. Insect antimicrobial peptides can be divided into four
589 classes: α -helical peptides (cecropin and moricin), cysteine-rich peptides (insect
590 defensin and drosomycin), proline-rich peptides (apidaecin, drosocin, and lebocin) and
591 glycine-rich peptides (attacin and gloverin) [37,109]. With this in mind, those features
592 were analyzed in the HDP identified from Scarabaeidae. Attacins and coleopterics
593 were the families with higher molecular mass (Mean: 12931Da SD: 1075Da and Mean:
594 7097Da SD: 736.6Da, respectively) and lowest hydrophobic nature (0.27 and 0.28
595 ratios respectively) (**Fig 18**). Defensins and cecropins showed similar hydrophobic
596 ratios (0.37 and 0.47, respectively). As described for other members of cecropins [26],
597 those identified in Scarabaeidae are characterized by high net charges (Mean: 9.25;
598 SD: 1.71) and pI values (Mean: 11.3; SD: 0.41) (**Fig 18**). These characteristics are
599 reflected in the amino acid composition of the peptide families (**Fig 19**). Cecropins
600 show a higher proportion of positively charged amino acids, and attacins and
601 coleopterics a higher content of polar residues. Prolines and glycines are structurally
602 important amino acids, hence, differences were sought in the content of these amino
603 acids in the HDP. In contrast to the other two families, more than 10 % of the amino

604 acids encoded by attacins and coleopterics correspond to these two residues (**Fig**
605 **19**).

606

607 **Fig 18.** Physicochemical properties of Scarabaeidae HDP families predicted with
608 APD3. **A.** Molar mass. **B.** Isoelectric point. **C.** Net charge. **D.** Hydrophobic ratio

609

610 **Fig 19.** Representation of amino acid groups in the families of Scarabaeidae HDP . **A.**
611 Positively charged amino acids (RK). **B.** Proline and glycine amino acids **C.** Polar
612 amino acids (GNST), statistical difference was observed among all groups (****).
613 Statistical differences were evaluated by ANOVA test with Tukey's multiple
614 comparisons (p-value: ***<0.001; ****<0.0001).

615

616 The amino-acid distribution represents a key characteristic to classify HDP families,
617 like proline, lysine, and cysteine-rich antimicrobial peptides [13,37,109,110].
618 According to this, in Scarabaeidae HDP it was found that positively charged amino-
619 acid proportion only differentiates the cecropin family (**Fig 19A**). The percentage of
620 glycine and proline obtained showed a statistical difference among all groups except
621 between the attacin and coleopterics. The polar amino acid (GNST) distribution
622 differentiates the HDP families with a statistically significant difference (**Fig 19B, C**).

623

624 **Antimicrobial activity prediction of dung beetle HDP *in***
625 ***silico*.**

626

627 Development of sequence-based computational tools can be helpful in identifying
628 candidate HDP for experimental characterization. Different tools classified the
629 sequences according to different parameters, like physicochemical characteristics,
630 compositional amino acids, family signatures, and hidden Markov models (HMM); with
631 complementary approaches regarding the accuracy, capacity of prediction, and
632 training set for the construction of the program [13,68,69].

633

634 The cecropin family in CAMPr3 had 17 of 18 sequences with a positive prediction with
635 four different tools (Random forest, support vector machine, discriminant classifier,
636 artificial neural network) compared to iAmPred which shows lower scores. iAmPred
637 and Campr3 predicted high antimicrobial probability to defensins (groups A and B) and
638 attacins; and low antimicrobial probability to cecropins and coleopterics. ClassAmp2
639 predicted a high probability for all the families involved (**Fig 20**). This high probability
640 prediction for defensins and low activity prediction for cecropins may be related with
641 the fact that β -defensins had been reported in a wide range of organisms and thus
642 have a higher diversity and representation in the data bases and training libraries,
643 whereas, cecropins had been found majorly in insects (limited taxon) with a low level
644 of representation for some groups, like Coleoptera [111].

645

646 **Fig 20.** Heat map for the antimicrobial prediction of Scarabaeidae HDP. The gradient
647 represents the probability score for each server from inactive (green), medium activity
648 (black), and active (red). The HDP families were separated in their respective groups:
649 Attacin A and B; Coleopterics A, B, and C; Defensins A, B, and C. SVM: support
650 vector machine; RFC: Random forest; ANN: artificial neural network; DAC discriminant
651 analysis classification; AB: antibacterial; AV: antiviral; AF: antifungal.

652

653 In general, CAMPr3 has a higher probability of prediction compared with iAMPpred.

654 These results may be due to the greater data set used to construct the prediction in

655 CAMPr3, including family signatures, compared with iAMPpred; nevertheless,

656 iAMPpred includes a wide diversity of physicochemical parameters and compositional

657 AA parameters. The cecropin family has a lower probability in iAMPpred, compared

658 with CAMPr3; this result may be explained by the underrepresentation of the cecropin

659 family of Coleoptera in the databases and the relative divergence of the Scarabaeidae

660 cecropins compared with other taxa (**Fig 4**). This also may explain the low prediction

661 probabilities for the coleopterics in general.

662

663 **Conclusion**

664 Using HDP has been suggested as a complement to traditional antibiotics, and insects

665 are considered attractive sources of novel HDP, given that their immune response

666 relies – in part – on the expression of diverse families of these peptides showing strong

667 antimicrobial activity at low concentrations and against a wide range of pathogens. So

668 far, identification of insect HDP has focused on the Hemiptera, Hymenoptera,

669 Lepidoptera, and Diptera orders [85]. In Coleoptera, the most diverse order of insects,

670 only a few HDP have been reported [2,24,53,85]. This work identified 155 novel

671 sequences of HDP found in nine transcriptomes from seven Coleoptera species: *D.*

672 *satanas* (n= 76; 49.03%), *O. curvicornis* (n= 23; 14.83%), *T. dichotomus* (n= 18;

673 11.61%), *O. nigriventris* (n= 10; 6.45%), *Heterochelus* sp. (n= 6; 3.87%), *O.*

674 *conspicillatum* (n= 18; 11.61%) and *P. japonica* (n= 4; 2.58%). Two information

675 sources were retrieved: 1) *De novo* transcriptomic data from two neotropical

676 Scarabaeidae species (*Dichotomius satanas* and *Ontophagus curvicornis*); 2)
677 Sequence data deposited in public sequence databases. The HDP sequences from
678 Coleoptera were identified based on similarity to known HDP insect families. New
679 members of defensins (n = 58; 37.42%), cecropins (n = 18; 11.61%), attancins (n =
680 41; 26.45%), and coleoptericsins (n = 38; 24.52%) were detected. These families were
681 described based on their physicochemical properties, structural features, and
682 sequence similarity. Both novel and previously described attributes were observed in
683 different families. These features are summarized in **Fig 21**. Most HDP sequences
684 show predicted antibacterial, antiviral, and antifungal activities (**Fig 20**), so they may
685 be promising candidates for experimental characterization in anti-microbial and
686 cytotoxicity screening assays. Additionally, this work would also help distinguish key
687 attributes associated with different peptide activities, allowing identification and
688 description of new anti-microbial peptides.

689

690 **Fig 21.** Scarabaeidae HDP general sequence and structural features **A.** Cecropins.
691 **B.** Defensins. **C.** Attacins **D.** Coleoptericsins.

692

693 **Acknowledgments**

694 Students of the research seedbed 2017, Universidad del Quindío, Jean Carlos
695 Sanchez Rojas, Luz Dahiana Erazo Urquijo; Alejandra Vélez García ; Helen Vanessa
696 Pinchao Salgar and Angélica Maria Madrid Ortiz.

697 **Funding**

698

699 This work was funded by Colombia's Ministry of Science, Technology and Innovation
700 (MINCIENCIAS) call, through grant number 744-2016 and project number 732; grant
701 number 727-2015 for doctorate study in Colombia (to LJT) and project number:
702 111356933173, grant number 784-2017 for postdoctoral stay in Colombia (to GAT)
703 and project number: FP44842-250-2018; grant number 844-2019 and project number:
704 111384466847; grant number 848-2020 and project number: 80740-145-2020.

705 **References**

706

- 707 1. Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol.* 1995;7: 4–10.
708 doi:10.1016/0952-7915(95)80022-0
- 709 2. Cociancich S, Bulet P, Hetru C, Hoffmann JA. The inducible antibacterial peptides of
710 insects. *Parasitol Today Pers Ed.* 1994;10: 132–139. doi:10.1016/0169-
711 4758(94)90260-7
- 712 3. Hoffmann JA, Reichhart JM, Hetru C. Innate immunity in higher insects. *Curr Opin*
713 *Immunol.* 1996;8: 8–13. doi:10.1016/s0952-7915(96)80098-7
- 714 4. Faruck MO, Yusof F, Chowdhury S. An overview of antifungal peptides derived from
715 insect. *Peptides.* 2016;80: 80–88. doi:10.1016/j.peptides.2015.06.001
- 716 5. Saikia K, Belwal VK, Datta D, Chaudhary N. Aromatic-rich C-terminal region of LCI is a
717 potent antimicrobial peptide in itself. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;519: 372–
718 377. doi:10.1016/j.bbrc.2019.09.013
- 719 6. Alencar-Silva T, Braga MC, Santana GOS, Saldanha-Araujo F, Pogue R, Dias SC, et
720 al. Breaking the frontiers of cosmetology with antimicrobial peptides. *Biotechnol Adv.*
721 2018;36: 2019–2031. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.08.005
- 722 7. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol.*
723 1995;13: 61–92. doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.000425
- 724 8. Zhang L, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Curr Biol.* 2016;26: R14–R19.
725 doi:10.1016/j.cub.2015.11.017
- 726 9. Gómez EA, Giraldo P, Orduz S. InverPep: A database of invertebrate antimicrobial
727 peptides. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017;8: 13–17. doi:10.1016/j.jgar.2016.10.003
- 728 10. Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of
729 the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol.* 2012;32: 143–171.
730 doi:10.3109/07388551.2011.594423

- 731 11. Imler J-L, Bulet P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene
732 regulation. *Chem Immunol Allergy*. 2005;86: 1–21. doi:10.1159/000086648
- 733 12. Xiao X, Wang P, Lin W-Z, Jia J-H, Chou K-C. iAMP-2L: A two-level multi-label classifier
734 for identifying antimicrobial peptides and their functional types. *Anal Biochem*.
735 2013;436: 168–177. doi:10.1016/j.ab.2013.01.019
- 736 13. Meher PK, Sahu TK, Saini V, Rao AR. Predicting antimicrobial peptides with improved
737 accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features
738 into Chou's general PseAAC. *Sci Rep*. 2017;7: 42362. doi:10.1038/srep42362
- 739 14. Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure
740 and function. *Dev Comp Immunol*. 1999;23: 329–344. doi:10.1016/s0145-
741 305x(99)00015-4
- 742 15. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune
743 system. *Virulence*. 2010;1: 440–464. doi:10.4161/viru.1.5.12983
- 744 16. Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. Insect Immunity. Purification and
745 Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized
746 Pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*. 2005;106: 7–16. doi:10.1111/j.1432-
747 1033.1980.tb05991.x
- 748 17. Boman. Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate Immunity: An
749 Update Review. *Scand J Immunol*. 1998;48: 15–25. doi:10.1046/j.1365-
750 3083.1998.00343.x
- 751 18. Wang L, Li Z, Du C, Chen W, Pang Y. Characterization and expression of a cecropin-
752 like gene from *Helicoverpa armigera*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*.
753 2007;148: 417–425. doi:10.1016/j.cbpb.2007.07.010
- 754 19. Marshall SH, Arenas G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical
755 antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron J Biotechnol*. 2003;6: 0–0.
756 doi:10.2225/vol6-issue3-fulltext-1
- 757 20. Cavallarin L, Andreu D, San Segundo B. Cecropin A—Derived Peptides Are Potent

- 758 Inhibitors of Fungal Plant Pathogens. *Mol Plant Microbe Interact.* 1998;11: 218–227.
759 doi:10.1094/MPMI.1998.11.3.218
- 760 21. DeLucca AJ, Bland JM, Jacks TJ, Grimm C, Cleveland TE, Walsh TJ. Fungicidal
761 activity of cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41: 481–483.
- 762 22. Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Kapur R, Boman HG. Insect Immunity: Isolation
763 and Structure of Cecropin D and Four Minor Antibacterial Components from *Cecropia*
764 Pupae. *Eur J Biochem.* 1982;127: 207–217. doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb06857.x
- 765 23. Volkoff A-N, Rocher J, d'Alençon E, Bouton M, Landais I, Quesada-Moraga E, et al.
766 Characterization and transcriptional profiles of three *Spodoptera frugiperda* genes
767 encoding cysteine-rich peptides. A new class of defensin-like genes from lepidopteran
768 insects? *Gene.* 2003;319: 43–53. doi:10.1016/S0378-1119(03)00789-3
- 769 24. Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates.
770 *Immunol Rev.* 2004;198: 169–184. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x
- 771 25. Araújo CAC, Waniek PJ, Stock P, Mayer C, Jansen AM, Schaub GA. Sequence
772 characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes
773 from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochem Mol Biol.*
774 2006;36: 547–560. doi:10.1016/j.ibmb.2006.04.003
- 775 26. Yi H-Y, Chowdhury M, Huang Y-D, Yu X-Q. Insect antimicrobial peptides and their
776 applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98: 5807–5822. doi:10.1007/s00253-014-
777 5792-6
- 778 27. Cornet B, Bonmatin J-M, Hetru C, Hoffmann JA, Ptak M, Vovelle F. Refined three-
779 dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure.* 1995;3: 435–448.
780 doi:10.1016/S0969-2126(01)00177-0
- 781 28. Hultmark D, Engström A, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG. Insect
782 immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO*
783 *J.* 1983;2: 571–576.
- 784 29. Wang J, Hu C, Wu Y, Stuart A, Amemiya C, Berriman M, et al. Characterization of the

- 785 antimicrobial peptide attacin loci from *Glossina morsitans*. *Insect Mol Biol.* 2008;17:
786 293–302. doi:10.1111/j.1365-2583.2008.00805.x
- 787 30. Engström A, Engström P, Tao ZJ, Carlsson A, Bennich H. Insect immunity. The primary
788 structure of the antibacterial protein attacin F and its relation to two native attacins from
789 *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* 1984;3: 2065–2070.
- 790 31. Carlsson A, Engström P, Palva ET, Bennich H. Attacin, an antibacterial protein from
791 *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli*
792 by interfering with omp gene transcription. *Infect Immun.* 1991;59: 3040–3045.
- 793 32. Sagisaka A, Miyanoshita A, Ishibashi J, Yamakawa M. Purification, characterization
794 and gene expression of a glycine and proline-rich antibacterial protein family from
795 larvae of a beetle, *Allomyrina dichotoma*: Antibacterial proteins from *A. dichotoma*.
796 *Insect Mol Biol.* 2001;10: 293–302. doi:10.1046/j.0962-1075.2001.00261.x
- 797 33. Bulet P, Cociancich S, Dimarcq JL, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D, et al. Insect
798 immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide
799 and of new members of the insect defensin family. *J Biol Chem.* 1991;266: 24520–
800 24525.
- 801 34. Hwang J-S, Lee J, Kim Y-J, Bang H-S, Yun E-Y, Kim S-R, et al. Isolation and
802 Characterization of a Defensin-Like Peptide (Coprinsin) from the Dung Beetle, *Copris*
803 *tripartitus*. *Int J Pept.* 2009;2009: 1–5. doi:10.1155/2009/136284
- 804 35. Purvis A, Hector A. Getting the measure of biodiversity. *Nature.* 2000;405: 212–219.
805 doi:10.1038/35012221
- 806 36. Hunt T, Bergsten J, Levkanicova Z, Papadopoulou A, John OSt, Wild R, et al. A
807 Comprehensive Phylogeny of Beetles Reveals the Evolutionary Origins of a
808 Superradiation. *Science.* 2007;318: 1913–1916. doi:10.1126/science.1146954
- 809 37. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research
810 and education. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: D1087–D1093. doi:10.1093/nar/gkv1278
- 811 38. Lee JH, Seo M, Lee HJ, Baek M, Kim IW, Kim SY, et al. Anti-Inflammatory Activity of

- 812 Antimicrobial Peptide Allomyrinasin Derived from the Dynastid Beetle, *Allomyrina*
813 *dichotoma*. *J Microbiol Biotechnol.* 2019;29: 687–695. doi:10.4014/jmb.1809.09031
- 814 39. Meng E, Li J, Tang B, Hu Y, Qiao T, Hou Y, et al. Alteration of the phagocytosis and
815 antimicrobial defense of *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae) pupae to
816 *Escherichia coli* following parasitism by *Tetrastichus brontispae* (Hymenoptera:
817 Eulophidae). *Bull Entomol Res.* 2019;109: 248–256. doi:10.1017/S0007485318000780
- 818 40. Namara LM, Griffin CT, Fitzpatrick D, Kavanagh K, Carolan JC. The effect of
819 entomopathogenic fungal culture filtrate on the immune response and haemolymph
820 proteome of the large pine weevil, *Hylobius abietis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2018;101:
821 1–13. doi:10.1016/j.ibmb.2018.07.001
- 822 41. Vogel H, Badapanda C, Vilcinskis A. Identification of immunity-related genes in the
823 burying beetle *Nicrophorus vespilloides* by suppression subtractive hybridization:
824 Burying beetle immunity. *Insect Mol Biol.* 2011;20: 787–800. doi:10.1111/j.1365-
825 2583.2011.01109.x
- 826 42. Jacobs CGC, Gallagher JD, Evison SEF, Heckel DG, Vilcinskis A, Vogel H.
827 Endogenous egg immune defenses in the yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*).
828 *Dev Comp Immunol.* 2017;70: 1–8. doi:10.1016/j.dci.2016.12.007
- 829 43. Rodríguez-García MJ, García-Reina A, Machado V, Galián J. Identification, structural
830 characterisation and expression analysis of a defensin gene from the tiger beetle
831 *Calomera littoralis* (Coleoptera: Cicindelidae). *Gene.* 2016;589: 56–62.
832 doi:10.1016/j.gene.2016.05.030
- 833 44. Lee J, Bang K, Hwang S, Cho S. cDNA cloning and molecular characterization of a
834 defensin-like antimicrobial peptide from larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis*
835 (Kolbe). *Mol Biol Rep.* 2016;43: 371–379. doi:10.1007/s11033-016-3967-1
- 836 45. Altincicek B, Vilcinskis A. Identification of immune-related genes from an apterygote
837 insect, the firebrat *Thermobia domestica*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2007;37: 726–731.
838 doi:10.1016/j.ibmb.2007.03.012

- 839 46. Zou Z, Evans JD, Lu Z, Zhao P, Williams M, Sumathipala N, et al. Comparative
840 genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Genome Biol.* 2007;8: R177.
841 doi:10.1186/gb-2007-8-8-r177
- 842 47. Altincicek B, Elashry A, Guz N, Grundler FMW, Vilcinskas A, Dehne H-W. Next
843 Generation Sequencing Based Transcriptome Analysis of Septic-Injury Responsive
844 Genes in the Beetle *Tribolium castaneum*. Mariño-Ramírez L, editor. *PLoS ONE.*
845 2013;8: e52004. doi:10.1371/journal.pone.0052004
- 846 48. Lee SY, Moon HJ, Kurata S, Kurama T, Natori S, Lee BL. Purification and Molecular
847 Cloning of cDNA for an Inducible Antibacterial Protein of Larvae of a Coleopteran
848 Insect, *Holotrichia diomphalia*1. *J Biochem (Tokyo).* 1994;115: 82–86.
849 doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124309
- 850 49. Imamura M, Wada S, Ueda K, Saito A, Koizumi N, Iwahana H, et al. Multipeptide
851 precursor structure of acaloleptin A isoforms, antibacterial peptides from the Udo
852 longicorn beetle, *Acalolepta luxuriosa*. *Dev Comp Immunol.* 2009;33: 1120–1127.
853 doi:10.1016/j.dci.2009.06.004
- 854 50. Login FH, Balmand S, Vallier A, Vincent-Monegat C, Vigneron A, Weiss-Gayet M, et al.
855 Antimicrobial Peptides Keep Insect Endosymbionts Under Control. *Science.* 2011;334:
856 362–365. doi:10.1126/science.1209728
- 857 51. Lee J, Lee D, Choi H, Kim HH, Kim H, Hwang JS, et al. Structure-activity relationships
858 of the intramolecular disulfide bonds in coprisin, a defensin from the dung beetle. *BMB*
859 *Rep.* 2014;47: 625–630. doi:10.5483/BMBRep.2014.47.11.262
- 860 52. Hull R, Alaouna M, Khanyile L, Byrne M, Ntwasa M. Lifestyle and Host Defense
861 Mechanisms of the Dung Beetle, *Euoniticellus intermedius* : The Toll Signaling
862 Pathway. *J Insect Sci.* 2013;13: 1–25. doi:10.1673/031.013.10801
- 863 53. Toro Segovia LJ, Téllez Ramírez GA, Henao Arias DC, Rivera Duran JD, Bedoya JP,
864 Castaño Osorio JC. Identification and characterization of novel cecropins from the
865 *Oxysternon conspicillatum* neotropic dung beetle. van Raaij MJ, editor. *PLOS ONE.*

- 866 2017;12: e0187914. doi:10.1371/journal.pone.0187914
- 867 54. Yoon IN, Hwang JS, Lee JH, Kim H. The Antimicrobial Peptide CopA3 Inhibits
868 *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Viability Loss and Apoptosis in Neural Cells. *J*
869 *Microbiol Biotechnol*. 2019;29: 30–36. doi:10.4014/jmb.1809.08065
- 870 55. Kim DH, Hwang JS, Lee IH, Nam ST, Hong J, Zhang P, et al. The Insect Peptide
871 CopA3 Increases Colonic Epithelial Cell Proliferation and Mucosal Barrier Function to
872 Prevent Inflammatory Responses in the Gut. *J Biol Chem*. 2016;291: 3209–3223.
873 doi:10.1074/jbc.M115.682856
- 874 56. Yoon IN, Hong J, Zhang P, Hwang JS, Kim H. An Analog of the Antimicrobial Peptide
875 CopA5 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Activation. *J Microbiol*
876 *Biotechnol*. 2017;27: 350–356. doi:10.4014/jmb.1607.07065
- 877 57. Tomie T, Ishibashi J, Furukawa S, Kobayashi S, Sawahata R, Asaoka A, et al.
878 Scarabaecin, a novel cysteine-containing antifungal peptide from the rhinoceros beetle,
879 *Oryctes rhinoceros*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;307: 261–266.
880 doi:10.1016/S0006-291X(03)01162-8
- 881 58. Cultid C, Medina C, Constantino LM, Bedir Martinez, Escobar AF. Escarabajos
882 coprófagos (Scarabaeinae) del eje cafetero: Guía para el estudio ecológico (Field
883 Guide). Cenicafé, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia and Wild life
884 Conservation Society; 2012. doi:10.13140/RG.2.1.1013.9049
- 885 59. CULTID-MEDINA CA, LOBO JM, MEDINA CA, GONZÁLEZ FA, ESCOBAR F,
886 CHACÓN DE ULLOA P. Completitud del inventario de escarabajos coprófagos
887 (Coleoptera: Scarabaeinae) en la Ecorregión del Eje Cafetero, Colombia. *Rev Colomb*
888 *Entomol*. 2014;40: 111–119.
- 889 60. Villada-Bedoya S, Cultid-Medina CA. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE DOS
890 ESPECIES DE *Dichotomius* HOPE, 1838 (COLEOPTERA: SCARABAEINAE) EN UN
891 PAISAJE CAFETERO DE LOS ANDES OCCIDENTALES DE COLOMBIA,
892 RISARALDA. *Boletín Científico Cent Mus Mus Hist Nat*. 2017;21: 188–198.

- 893 61. Bouchard P, Bousquet Y, Davies A, Alonso-Zarazaga M, Lawrence J, Lyal C, et al.
894 Family-Group Names In Coleoptera (Insecta). *ZooKeys*. 2011;88: 1–972.
895 doi:10.3897/zookeys.88.807
- 896 62. FastQC. 2015. Available: <https://qubeshub.org/resources/fastqc>
- 897 63. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence
898 data. *Bioinformatics*. 2014;30: 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- 899 64. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Čech M, et al. The Galaxy
900 platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018
901 update. *Nucleic Acids Res*. 2018;46: W537–W544. doi:10.1093/nar/gky379
- 902 65. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search
903 tool. *J Mol Biol*. 1990;215: 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- 904 66. Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bolton E, Bryant SH, Canese K, et al. Database
905 resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*.
906 2011;39: D38–D51. doi:10.1093/nar/gkq1172
- 907 67. Nielsen H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Methods Mol Biol Clifton NJ*.
908 2017;1611: 59–73. doi:10.1007/978-1-4939-7015-5_6
- 909 68. Waghu FH, Barai RS, Gurung P, Idicula-Thomas S. CAMPR3: a database on
910 sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res*.
911 2016;44: D1094–1097. doi:10.1093/nar/gkv1051
- 912 69. Joseph S, Karnik S, Nilawe P, Jayaraman VK, Idicula-Thomas S. ClassAMP: A
913 Prediction Tool for Classification of Antimicrobial Peptides. *IEEE/ACM Trans Comput
914 Biol Bioinform*. 2012;9: 1535–1538. doi:10.1109/TCBB.2012.89
- 915 70. Buchan DWA, Minneci F, Nugent TCO, Bryson K, Jones DT. Scalable web services for
916 the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res*. 2013;41: W349–W357.
917 doi:10.1093/nar/gkt381
- 918 71. Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M, Li W, McAnulla C, et al. InterProScan 5:
919 genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*. 2014;30: 1236–1240.

- 920 doi:10.1093/bioinformatics/btu031
- 921 72. Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, et al. Template-based protein
922 structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc.* 2012;7: 1511–1522.
923 doi:10.1038/nprot.2012.085
- 924 73. Wang S, Peng J, Xu J. Alignment of distantly related protein structures: algorithm,
925 bound and implications to homology modeling. *Bioinformatics.* 2011;27: 2537–2545.
926 doi:10.1093/bioinformatics/btr432
- 927 74. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al.
928 UCSF Chimera A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput*
929 *Chem.* 2004;25: 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084
- 930 75. Vajda S, Yueh C, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, et al. New additions to
931 the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins.* 2017;85: 435–444.
932 doi:10.1002/prot.25219
- 933 76. Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y, Yao X. DOG 1.0: illustrator of protein domain
934 structures. *Cell Res.* 2009;19: 271–273. doi:10.1038/cr.2009.6
- 935 77. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable
936 generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.
937 *Mol Syst Biol.* 2011;7: 539. doi:10.1038/msb.2011.75
- 938 78. Pei Z, Sun X, Tang Y, Wang K, Gao Y, Ma H. Cloning, expression, and purification of a
939 new antimicrobial peptide gene from *Musca domestica* larva. *Gene.* 2014;549: 41–45.
940 doi:10.1016/j.gene.2014.07.028
- 941 79. Wang G, editor. *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic*
942 *strategies.* Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA: CABI; 2010.
- 943 80. Pane K, Durante L, Crescenzi O, Cafaro V, Pizzo E, Varcamonti M, et al. Antimicrobial
944 potency of cationic antimicrobial peptides can be predicted from their amino acid
945 composition: Application to the detection of “cryptic” antimicrobial peptides. *J Theor*
946 *Biol.* 2017;419: 254–265. doi:10.1016/j.jtbi.2017.02.012

- 947 81. Yoo WG, Lee JH, Shin Y, Shim J-Y, Jung M, Kang B-C, et al. Antimicrobial peptides in
948 the centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Funct Integr Genomics*. 2014;14:
949 275–283. doi:10.1007/s10142-014-0366-3
- 950 82. Jacobs CGC, Steiger S, Heckel DG, Wielsch N, Vilcinskas A, Vogel H. Sex, offspring
951 and carcass determine antimicrobial peptide expression in the burying beetle. *Sci Rep*.
952 2016;6: 25409. doi:10.1038/srep25409
- 953 83. Duwadi D, Shrestha A, Yilma B, Kozlovski I, Sa-eed M, Dahal N, et al. Identification
954 and screening of potent antimicrobial peptides in arthropod genomes. *Peptides*.
955 2018;103: 26–30. doi:10.1016/j.peptides.2018.01.017
- 956 84. Brady D, Grapputo A, Romoli O, Sandrelli F. Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides
957 with Potential Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci*. 2019;20: 5862.
958 doi:10.3390/ijms20235862
- 959 85. Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, Vilcinskas A. Diversity, evolution and
960 medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*.
961 2016;371: 20150290. doi:10.1098/rstb.2015.0290
- 962 86. Wang Y-P, Lai R. Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene
963 Regulation: Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation.
964 *Zool Res*. 2010;31: 27–34. doi:10.3724/SP.J.1141.2010.01027
- 965 87. Xu J, Zhang Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5?
966 *Bioinforma Oxf Engl*. 2010;26: 889–895. doi:10.1093/bioinformatics/btq066
- 967 88. Wang S, Ma J, Peng J, Xu J. Protein structure alignment beyond spatial proximity. *Sci*
968 *Rep*. 2013;3: 1448. doi:10.1038/srep01448
- 969 89. Memarpoor-Yazdi M, Zare-Zardini H, Asoodeh A. A Novel Antimicrobial Peptide
970 Derived from the Insect *Paederus dermatitis*. *Int J Pept Res Ther*. 2013;19: 99–108.
971 doi:10.1007/s10989-012-9320-1
- 972 90. Saito A, Ueda K, Imamura M, Atsumi S, Tabunoki H, Miura N, et al. Purification and
973 cDNA cloning of a cecropin from the longicorn beetle, *Acalolepta luxuriosa*. *Comp*

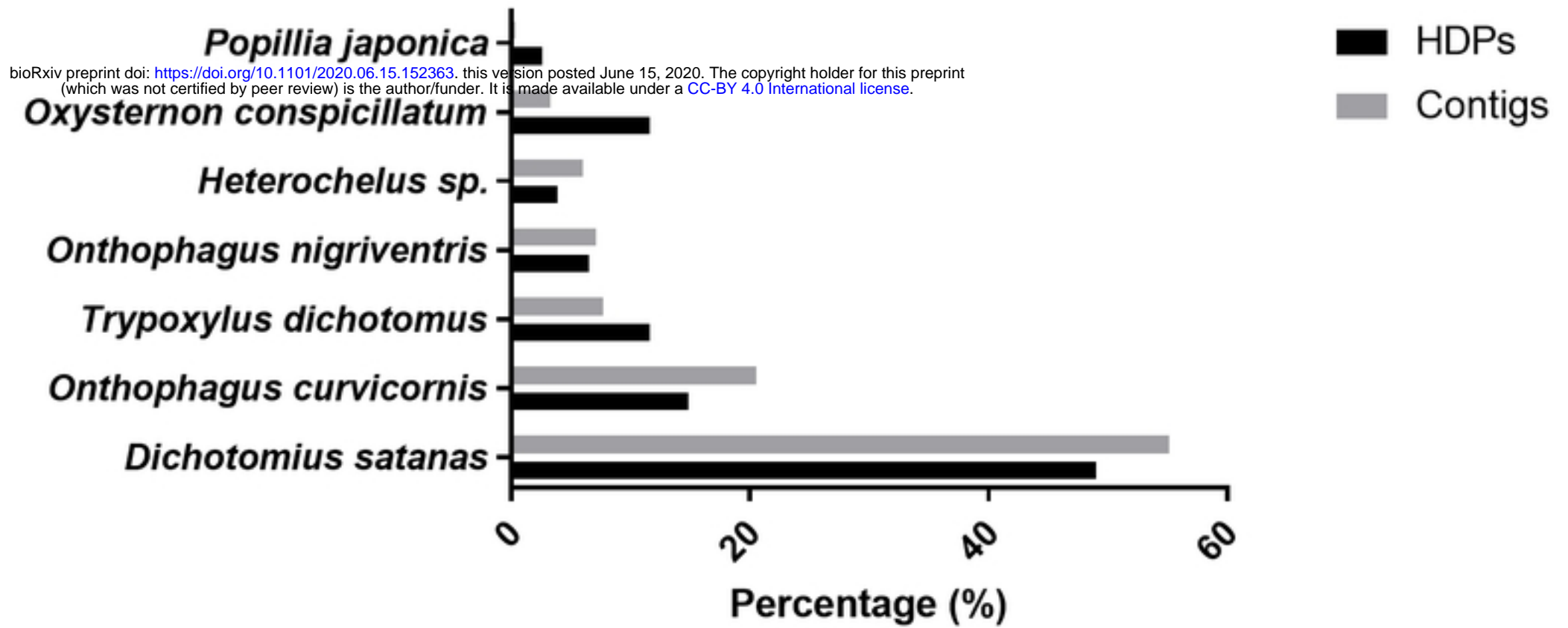
- 974 Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2005;142: 317–323.
975 doi:10.1016/j.cbpb.2005.08.001
- 976 91. Hoffmann JA, Hetru C. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. Immunol
977 Today. 1992;13: 411–415. doi:10.1016/0167-5699(92)90092-L
- 978 92. Wu Q, Patočka J, Kuča K. Insect Antimicrobial Peptides, a Mini Review. Toxins.
979 2018;10: 461. doi:10.3390/toxins10110461
- 980 93. Zhu S, Gao B. Evolutionary origin of β -defensins. Dev Comp Immunol. 2013;39: 79–84.
981 doi:10.1016/j.dci.2012.02.011
- 982 94. Dias R de O, Franco OL. Cysteine-stabilized $\alpha\beta$ defensins: From a common fold to
983 antibacterial activity. Peptides. 2015;72: 64–72. doi:10.1016/j.peptides.2015.04.017
- 984 95. Tarr DEK. Establishing a reference array for the CS- $\alpha\beta$ superfamily of defensive
985 peptides. BMC Res Notes. 2016;9: 490. doi:10.1186/s13104-016-2291-0
- 986 96. Shafee TMA, Lay FT, Phan TK, Anderson MA, Hulett MD. Convergent evolution of
987 defensin sequence, structure and function. Cell Mol Life Sci. 2017;74: 663–682.
988 doi:10.1007/s00018-016-2344-5
- 989 97. Lowenberger CA, Smartt CT, Bulet P, Ferdig MT, Severson DW, Hoffmann JA, et al.
990 Insect immunity: molecular cloning, expression, and characterization of cDNAs and
991 genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*. Insect Mol
992 Biol. 1999;8: 107–118. doi:10.1046/j.1365-2583.1999.810107.x
- 993 98. Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G, et al.
994 *Staphylococcus aureus* Resistance to Human Defensins and Evasion of Neutrophil
995 Killing via the Novel Virulence Factor Mprf Is Based on Modification of Membrane
996 Lipids with L-Lysine. J Exp Med. 2001;193: 1067–1076. doi:10.1084/jem.193.9.1067
- 997 99. Brogden KA, De Lucca AJ, Bland J, Elliott S. Isolation of an ovine pulmonary
998 surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. Proc
999 Natl Acad Sci. 1996;93: 412–416. doi:10.1073/pnas.93.1.412
- 1000 100. Lai R, Liu H, Hui Lee W, Zhang Y. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina*

- 1001 maxima. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295: 796–799. doi:10.1016/S0006-
1002 291X(02)00762-3
- 1003 101. Gunne H, Hellers M, Steiner H. Structure of preproattacin and its processing in insect
1004 cells infected with a recombinant baculovirus. *Eur J Biochem.* 1990;187: 699–703.
1005 doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15356.x
- 1006 102. Kockum K, Faye I, Hofsten PV, Lee JY, Xanthopoulos KG, Boman HG. Insect
1007 immunity. Isolation and sequence of two cDNA clones corresponding to acidic and
1008 basic attacins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* 1984;3: 2071–2075.
- 1009 103. Shin HS, Park S-I. Novel attacin from *Hermetia illucens*: cDNA cloning,
1010 characterization, and antibacterial properties. *Prep Biochem Biotechnol.* 2019;49: 279–
1011 285. doi:10.1080/10826068.2018.1541807
- 1012 104. Ando K, Natori S. Molecular cloning, sequencing, and characterization of cDNA for
1013 sarcotoxin IIA, an inducible antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly).
1014 *Biochemistry.* 1988;27: 1715–1721. doi:10.1021/bi00405a050
- 1015 105. Sun S-C, Lindstrom I, Lee J-Y, Faye I. Structure and expression of the attacin genes in
1016 *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem.* 1991;196: 247–254. doi:10.1111/j.1432-
1017 1033.1991.tb15811.x
- 1018 106. Engström P, Carlsson A, Engström A, Tao ZJ, Bennich H. The antibacterial effect of
1019 attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane
1020 of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 1984;3: 3347–3351. doi:10.1002/j.1460-
1021 2075.1984.tb02302.x
- 1022 107. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure.
1023 *Nat Protoc.* 2006;1: 2876–2890. doi:10.1038/nprot.2006.202
- 1024 108. Vilcinskas A, Mukherjee K, Vogel H. Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in
1025 the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2013;280: 20122113.
1026 doi:10.1098/rspb.2012.2113
- 1027 109. Zhou X, Peng L-Y, Wang Z-C, Wang W, Zhu Z, Huang X-H, et al. Identification of novel

- 1028 antimicrobial peptides from rice planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochem Mol*
1029 *Biol.* 2019;113: 103215. doi:10.1016/j.ibmb.2019.103215
- 1030 110. Lu W. Antimicrobial peptides. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;88: 105–106.
1031 doi:10.1016/j.semcdb.2018.05.026
- 1032 111. Waghu FH, Barai RS, Idicula-Thomas S. Leveraging family-specific signatures for AMP
1033 discovery and high-throughput annotation. *Sci Rep.* 2016;6: 24684.
1034 doi:10.1038/srep24684

A.

HDPs and contigs per species



B.

Families of HDPs per species

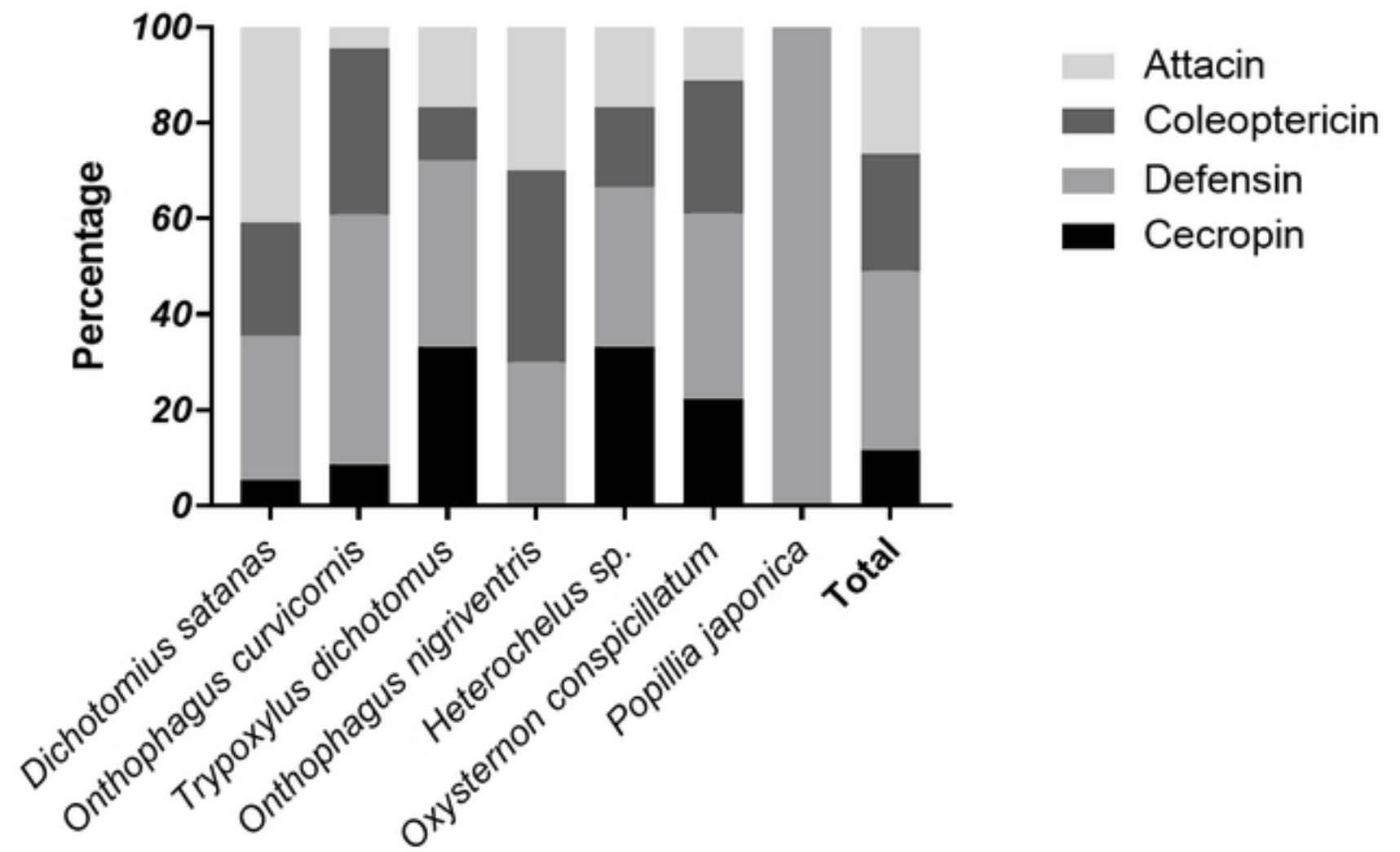


Figure 1

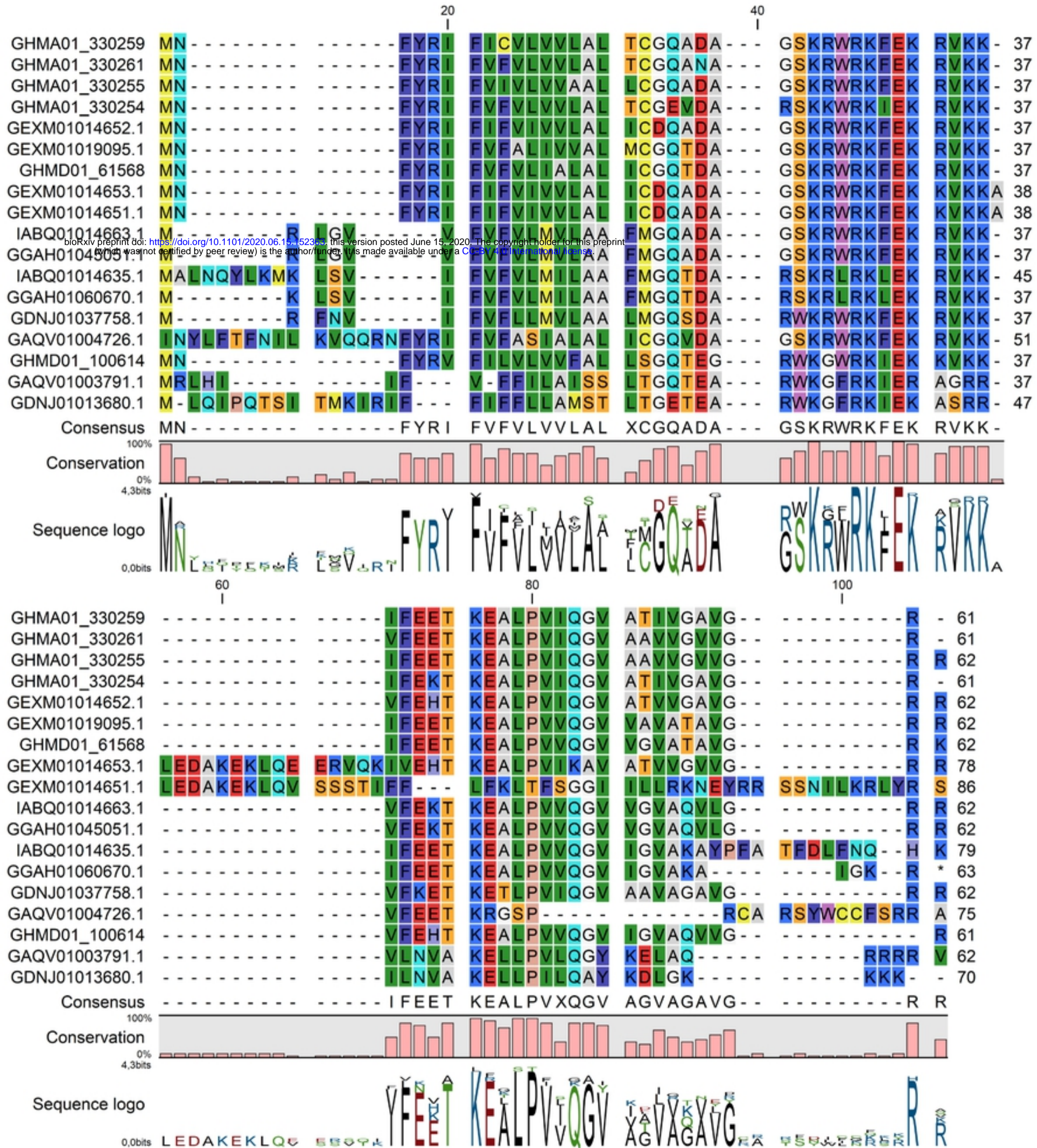


Figure 2

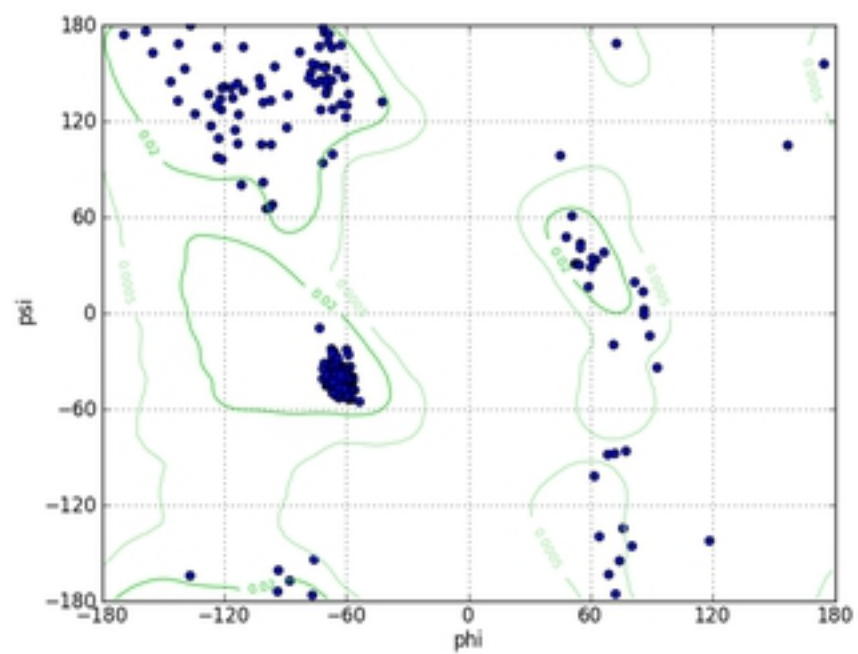
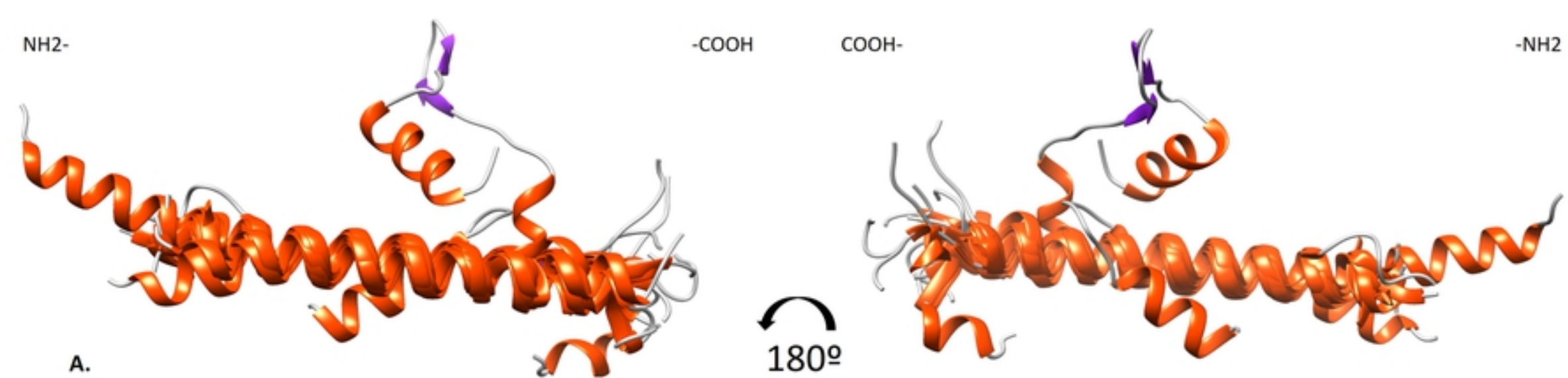


Figure 3

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.15.152363>; this version posted June 15, 2020. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. It is made available under a [CC-BY 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

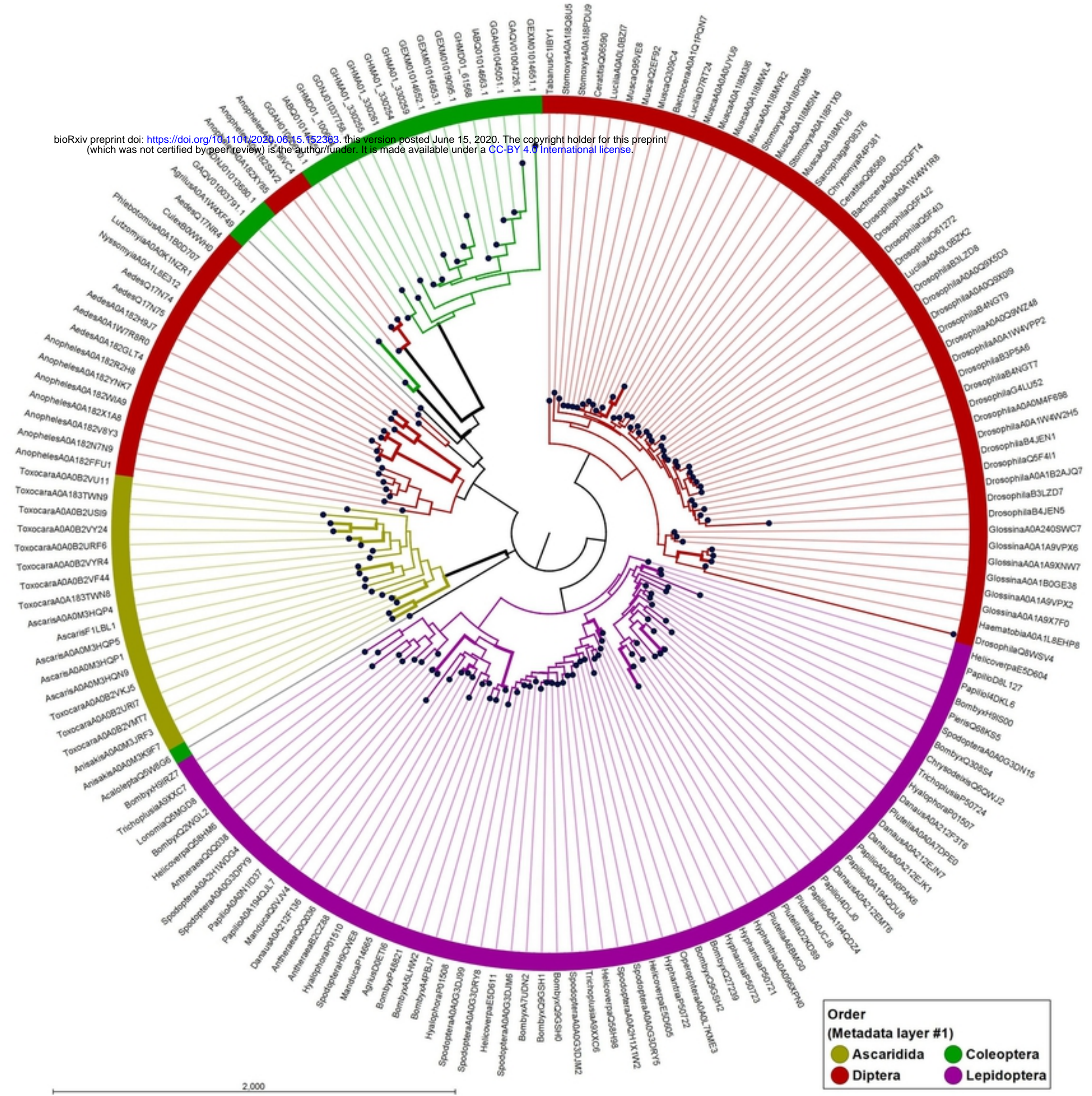


Figure 4

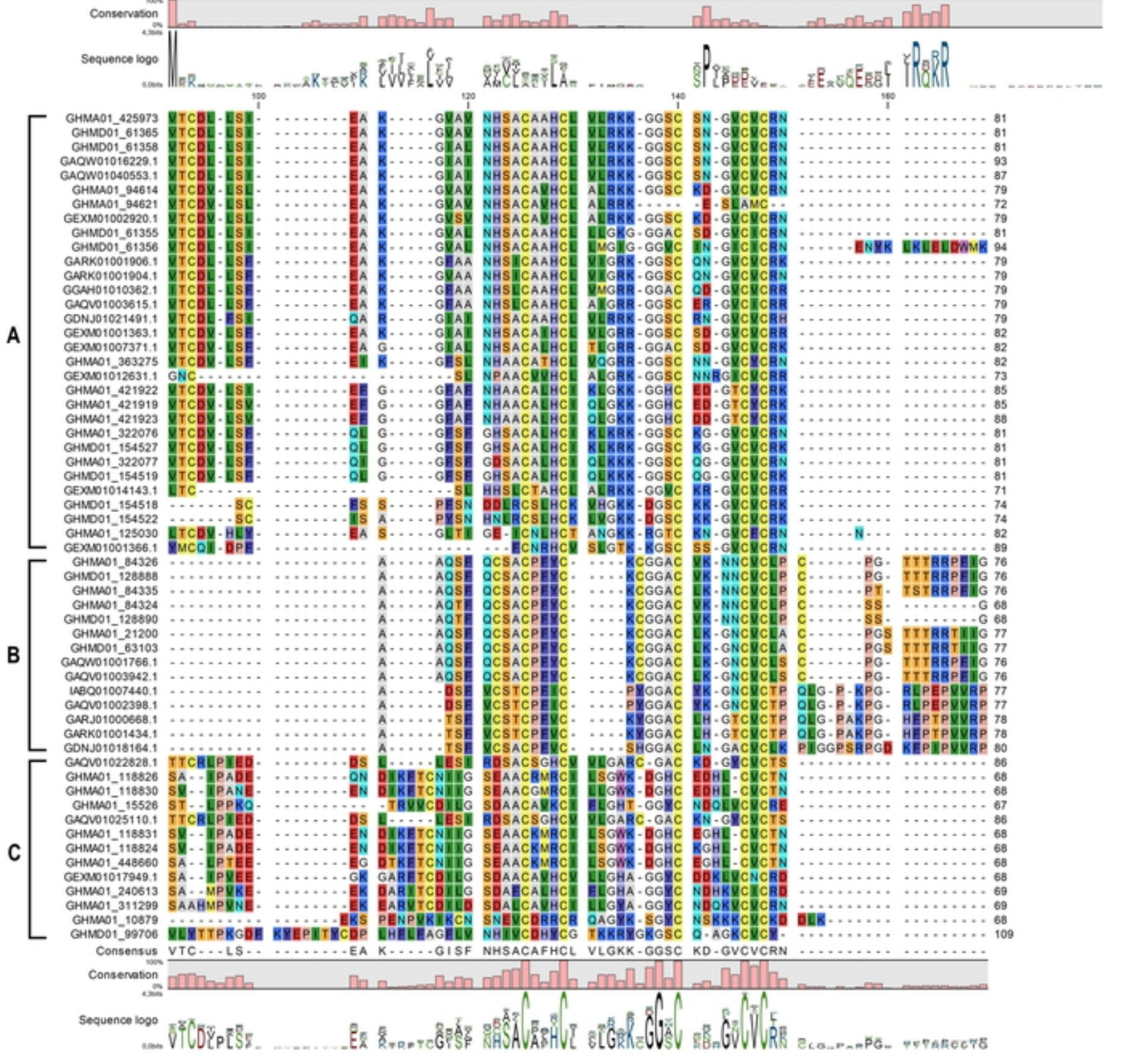
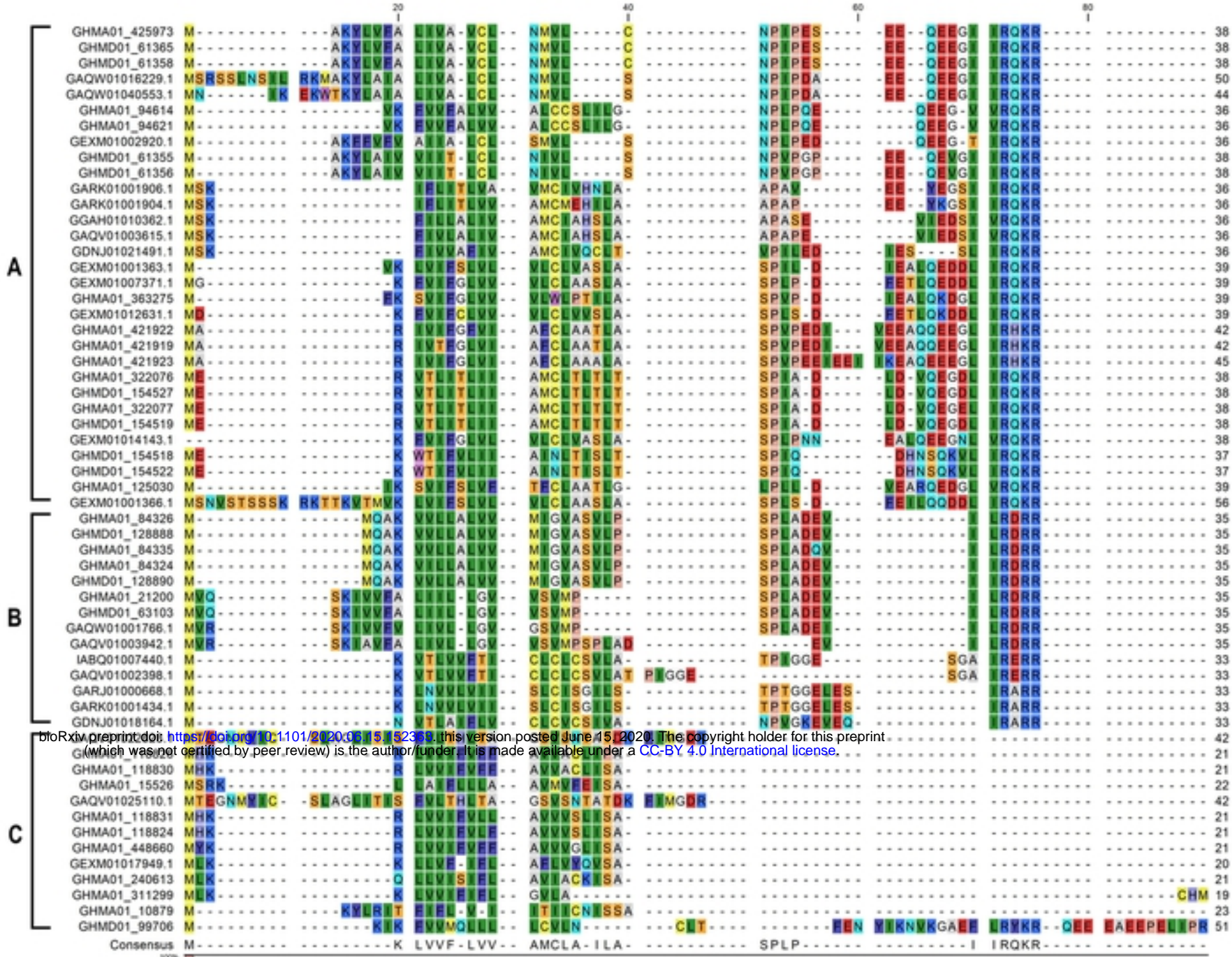
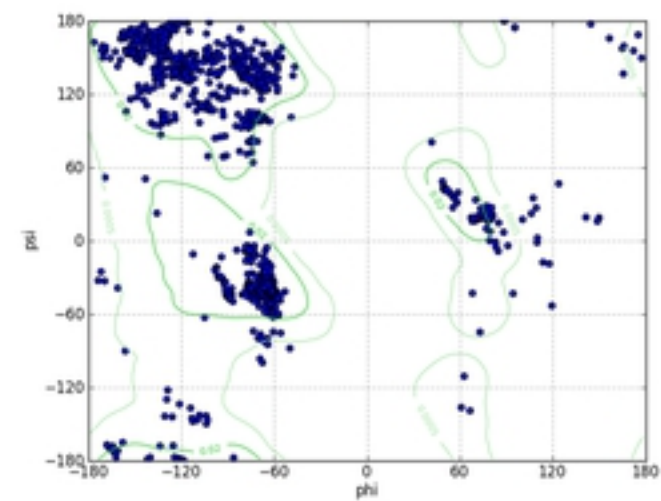
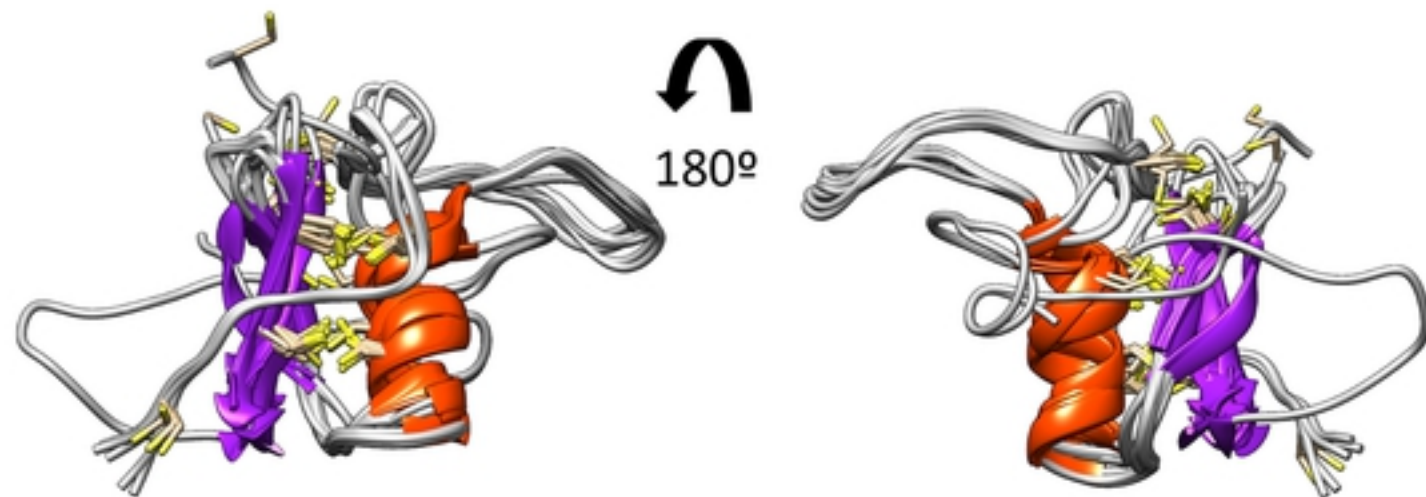
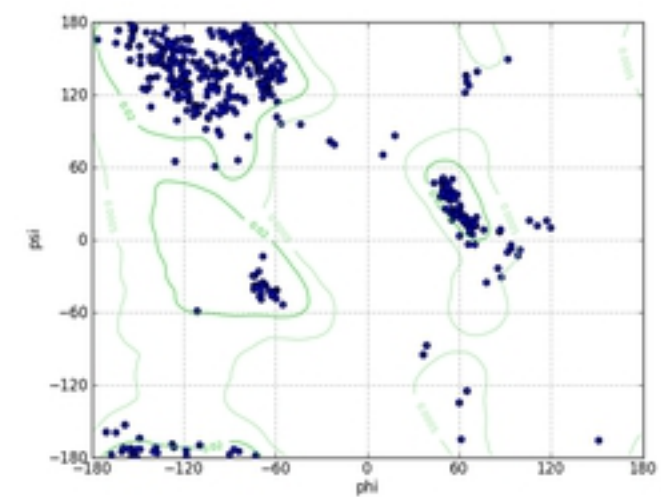
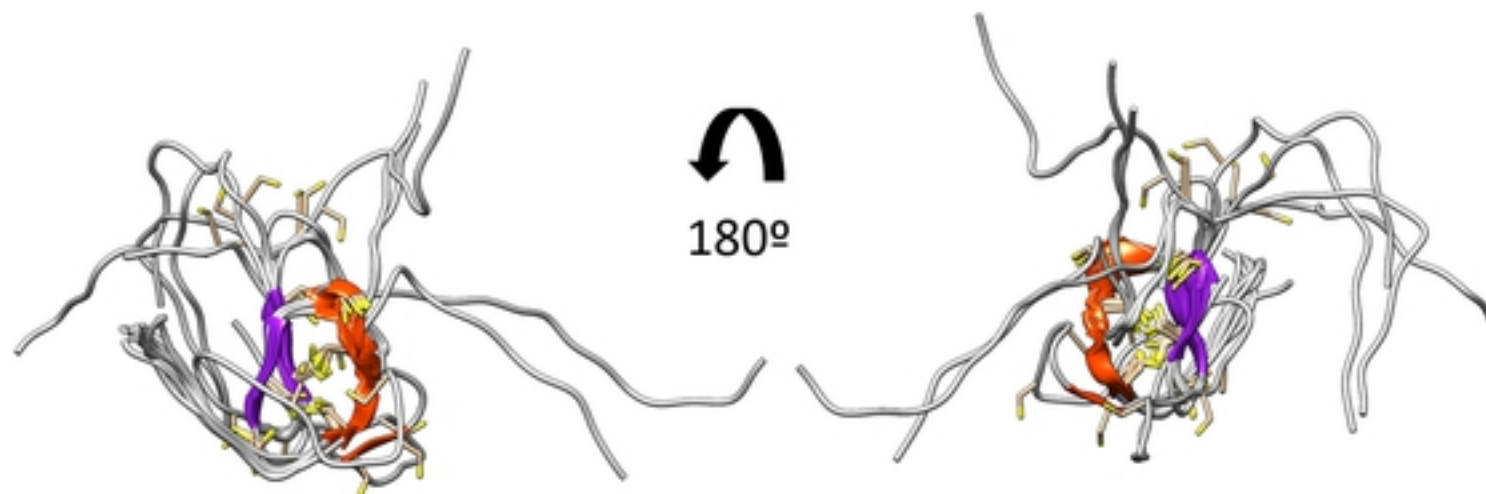
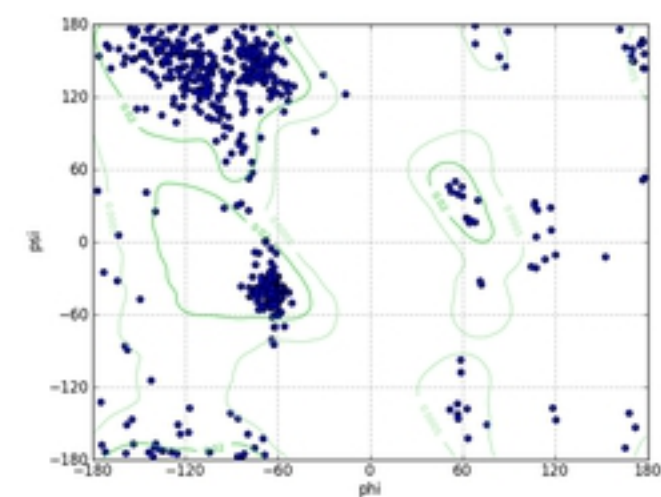
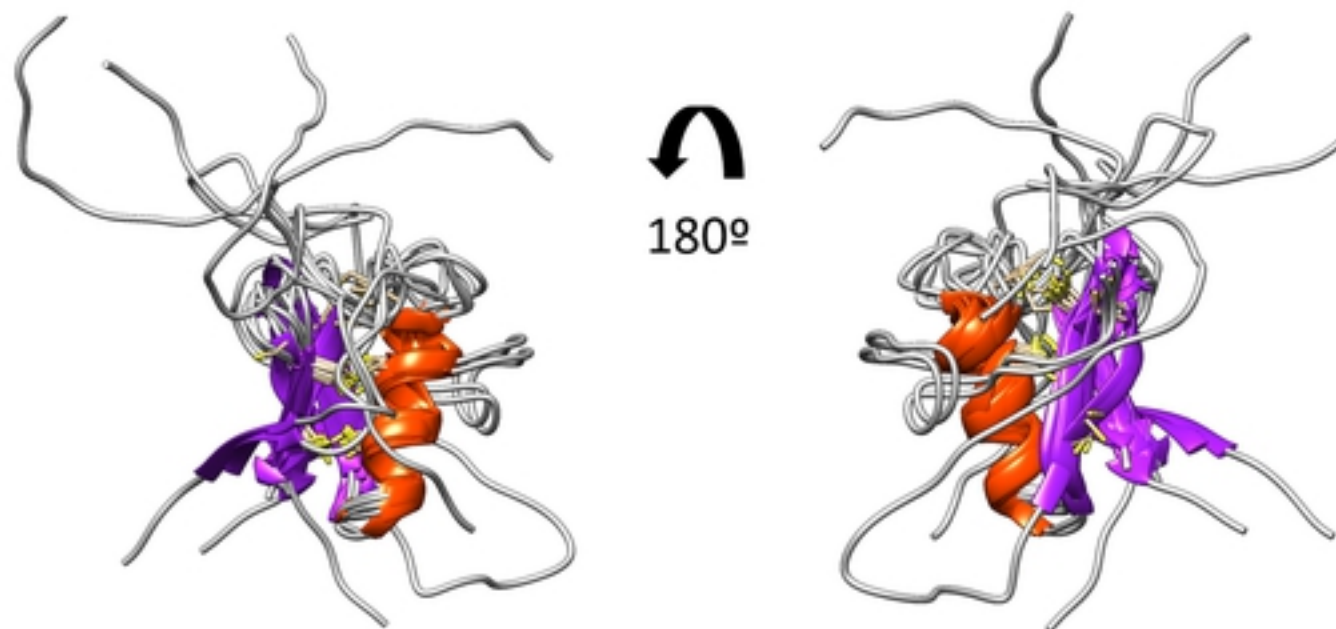


Figure 5

A.**B.****C.****Figure 6**

Defensin groups net charge

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.15.152363>; this version posted June 15, 2020. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. It is made available under a [CC-BY 4.0 International license](#).

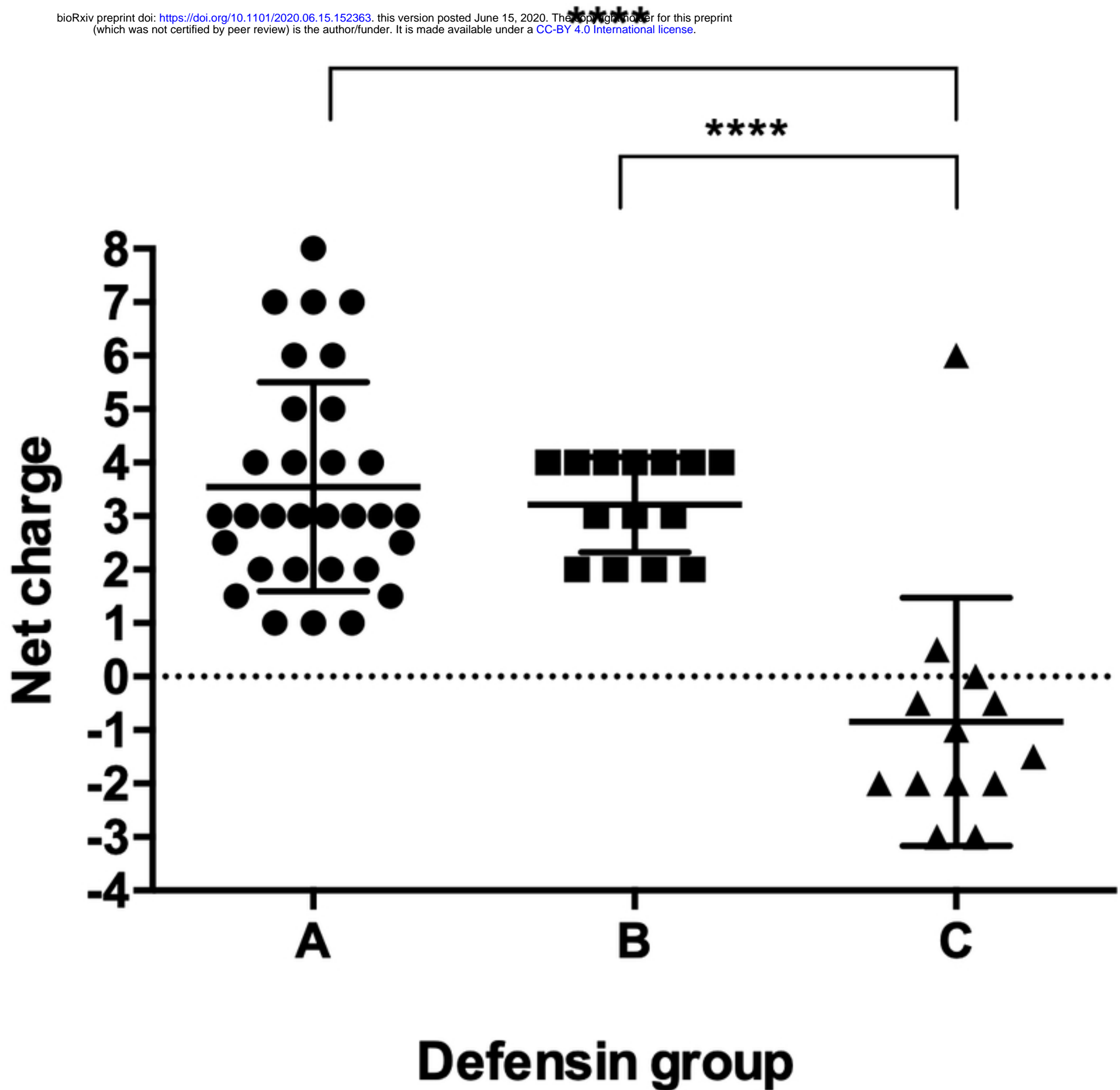


Figure 7

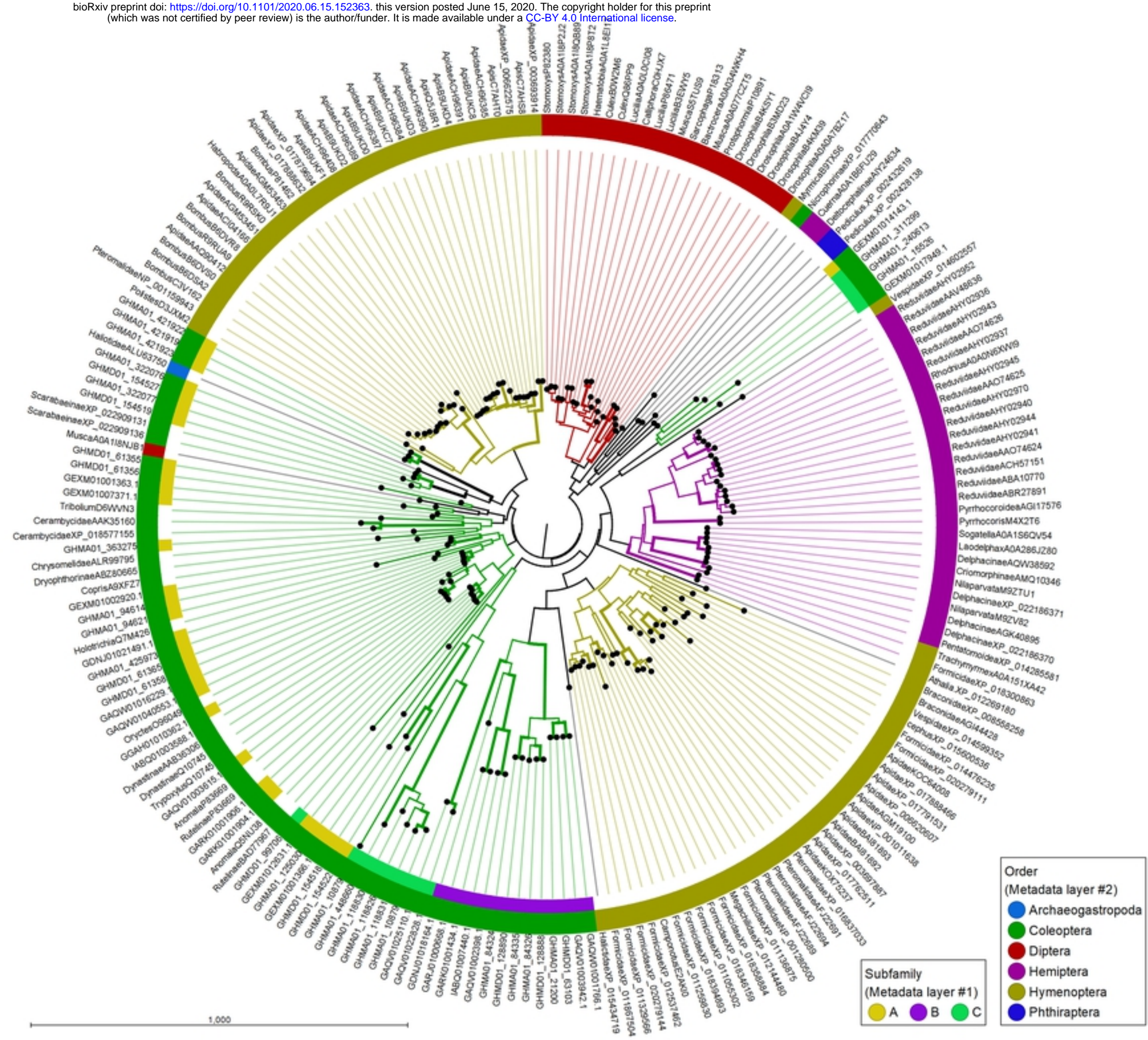


Figure 8

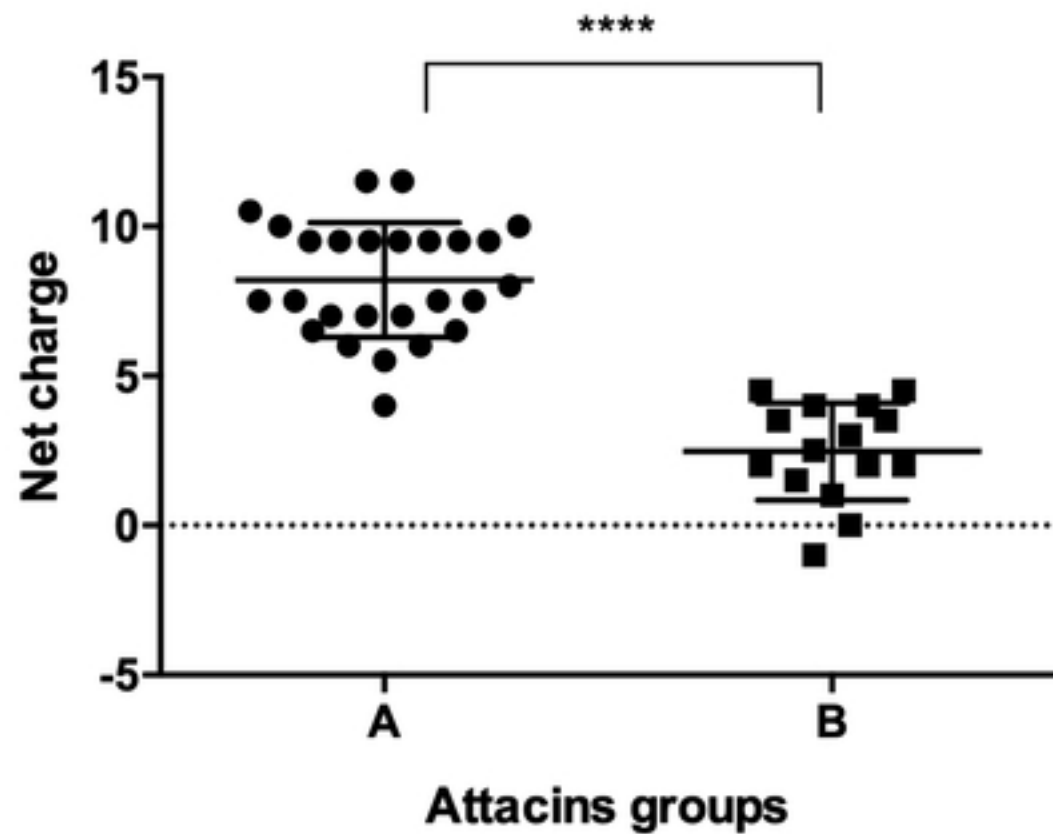
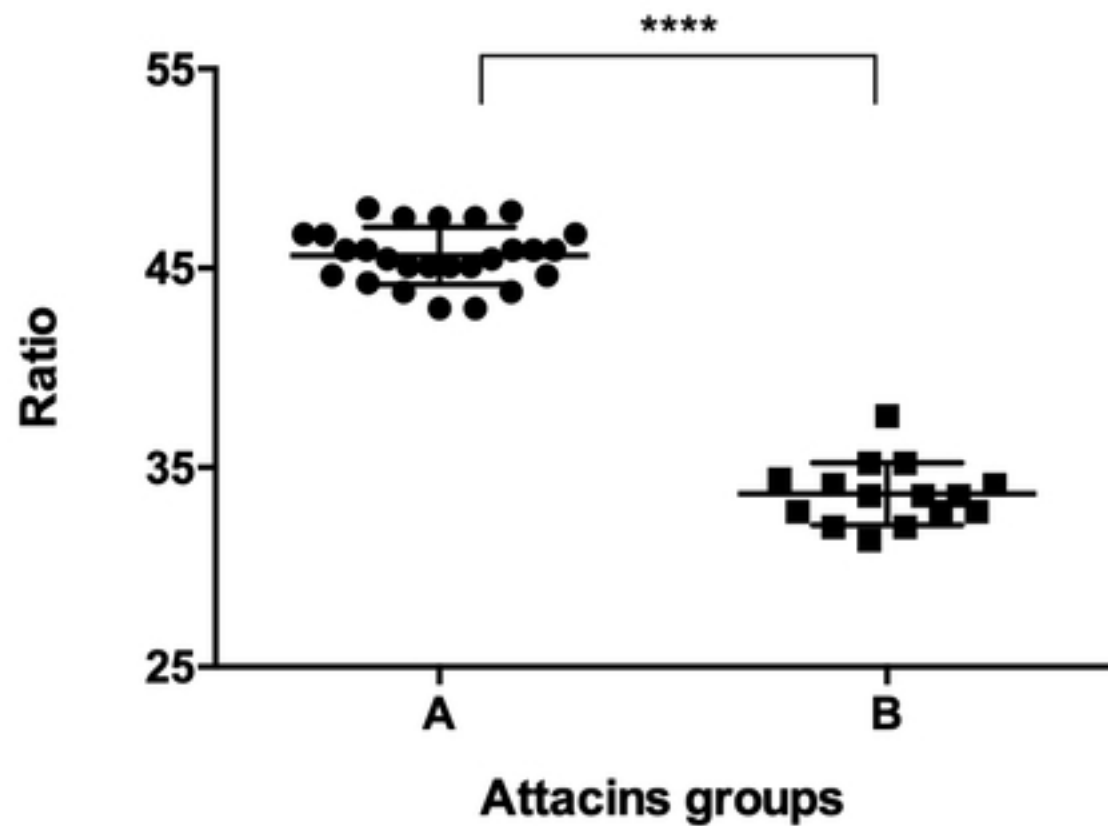
A.**Attacins net charge****B.****Attacins GNTS ratio**

Figure 10

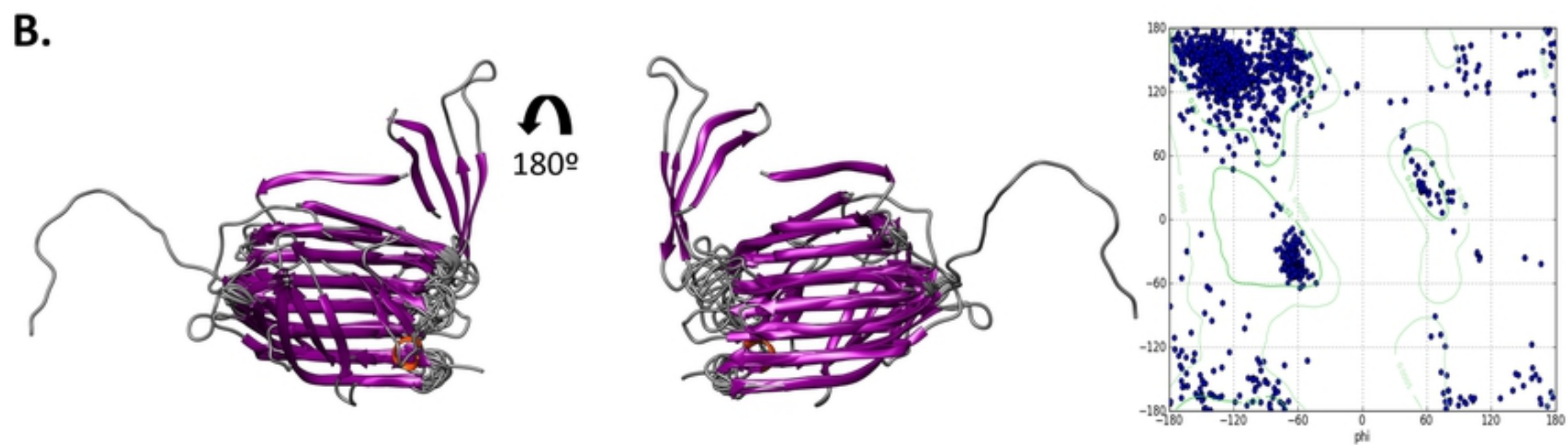
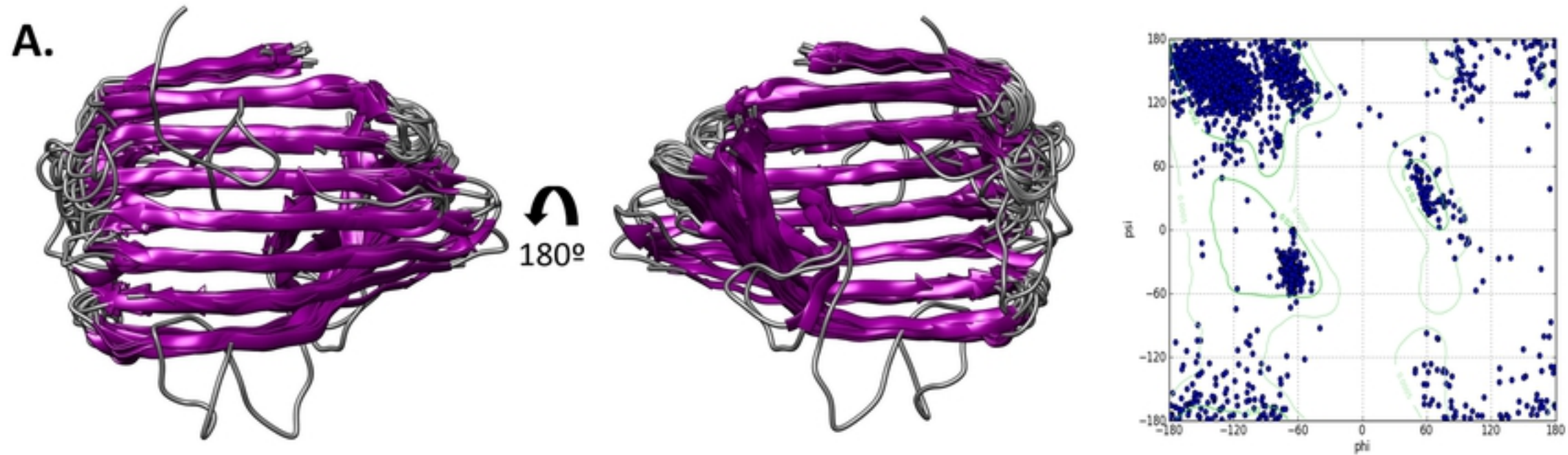
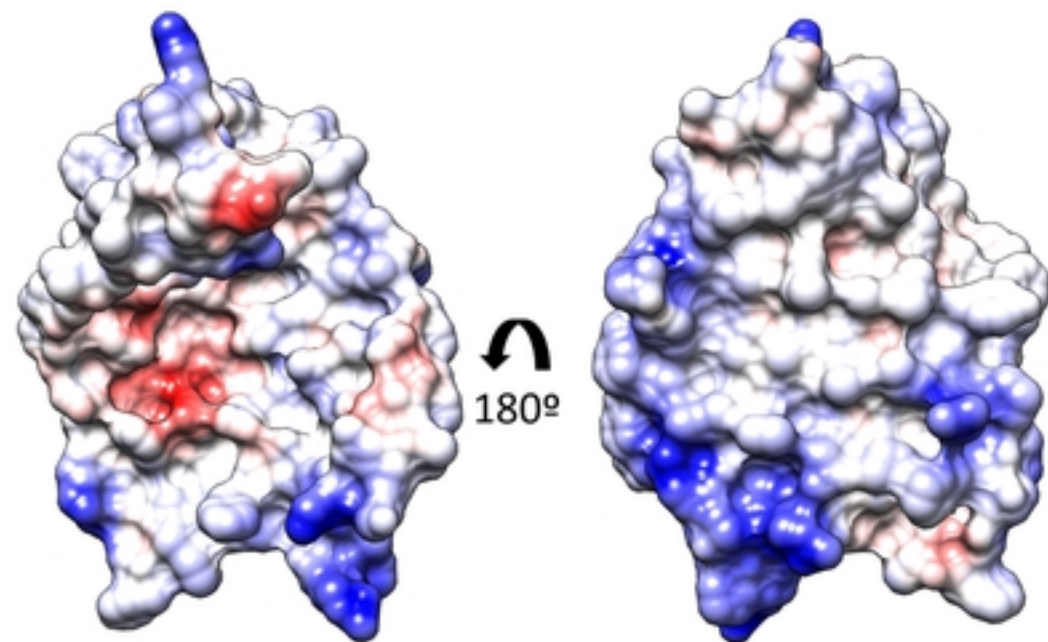


Figure 11

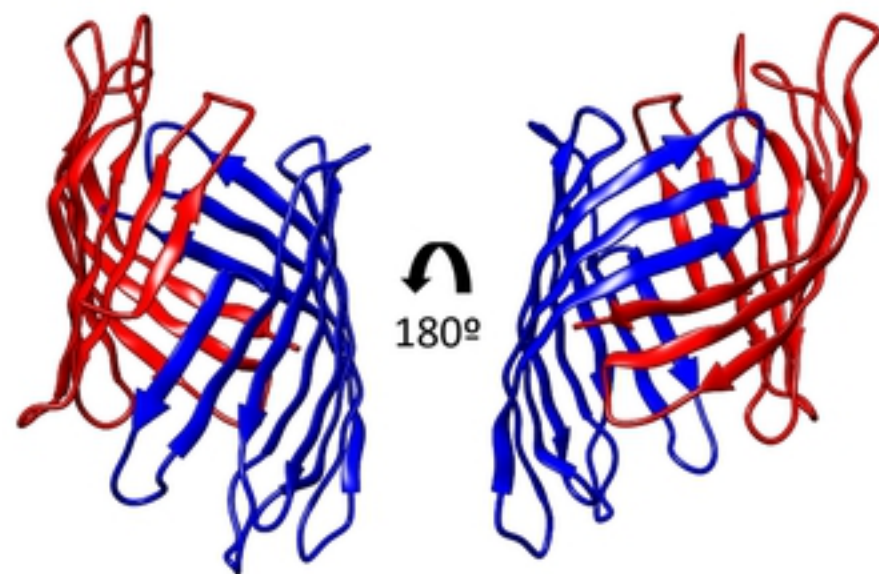
Inner face

Outer face

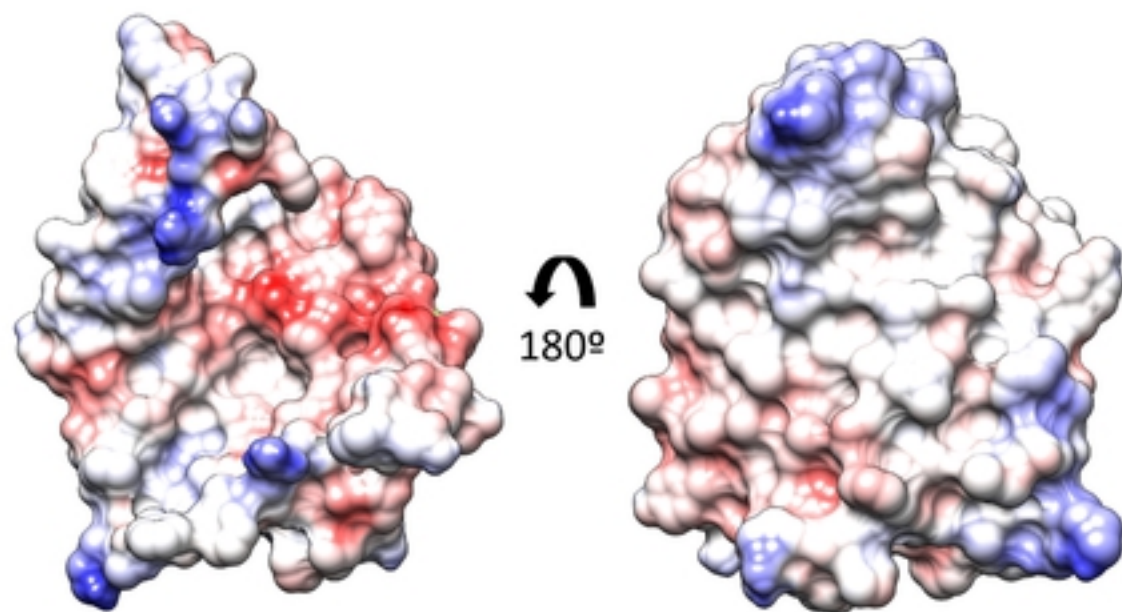
A.



B.



C.



D.

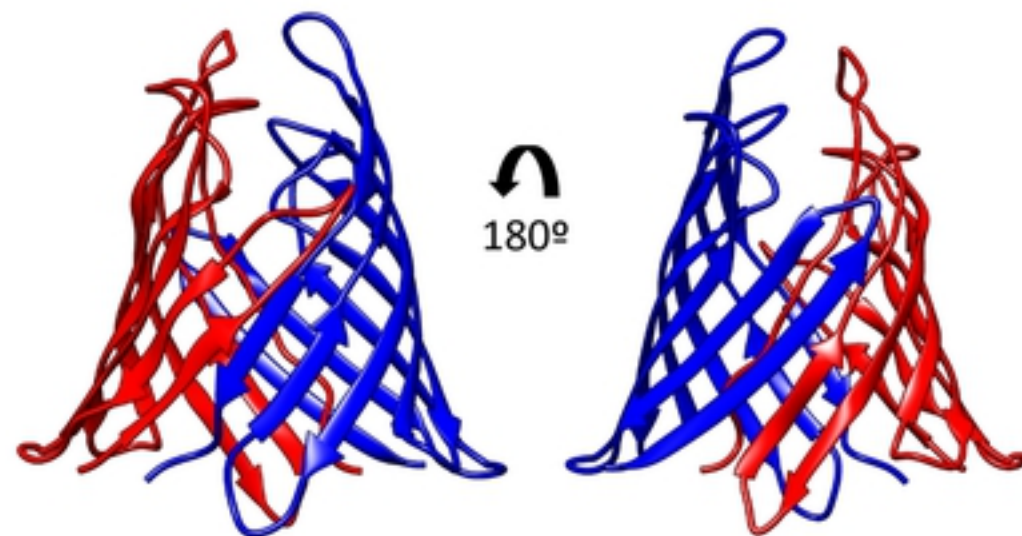


Figure 12

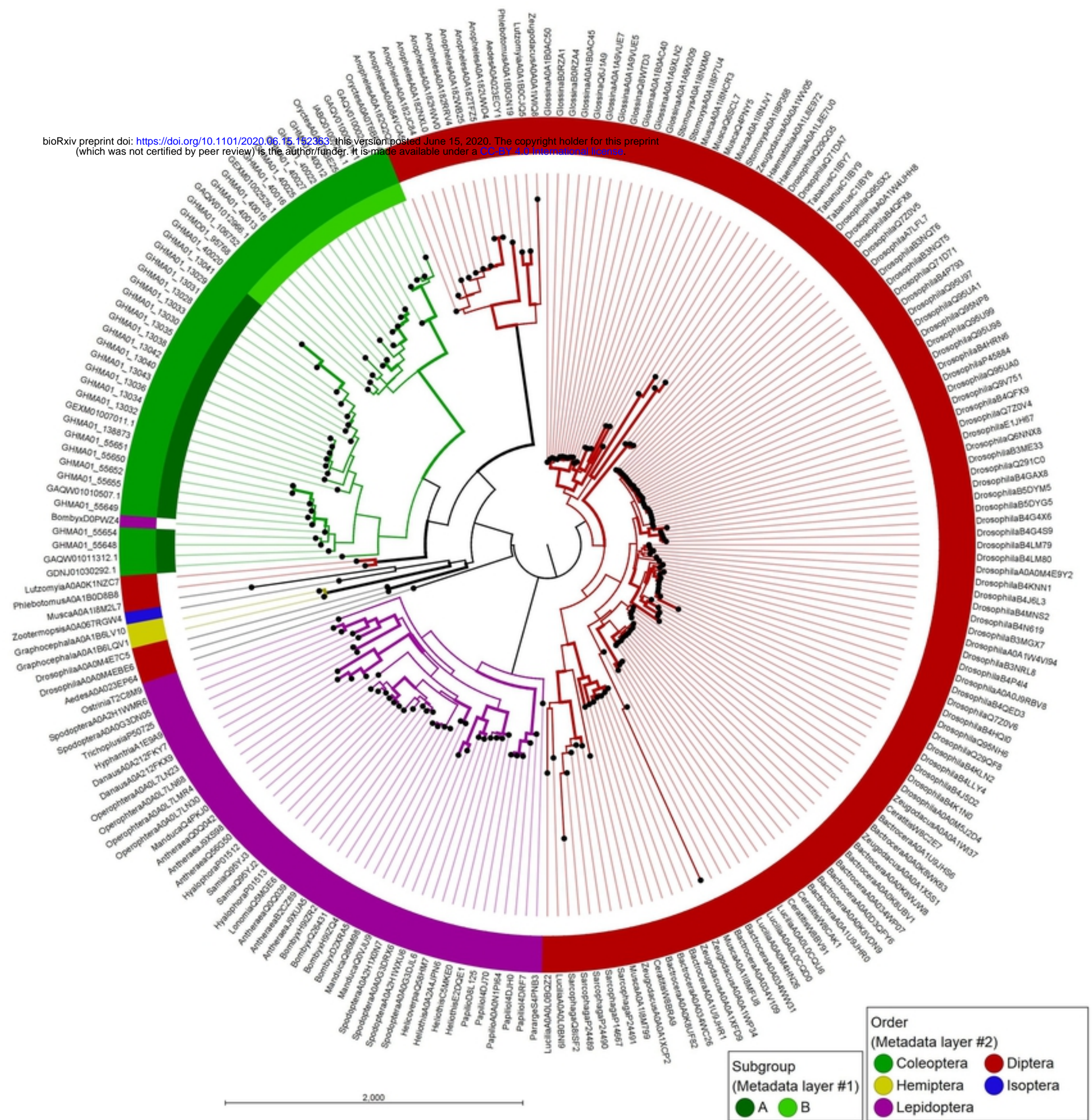


Figure 13

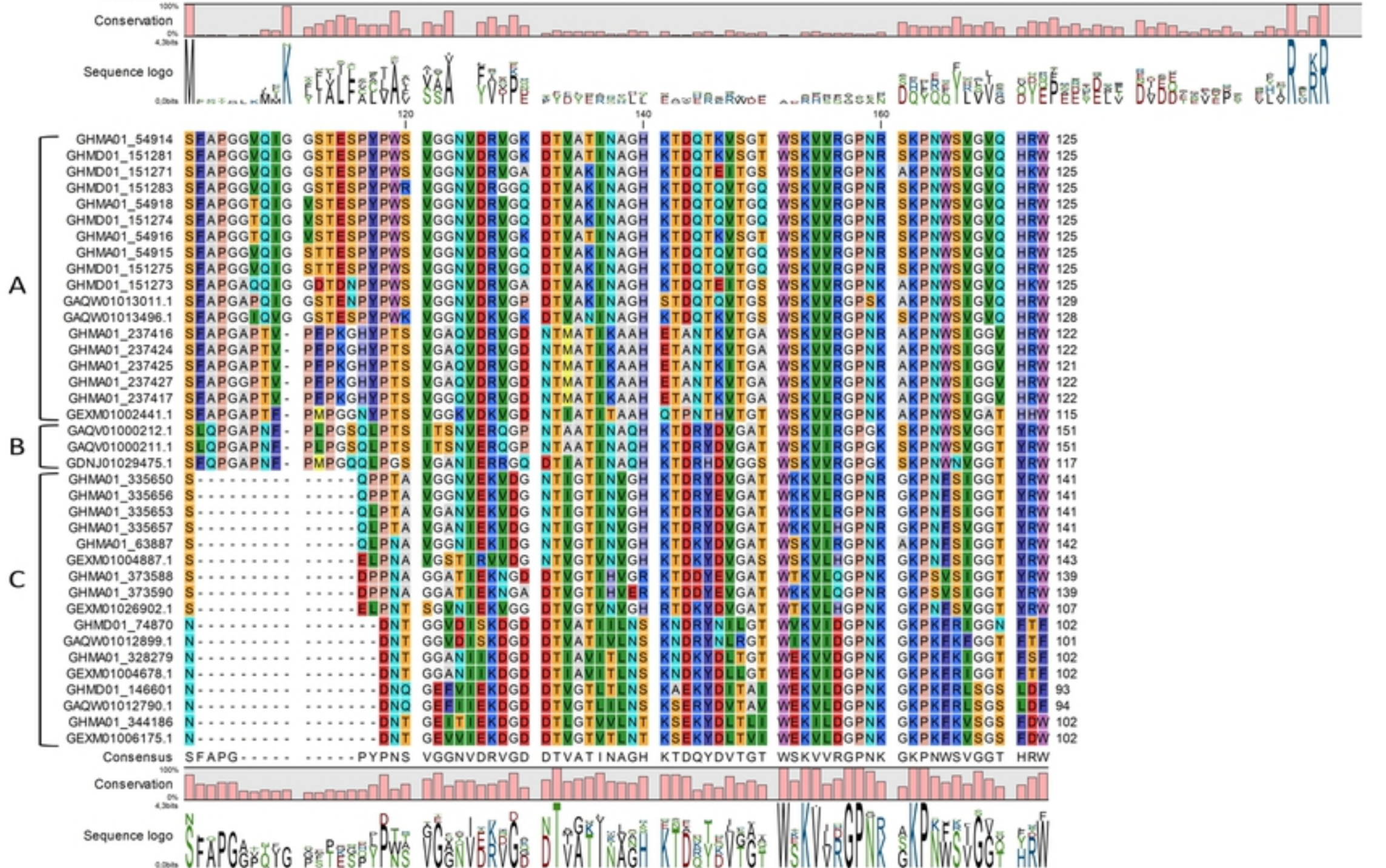
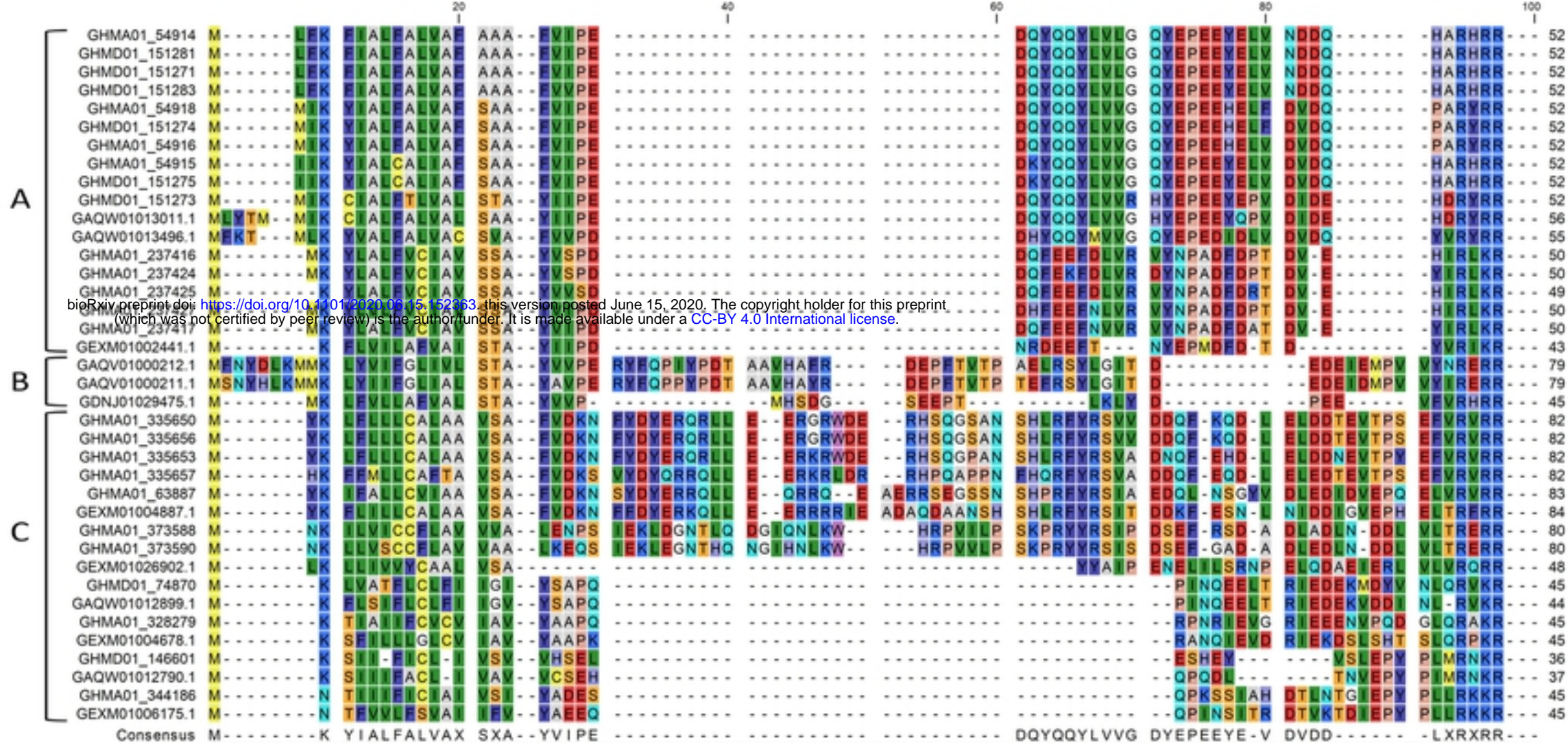


Figure 14

Net charge

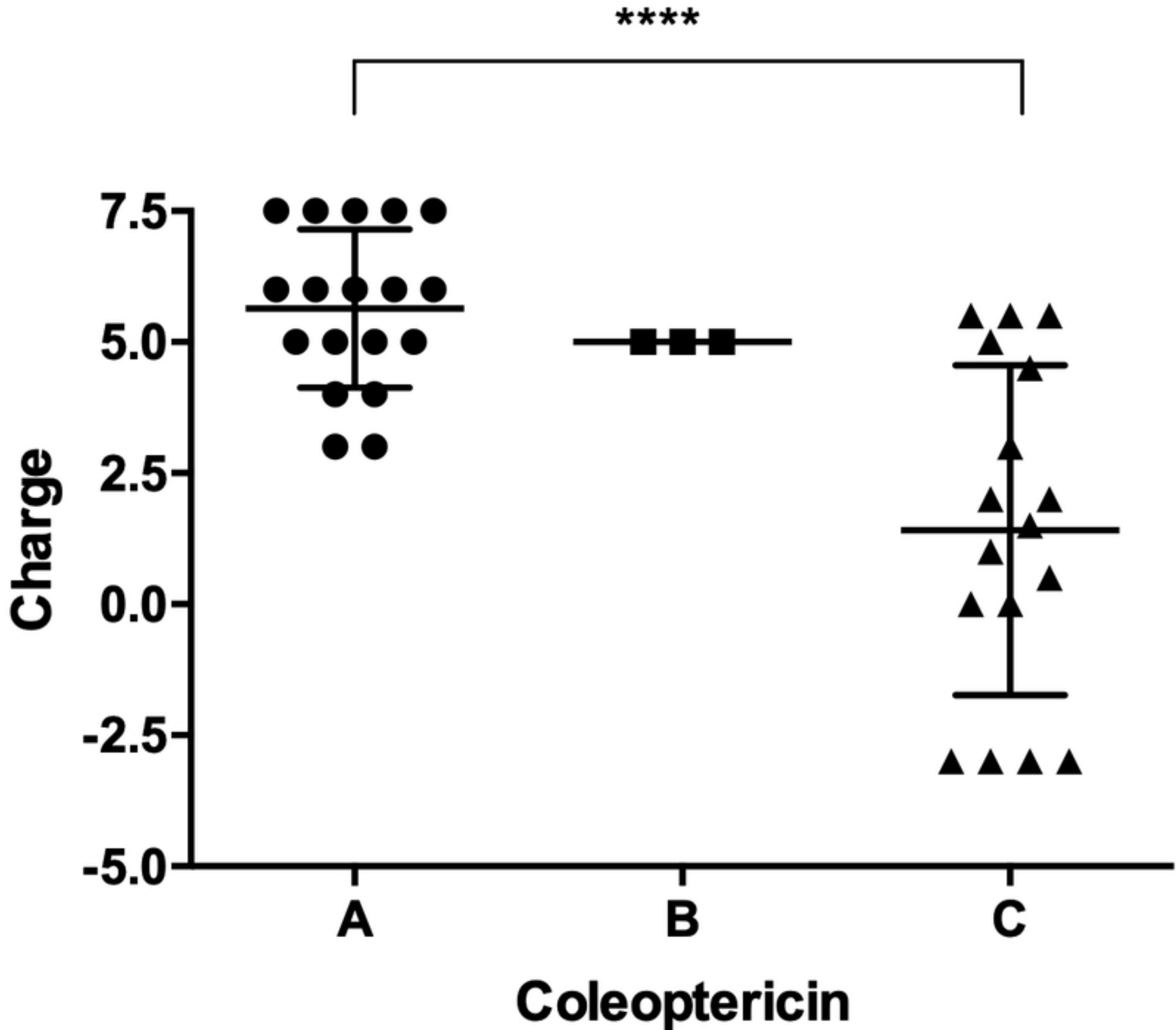
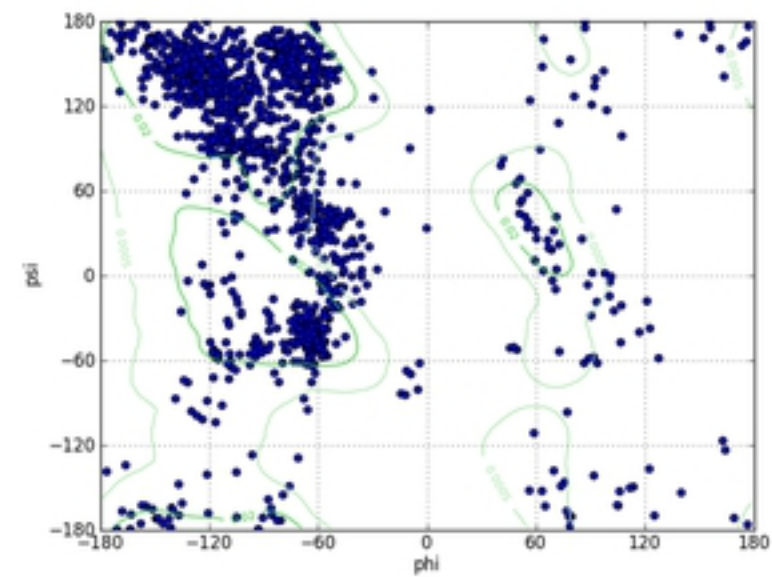
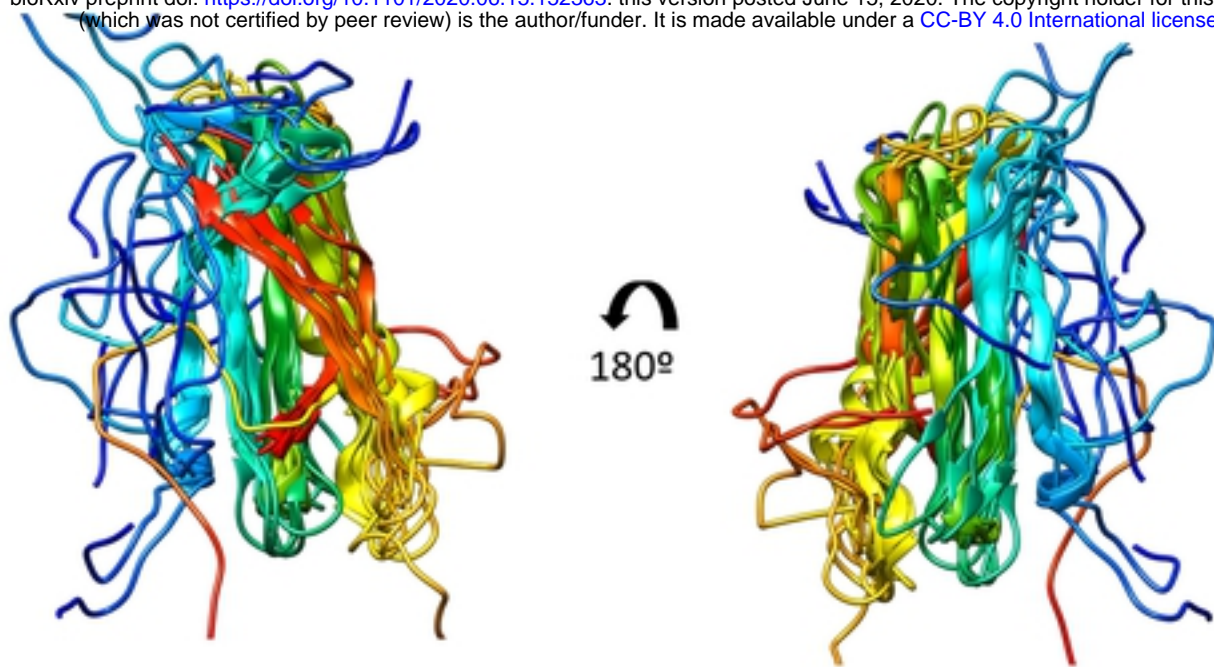
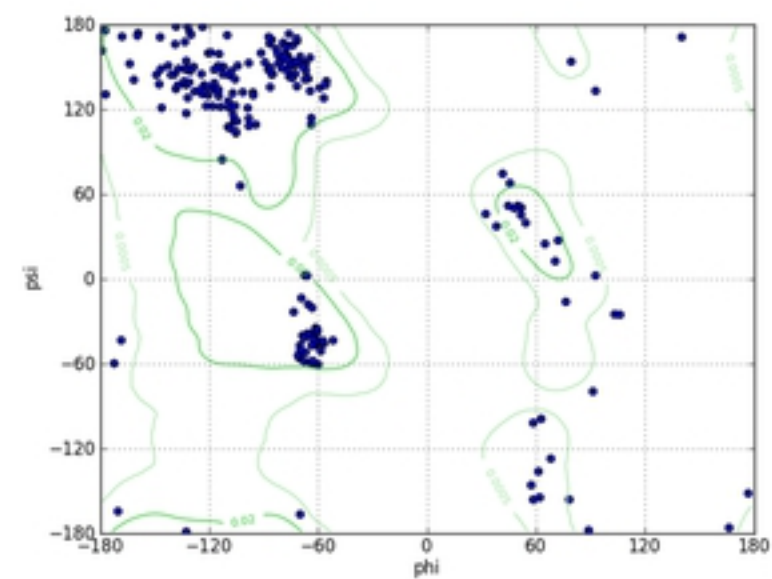
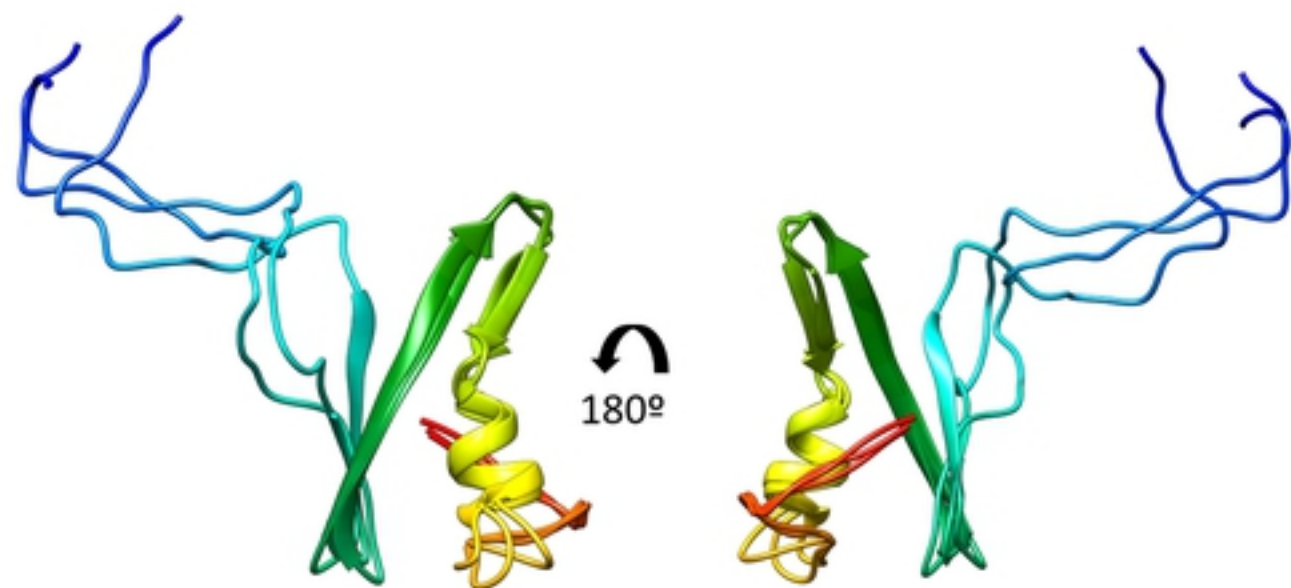


Figure 15

A.



B.



C.

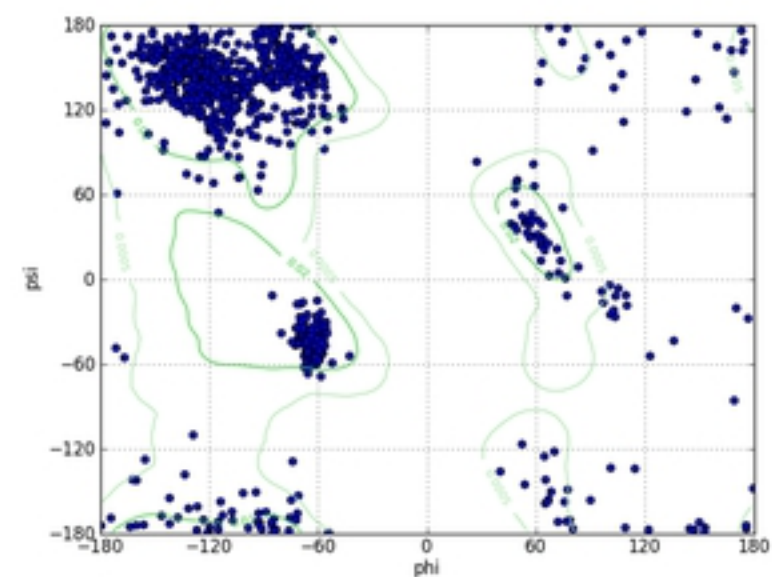
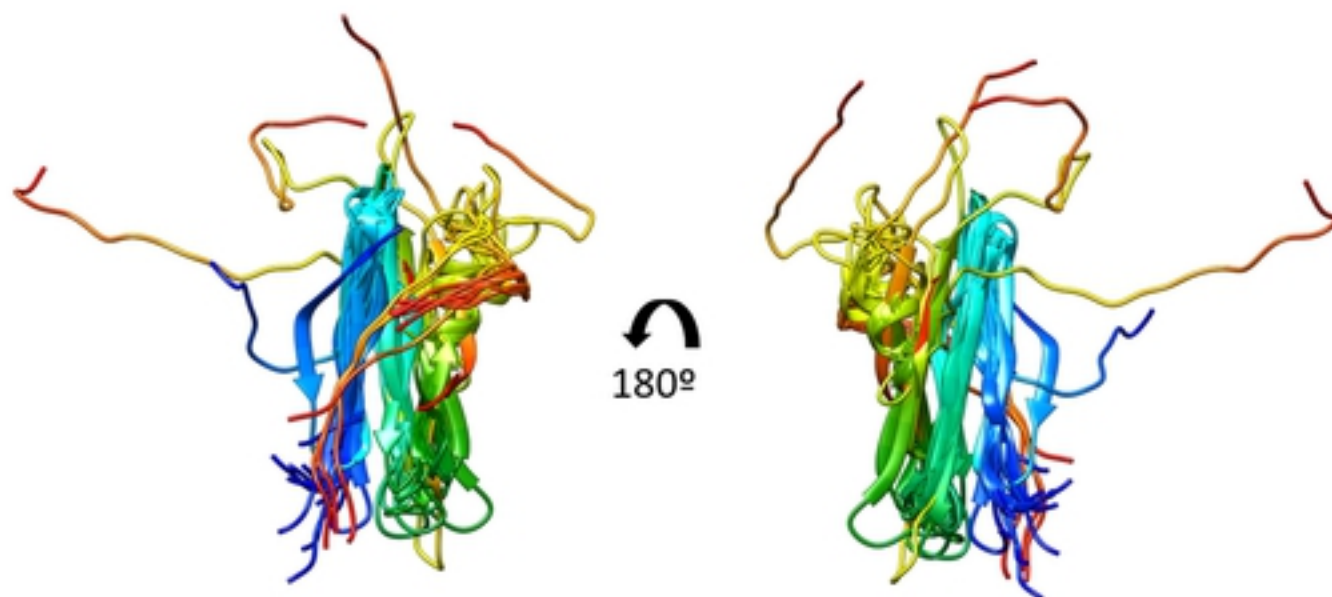


Figure 16

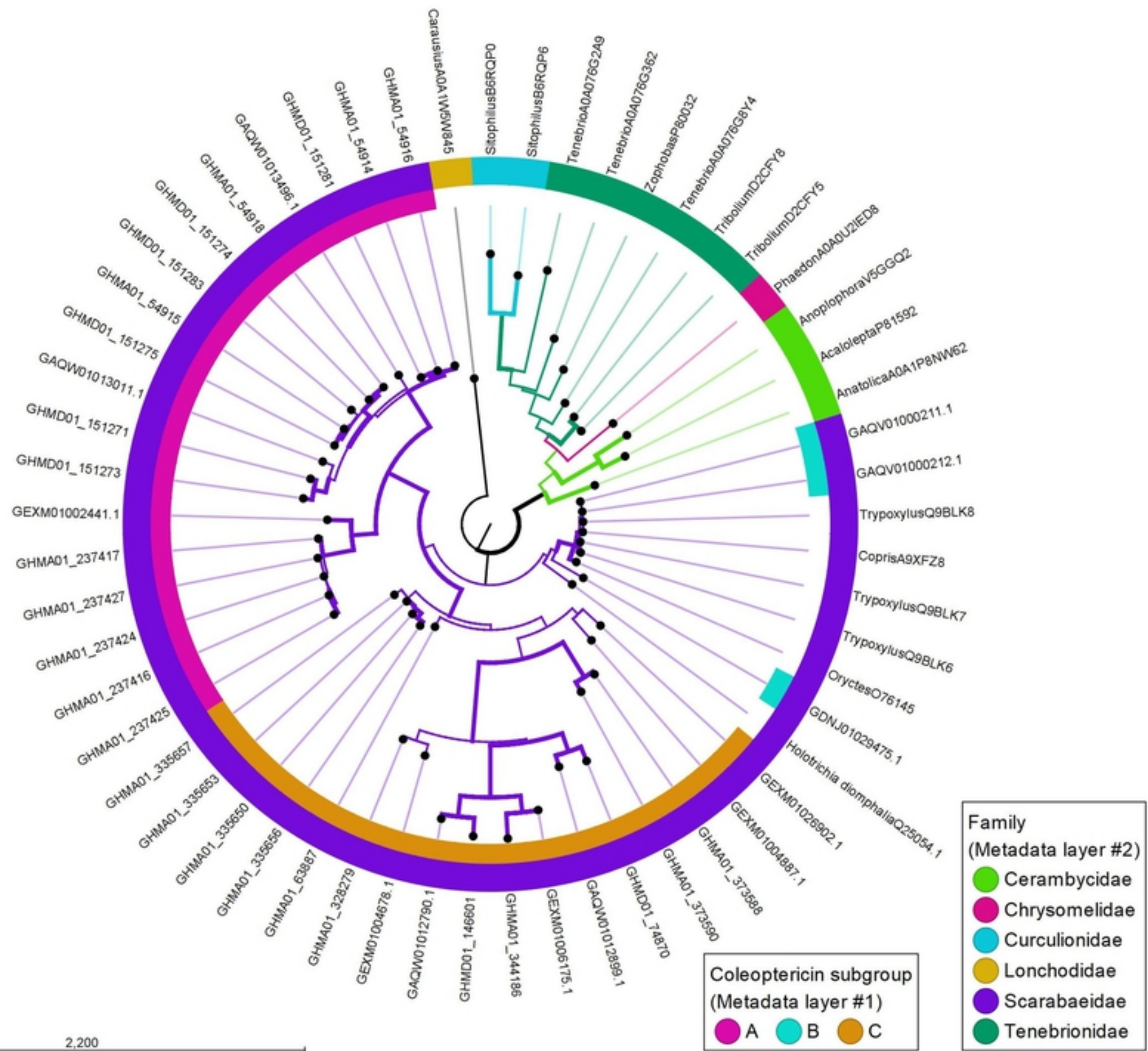
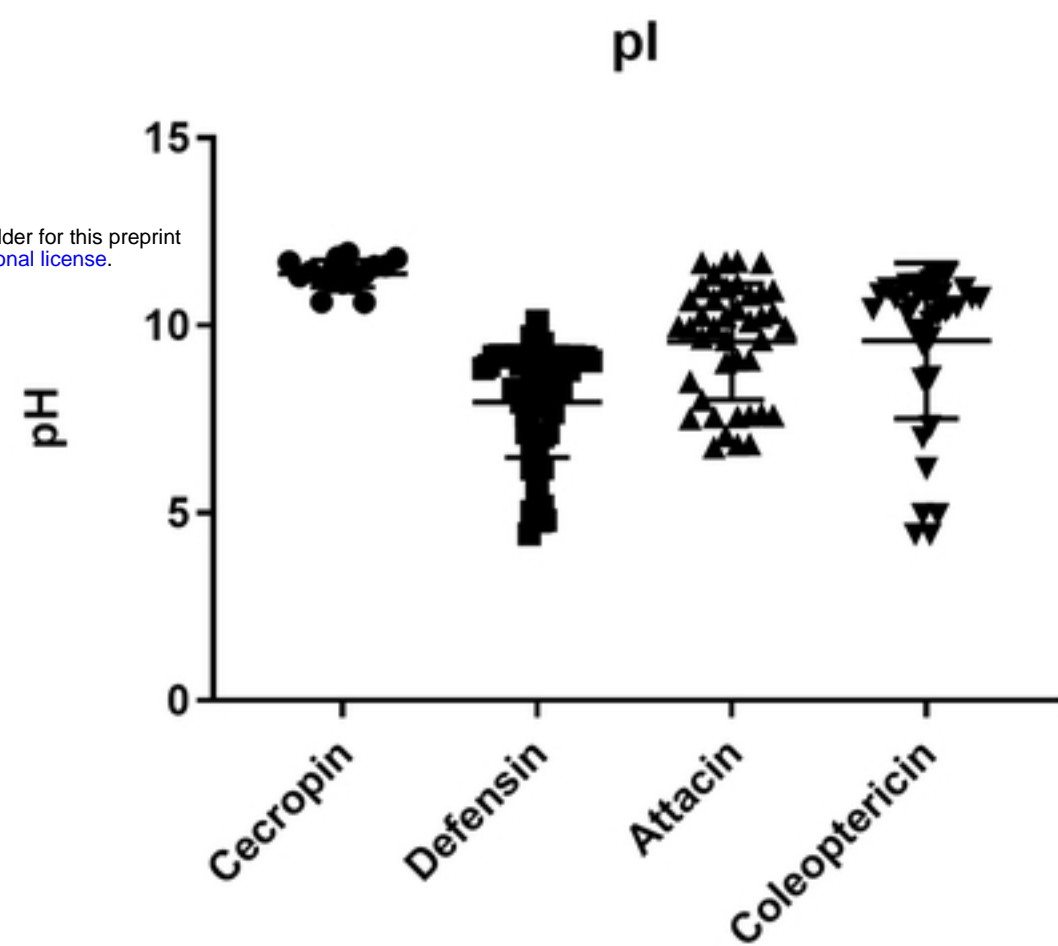
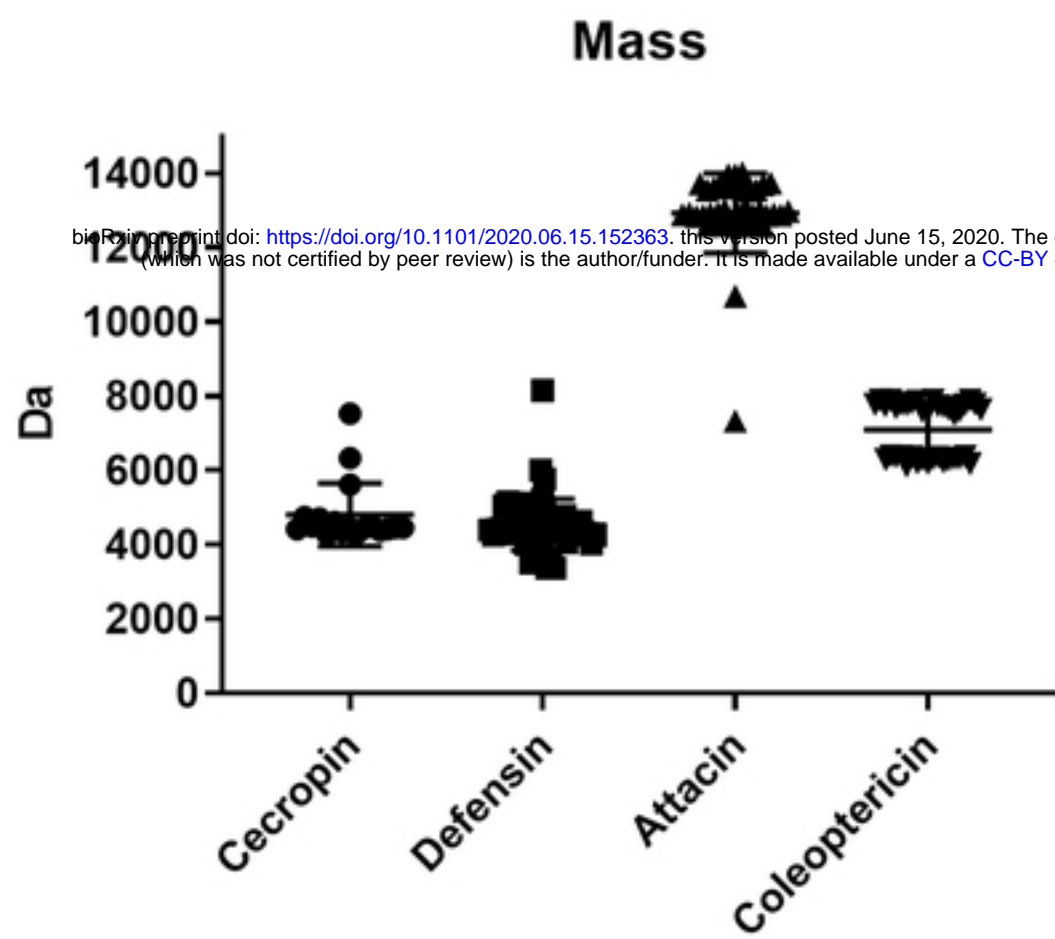
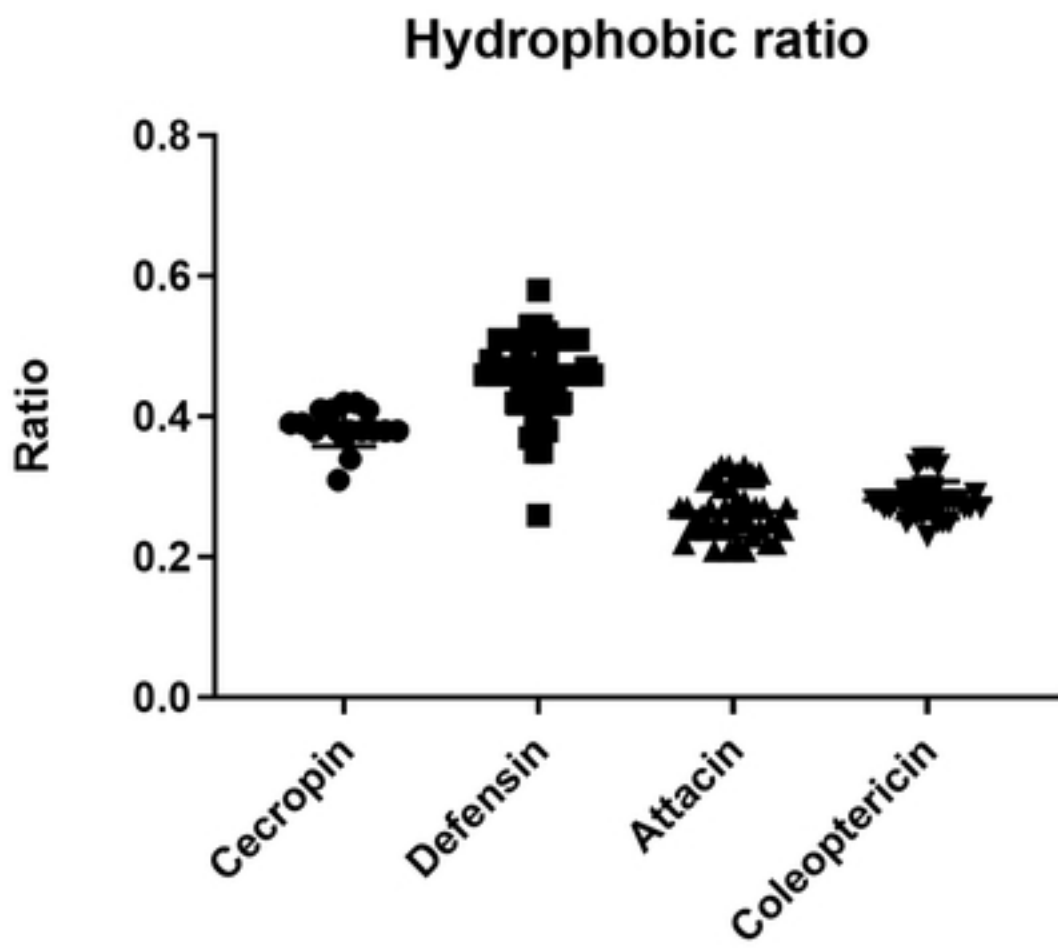
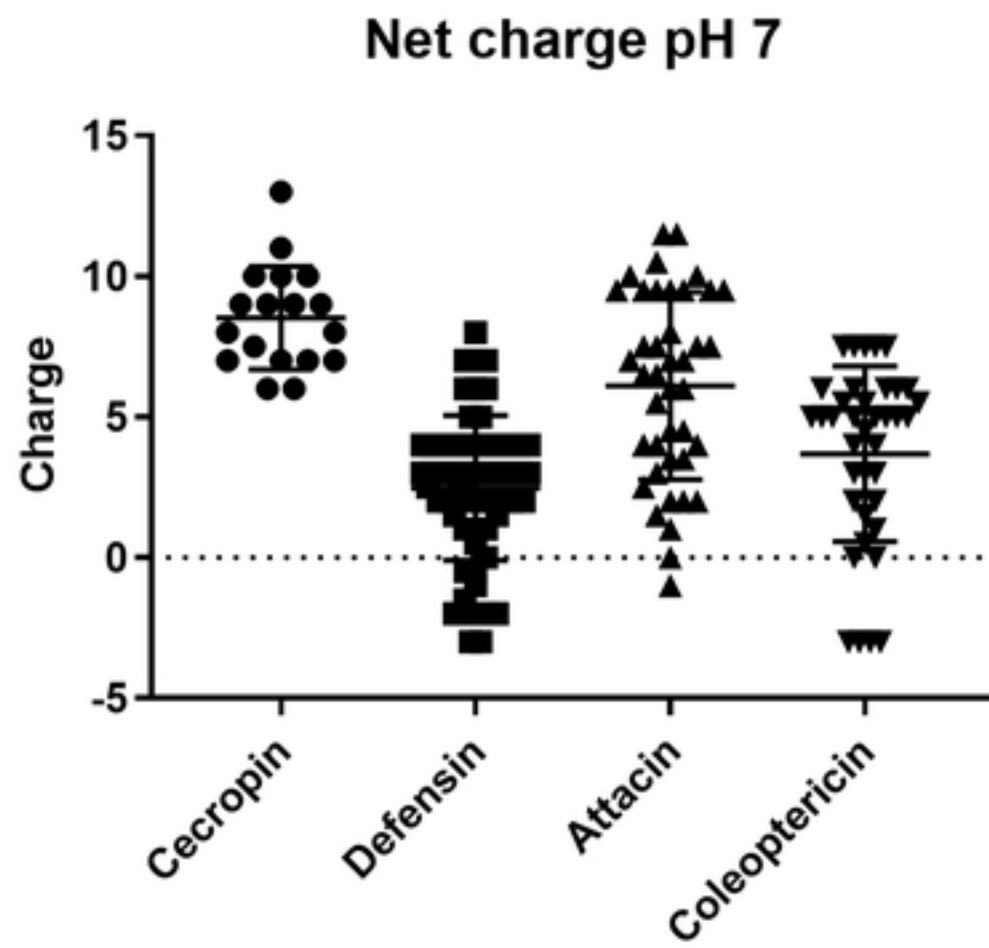


Figure 17



A.

B.



C.

D.

Figure 18

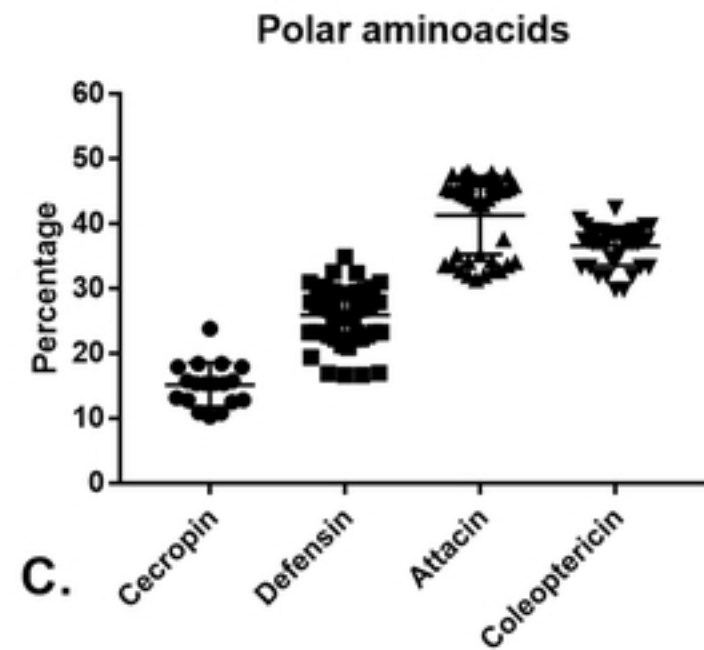
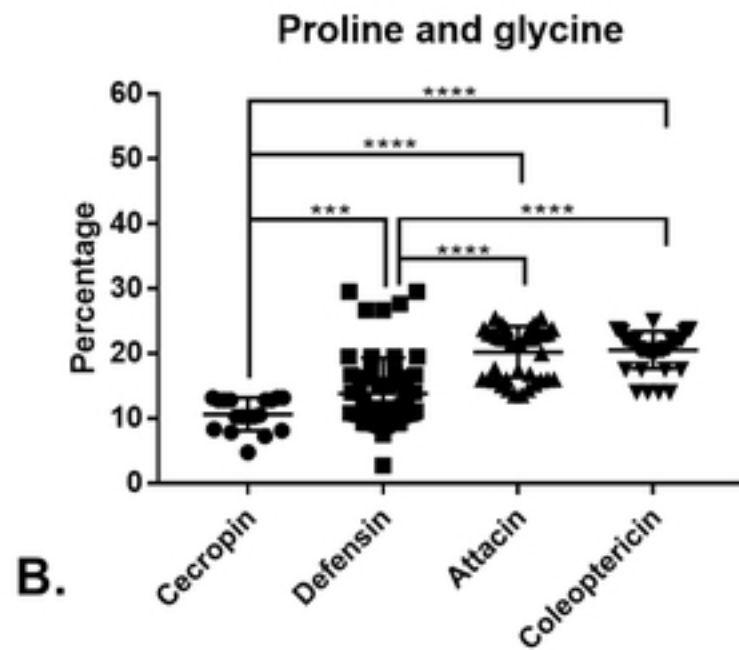
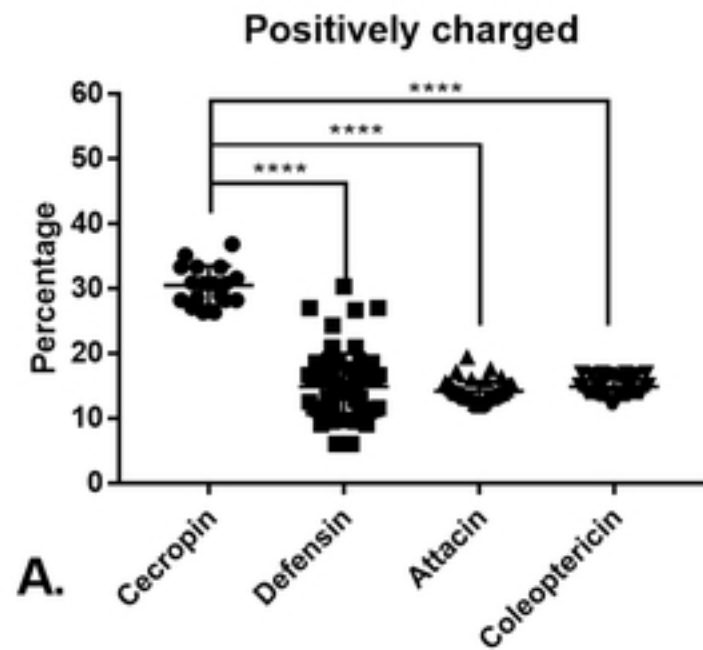


Figure 19

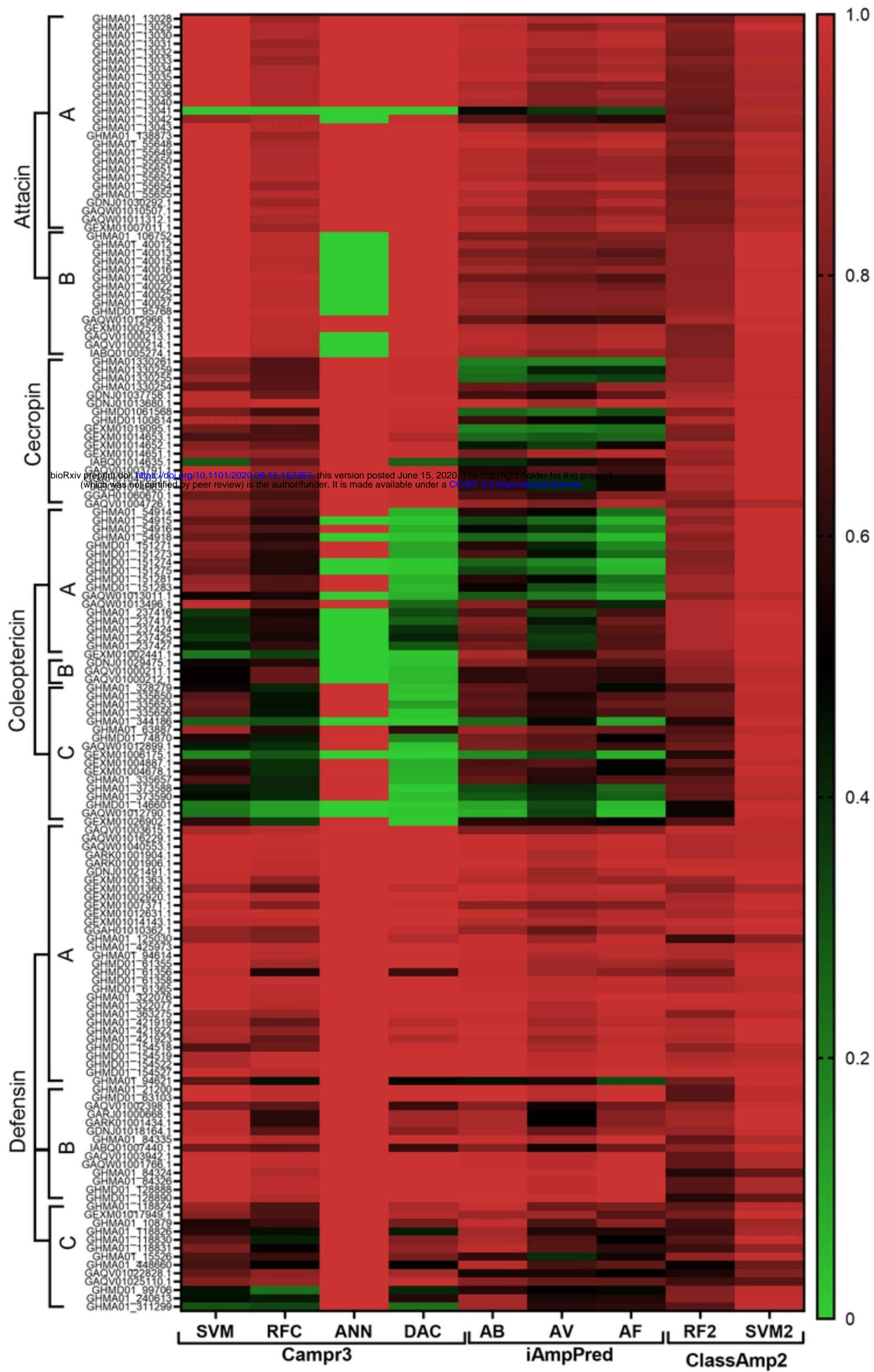


Figure 20

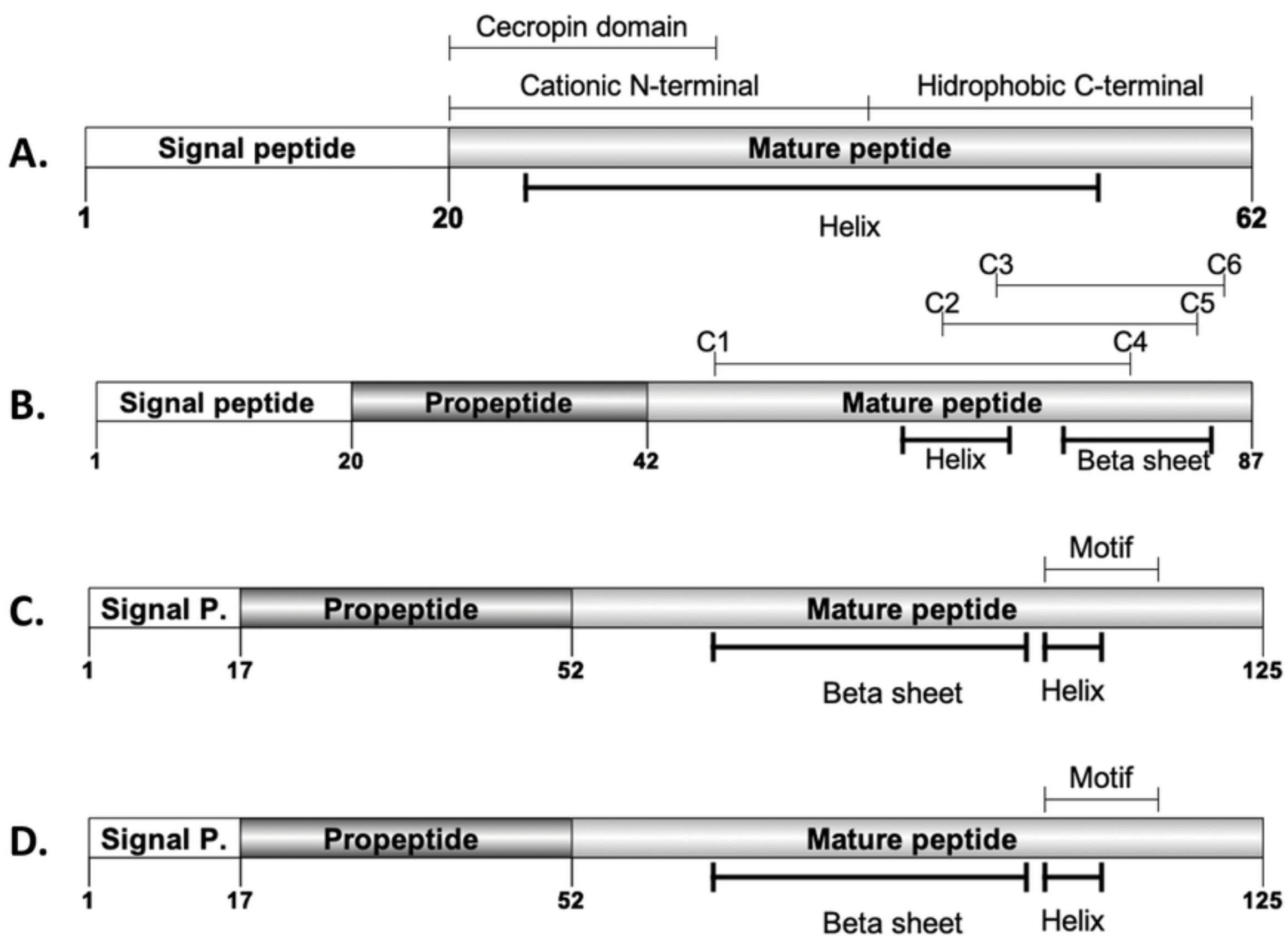


Figure 21