



Identificación y evaluación de la actividad antibacteriana de un péptido antimicrobiano del escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum*

Lily Johanna Toro Segovia

Estudiante

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
ARMENIA (QUINDÍO)
2014**

Identificación y evaluación de la actividad antibacteriana de un péptido antimicrobiano (PAM) del escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum*

Trabajo de grado presentado como prerrequisito para optar por el título de

**MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
Énfasis Microbiología y Medicina Tropical**

DIRECTOR

**Jhon Carlos Castaño Osorio. MD, MSc, PhD.
Universidad del Quindío**

CODIRECTOR

Germán Alberto Téllez Marín. MD

Grupo de Inmunología molecular

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
ARMENIA (QUINDÍO)**

2014

Los conceptos emitidos son responsabilidad del (de los) autor (es).

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y amor para las personas que hicieron parte de este proceso de formación tan importante y anhelado en mi vida.

Mamá y papá

AGRADECIMIENTOS

ENTES PATROCINADORES

Proyecto 654 “Producción y evaluación de la actividad citotóxica, antitumoral, cicatrizal y antimicrobiana de los péptidos de defensa del hospedero Lucilina y Lucifensina recombinantes in vitro e in vivo” - COLCIENCIAS

Maestría en Ciencias Biomédicas

Convocatoria interna 579 - Universidad del Quindío

Proyecto Jóvenes Investigadores e Innovadores, COLCIENCIAS año 2013- 2014 y 2014-2015.

DIRECTOR Y CODIRECTOR

Jhon Carlos Castaño Osorio y Germán Alberto Téllez Marín

AMIGOS

Julián Londoño por su apoyo y compañía.

Al grupo de inmunología molecular GYMOL y todos sus integrantes.

Integrantes del grupo de investigación en Parasitología molecular GEPAMOL.

Contenido

Identificación y evaluación de la actividad antibacteriana de un péptido antimicrobiano del escarabajo coprófago <i>Oxysternon conspicillatum</i>	1
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	12
2.1 Los péptidos antimicrobianos (PAMs).....	12
2.2 Cecropinas	14
2.3 Defensinas	15
2.4 Antibiótico-resistencia.....	16
2.5 Escarabajos Coprófagos	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
5. JUSTIFICACIÓN	20
6. OBJETIVOS	21
General.....	21
Específicos	21
7. METODOLOGÍA:.....	22
7.1 Obtención de los escarabajos, inducción de respuesta inmune y extracción de cuerpo graso.	22
7.2 Extracción de material genético	22
7.3 Secuenciamiento y análisis de los datos	22
7.4 Ensamblaje del transcriptoma.....	23
7.5 Identificación de las secuencias de péptidos en el transcriptoma	23
7.6 Construcción de árboles filogenéticos para la familia de las cecropinas y defensinas	24
7.7 RT-PCR para validación de blancos.	24
7.8 Análisis bioinformático de la Oxysterlina 1 y la Oxysfensina 1.	25
7.9 Oxysterlina 1	26
7.10 Oxysfensina 1.	30
7.11 IMPACTO AMBIENTAL (ASPECTOS BIOÉTICOS)	33
8. RESULTADOS	35
9. DISCUSIÓN	65
10. RECOMENDACIONES	68
11. CONCLUSIONES	69
12. PRESENTACIÓN EN CONGRESOS	70

13. BIBLIOGRAFIA71
14. Anexos.....77

RESUMEN

Dado el problema creciente de la resistencia bacteriana a los antibióticos tradicionales, es necesario buscar en la naturaleza nuevas estrategias y fuentes de sustancias con propiedades antibacterianas para el control de estos patógenos, una de las mejores alternativas es la búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica antimicrobiana con modelos de acción que no generen resistencia con facilidad. Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas que producen la mayoría de los seres vivos y lo hacen como defensa contra microorganismos patógenos. En los insectos se han descrito, caracterizado y sintetizado numerosos PAMs, con excelentes resultados en la actividad antimicrobiana, que se han postulado a candidatos potenciales para hacer frente a los microorganismos patógenos de importancia en salud pública. En este trabajo se identificaron dos secuencias de PAMs (**Oxysterlina 1** y **Oxysfensina 1**) derivadas del transcriptoma del escarabajo *Oxysternon conspicillatum*, se caracterizaron por identidad dentro de dos familias de péptidos (**cecropinas** y **defensinas**) respectivamente, se hizo el modelo estructural y se identificaron las características fisicoquímicas por métodos bioinformáticos; se evaluó la actividad citotóxica, antimicrobiana y hemolítica del péptido sintético Oxysterlina 1, la actividad antimicrobiana contra bacterias *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ESBL, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albican*, la actividad hemolítica sobre los eritrocitos humanos y citotóxica en células Vero (ATCC:CCL-81). Adicionalmente se evaluaron las condiciones de expresión de la Oxysfensina 1, se logró clonar en bacterias *E. coli* DH10B, expresar en bacterias *E. coli* BL21 y purificar parcialmente utilizando un buffer de elusión con 500mM de Imidazol.

Se encontró actividad antibacteriana del péptido sintético Oxysterlina 1 frente a *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ESBL, *Salmonella typhi* (MIC 6,25 µg/mL) y *Enterobacter cloacae* (MIC 12,5 µg/mL). No se encontró actividad frente a *S.epidermidis* ni frente a *Candida albicans*. Se observó una hemólisis mínima en algunas de las concentraciones evaluadas, la cual no supero el 20% de hemólisis. Se encontró actividad citotóxica en células vero a una concentración del 2000µg/mL y se halló un índice terapéutico in vitro de 320. Según la curva tiempo muerte se encontró una actividad bactericida dependiente de la concentración.

De la Oxysfensina 1, se logró establecer las condiciones de expresión (30°C, 20 horas post-inducción y 0,1mM de IPTG) y se logró purificar parcialmente, obteniendo una concentración máxima (lectura A280) de 0,137 mg/mL. La Oxysterlina 1 podría ser un potencial antibiótico contra bacterias Gram negativas dada su alto índice terapéutico, actividad bactericida y presencia de una estructura y mecanismos de acción diferentes a los antibióticos convencionales. Los resultados de actividad del péptido sintético Oxysterlina

1 demuestran la promisorio utilidad de estos péptidos para el control de patógenos que puedan aportar al futuro desarrollo de nuevas estrategias de control.

1. INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de la terapia antibiótica para el control de infecciones, así como la disminución en la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos activos contra estos microorganismos resistentes, están llevando a una crisis de salud pública (Andersson, 2010). En los últimos 40 años sólo tres nuevas clases de antibióticos estructurales se han introducido en la práctica médica (oxazolidinonas, estreptograminas y el lipopéptido daptomicina) (Jacqueline, 2004) (Cabrera, 2007) (Cabrera., 2011).

Este problema nos muestra la necesidad cada vez más urgente de buscar estrategias diferentes que contemplen la búsqueda de nuevos agentes con actividad biológica antimicrobiana y modelos de acción diferentes. Se ha reportado los PAMs, que hacen parte del sistema de defensa de prácticamente todas las formas de vida y que tienen propiedades bactericidas, fungicidas y citolíticas, además de propiedades inmunomoduladoras (Marshall, 2003) (Arenas, 2009). La ventaja de los PAMs como estrategias de control de patógenos es que, dada la relativa inespecificidad de su mecanismo, no es fácil para los patógenos desarrollar mutantes resistentes, ya que esto requeriría cambios sustanciales en la composición lipídica de sus membranas celulares (Chen, 2005) (Nizet, 2006). Adicionalmente, los PAMs han co-evolucionado con los microorganismos a lo largo de millones de años, lo cual se debe principalmente a su mecanismo de acción (Yeaman, 2003).

Además de la búsqueda de PAMs en una gran variedad de organismos vivos, los insectos se han convertido en un importante grupo de estudio de estas moléculas efectoras, por ejemplo las cecropinas fueron encontradas inicialmente en la hemolinfa de insectos, su tamaño oscila entre 3 y 4 kDa, tienen actividad frente a bacterias, no presentan citotoxicidad y son susceptibles a proteasas (Marshall, 2003), (Díaz, 2011). Los insectos no tienen inmunidad adaptativa, pero en su lugar tienen una sofisticada inmunidad innata que consiste de respuesta inmune humoral y celular. La respuesta inmune celular como la fagocitosis, encapsulación y nodulación mediada por hemocitos (Lavine, 2002). La respuesta inmune humoral está representada por melanización con fenoloxidasas (Cerenius, 2008), producción de especies reactivas de Oxígeno (Nappi, 2002) y producción de PAMs (Butel, 1999) (Hultmark, 2003). Los PAMs son las principales proteínas de defensa del huésped contra la invasión por microorganismos patógenos, como las bacterias, micoplasmas y hongos (Imler, 2005.). Estos PAMs se han diferenciado como blancos específicos contra microorganismos patógenos – por ejemplo, los PAMs de *Drosophila melanogaster* han sido caracterizados dentro de tres grupos específicos basado en su mayor blanco biológico: 1. Defensinas, las cuales actúan contra bacterias Gram

positivas. 2. Dipericinas, Atacinas y Cecropinas contra bacterias Gram negativas y 3. Drosomisinas y metchnikowinas activos contra hongos (Lemaitre, 1996).

Dentro de los insectos, los coleópteros han sido usados para estudios bioquímicos de la inmunidad innata de invertebrados, la razón principal para usar escarabajos como un sistema modelo, es porque se pueden extraer grandes cantidades de hemolinfa para estos estudios (Ji-Won Park, 2010), se han identificado tres PAMs en *T. molitor*, Tenecin 1, 2 y 3 (Moon, 1994) (Roh, 2009) (Lee, 1996). Defensinas, Coleopterinas, Cecropinas y péptidos antifúngicos han sido aislados a partir de coleópteros y han sido caracterizados bioquímicamente (Barbault, 2003) (Bulet, 1991). El presente trabajo tuvo como objetivo principal identificar secuencias de PAMs en el transcriptoma del escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum*, caracterizar sus perfiles por alineamiento con otras secuencias, modelamiento de su estructura terciaria y características fisicoquímicas identificadas bioinformáticamente, evaluar la actividad antimicrobiana de un péptido sintético (Oxysterlina 1) y determinar las condiciones de expresión de un péptido recombinante (Oxysfensina 1). Cabe resaltar que la propuesta es innovadora, en el contexto de la investigación de PAMs derivados de un escarabajo coprófago, ya que hasta la fecha no hay publicaciones de este tipo, por lo que es importante estudiar más sobre este tema y poder desarrollar nuevas estrategias para intentar mitigar la problemática de microorganismos resistentes a antibióticos.

2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.1 LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMS)

Los organismos vivos se encuentran constantemente expuestos a infecciones microbianas y patógenos, para defenderse de este tipo de amenazas han desarrollado mecanismos de defensa que conforman el sistema inmune tanto innato como adaptativo. A diferencia de los organismos vertebrados los invertebrados solo cuentan con el sistema innato y como parte de éste se encuentra la producción de sustancias antimicrobianas, éstas son principalmente péptidos o polipéptidos, que en su mayoría contiene menos de 200 aminoácidos y son producidos en diferentes tipos de células y secreciones (Ortega-Rubio, 1994). Dependiendo del organismo, están presentes de forma constitutiva o inducibles en el momento de la infección (Hancock, 2000).

Fue hace aproximadamente 20 años que se vio que la linfa de los insectos, los gránulos de los neutrófilos humanos y la piel de las ranas contenían péptidos que podían matar bacterias en cultivo, desde entonces se han observado más de 600 péptidos catiónicos en casi todas las especies incluyendo bacterias, hongos, insectos, tunicados, anfibios, crustáceos, aves, peces, mamíferos y humanos. Estos son referidos como péptidos catiónicos antimicrobianos, que además de la habilidad de matar microorganismos directamente, estas sustancias parecen capaces de reclutar y promover otros elementos de la inmunidad, particularmente de la inmunidad innata (Scott, 2000).

Los PAMs son estructuras de aminoácidos unidas por enlaces covalentes, su tamaño aproximado oscila generalmente entre 12-50 aminoácidos y tienen una masa molecular menor de 10000. Estos péptidos son anfipáticos, lo cual significa que poseen una región hidrofóbica, cargada positivamente que interactúa con lípidos y una región hidrofílica o residuos cargados negativamente, que interactúa con el agua (Hancock R. , 2001) (Wang, 2010) (Ganz T. , 2001). Estas características permiten a los péptidos interactuar mejor con membranas que están compuestas de moléculas anfipáticas, especialmente con membranas de bacterias cargadas negativamente (Hancock R. , 2001).

Uno de los primeros péptidos evaluados frente a varias cepas bacterianas y con una actividad antimicrobiana importante fueron las maganinas producidas por anfibios (Zaslouff, 1987) (Gutierrez, 2003) de ahí en adelante otros PAMs fueron encontrados y estudiados, entre ellos las cecropinas y las defensinas de insectos y humanos respectivamente, con acción frente a diferentes tipos de bacterias y hongos (Daher, 1986) (Gudmundsson, 1991)

La mayoría de los PAMs son catiónicos, lo que significa que tienen una carga positiva a un pH fisiológico debido a la presencia de altos contenidos de arginina y lisina (residuos cargados positivamente) sobre ácido aspártico y ácido glutámico (residuos cargados negativamente). Además este carácter catiónico puede ser reforzado por una amidación en el extremo C terminal (Hancock., 2006). Aunque su carácter catiónico asociado con su tendencia a ser anfipáticos facilitan su interacción e inserción en las paredes celulares aniónicas y membranas de fosfolípidos de microorganismos, se han propuesto varios mecanismos que explican su modo de acción, tales como: Autopromotores de captación, mecanismo detergente sobre la membrana celular y mecanismo de poro sobre la membrana celular (Téllez G. A & Castaño J.C., 2010).

Se han publicado numerosas clasificaciones de PAMs teniendo en cuenta el organismo donde se producen, familia a la que pertenece, función, tropismo, mecanismos de acción, entre otras. Una de las clasificaciones más utilizadas es la conformación estructural; la cual depende de la secuencia de aminoácidos, las más comunes son las hélices α y láminas β como las cecropinas y las defensinas respectivamente (Wimley, 2010). La mayoría de los PAMs están dentro de la conformación de hélices α , un ejemplo de estos son las Cecropinas, la principal familia de PAMs producidos por insectos (Tamang & Saier, 2006) (Steiner & Andreu, 1988), tienen bajo peso molecular, son solubles en agua y poseen un amplio espectro de actividad antibacteriana, y en algunos casos son incapaces de lisar las células eucariotas (Tamang & Saier, 2006), (Holak & Engstrom, 1988). Los PAMs con conformación de láminas β , regularmente tienen un peso entre 2 y 8 kDa, estos péptidos están conformados por cadenas dispuestas en forma antiparalela unidas uno o varios puentes disulfuro que permiten formar una estructura estable importante en su actividad antimicrobiana (Yount., 2003).

Dentro de las características necesarias para la actividad antimicrobiana están, el tamaño, los residuos por los que están compuestos y su organización, la tendencia a formar una estructura secundaria determinada (hélices α o láminas β), la carga, que normalmente es positiva, la anfipaticidad, entre otros (Zelezetsky, 2006). Estas características no son independientes, no basta con que una molécula tenga una sola de ellas para tener una excelente actividad, es importante que agrupe varias y en una proporción adecuada para mantener un equilibrio entre alta capacidad antimicrobiana y baja toxicidad, por lo general la atracción de alguno de estos aspectos lleva a efectos adversos (Yount., 2003) (Takahashi, 2010).

2.2 CECROPINAS

Las cecropinas son una familia de PAMs básicos producidos por insectos, fueron unos de los primeros PAMs identificados (Tamang, 2006), (Steiner, 1988). Inicialmente aislados de la polilla de seda *Hyalophora cecropia* (Steiner., 1981). Han sido identificados en insectos del orden Lepidoptera, Diptera y Coleopteros, recibiendo diferentes nombres como sarcotoxin-1 (Okada M, 1985), (Kim SR, 2010), stomoxyn (Boulanger N, 2002b), (Landon C., 2006), hinnavin (Yoe S, 2006), entre otros.

La familia de las cecropinas contiene de 31 a 39 aminoácidos con un dominio N Terminal anfipáticos y un dominio hidrofóbico C Terminal, poseen una amplia actividad antimicrobiana prácticamente contra todas las bacterias Gram-negativas y algunas Gram-positivas. Pero curiosamente son relativamente inactivos contra *Staphylococcus aureus*. Estas moléculas muestran una buena actividad contra protozoos parásitos como *Plasmodium falciparum* (Andreu et al., 1992), (Boman., 1989) y *Leishmania* (Chicharro, 2001), levaduras como *Candida albicans*. También han mostrado una buena actividad in vitro frente a varias líneas celulares de tumores (Shin., 1999), (Chen., 1997). Las cecropinas muestran una baja toxicidad frente a células eucariotas normales y una actividad hemolítica relativamente débil. En un modelo de sepsis bacteriana por Gram negativos en rata, el tratamiento con cecropina B sola o en combinación con beta-lactámicos redujo significativamente los niveles plasmáticos de factor de necrosis tumoral alfa y endotoxinas, disminuyó la carga infecciosa y mejoró la supervivencia (Ghiselli, 2004).

Análogos de la cecropinas han sido aisladas de una variedad de especies de insectos y también se han hallado en mamíferos. Numerosos análogos sintéticos de la cecropinas naturales han sido usados para elucidar la relación secuencia – actividad. La sustitución de los residuos de prolina en el dominio N terminal disminuye significativamente la actividad, indicando la importancia de la alfa hélice anfipática (Andreu., 1985). Un residuo aromático conservado en la posición 2 es esencial para una actividad antimicrobiana completa, siendo los análogos que contienen el triptofano nativo más activos que los que contienen fenilalanina (Ramirez, 2007). Estudios usando un constructor modular indican que la organización general de una hélice N - Terminal anfipática conectada a una hélice hidrofóbica C - Terminal por una región de bisagra flexible es requerida para una fuerte actividad antimicrobiana de amplio espectro (Fink, 1989).

2.3 DEFENSINAS

Las defensinas han sido encontradas en una gran variedad de animales y plantas e incluso en el hongo *Pseudoplectania nigrella*, lo que sugiere un papel evolutivamente conservado en la inmunidad innata y que puede haber surgido a partir de un gen ancestral común (Mygind PH, 2005). Las defensinas son PAMs pequeños (~4kD) con seis residuos conservados de cisteínas que forman tres puentes disulfuro dentro de la molécula. Basados en su estructura pueden estar clasificadas dentro de tres familias: “Defensinas clásicas”, beta- defensinas y defensinas de insectos (Ganz T, 1994). Hay diversas revisiones sobre defensinas, incluyendo defensinas de la inmunidad innata de vertebrados (Ding J, 2009), (Jarczak J, 2013), (Lehrer RI, 2012), (Wilson SS, 2013), (Zhao., 2014), defensinas de plantas (Carvalho Ade O, 2011), modelos de acción y estructuras de defensinas de diferentes reinos (Wilmes M, 2011), modelo de acción de plantas, insectos y humanos en respuesta antifúngica (Aerts AM, 2008).

Las defensinas de insectos son péptidos catiónicos de 34-51 residuos de aminoácidos con seis cisteínas conservadas. Estos péptidos han sido identificados en el orden *Diptera*, *Hymenoptera*, *Hemiptera*, *Coleoptera* y *Lepidoptera*, pero también están presentes en insectos ancestrales del orden Odonata (Bulet, 1991), sugiriendo que las defensinas de insectos pueden derivar de un gen ancestral común. La estructura de las defensinas de insectos está compuesta de un bucle N-terminal, una hélice alfa seguida por una lámina β antiparalela (Bonmatin JM, 1992), (Cornet B, 1995), (Hanzawa H, 1990). Las hélices alfa y láminas β están unidas por dos enlaces disulfuro intramoleculares formando una estructura de “hélices α , laminas β y cisteínas estable” o una estructura “bucle- hélice α y lamina β ” (Cornet B B. J., 1995). Los motivos de cisteínas han sido conservados en otras defensinas de insectos como tenecin1 y heliomycin (Lamberty M, 2001), (Lee KH, 1998) y también están presentes en péptidos anti-fúngicos como drosomicin de *D. melanogaster* (Landon C, 1997) y en el PAM termicin de la termita *Pseudacanthotermes spiniger* (Da Silva P, 2003).

2.4 ANTIBIÓTICO-RESISTENCIA.

Desde la introducción en la medicina de los antibióticos, estos han tenido un impacto enorme en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y en el éxito de procedimientos invasivos como la cirugía y quimioterapia. Sin embargo el advenimiento de la antibiótico-resistencia amenaza con revertir este progreso (Waterer, 2001). La prevalencia creciente de patógenos resistentes a múltiples medicamentos es una gran amenaza al sistema de salud mundial. Fue así como en 2003 en Estados Unidos, cerca del 57% de las infecciones por *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a múltiples antibióticos, y hay una resistencia emergente a la Vancomicina (Levy, 1998), (Willems, 2005), una droga considerada generalmente como última línea de defensa en el tratamiento antimicrobiano. La distribución de estos patógenos a nivel mundial y de Colombia varía entre el 2 y 37% y se está incrementando a pesar de los intentos de control por las entidades de salud de cada país. *S. aureus* MR es el patógeno con las frecuencias de resistencia más altas reportadas y se distribuye no solo a nivel hospitalario sino también en la comunidad, tanto rural como urbana (Cabrera., 2011)

Entre los factores que favorecen la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, esta principalmente el uso inadecuado por los humanos. Son varias las publicaciones en las que se describen los daños ambientales y en la salud humana debido al uso irracional de los antibióticos, iniciando con la contaminación de las fuentes de agua, la cual, puede ser consumida directamente por humanos y animales o ser utilizada para el riego de cultivos de vegetales que luego son consumidos también por humanos y animales. Adicionalmente los humanos consumimos productos derivados de animales como carne o leche que presentan también altas concentraciones de estos fármacos (Tenover, 2006), (Davies, 2010), (Andersson & Hughes, 2012). Por otro lado, los humanos contaminamos con nuestra orina fuentes de agua teniendo en cuenta que entre el 20 y el 90%, dependiendo del antibiótico, se excretan por la orina aun en forma activa (Andersson & Hughes, 2012). Todo esto genera un ambiente con alta presión selectiva, donde las bacterias están en contacto permanente con diferentes concentraciones de diferentes antibióticos, lo que conlleva a que activen y desarrollen mecanismos de resistencia (Cabrera, 2007).

Los agentes anti-microbianos se clasifican según la forma de acción, de la siguiente forma; inhibición de la síntesis de la pared bacteriana (β - lactámicos y glicopéptidos), inhibición de la síntesis de proteínas (macrolidos y tetraciclinas), interferencia con la síntesis de los ácidos nucleicos (fluoroquinolonas y rifampicinas), inhibición de rutas metabólicas (trimetoprim-sulfametoxazole) y daño de la estructura de la membrana bacteriana (polimixinas y daptomicina) (Tenover, 2006). Desafortunadamente estos antibióticos tienen rangos de acción restringidos y cierto grado de toxicidad, lo que limita su impacto. Por lo

tanto es importante considerar nuevas clases de antibióticos con estructuras diferentes a los desarrollados hasta el momento para evitar la generación de resistencia cruzada por mecanismos hasta ahora evidenciados en las bacterias. Una de las fuentes de estos nuevos antibióticos son los PAMs (Hancock, 2000).

2.5 ESCARABAJOS COPRÓFAGOS

Los llamados escarabajos coprófagos o estercoleros, son uno de los grupos tropicales más característicos del Orden Coleóptera. Estos insectos pertenecen a la familia *Scarabaeidae*, subfamilia *Scarabaeinae* (Morón, 2004). La denominación de este grupo se debe a que el ciclo de vida de la mayoría de las especies, depende del excremento de vertebrados, principalmente mamíferos (Halffter, 1982).

Los escarabajos del estiércol, conocidos también como rodacacas, caqueros o peloteros, son llamados así porque tanto los adultos como los individuos en desarrollo se alimentan de excrementos de grandes herbívoros, como las vacas. Los que viven en los pastizales ganaderos encuentran su alimento más fácilmente, ahí la mayoría de ellos ayuda a limpiar el pasto al enterrar el estiércol y usarlo para alimentarse y reproducirse. Los escarabajos del estiércol adultos se alimentan de la suspensión líquida del excremento que contiene microorganismos como bacterias y hongos, mientras que las larvas comen los restos sólidos de las plantas que no fueron digeridas por las vacas (Magdalena Cruz R, 2011).

Estos escarabajos son un grupo importante de la comunidad de insectos en los bosques Neotropicales. A nivel mundial se conocen 16 tribus, distribuidas en 266 géneros y aproximadamente 6000 especies de escarabajos coprófagos, para el neotrópico se conocen 1300 especies y 70 géneros y para Colombia en el 2001, se reportan 283 especies y 35 géneros (Medina., 2001), sin embargo se han reportado diferentes números de especies y géneros a través del tiempo (Vaz de Mello, 2011) (Escobar, 2000) (Pulido, 2007). De esta forma los Andes concentran cerca del 45.6% y 65.7% de las especies y géneros reconocidos para el país respectivamente (Medina., 2001).

A pesar de existir un listado regional para los Andes Colombianos, se ha detectado un alto grado de incertidumbre e incoherencia taxonómica dentro y entre listados de especies de escarabajos coprófagos obtenidos en diferentes localidades Andinas (Cultid, 2008). En Colombia, se presenta el mayor número de especies en las regiones biogeográficas de la Amazonía y la Orinoquía, con 40 y 70 especies por localidad, en contraste con la baja riqueza de especies en los bosques de alta montaña (Medina, 2002).

El estudio de los escarabajos coprófagos ha sido rezagado casi que exclusivamente a su importancia como grupo indicador de perturbación antrópica (Nichols, 2007) y por tanto

como grupo biológico de interés para el estudio y conservación de la biodiversidad, también han sido estudiados desde un punto de vista taxonómico, ecológico y de estructura de comunidades ((Escobar, 2000.), (Martín, 1996), (Medina ., 1996) , (Pardo, 1997) , (Amézquita., 1999) , (Escobar, 2000), (Medina., 2001), (Galeano, 2000)).

Los escarabajos de la subfamilia *Scarabaeinae*, grupo de interés en este proyecto, conforman un gremio importante de organismos involucrados en el control de parásitos de vertebrados, ciclado de nutrientes, dispersión de semillas y en los procesos de conservación de la estructura del suelo; como consecuencia del proceso de enterramiento del excremento (Bornemissza, 1970), (McKinney, 1975.), (Fincher, 1981). Dentro de esta familia se incluye el género *Oxysternon*, el cual, está caracterizado por su habitad de excavación y cuerpo robusto. A nivel taxonómico son determinados por el Escutelo completamente cubierto por los élitros, tibias medias y posteriores engrosadas apicalmente, cortas y triangulares; primer segmento de la masa antenal cóncavo, recibiendo completamente los otros segmentos y borde anterior del metaesternon prolongado en forma de espina larga y aguda, extendiéndose entre las coxas anteriores. Estos son partes de los caracteres definidos por Medina & Lopera 2001 (Medina., 2001) diagnosticados como sinapomorficos, que define el género como un grupo monofilético (Cuadrado. R., 2014). El género incluye 11 especies dividido dentro de dos subgéneros, *Oxysternon* y *Mioxysternon*. Este género está restringido a América y su distribución esta entre el Norte del trópico de capricornio y el Este de los Andes; pero la distribución entre las especies del subgénero *Oxysternon* es diferente, *O. conspicillatum* y *O. silenius* se han localizado en la región Sur de América Central y la región Amazónica respectivamente; *O. festivum* se ha encontrado en el Norte del Amazonas desde el este de Venezuela hasta el Noroeste de Brasil (Edmonds W. &., 2004), (SIB, 2014).

Estudios de este género a nivel molecular son pocos; para el año 2013 se reporta un análisis filogenético de cuatro especies neotropicales del genero *Oxysternon*, (*O. conspicillatum*, *O. festivum*, *O. silenius* and *O. durantoni*), basados en marcadores moleculares como Citocromo Oxidasa I (COI) y ribosomal 28S, en el cual la secuenciación parcial del marcador ribosomal 28S da un nuevo valor a las relaciones filogenéticas entre *O. conspicillatum*, *O. durantoni*, *O. festivum* y *O. silenius*, especies del sub-género *Oxysternon*, coincidiendo con las agrupaciones hechas por Edmonds (Edmonds, 2004) sobre la base de caracteres morfológicos, concordando con la estrecha relación encontrada entre *O. conspicillatum* y *O. silenius* probablemente por su distribución similar (Cuadrado, 2014). (Anexo 4).

Basados en esta clasificación y distribución del sub-género *Oxysternon* se determinó trabajar con la especie *Oxysternon conspicillatum*, la cual es la más distinguida a nivel poblacional en la región del eje cafetero, además de ser un espécimen a partir del cual se pueden extraer grandes cantidades de cuerpo graso para el secuenciamiento del

transcriptoma. No existe ningún reporte sobre la determinación de la presencia de PAMs en estos insectos ni en Colombia ni en el mundo. Solo se ha reportado la presencia de PAMs en algunos coleópteros, incluido el Gorgojo castaño de la harina. Orden: *Coleoptera*, Familia: *Tenebrionidae*. Utilizando la metodología de hibridación de supresión sustractiva o SSH (del inglés suppression subtractive hybridization) para determinar genes que son transcripcionalmente inducidos en respuesta a una inyección de Lipopolisacaridos (LPS). Determinaron genes codificantes para secuencias de proteínas similares a otras secuencias conocidas de insectos que tuvieran un potente efecto antimicrobiano (ferritina, inhibidores de serín proteasas y defensinas), logrando producir thaumatin-1 recombinante, en bacterias, un PAM con actividad contra hongos filamentosos (Altincicek, 2007).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El fenómeno de la antibiótico-resistencia es un problema creciente a nivel mundial que representa altos costos al sistema de salud y también afecta la salud animal. La urgencia de investigación de nuevas sustancias para combatir la antibiótico-resistencia hace necesario la búsqueda de estrategias terapéuticas de amplio espectro y poco tóxicos; alternativas con actividad antimicrobiana que no dependan de los mecanismos de acción de los antibióticos convencionales.

Los péptidos antimicrobianos (PAMs), son sustancias con un gran potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos al tener un amplio espectro de acción sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas, protozoos, hongos, virus e incluso se ha visto actividad sobre algunas líneas celulares de tumores, además de tener una estructura química y mecanismos de acción diferentes a las sustancias actualmente utilizadas en el campo biomédico minimizando el riesgo de resistencia cruzada por mecanismos ya desarrollados y diseminados en las bacterias (Marr, 2006). Se ha demostrado la presencia de estos péptidos en muchos organismos, estos PAMs se han descubierto como moléculas efectoras de la respuesta inmune inespecífica.

La búsqueda de estos compuestos en insectos pertenecientes a la familia *Scarabidae* es poca a pesar de la gran diversidad biológica en esta familia, específicamente en los escarabajos coprófagos como *O. conspiciatum* que son capaces de sobrevivir, alimentarse y reproducirse en un ambiente microbiológico absolutamente hostil para el ser humano.

Dado el ambiente microbiológico en el que se encuentra el escarabajo estos han desarrollado una estrategia de adaptación que les permite sobrevivir eficientemente; al depender este grupo de insectos de una respuesta inmune inespecífica y al ser los PAMs efectores de esta respuesta, creemos que es posible identificar péptidos de interés

biomédico en este grupo diverso y poco estudiado a nivel molecular.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿*Oxysternon conspicillatum* expresa PAMs que sean activos contra microorganismos patógenos con multi-drogo resistencia?

5. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de este proyecto de investigación es un aporte en la búsqueda de nuevos PAMs que puedan ayudar a contrarrestar el problema de la antibiótico-resistencia. Buscando nuevos PAMs en el escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum*, una especie que en la actualidad no tiene ningún reporte relacionado y por sus características biológicas nos puede ofrecer alternativas interesantes.

En este proyecto se identificó secuencias pertenecientes a PAMs y a través de la metodología implementada se generó nueva información a nivel genético del escarabajo, esto se logró al haber secuenciado el transcriptoma y al haber usado un único escarabajo para extraer esta información se hizo una explotación racional de los recursos naturales y se apoyó la investigación en estos individuos la cual ha sido rezagada exclusivamente a la importancia ecológica.

En este trabajo solo se estudió una especie de escarabajos coprófagos, con lo cual pudimos identificar dos secuencias de PAMs; esto permite deducir que hay mucha riqueza de péptidos en la gran diversidad de especies de escarabajos que tenemos, específicamente en el eje cafetero.

Finalmente la investigación en estas sustancias pertenecientes a las dos familias más estudiadas de PAMs (cecropina y defensinas) en este escarabajo prevalente en el departamento del Quindío, permitió avanzar en la comprensión de los mecanismos antimicrobianos desarrollados por estos coleópteros y empezar a determinar la utilidad de estos para hacer frente al problema de la antibiótico-resistencia

6. OBJETIVOS

GENERAL

Clonar, expresar, purificar y evaluar la actividad antibacteriana, hemolítica y citotóxica de un PAM del escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum*.

ESPECÍFICOS

- Identificar secuencias de PAMs putativos a partir del transcriptoma del escarabajo *Oxysternon conspicillatum*.
- Clonar, expresar y purificar un PAM del escarabajo *Oxysternon conspicillatum*.
- Evaluar la actividad antibacteriana, hemolítica y citotóxica de un PAM del escarabajo *Oxysternon conspicillatum*.

7. METODOLOGÍA:

7.1 OBTENCIÓN DE LOS ESCARABAJOS, INDUCCIÓN DE RESPUESTA INMUNE Y EXTRACCIÓN DE CUERPO GRASO.

Se realizó la colecta de 3 escarabajos adultos del género *Oxysternon*, utilizando trampas de caída con cebo, en el corregimiento de pueblo Tapao del municipio de Montenegro, Quindío, coordenadas 4°30'39.0"N y 75°47'12.0"W. La identificación de los escarabajos se hizo con la clave taxonómica de (Weber F., 1801) modificada por Medina y Lopera, 2001 (Cultid Carlos A, 2001). Los escarabajos se mantuvieron en acuarios de vidrio con tierra y comida. La respuesta inmune se indujo inoculando con una jeringa hipodérmica de 26G en el mesotórax 10µL de *E. coli DH10B* en una escala de McFarland de 3, fijadas en formalina al 10% y suspendidas en PBS; a las 18 horas se realizó extracción del cuerpo graso y se guardó a -80°C para su posterior utilización.

7.2 EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO

Para la extracción del material genético se utilizó el kit de extracción de ARN PureLink® RNA Mini Kit, (catalog numbers: 12183018A, Ambion, Life Technologies); siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN extraído se cuantificó por espectrofotometría a 260/280nm en el espectrofotómetro EPOCH (Biotek) en placa take3 y la integridad se evaluó por electroforesis en gel de Agarosa.

7.3 SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

A partir del ARN total fue secuenciado el transcriptoma, contratando los servicios de Axseq Technologies Inc, en una plataforma Illumina HiSeq2000/2500, con una metodología de secuenciamiento Paired End Sequencing con una longitud de lecturas de 101pb (Read length 101 pb).

El procedimiento llevado a cabo inicio con la purificación de las moléculas poli A del ARNm utilizando perlas magnéticas unidas a un oligo poli-T, después de la purificación se realizó fragmentación del ARNm utilizando cationes divalentes bajo condiciones de temperatura elevada. Los fragmentos de ARNm fueron pasados a ADNc utilizando una transcriptasa reversa, para la construcción de la librería de ADNc, estos fragmentos fueron sometidos a una reparación final con adición de unos adaptadores a los extremos del ADNc,

preparándolo para la hibridación en las celdas. Para enriquecer los fragmentos de ADNc se utiliza el procedimiento de PCR, la cual se realiza con un coctel de cebadores que hibrida con los extremos de los adaptadores y finalmente hace un procedimiento de control de calidad de la librería y la cuantificación de las plantillas de la biblioteca de ADN.

El secuenciamiento se hace por amplificación por “puente”, en donde una celda de flujo que contiene millones de grupos únicos de ADNc se carga en el HiSeq2000 para correr los ciclos automatizados de extensión y formación de imágenes. Este secuenciamiento utiliza cuatro nucleótidos con propiedades de terminación y de fluoroforo reversible. Cada ciclo de secuenciación utiliza los cuatro nucleótidos que conducen a una mayor precisión que los métodos donde solo uno de los nucleótidos está presente en la mezcla de la reacción a la vez. Este ciclo se repite una vez al mismo tiempo, generando una serie de imágenes, donde cada una representa una única coordenada específica en la celda de flujo. La cual va a corresponder a un cluster específico.

7.4 ENSAMBLAJE DEL TRANSCRIPTOMA

El análisis de los datos fue realizado con el programa Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>), para la reconstrucción de *novo* a partir de los datos de RNA-seq, para la cuantificación de la abundancia de los transcritos se utilizó el software RSEM. Para la ontología genética se utilizó BlastX y GO en donde se comparó los seis marcos de lectura de todos los contigs del transcriptoma contra las proteínas descritas en las bases de datos. Definiendo el porcentaje del transcriptoma con una función biológica, componente celular y función molecular.

7.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE PÉPTIDOS EN EL TRANSCRIPTOMA

El análisis de los datos fue realizado con Blasttx (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), y Blast2GO (<https://www.blast2go.com/b2ghome>).

7.6 CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS PARA LA FAMILIA DE LAS CECROPINAS Y DEFENSINAS

Para la generación de un grupo de secuencias se realizó Blastp y tblastx usando las secuencias de las Oxysterlinas y las Oxysfensinas identificadas en el transcriptoma y se tomaron las secuencias que presentaron mayor identidad que correspondieran a PAMs, se descargaron las secuencias en formato FASTA, a este grupo de secuencias se identificó y elimino el péptido señal; con el grupo de secuencias de los péptidos maduros se realizó una alineamiento con el programa Clustalw, a partir de este alineamiento se generaron arboles filogenéticos usando la metodología de Neighbor-Joining. Estos árboles fueron dibujados a escala, con longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas usadas para inferir los arboles filogenéticos. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de corrección de Poisson. Los análisis evolutivos fueron realizados en MEGA 6.

La interpretación se hizo con respecto a las distancias entre las secuencias de las cecropinas de coleópteros con respecto a otros insectos como dípteros, deduciendo que entre más alejadas se encuentre una secuencia de la otra más difieren.

7.7 RT-PCR PARA VALIDACIÓN DE BLANCOS.

El ARNm fue sometido a una RT-PCR utilizando oligo-dT como iniciador para obtener ADNc, la enzima que se utilizó para este procedimiento fue M-MLV (Life Technologies. Catalogo N° 28025-013) siguiendo las indicaciones del fabricante, para lo cual se preparó 20µL de reacción final conteniendo 500µg/mL de OligodT, 592ng/µL de la muestra, dNTPs 10mM, esta mezcla fue calentada a 65°C por 5 minutos y se enfrió rápidamente en hielo, luego se adiciono buffer 5X (first-strand), 0,1M DTT y 40unidades/µL de RNAasa out, finalmente se adiciono 200unidades/µL de la enzima M-MLV, se incubo por 50 min a 37°C y se inactivo calentando a 70°C por 15 minutos. El ADNc obtenido fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% y corrido por 45 minutos a 100Voltios. Para validar las secuencias defensinas y la cecropina identificadas en el transcriptoma, se diseñaron iniciadores, los cuales fueron construidos con el programa gene designer 2.0 (versión 2.0.184) y evaluados con oligoanalyzer, se construyeron un par de iniciadores para la Oxysfensinas 1 y la Oxysterlina 1, adicionalmente se construyó un par de iniciadores de clonación en el plásmido pEXP5-CT@TOPO para la Oxysfensina 1; Las condiciones para la amplificación se realizaron con un volumen de reacción final de 12,5µL, 1 ciclo de 2 minutos para la desnaturalización a 94°C; 40 ciclos en el proceso de hibridación y extensión

con 30 seg – 94°C seguido por 30 seg a 60°C; 30 seg a 72°C y una etapa de extensión final 1 ciclo de 10 min a 72°C .

7.8 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA OXYSTERLINA 1 Y LA OXYSFENSINA 1.

Para el análisis bioinformático de las secuencias se identificó el péptido señal por SIGNALP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), obteniendo la secuencia del péptido maduro.

La estructura secundaria fue hallada con PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) y JPRED (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) y se identificaron las características fisicoquímicas de esta secuencia por PROTPARAM (<http://web.expasy.org/protparam/>), identificando el peso molecular, punto isoeléctrico, número de aminoácidos, momento hidrofóbico, polaridad, arquitectura, además se realizó el diagrama de representación visual conocido como diagrama helicoidal (<http://rزلab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>), el cual representa las hélices antipáticas en rojo y los residuos polares en azul.

El modelo tridimensional de estas secuencias fue realizado por RAPTORX (<http://raptorx.uchicago.edu/>), identificando los aminoácidos polares, hidrofóbicos, aromáticos, flexibilidad estructural.

7.9 OXYSTERLINA 1

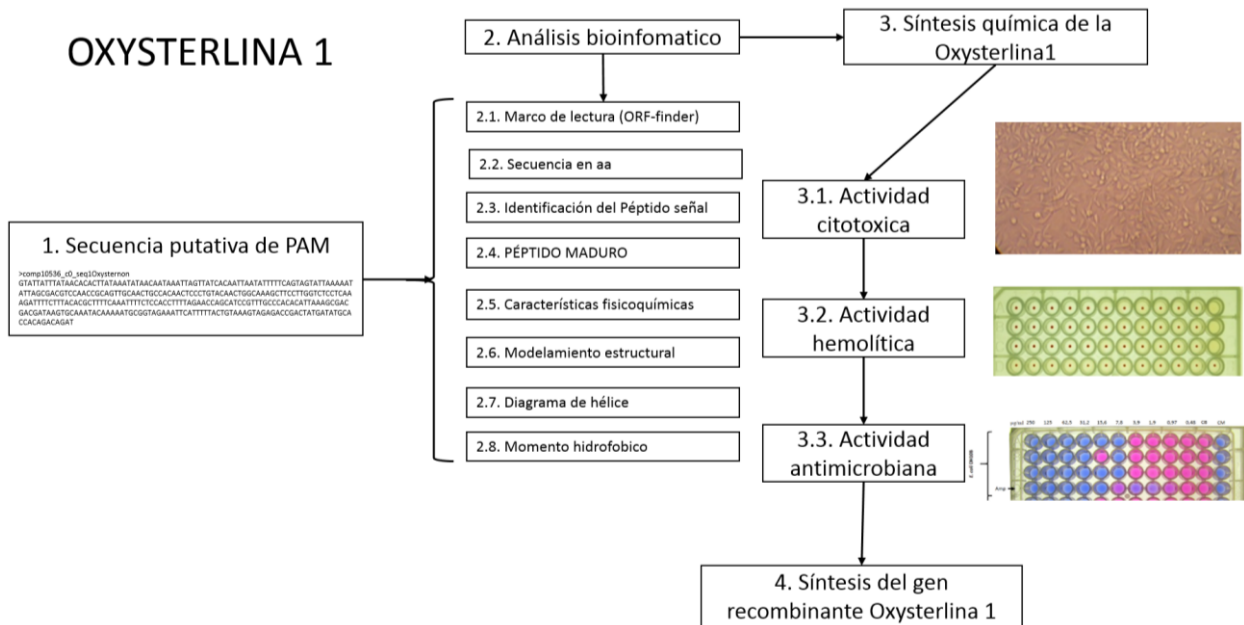


Figura 1. Metodología utilizada para el análisis bioinformático, síntesis química, evaluación de actividad citotóxica, antimicrobiana y hemolítica de la Oxysterlina 1; y síntesis del gen recombinante.

7.9.1 Síntesis química del Péptido Oxysterlina 1

Para la síntesis de la secuencia de la Oxysterlina 1, se contrataron los servicios de Synteticbiomolecules, tomando la opción de sintetizar de hasta 5 mg en una pureza del 95% por síntesis química en fase sólida, purificado por HPLC (anexo 1) y la masa molecular fue verificada por espectrometría de masas (anexo 2).

7.9.2 Evaluación de la actividad citotóxica de la Oxysterlina 1

Se evaluó en células Vero (ATCC:CCL-81) en medio de cultivo DMEM (suplementado con al 1X con 100 unidades de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomina, 0,25 µg anfotericina B, L-glutamina 100 mM y 2% (v/v) de suero fetal bovino con concentraciones del péptido desde 2000 µg/mL, hasta 0,03 µg/mL; en microplacas de 96 pozos (Nunc, Suiza), se adicionaron 25000 células por pozo, las cuales fueron incubadas por 24 horas a 37°C y 5% CO₂, después se adicionó resazurin a cada pozo a una concentración final de 44 µM, se incubó 2 horas a 37°C, 5% de CO₂ y se midió la absorbancia de resofurin 570 nm-603 nm.

Se calculo el porcentaje de viabilidad celular, deteminando el delta (lectura a 570nm – la lectura a 603nm), se resto el promedio del blanco (valor de absorbancia del medio) y se calculo el porcentaje de viabilidad tomando el 100% de viabilidad las células diluidas en agua (control de células).

$$\% \text{ viabilidad celular} = \left(\frac{Y(A570nm-A603nm) - (\text{promedio de } B(A570nm-603nm) * 100)}{C(A570nm-A603nm) - (\text{promedio de } B(A570nm-603nm))} \right)$$

Y= muestra.

B= blancos.

C= control positivo de actividad citotóxica

7.9.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana del péptido sintético Oxysterlina 1

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de dilución en placa (Wiegand I, 2008), para lo cual se tomó un inóculo de bacterias *E. coli ATCC 35218*, *E coli ESBL*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis* y un hongo *Candida albicans* y se puso a crecer en 1 mL de medio Muller Hilton (MHB) en agitación toda la noche.

Al día siguiente se tomó un inóculo de las bacterias y el hongo crecidas toda la noche y se transfirió a tubo con medio fresco conteniendo 4 mL de MHB, se incubo el medio a 37°C en 225rpm, hasta que alcanzó una turbidez en escala de McFarland de 0,5.

Posteriormente se sirvieron 10µL de la Oxysterlina 1 en concentraciones finales del péptido de 200-0,37µg/mL y se añadieron 90µL de la suspensión bacteriana diluida 1:1000, mencionada en el paso anterior; se incubaron las placas a 37°C por 12 horas, después de las cuales se añadió 10µL de resazurin a 440µM, y se dejó incubar por 2 horas adicionales, finalmente se leyeron las placas en el espectrofotómetro referencia EPOCH marca BIOTEK a 570-603nm.

El análisis de los datos se realizó, calculando el porcentaje de crecimiento bacteriano para esto se determino el valor de delta, (A570- A603nm), se calculo el promedio del delta de los blancos y se resto al delta de todas las lecturas; se calculo el porcentaje de crecimiento tomando cada valor de los deltas menos el promedio de los delta del blanco por 100 y dividiendo por el promedio del delta de los controles positivos.

% crecimiento bacteriano= $(X(A570nm-A603nm)-(promedio\ de\ B(A570nm-603nm)*100))/(C(A570nm-A603nm)-(promedio\ de\ B(A570nm-603nm))$

X= muestra.

B= blancos.

C= control positivo de crecimiento.

7.9.4 Evaluación de la actividad hemolítica de la Oxysterlina 1

Para evaluar la actividad hemolítica de la Oxysterlina 1 sobre eritrocitos humanos, se tomaron 2 mL de sangre heparinizada y se centrifugo a 800g por 10 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron 3 veces los eritrocitos en PBS (130mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ y 1,5mM K₂HPO₄ pH 7,4), y se resuspendieron en 2mL de PBS (150mM KCl, 5mM Tris-HCl, pH 7,4), posteriormente se preparo una solución stock de los eritrocitos a una relacion 1:10 a partir de la cual se preparo una solucion de eritrocitos 1:25, obteniendo una solución de trabajo al 0,4% - 0,5% V/V de eritrocitos.

Se preincubo la solución de trabajo por 15 minutos a 37°C, y se añadio 90µL de la solución de trabajo a los pozos correspondientes en una placa de 96 pozos.

se añadio 10µL del péptido sintético Oxysterlina 1 a cada pozo correspondiente a concentraciones finales desde 2000µg/mL hasta 1,95µg/mL en diluciones seriadas en agua destilada esteril. Como control positivo de hemolisis se utilizo 10µL de tritonX100 1% V/V para una concentración final de 0,1%. Se incubo la placa por 1 hora a 37°C y se centrifugo a 2000g por 15 minutos, se extrajo el sobrenadante y se leyo la absorbancia a 410nm en espectrofotometro EPOCH (biotek). El porcentaje de hemolisis se calculo tomando la absorbancia del tritonX100 como 100% de hemolisis.

% hemolisis= $(M(A410nm)-(promedio\ de\ B(A410nm)))*100/(C(A410nm)-(promedio\ de\ B(A410nm)))$.

M=Muestra

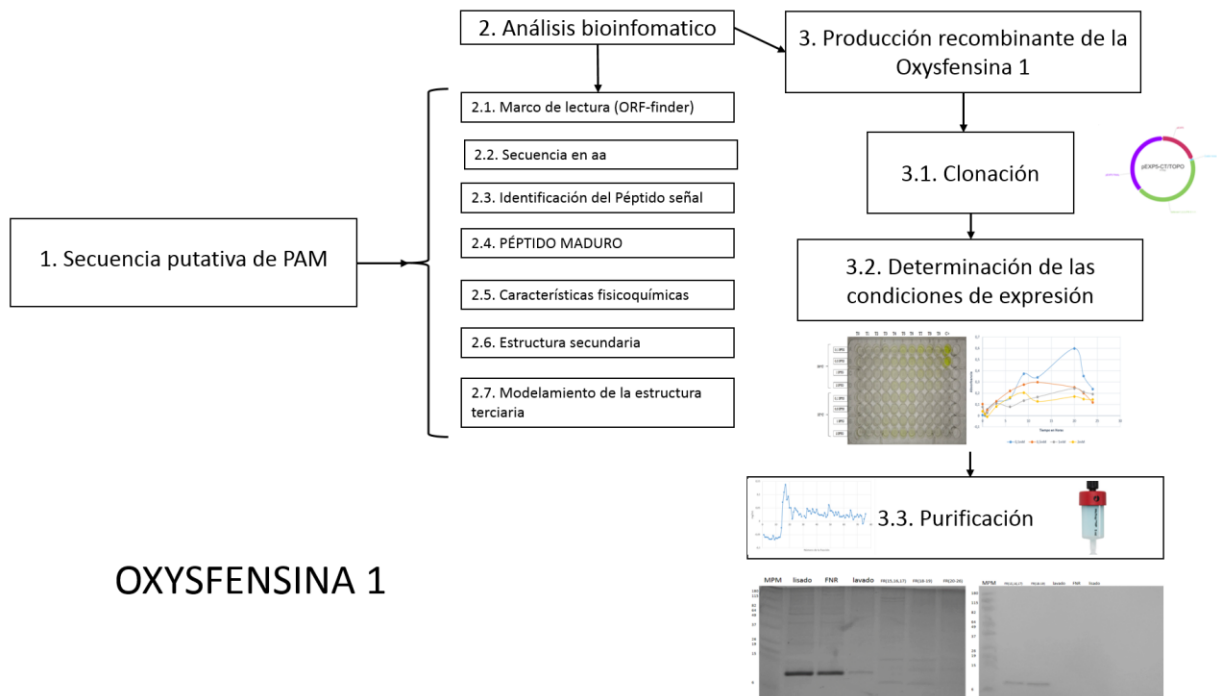
B=Blanco

C=Control positivo de hemolisis

7.9.5 Síntesis del gen recombinante Oxysterlina 1

Se diseñó un gen para la expresión recombinante de la Oxysterlina 1 en *E. coli* optimizando la secuencia de codones para *E. coli* y se insertó la secuencia en el plásmido pD444-CH:150744, con el promotor T5 inducible por IPTG, y como factor de selección el gen de resistencia a la ampicilina (*bla*), una etiqueta de purificación de 6XHistidinas en el extremo C-terminal, sitio de inicio de la replicación pUC ori y un sitio de unión al ribosoma “strong RBS”, (anexo 3). El gen fue sintetizado en DNA 2.0.

7.10 OXYSFENSINA 1.



OXYSFENSINA 1

Figura 2. Metodología utilizada para el proceso de clonación, expresión y purificación de la Oxysfensina 1.

7.10.1 Clonación de la Oxysfensina 1

El producto de PCR de la Oxysfensina 1 fue clonado con el estuche TOPO® Cloning (V960-05, Life Technologies) utilizando el plásmido de clonación pEXP5-CT/TOPO®TA, el cual presenta el promotor del bacteriófago T7 inducible por IPTG, una etiqueta de purificación de 6XHistidinas unido al extremo C-Terminal, un sitio de clonación por TOPOisomerasas, el gen de resistencia a la ampicilina para la selección en *E. coli* y el sitio de origen pUC.

La clonación se llevó a cabo en células *E. coli* DH10B para el almacenamiento, replicación y purificación de cantidades más grandes del plásmido; también, se clono en *E. coli* BL21 para el proceso de expresión del péptido recombinante.

La competencia de las bacterias *E. coli* DH10B y BL21 se realizó como se describe en (Sambrook, 2006). Usando Cloruro de Calcio 0,1M y Cloruro de Calcio- Cloruro de Magnesio (80mM MgCl₂, 20mM CaCl₂), la transformación se realizó por choque térmico y la selección con crecimiento selectivo en medio LB suplementado con ampicilina (100µg/ml)

las colonias resultantes fueron evaluadas para la presencia del inserto de interés por medio de PCR. Las colonias positivas fueron congeladas en medio (Medio LB líquido con glicerol al 30% y ampicilina (100µg/mL). Las colonias seleccionadas se les realizó extracción de plásmidos con el estuche (PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit) y fueron sometidos a secuenciación para verificar la correcta ligación de los genes clonados en la secuencia al plásmido.

7.10.2 Determinación de las condiciones de expresión del péptido recombinante Oxysfensina 1.

Para la expresión de la Oxysfensina 1 se evaluaron dos temperaturas (30°C y 37°C), cuatro condiciones de IPTG para cada temperatura (0,1; 0,5; 1; 2 mM) y diez tiempos, la velocidad de agitación fue 260 rpm. Para esto, se puso a crecer toda la noche un inóculo de bacterias *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pEXP5-CT- TOPO-OXYSFENSINA1, en 1mL de LB suplementado con ampicilina a 100 µg/mL; después, se tomaron 100 mL de LB+ amp (100 µg/mL) y se adiciono el inóculo crecido toda la noche, se dejó en incubación a 37°C hasta alcanzar un OD de 0,4 y se distribuyeron de a 5 mL en tubos conicos tapa rosca de 50mL, cada tubo con una condición de IPTG, se tomaron alícuotas de 200µL por 10 horas en los tiempos (0,1/2, 1, 3, 6, 9, 12, 20, 22, 24 horas) posterior a la inducción con IPTG. Las muestras fueron leídas a 570nm para observar la cinética de crecimiento bacteriano, luego de leídas estas alícuotas fueron centrifugadas a max rpm (10000rpm), se colecto tanto el pellet como el sobrenadante y se almaceno a -30°C hasta su posterior uso.

7.10.3 ELISA para evaluación de la expresión de la Oxysfensina 1.

La evaluación de la expresión en los tiempos recolectados de la Oxysfensina 1 se realizó por medio de un ELISA indirecto, para lo cual se sensibilizo una placa de 96 pozos por toda la noche con las diferentes alícuotas resuspendidas en 100µL de PBS1X (1,4M NaCl, 27mM KCl, 101mM Na₂HPO₄, pH: 7,3) recogidas en los 10 tiempos, las cuatro concentraciones de IPTG y las dos temperaturas, se hizo el bloqueo por ½ hora con leche descremada al 3% diluida en PBS 1X (1,4M NaCl, 27mM KCl, 101mM Na₂HPO₄, pH: 7,3) conteniendo tween20 0,05%, se añadió 100µL del Ac primario (Anti-Histidinas, catalogo sigma H1029-2mL) a 37°C por 1 hora y media a una concentración 1:3000, se lavaron los pozos 5 veces con PBS1X y se adiciono 100µL del Ac secundario (Anti-Mouse IgG marcado con peroxidasa-número de catálogo A0168), en una dilución 1:50,000 en solución de bloqueo por una hora y media incubando la placa a 37°C, nuevamente se hicieron 5 lavados con PBS1X y finalmente se añadieron 100µL de solución de revelado TMB (fosfato de sodio dibásico

51,4mM y ácido cítrico 24,3mM, TMB a una concentración final de 0,0066% p/v y peróxido de hidrogeno a 0,0006%; se dejó 15 minutos a 37°C después de los cuales se detuvo la reacción con Ácido sulfúrico H₂SO₄ al 5% y se leyó el resultado final a 450nm.

Los datos de las absorbancias fueron graficados contra el tiempo para cada concentración de IPTG evaluada, el control positivo fue una proteína recombinante purificada con etiqueta de histidinas (proteína D43).

7.10.4 SDS- PAGE

Para visualizar la banda del peso esperado del péptido Oxysfensina 1, se hizo por medio de un gel de Tricina al 12%, el cual se corrió a 30V por 45 minutos y luego a 80V por 1 hora y media, las muestras fueron mezcladas con 5µL de buffer carga ((12% (p/v) SDS; 6% (v/v) mercaptoetanol; 30% (p/v) glicerol; 0,05% azul de comeasie G250; 150mM tris/HCl (pH 7,0)) y fueron sometidas a temperatura de ebullición por 5 minutos antes de ser corridas en el gel, se usaron 5µL del marcador de peso molecular (BenchMark; Pre-stained Protein Ladder, Life Technologies) para este procedimiento se utilizó la técnica basada en el protocolo A8.40 molecular cloning a laboratory manual (Sambrook, 2006).

7.10.5 Ensayo de Wester Blot para verificación de la banda esperada de la Oxysfensina1

Para verificar que la banda observada en el peso esperado correspondía a la Oxysfensina 1, se realizó un ensayo de Wester Blot en membrana de PVDF a partir de un gel de Tricina al 12% corrido en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, para esto se trató la membrana con metanol al 100% por 30 segundos, luego se sensibilizo con buffer de transferencia (Tris 25mM, Glicina 192mM y metanol al 20%) por 10 minutos, para la transferencia se utilizó el equipo Trans-Blot®Turbo™ Blotting System- número de catálogo 170-4155- BioRad y se corrió a 25V constante 1 Amperio por 30 minutos.

Luego de la trasferencia se lavó la membrana 3 veces por 5 minutos cada vez, con PBS1X-Tween20-0,05%, se bloqueó con leche descremada al 5% por 40 minutos y se dejó en Anticuerpo primario a concentración 1:3000 (Anti-Histidinas, catalogo sigma H1029-2mL) toda la noche, se hicieron 5 lavados con PBS 1X y se añadió el Ac secundario 1:30000 (Anti-Mouse IgG-marcado con fosfatasa alcalina) por 1 hora, nuevamente se hicieron 3 lavados con PBS1X y finalmente se revelo con BCIP (SIGMAFAST™BCIP®/NBT-catalogo B5655), conteniendo BCIP (0.15 mg/ml), NBT (0.30 mg/ml), Tris buffer (100 mM), and MgCl₂ (5 mM), pH 9,25–9,75; este procedimiento fue realizado con el protocolo de Immunoblotting (Sambrook, 2006).

7.10.6 Expresión del péptido recombinante Oxysfensina 1.

Se puso a crecer un inóculo de la bacteria *E. coli* BL21-pEXP5-CT- TOPO-OXYSFENSINA1 en 1 mL de medio LB por 24 horas, luego se tomaron 500µL de inóculo ya crecido y se dejó en agitación a 37°C en 50mL de medio LB, utilizando un Erlenmeyer de 500mL para conservar las proporciones de aireamiento de la bacteria hasta que alcanzo un OD de 0,4; luego se realizó la inducción con 0,1mM de IPTG, tomando una alícuota de 500µL para el tiempo0 (t₀), y se detuvo la expresión a las 20 horas post-inducción, este medio fue centrifugado a 2700 g por 20 min a 4°C y el pellet fue congelado a 20°C hasta su uso, el sobrenadante también se congelo hasta visualizar que no haya quedado péptido en este.

7.10.7 Purificación del péptido recombinante Oxysfensina 1

Se tomó pellet del paso anterior, se resuspendio en 10mL de Buffer de Unión (NaCl 0,5M, NaH₂PO₄ 20mM, Imidazol 20mM, pH:8,0). Se realizó lisis de estas bacterias con lisozima (1mg/mL) y triton 0,5% (se incubo en hielo por 30 min), se centrifugo a 2700 g por 20 min a 4°C; se tomó el sobrenadante y se pasó por un filtro milex de 0,2µm.

Este lisado se pasó por una columna equilibrada de Ni Sepharose HisTrap (GE Healthcare Life Sciences) en el equipo de cromatografía de baja presión AKTA prime(Pharmacia Biotech) con sensor UV y filtro de 280nm a una tasa de flujo de 0,5mL/min, se recogió la fracción no retenida (FNR) y se guardó a -30°C, posteriormente se aplicó el buffer de elusión (NaCl 0,5M; NaH₂PO₄ 20mM; Imidazol 500mM), y se recogieron 70 fracciones retenidas (FR) de a 15 gotas por fracción, las cuales fueron leídas a 280nm en el espectrofotómetro EPOCH (Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer System).

Las FR que arrojaron la mayor absorbancia, fueron confirmadas por Wester Blot tal como se explica arriba en la sección Ensayo de Wester Blot para verificación de la banda esperada de la Oxysfensina 1.

7.11 IMPACTO AMBIENTAL (ASPECTOS BIOÉTICOS)

La colecta de los ejemplares se realizó bajo los protocolos de bioseguridad, para las salidas de campo se cuenta con el permiso de colecta ante la Corporación Autónoma Regional (C.R.Q.) (Anexo 1), además de la exigencia de emplear la indumentaria de trabajo en campo y botiquín.

En cuanto a la manipulación de excretas que implica un riesgo biológico fue necesario el uso de guantes de látex, tapabocas, pinzas, jabón yodado o antibacterial, además de reconocer la procedencia de las excretas empleadas como cebo.

Con respecto a la colecta de las especies de escarabajos coprófagos del proyecto, las cuales no aparecen registradas bajo alguna categoría de vulnerabilidad ante el Instituto de Investigaciones Biológicas Alexander von Humboldt (Libros Rojos CITES), por lo anterior las especies no reportan algún riesgo de extinción. Por necesidad a la hora de publicar se debe contar con un registro de colección, para este caso se sacrificaron tres especímenes que serán preservados en seco o en alcohol al 70%, y se depositará en la colección del Museo de Artrópodos de la Universidad del Quindío (MAUQ).

El desarrollo del proyecto implicó la utilización de ejemplares in vivo y exigió la necesidad de asegurar tanto la sobrevivencia como la reproducción de las especies en condiciones óptimas; para obtener lo anterior se colectaron tres especímenes y se mantuvieron en microcosmos bajo las condiciones ambientales más cercanas a las condiciones naturales. Por la naturaleza de los hábitos de coprofagia de este grupo de insectos en la actualidad en Colombia no se reconocen intereses de biocomercio o de coleccionistas. Al contrario los escarabajos coprófagos han sido relegados casi que exclusivamente a los intereses de algunos académicos que reconocen en ellos el valor ecológico que tienen en la recuperación de suelos. Por lo tanto se aportara la primera información molecular de tales escarabajos llevándolos a tener mayor reconocimiento e importancia por parte de los investigadores.

Los microorganismos con los cuales se cultivó son *E. coli DH10B*, *E. coli BL21*, cepas comercialmente no patógenas, igualmente los plásmidos en los que se realizó las clonaciones son microorganismos que representan un riesgo mínimo para el individuo y limitado para la comunidad según la Resolución 8430 de 1993, se realizó previamente los protocolos para la manipulación, descontaminación de desecho, así mismo todos los procedimientos que se realizaron con los microorganismos fueron realizados en condiciones, instalaciones, equipos e implementación personal adecuada, para evitar el menor riesgo posible de contaminación.

La propiedad intelectual de los resultados alcanzados en la presente investigación se rige por el acuerdo 003 del 03 Abril de 2007 del consejo superior de la Universidad del Quindío, por el cual se expide el “estatuto sobre la propiedad intelectual”.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención de escarabajos, inducción de la respuesta inmune y extracción del cuerpo graso.

Se colectaron tres escarabajos hembras para descartar cualquier tipo de variabilidad morfológica; mediante las clave taxonómica de Weber, 1801 (Weber F., 1801) Modificada por Medina & Lopera, 2001 (Medina., 2001) se identificaron como *Oxysternon conspicillatum* (Figura 3); y los individuos fueron depositados en el museo de artrópodos de la Universidad del Quindío.

Se realizó inoculación con *E. coli DH10B* a un escarabajo y se le realizó extracción del cuerpo graso a las 16 horas obteniéndose 100mg de tejido, el cual se utilizó para realizar extracción de ARN.

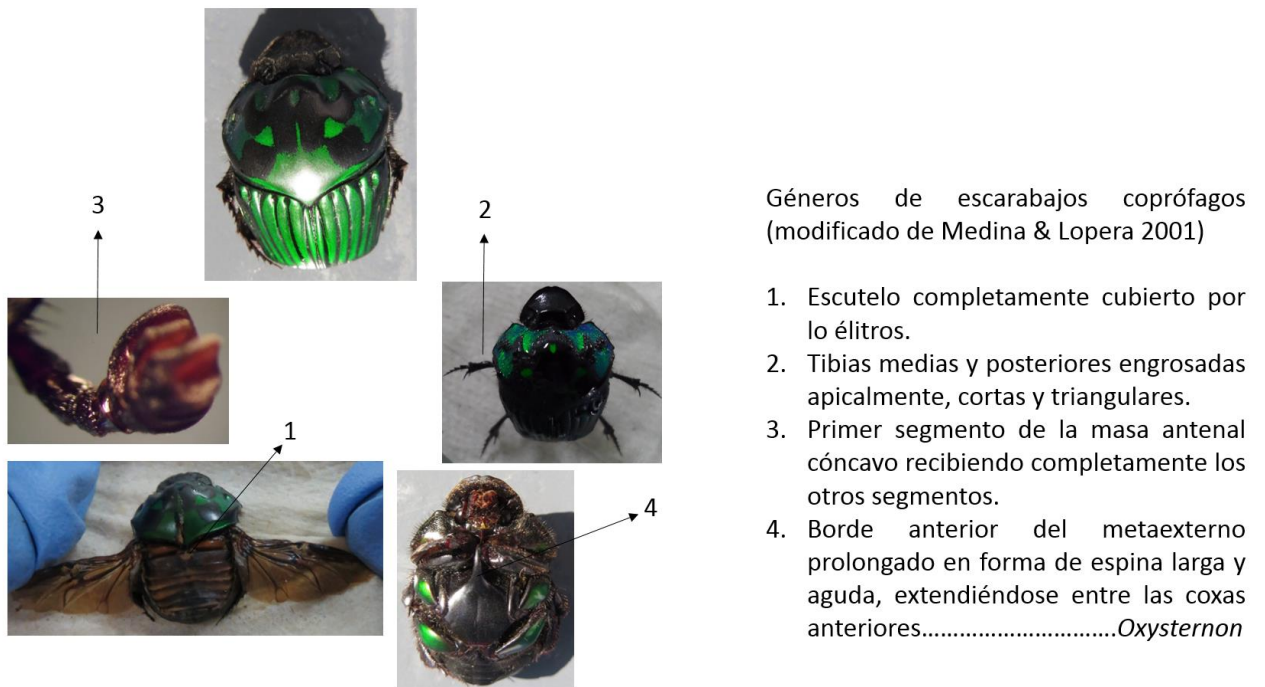


Figura 3. Identificación del genero *Oxysternon*, pasando clave taxonomica descrita por Weber, 1801 y modificada por Medina & Lopera, 2001.

8.2 Extracción de material genético.

A partir del cuerpo graso obtenido se realizó extracción de ARN total obteniendo 11,431 µg de ARNt a una concentración de 163,30 ng/µL y una relación de A260nm/280nm de 2,1. El ARNt obtenido fue visualizado en un gel de agarosa al 2% (Figura 4), el cual fue corrido a 100 voltios por 45 minutos. Y finalmente fue precipitado en Etanol Acetato de sodio 3M y almacenado a -80°C hasta su envío.

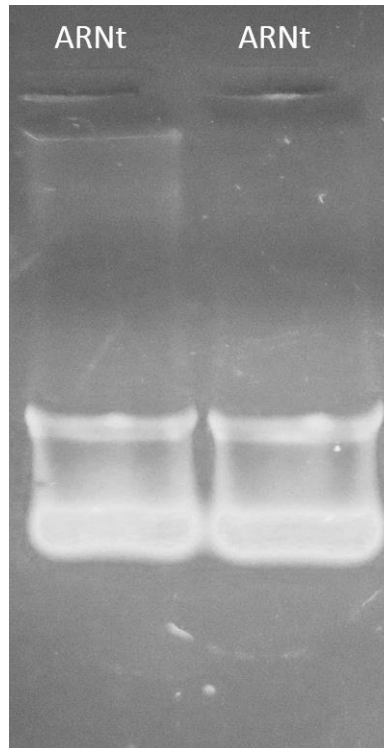


Figura 4. Gel de agarosa al 2%. Visualizando el ARNtotal extraído a partir del cuerpo graso del escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum*.

8.3 Secuenciamiento y análisis de los datos

El secuenciador Illumina HiSeq2000/2500 arrojó lecturas de una longitud de 101pb, con un total de lecturas de 30,787,530, un total de pares de bases secuenciadas de 3,109,540,530 pb y un número total de contigs de 27,603; el N50 fue igual a 2,159; lo que me indica que el 50% del ensamblaje total está contenido en contigs mayores o iguales a este valor (Figura 5).

Sample Name		Oxystemon_conspicilatum
Raw Sequences	Read Type	Paired-End
	Read Length (bp)	101
	Number of Total Reads	30,787,530
	Total (bp)	3,109,540,530
Transcriptome Assembly	total length of contigs	32,122,278
	total number of contigs	27,603
	Max Length	12,138
	Min Length	201
	N90	448
	N80	862
	N70	1,301
	N60	1,729
N50	2,159	

Figura 5. Resultados obtenidos después del secuenciamiento y ensamblaje del transcriptoma.

8.4 Ontología genética

La ontología genética realizada por BlastX2GO, comparo la traducción de los seis marcos de lectura de las secuencias de contigs del transcriptoma contra la base de datos de proteínas, clasificando estas secuencias en tres ontologías (Figura 6) la función molecular de los productos génicos (24%), su rol en los procesos biológicos de múltiples direcciones (23%) y su localización en componentes celulares (16%).

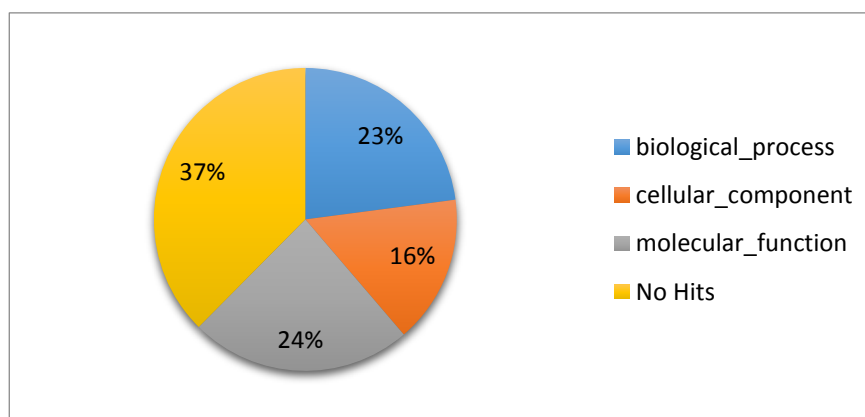


Figura 6. Grafico circular mostrando el porcentaje de secuencias del transcriptoma asociados a los procesos biológicos, localización de componentes celulares, función molecular y no identificados.

Dentro del 23% correspondiente a los procesos biológicos se realizó una caracterización de los productos génicos, buscando asociaciones entre los productos anotados en las bases de datos y todos los productos de los genes correspondientes a los procesos biológicos en el transcriptoma del escarabajo *Oxysternon conspiciatum*. De esta forma se identificó que el 1% de los procesos biológicos correspondió a procesos del sistema inmune (Figura 7), dentro de los cuales se tomó la secuencia de 1 cecropina y 1 defensina.

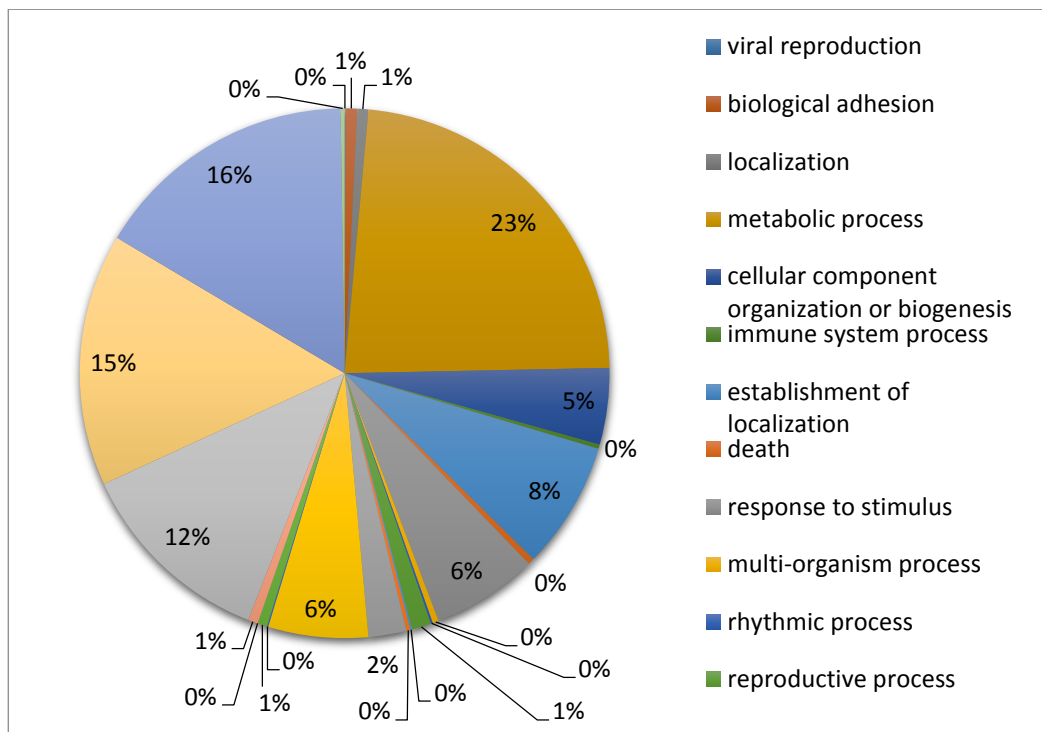


Figura 7. Grafica circular mostrando que el 1% de las secuencias del transcriptoma (verde oscuro) dentro de los procesos biológicos están involucrados con procesos del sistema inmune.

8.5. Identificación de la Oxysterlina 1 en el transcriptoma del escarabajo *Oxysternon conspicillatum*.

Se encontró por Ontología genética una secuencia putativa de PAM identificada por el Pfam PF00272 como una secuencia perteneciente a la familia de las cecropinas. Esta base de datos me comparo 182 secuencias de cecropinas ya descritas y caracterizadas con alguna función biológica contra la secuencia de la Oxysterlina 1, ubicandola dentro de este grupo de PAMs. Además me comparo los aminoácidos conservados dentro de estas secuencias, identificando el aminoácido E en la posición 7 de todas las secuencias de cecropinas (Figura 8).

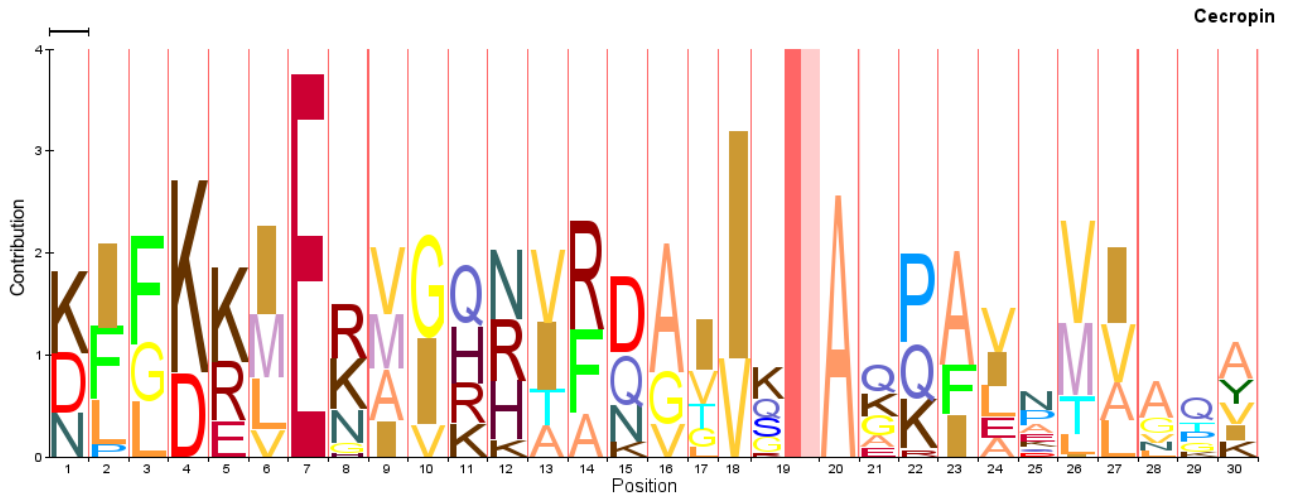


Figura 8. WebLogo de secuencias de cecropinas, incluida la Oxysterlina 1. Arrojado por el Pfam PF00272, identificando aminoácidos conservados dentro de las 182 secuencias de cecropinas caracterizadas con alguna función biológica.

Esta secuencia fue elegida como una secuencia putativa de PAM del escarabajo *Oxysternon conspicillatum* de la familia de las cecropinas; se escogió un nombre para esta secuencia, basados en el organismo en cual fue identificada y la familia de péptidos a la cual perteneció, de esta forma se nombró Oxysterlina 1.

8.5.1 Alineamiento de la secuencia completa de Oxysterlina 1

La secuencia completa de la Oxysterlina 1 fue alineada contra la base de datos de Blastp para ver secuencias relacionadas, las cuales fueron curadas manualmente y se escogieron las secuencias de cecropinas con mayor identidad, incluidas secuencias de otros coleópteros (figura 9).

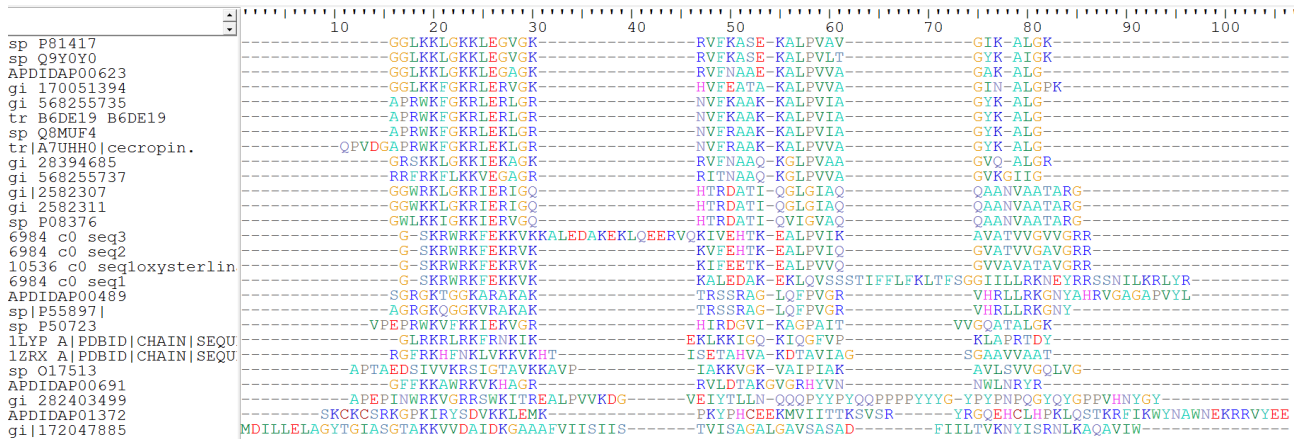


Figura 9. Resultado del alineamiento entre la Oxysterlina 1 y secuencias de cecropinas con mayor porcentaje de identidad. Incluidas cecropinas de dípteros, colopteros y polillas. Identificando sitios conservados entre las secuencias.

8.5.2 Árbol filogenético de la familia de Cecropinas

La secuencia de la Oxysterlina 1 fue alineada con otras secuencias de cecropinas identificadas en *Oxysternon conspicillatum*, además de otras cecropinas identificadas en el escarabajo *Tribolium castaneum*, en moscas como *Drosophila melanogaster*, *Sarcophaga peregrina* y *Stomoxys calcitrans*, en mosquitos como *Culex pipiens pipiens*, *Anopheles darlingi*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles estephensi*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes albopictus* y la Polilla *Hyphantria cunea* como grupo externo.

Con el alineamiento de estas secuencias (figura 9) se contruyó el árbol para las cecropinas, ubicando las secuencias de las Oxysterlinas cercanas a la cecropina de *Tribolium castaneum* en una rama diferente a las secuencias de cecropinas de mosquitos, moscas y polillas (Figura 10).

Este árbol nos caracterizo por identidad que la Oxysterlina 1 pertenece al grupo de péptidos de la familia de las cecropinas.

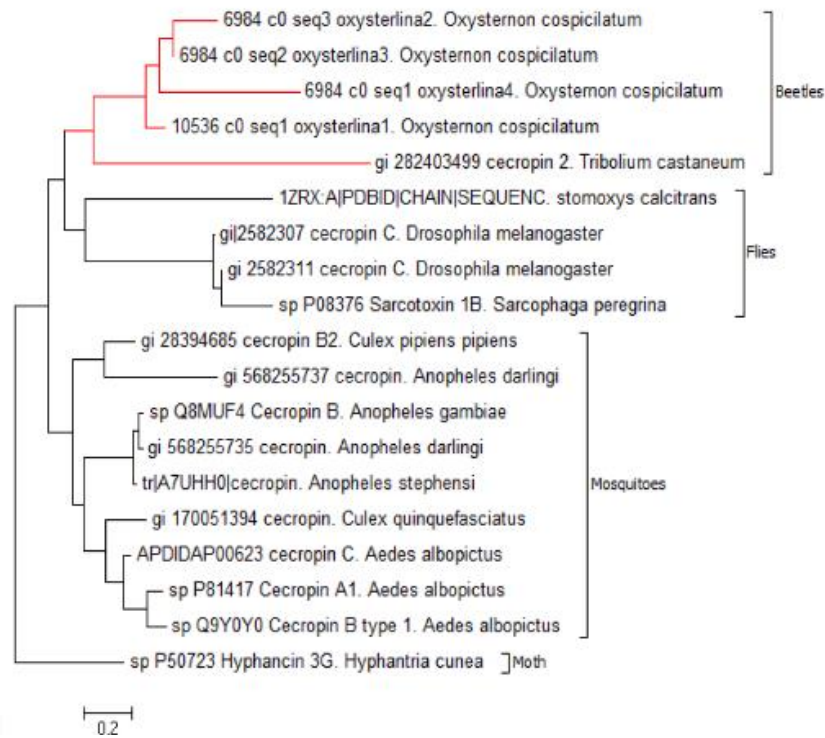


Figura 10. Arbol filogenetico de secuencias de cecropinas de insectos. Incluidas las secuencias identificadas en *Oxysternon conspiciatum* que caracterizaron por identidad las cecropinas. Este arbol fue construido por MEGA6.

8.6 Identificación de la Oxysfensina 1 en el transcriptoma del escarabajo coprófago *Oxysternon conspiciatum*.

El resultado de la Ontología genética arrojó una secuencia putativa de PAM identificada por el Pfam PF01097 como una secuencia perteneciente a la familia de las defensinas. En este caso se compararon 314 secuencias de defensinas caracterizadas estructural y funcionalmente por pertenecer a esta familia de PAMs contra la secuencia de la Oxysfensina 1. Identificando cinco Cisteinas conservadas dentro de este grupo de secuencias en las posiciones 11, 15, 25, 31 y 33 (Figura 11).

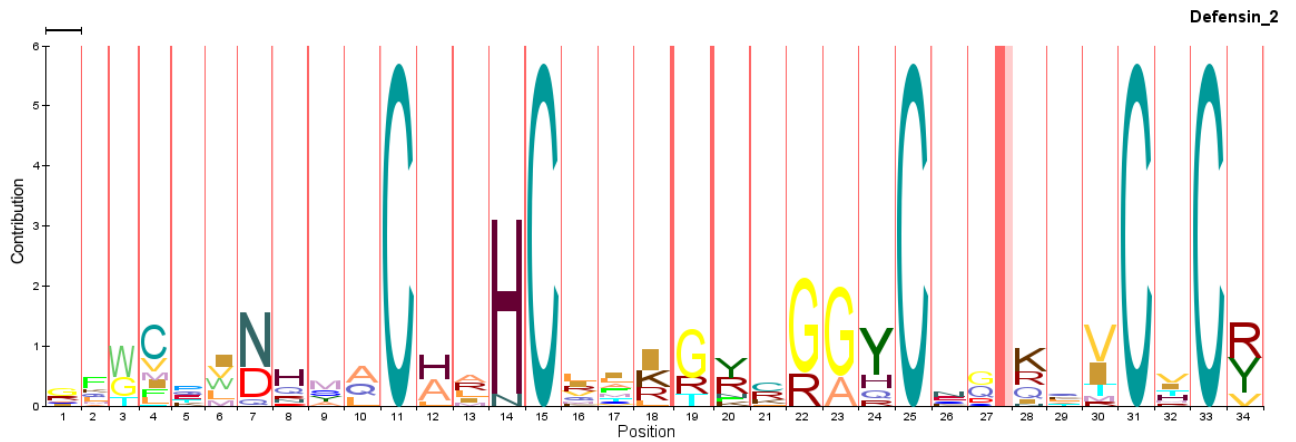


Figura 11. WebLogo de secuencias de defensinas, incluida la Oxysfensina 1. Arrojado por el Pfam PF01097, identificando cinco aminoácidos Cisteínas conservadas dentro de las 314 secuencias de defensinas caracterizadas estructural y funcionalmente por pertenecer a esta familia de PAMs.

8.6.1 Alineamiento de la secuencia completa de Oxysfensina 1

Después de identificar la secuencia de la Oxysfensina 1, también se pudo identificar cinco secuencias dentro del transcriptoma pertenecientes a esta familia de PAMs, las cuales se alinearon junto con secuencias de defensinas de otros insectos con mayor identidad, identificando sitios similares entre las secuencias (figura 12).

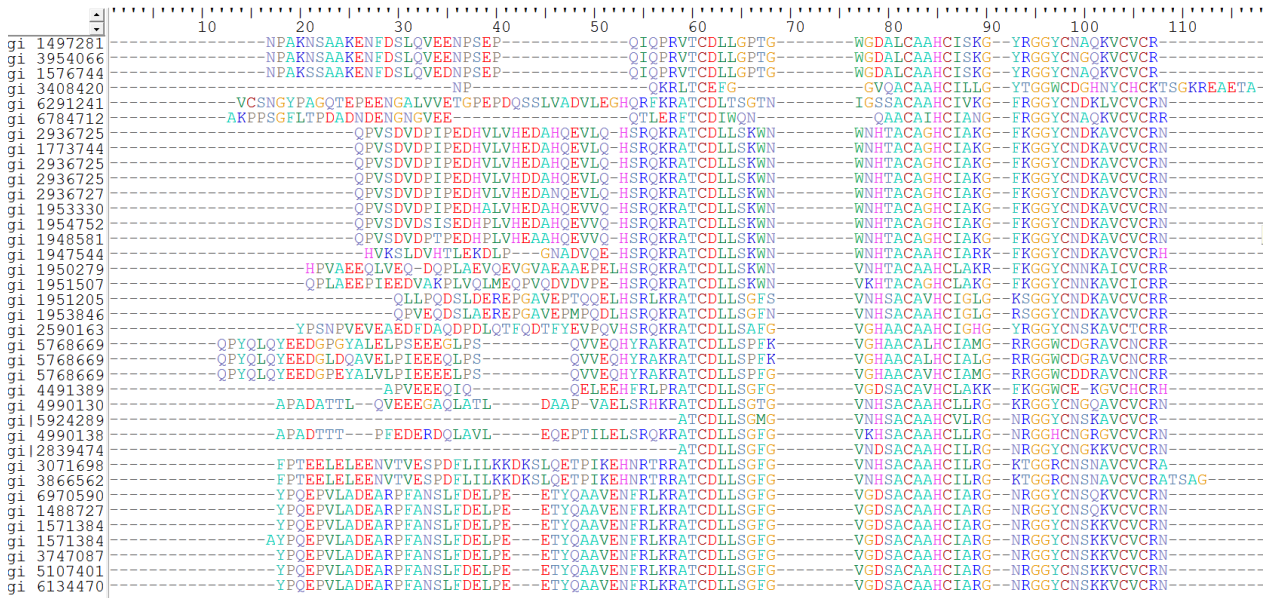


Figura 12. Resultado del alineamiento entre la Oxysfensina 1 y secuencias de defensinas de otros insectos. Mostrando sitios idénticos entre las secuencias.

8.6.2 Árbol filogenético para la familia de las defensinas

La secuencia de la Oxysfensina 1 fue alineada con secuencias de defensinas de otros coleópteros como *Tribolium castaneum*, *Acalolepta luxuriosa*, *Tenebrio molitor*, *Anomala cuprea*, *Rinocerontes orictes*. Además de defensinas identificadas en mosquitos, moscas, hormigas, avispas, entre otras (figura 13).

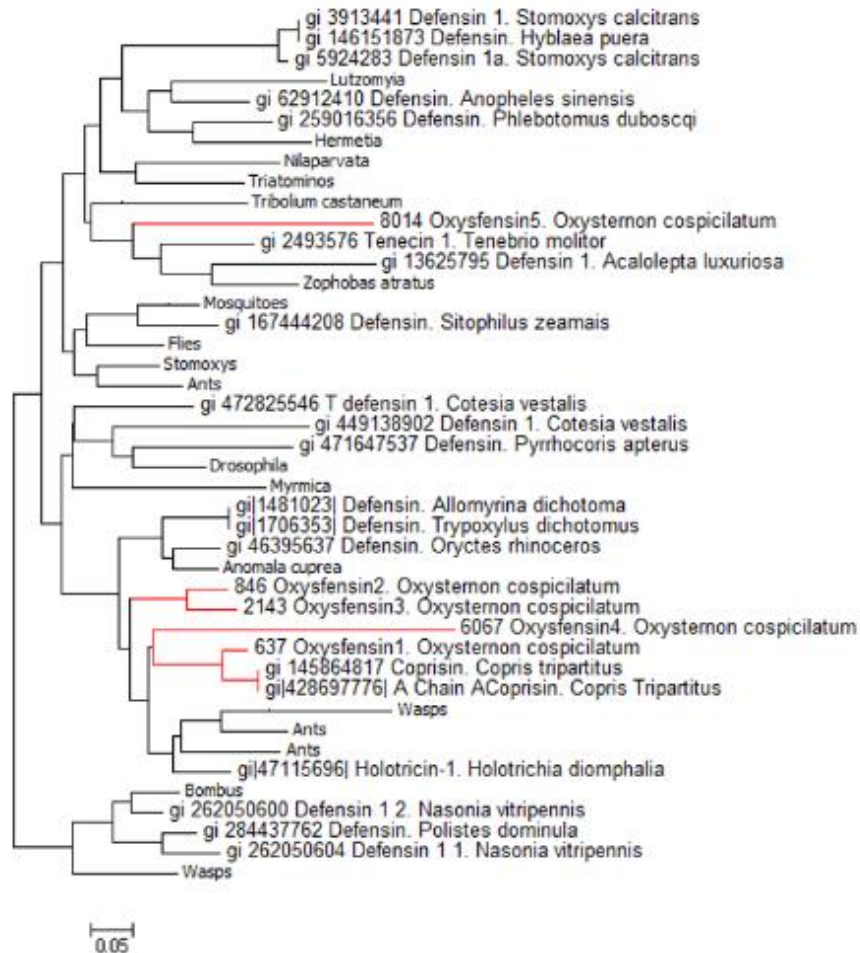


Figura 13. Árbol filogenético de secuencias de defensinas de insectos incluidas las identificadas en *Oxysternon conspiciatum*.

Las Oxysfensinas 1 y 4 estuvieron estrechamente relacionadas con la defensina copricin del escarabajo coprófago *Copris tripartitus*, las ramas de las Oxysfensinas 2 y 3 se encontraron cerca de las defensinas de otros coleópteros como *Anomala cuprea* y *Rinocerontes Orictes*; la Oxysfensina 5 se encontró relacionada con defensinas de otros escarabajos como tenecina 1, la defensina 1 de *Acalolepta luxuriosa* y la defensina 1 de *Tribolium castaneum*.

9. Validación de blancos por PCR

Se amplificó por PCR las cinco Oxysfensinas y la Oxysterlina 1, con lo cual se observaron bandas de alrededor de 200pb para todas las secuencias de PAMs identificadas (Figura 14).

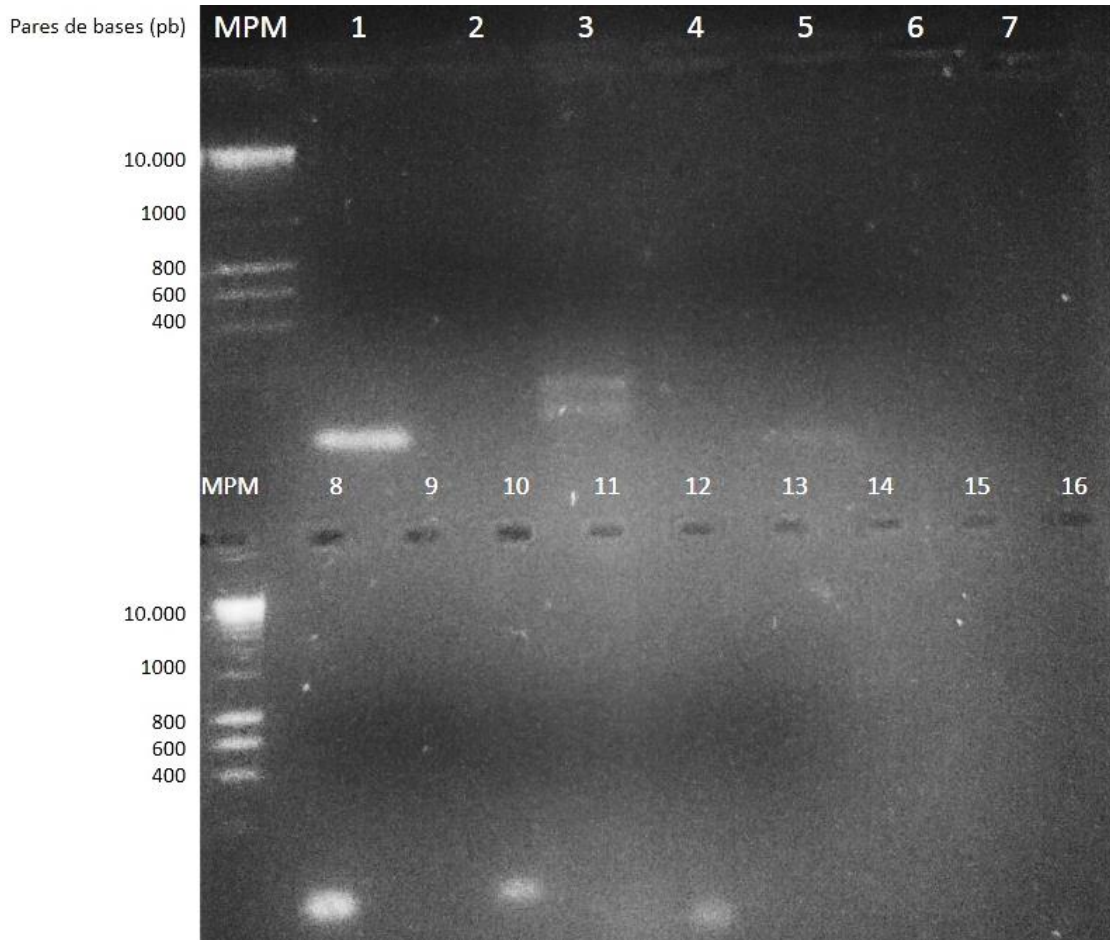


Figura 14. Visualización en gel de agarosa al 2% de la PCR para las cinco Oxysfensinas (D) 1, 2, 3, 5, 6 y la Oxysterlina 1 (CE1) y su respectivo control negativo (CN). Marcador de peso molecular (Mpm, 100 pb DNA Ladder; Cat N° 15628-019 Invitrogen). Carril 1: D1. Carril 2: CN-D1. Carril 3: D2. Carril 4: CN D2. Carril 5: D3. Carril 6: CN D3. Carril 8: D5. Carril 9: CN D5. Carril 10: D6. Carril 11: CN D6. Carril 12: CE1. Carril 13: CN CE1.

De las seis secuencias putativas de péptidos antimicrobianos identificados en el transcriptoma del escarabajo y amplificadas por PCR se siguió el proceso de clonación, expresión y purificación con la **OXYSFENSINA 1** de la familia de las **DEFENSINAS** y obtener el péptido sintético de la **OXYSTERLINA 1** de la familia de las **CECROPINAS** para realizar ensayos de actividad citotóxica, antimicrobiana y hemolítica.

OXYSTERLINA 1

10. Análisis bioinformático de la Oxysterlina 1

10.1. Secuencia en nucleótidos de la Oxysterlina 1 identificada en el transcriptoma

>comp10536_c0_seq1Oxysternon

```
GTATTATTTATAACACACTTATAAATATAACAATAAATTAGTTATCACAATTAATATTTTTCAGTAGTAT
TAAAAATATTAGCGACGTCCAACCGCAGTTGCAACTGCCACAACCTCCCTGTACAACCTGGCAAAGCTT
CCTTGGTCTCCTCAAAGATTTTCTTTACACGCTTTTCAAATTTTCTCCACCTTTTAGAACAGCATCCG
TTTGCCCACACATTAAGCGACGACGATAAGTGCAAATACAAAATGCGGGTAGAAATTCATTTTTAC
TGTAAGTAGAGACCGACTATGATATGCACCACAGACAGAT
```

A la secuencia completa de la Oxysterlina 1 se le identificó el marco de lectura “-3” por ORF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), el cual presentó el codón de inicio al principio de la secuencia y el codón de parada al final de esta, una longitud de 62 aminoácidos y 187 nucleótidos (Figura 15).

```
267 atgaatttctaccgcatTTTTgtatttgcaattatcgtcgtcgtcct
M N F Y R I F V F A L I V V A
222 ttaatgtgtgggcaaacggatgctggttctaaaaggtggagaaaa
L M C G Q T D A G S K R W R K
177 ttgaaaagcgtgtaagaaaaatcttgaggagaccaaggaagct
F E K R V K K I F E E T K E A
132 ttgccagttgtacagggagttgtggcagttgcaactcggttgga
L P V V Q G V V A V A T A V G
87 cgtcgttaa 79
R R *
```

Figura 15. Resultado de la búsqueda del marco de lectura por el servidor ORF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), con el cual se pudo identificar el marco de lectura “-3”, con el codón de inicio **atg** al principio de la secuencia y el codón de parada **taa** al final de la misma.

10.2. Secuencia completa de la Oxysterlina 1 en aminoácidos

>|c|Sequence 1 ORF:79..267 Frame -3

MNFYRIFVFALIVVALMCGQTDAGSKRWRKFEKRVKIKIFEETKEALPVVQGVVAVATAVGRR*

Se obtuvo la secuencia completa de la Oxysterlina 1 en aminoácidos, la cual fue introducida en el servidor que predice la ubicación de péptidos señales (SignalP 4,1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)), el péptido señal se ubicó en la posición 24 (Figura 14).

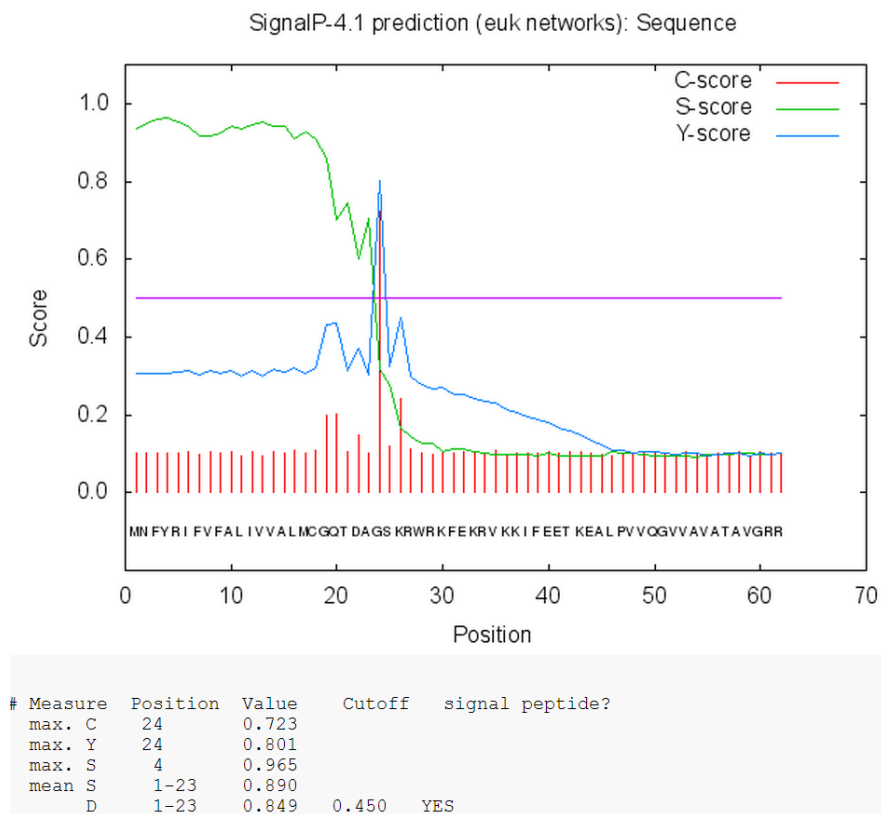


Figura 16. Grafica de arrojada por el servidor SignalP, ubicando el péptido señal de la Oxysterlina 1 en la posición 24.

El péptido señal fue removido de la Oxysterlina 1, obteniendo el péptido maduro, al cual se le realizo análisis de las características fisicoquímicas.

10.5. Modelamiento estructural de la Oxysterlina 1

La predicción de la estructura terciaria se hizo con RaptorX, identificando la posible estructura de la secuencia basado en el alineamiento de la secuencia diana y la plantilla utilizada, utilizando el visualizador JSmol, cada posición en la estructura es un código de colores de acuerdo a la naturaleza química de los residuos. El esquema utilizado es: Rojo = hidrofóbica, Azul = ácida, Magenta = básico, verde = hidroxilo + Amina (Figura 18).

El modelamiento estructural de la Oxysterlina 1 mostro una única alfa hélice sin bisagra en medio de la secuencia, con una cara acida en azul y una cara hidroxilo amina en verde



Figura 18. Modelamiento estructural de Oxysterlina 1 por el servidor RaptorX y visualizado en Jsmol en donde se observa una estructura de alfa hélice con una cola de residuos ácidos en el extremo carboxiterminal.

11. Síntesis química y ensayos de actividad de la Oxysterlina 1.

11.1. Proceso de síntesis química del péptido, evaluación de actividad citotóxica, antibacteriana, hemolítica y proceso de síntesis del gen sintético de la Oxysterlina 1

Debido a que la secuencia de la Oxysterlina 1 es más corta que la secuencia de la Oxysfensina 1, se obtuvo el péptido sintético de esta secuencia, para evaluar actividad citotóxica, antibacteriana, hemolítica.

11.2. Resuspensión del péptido sintético de la Oxysterlina 1

Los 6mg de péptido (Oxysterlina 1) liofilizado fueron resuspendidos en 300 μ L de agua destilada estéril (grado B.M) a una concentración de 20mg/mL, se alícuotó en fracciones de 10 μ L en cada tubo y se almacenó a -30°C hasta su uso.

11.3. Ensayo de la actividad citotóxica del péptido sintético Oxysterlina1

La evaluación del porcentaje de viabilidad sobre células Vero mostró una disminución mayor al 50% a una concentración del péptido de 2000 μ g/mL (figura 19). Se encontró un índice terapéutico de 320 comparado con la MIC de *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ESBL, *Salmonella typhi*, mientras que para *Enterobacter cloacae* se obtuvo un índice terapéutico de 160.

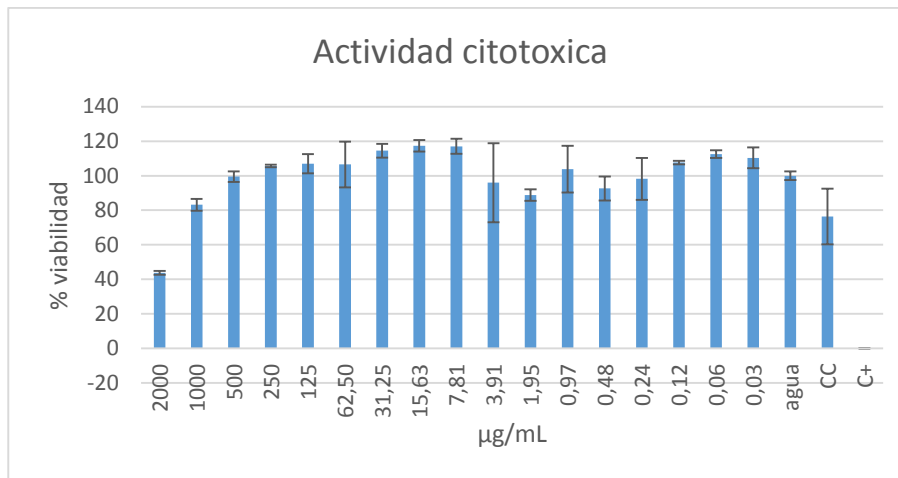


Figura 19. Grafico de barras de la evaluación de la actividad citotóxica del péptido sintético Oxysterlina 1. Porcentaje de viabilidad de células vero vs concentraciones del peptido en µg/mL (Oxysterlina 1), observando disminución de la viabilidad de las células en concentraciones de 2000 y 1000µg/mL.

11.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana del péptido sintético Oxysterlina 1

Se evaluó el péptido Oxysterlina 1 por microdilución en placa contra *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ESBL, *Salmonella typhi*, bacterias Gram negativas, *Staphylococcus epidermidis* una Gram positiva y *Candida alicans*, un hongo, encontrando la misma MIC (Concentración mínima inhibitoria) para *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ESBL, *Salmonella typhi*, siendo estas las que presentaron mayor porcentaje de inhibición del crecimiento (figura 20); el crecimiento de la *Enterobacter cloacae* se observó inhibido a una MIC más alta del péptido (12,5µg/mL), sin embargo para *S. epidermidis* y *Candida albicans* no se encontró actividad del péptido a ninguna de las concentraciones evaluadas (tabla 1).

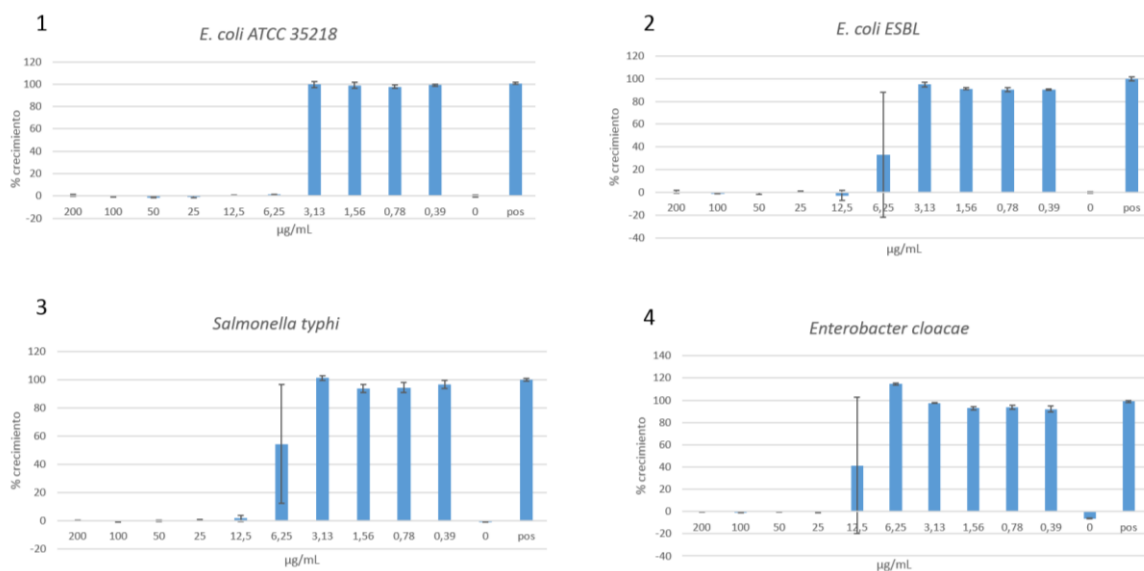


Figura 20. Graficas de barras de la evaluación de la actividad del péptido sintético Oxysterlina 1. 1. *E.coli ATCC 35218*, 2. *E. coli ESBL*, 3. *Salmonella typhi*, 4. *Enterobacter cloacae*. Porcentaje de crecimiento bacteriano vs concentración del péptido en µg/mL, observando una MIC de 6,25µg/mL contra *E.coli ATCC 35218*, *E. coli ESBL* y *Salmonella typhi* y una MIC de 12,5µg/mL contra *Enterobacter cloacae*.

Bacteria	MIC (µg/mL)
<i>E. coli ATCC 35218</i>	6,25
<i>E. coli ESBL</i>	6,25
<i>Salmonella typhi</i>	6,25
<i>Enterobacter cloacae</i>	12,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NPA
<i>Candida albicans</i>	NPA

Tabla 1. Concentraciones minimas inhibitorias (MIC) del peptido sintético (Oxysterlina 1) para *E. coli ESBL*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans*. NPA (no presente actividad).

11.5. Ensayo de actividad hémolítica del péptido sintético Oxysterlina1

No se observó hemólisis total de los eritrocitos, sin embargo a una concentración del péptido de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó un porcentaje de hemólisis de 19%, lo cual indica que la actividad hemolítica del péptido sobre eritrocitos humanos tuvo un pico de activación en esta concentración (Figura 21). Cabe resaltar que a la observación morfológica de estos se encontraron aglutinados a las concentraciones de (2000 – 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 22).

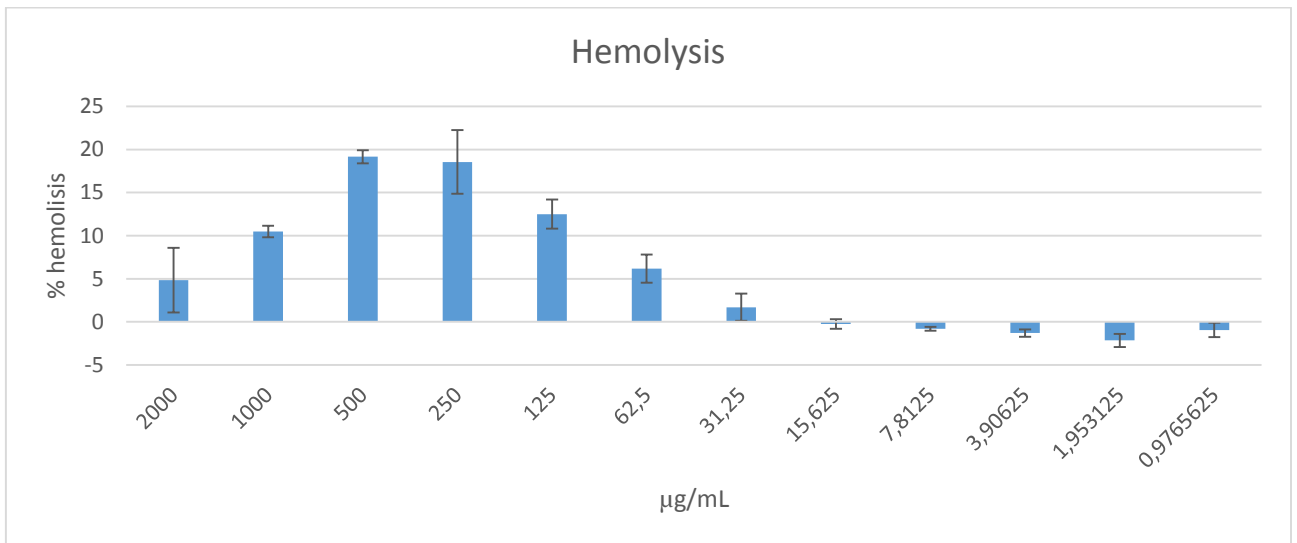


Figura 21. Grafica de barras de la evaluación de la actividad hémolítica del péptido sintético Oxysterlina 1. Porcentaje de hemólisis vs concentración del péptido sintético Oxysterlina en ($\mu\text{g}/\text{mL}$), observando un pico de actividad hemolítica a una concentración del péptido de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

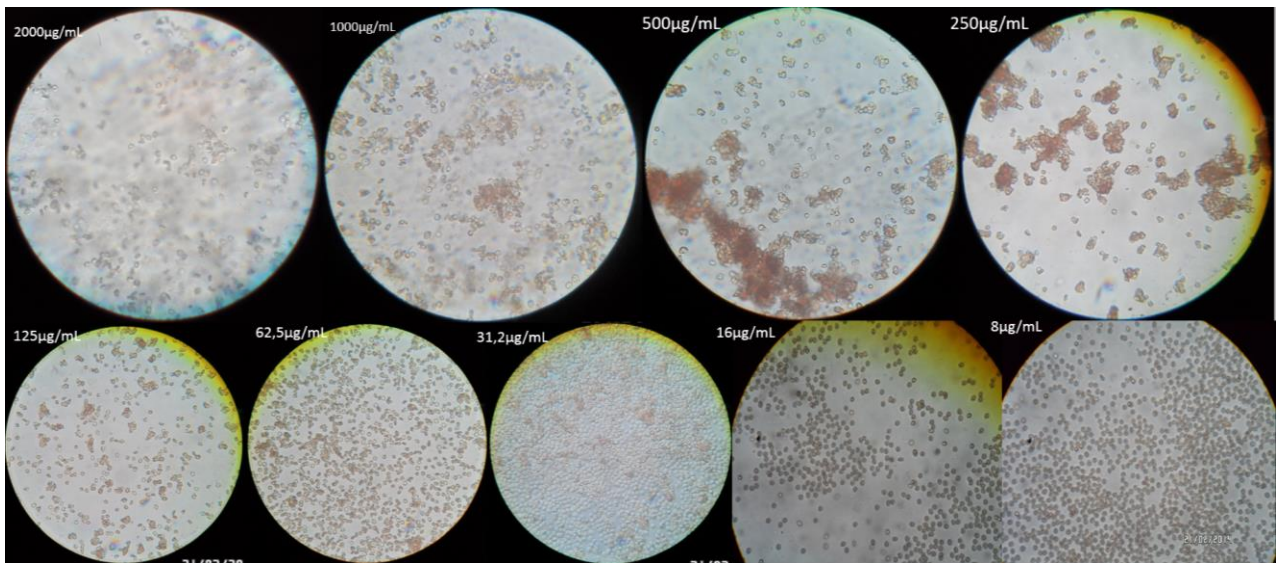


Figura 22. Morforlogia de eritrocitos humanos observados al microscopio optico (ULWCD 0,30, OLIMPUS; Japon), objetivo 40X, a concentraciones del peptido de 2000 – 8µg/mL, observando aglutinación de los eritrocitos a 500µg/mL.

11.6. Síntesis de la secuencia del gen recombinante Oxysterlina 1

El plásmido pD444-CH:150744 tuvo un tamaño aproximado de 114pb, obteniendo una concentración aproximada de 20ng/µl, diluidos en Tris HCl 10mM pH 7,4.

OXYSFENSINA 1

12. Análisis bioinformático de la Oxysfensina 1

12.1. Secuencia en nucleótidos de la Oxysfensina 1 identificada en el transcriptoma

Se obtuvo la secuencia en aminoácidos de la Oxysfensina 1 identificada en el transcriptoma del escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum*.

```
>comp637_c0_seq1OXYSTERNON
```

```
GCCCTCTACCGGAAGGCCAAGATTAGTTTGCAAACATCTCCAAAACCAGTACGTAACATCTTTAAGA  
AATGGCAAATTCTTCGTATTCGTTGCTATAATTGCCTTGTGCTTATCCATGGTCTTAAGCAACCCTC  
TACCGGAAGACCAAGAAGAGGGGAACCATAAGACAGAAGAGAGTGACTTGTGACGTGTTAAGTCTTG  
AGGCCAAAGGAGTGTCCGTCAACCATTCCGCTTGTGCTGTACACTGTCTTGCTCTTCGTAAGAAGGG  
TGGATCTTGCAAAGATGGCGTCTGCGTTTGCAGAAATTAAGTACGCTTTGTTTGATTGTTCTTTCT  
GATTAATTTTTTTGATCGTTTAAATATAAACGTAGAAAAACTGATAAAAAAAAAAAAAA
```

12.2. Identificación del marco de lectura y péptido señal de la Oxysfensina 1

Para la Oxysfensina 1 se identificó el marco de lectura "+3" con el codón de inicio **atg** al principio de la secuencia y el codón de parada **taa** al final de la misma, esta secuencia presento una longitud de 79 aminoácidos y 240 nucleótidos (Figura 23).

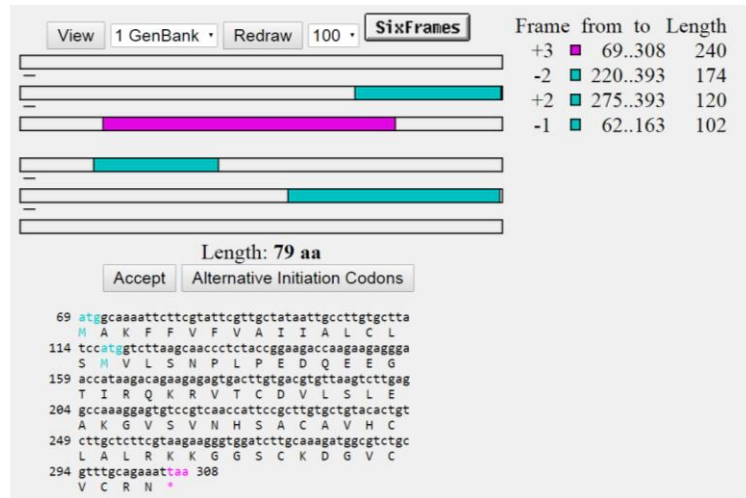


Figura 23. Resultado de la búsqueda del marco de lectura de la Oxysfensina 1 por el servidor ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), con el cual se pudo identificar el marco de lectura “+3”, con el codón de inicio **atg** al principio de la secuencia y el codón de parada **taa** al final de la misma.

Se obtuvo la secuencia en aminoácidos de la Oxysfensina 1

>|c|Sequence 1 ORF:69..308 Frame +3

**MAKFFVFVAIIALCLSMVLSNPLPEDQEEGTIRQKRVTCDVLSLEAKGVSVNHSACAVHCLALRKKGGSC
KDGVCVCRN***

A partir de esta secuencia se identificó el péptido señal por SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), para obtener la secuencia del péptido maduro, encontrando la ubicación de este péptido señal en la posición 21 de la secuencia (Figura 24).

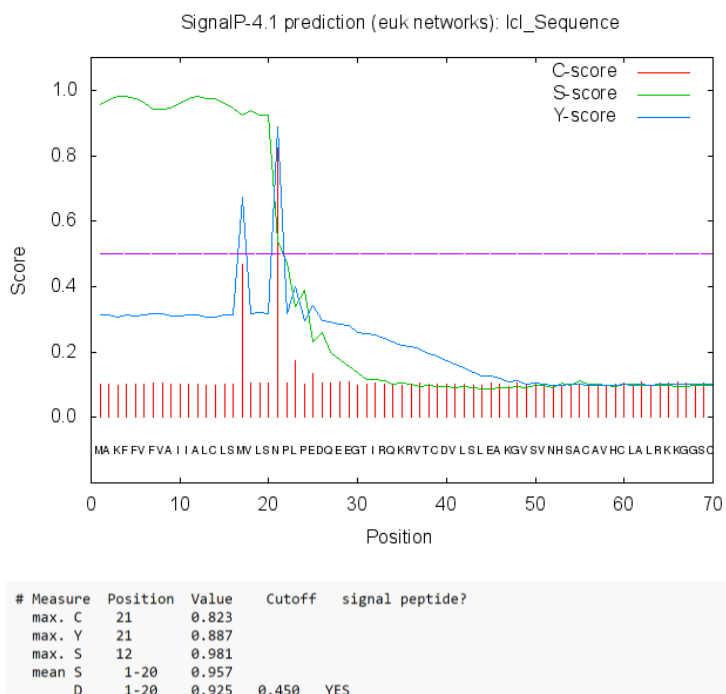


Figura 24. Grafica de arrojada por el servidor SignalP, ubicando el péptido señal de la Oxysfensina 1 en la posición 21 de la secuencia.

El péptido señal fue removido de la secuencia de la Oxysfensina 1 y se obtuvo la secuencia del péptido maduro, la cual fue utilizada para realizar el análisis de las características fisicoquímicas.

12.3. Secuencia en aminoácidos del péptido maduro de la Oxysfensina1

>lcl|Sequence 1 ORF:69..308 Frame +3
 NLPEDQEEGTIRQKRVTCDVLSLEAKGVSVNHSACAVHCLALRKKGGSCDKGVCVCRN

Se obtuvo una secuencia de 59 aminoácidos con un peso molecular de 6324,2 y un punto isoelectrico teórico de 8,32, con una composición de aminoácidos de 1,7% de I; 3,4% compuesta de Q, H, P y T; 5,1% de riqueza N y D; 6,8% para A, R, E y S; 8,5% compuesta de G, L y K; 10,2% compuesta de C y finalmente 11,9% de composición con V.

El número total de residuos cargados negativamente (Asp+Glu) fue 7 y número total de residuos cargados positivamente (Arg+Lys) fue 9.

Se realizó la identificación de dominios conservados, identificando tres enlaces disulfuro en la posición 19, 36 y 40 de la secuencia con un score de 9,96 (Figura 25).



ScanProsite Results Viewer

Output format: Graphical view - this view shows ScanProsite results together with ProRule-based predicted intra-domain features [help].

Hits for all PROSITE (release 20.107) motifs on sequence USERSEQ1 :

found: 1 hit in 1 sequence

USERSEQ1 (59 aa)

NPLPEDQEEGTIRQK RVT D V L S L E A K G V S V N H S A C A V H C L A L R K K G G S K D G V C V C R N

Please note that the graphical representations of domains displayed hereafter are for illustrative purposes only, and that their colors and shapes are not intended to indicate homology or shared function.

For more information about how these graphical representations are constructed, go to <http://prosite.expasy.org/mydomains/>.

hits by profiles: [1 hit (by 1 profile) on 1 sequence]

Upper case represents match positions, lower case insert positions, and the '-' symbol represents deletions relative to the matching profile.

Hits by **PS51378 INVERT_DEFENSINS** *Invertebrate defensins family profile* :

ruler: 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000

USERSEQ1  (59 aa)

16 - 59: score = 9.966

RVT D V L S L E A K G V S V N H S A C A V H C L A L R K K G G S K D G V C V C R N

Predicted features:

DISULFID	19	50	By similarity	[condition: C-x*-C]
DISULFID	36	55	By similarity	[condition: C-x*-C]
DISULFID	40	57	By similarity	[condition: C-x*-C]

Figura 25. Resultado de la búsqueda de dominion y motivos conservados en la secuencia madura de la Oxysfensina 1. Observando tres puentes disulfuro en las posiciones 19, 36 y 40.

12.4. Estructura secundaria de la Oxysfensina 1

La predicción de la estructura secundaria se realizó utilizando el servidor Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) nos arrojó una predicción de estructuras de Láminas beta desde la posición 16-19 y 54-57 y hélices alfa 33-43 (Figura 26).

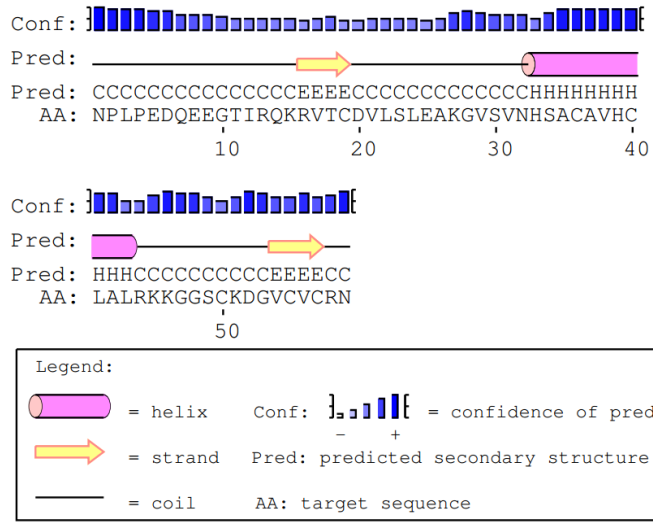


Figura 26. Resultado de la predicción de la estructura secundaria utilizando el servidor Psipred, observando laminas beta y hélices alfa dentro de la estructura.

12.5 Modelamiento estructural de la Oxysfensina 1

La predicción de la Oxysfensina 1 arrojó la ubicación de estructuras laminas beta (rojo) y helices alfa (verde) (figura 27).

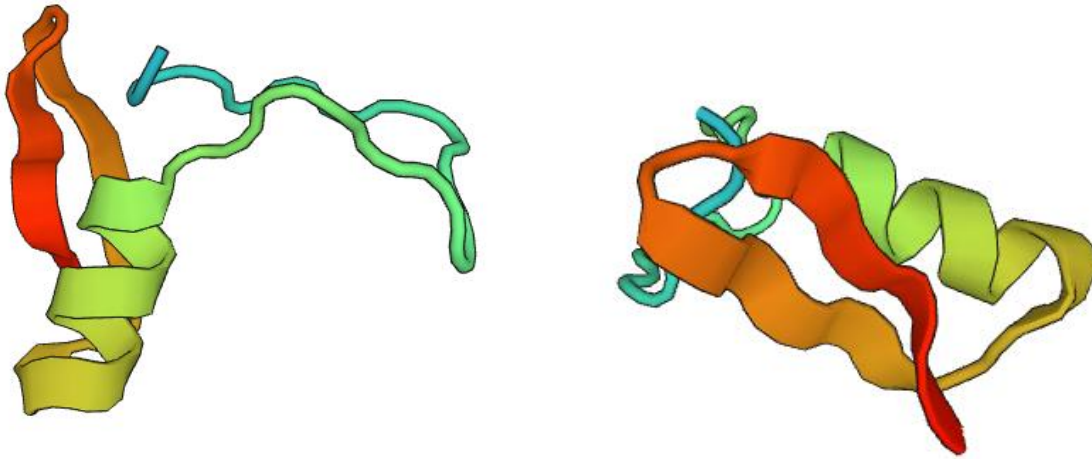


Figura 27. Modelamiento estructural de la secuencia de la Oxysfensina 1, utilizando el servidor Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/interactive/weZ8jV/templates/>) y el visualizador PV (<http://biasmv.github.io/pv/>), observando laminas beta y helices alfa.

13. Proceso de clonación, expresión y purificación del péptido Oxysfensina 1

13.1. Clonación de la Oxysfensina 1 y secuenciamiento

La Oxysfensina 1 fue clonada en el plásmido pEXP5-CT/TOPO®TA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó extracción de plásmidos con el kit (PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kits) y fueron sometidos a secuenciación.

Arrojando un 100% de identidad entre la secuencia plantilla y el resultado del secuenciamiento, con la secuencia en nucleótidos como de aminoácidos (Figura 28).

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

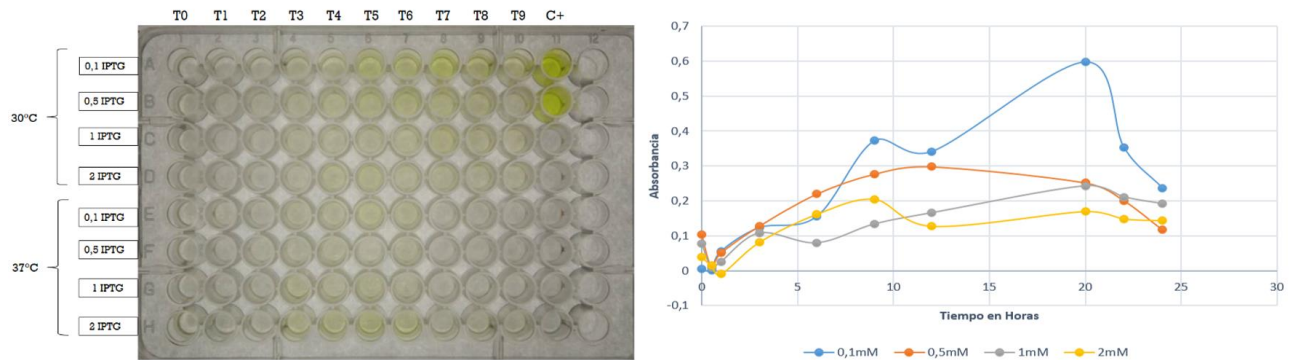
D1      -NPLPEDQEEGTIRQKRVTCDVLSLEAKGVSVNHSACAVHCLALRKKGGSKDGVVCVRN 59
D1C1    MNPLPEDQEEGTIRQKRVTCDVLSLEAKGVSVNHSACAVHCLALRKKGGSKDGVVCVRN 60
D1C9    MNPLPEDQEEGTIRQKRVTCDVLSLEAKGVSVNHSACAVHCLALRKKGGSKDGVVCVRN 60
          *****

D1      -----
D1C1    KGHHHHHH 68
D1C9    KGHHHHHH 68
  
```

Figura 28. Resultado del alineamiento por ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Entre el resultado del secuenciamiento y la secuencia plantilla. Obteniendo un 100% de identidad en el alineamiento.

13.2. Expresión de la Oxysfensina 1

Se logro expresar el péptido Oxysfensina 1 en células *E. coli BL21* con 0,1mM de IPTG a 30°C a las 20 horas post-inducción. Lo cual fue visualizado por ELISA (figura 29), electroforesis y Wester blot, tal como se describe arriba en la metodología.



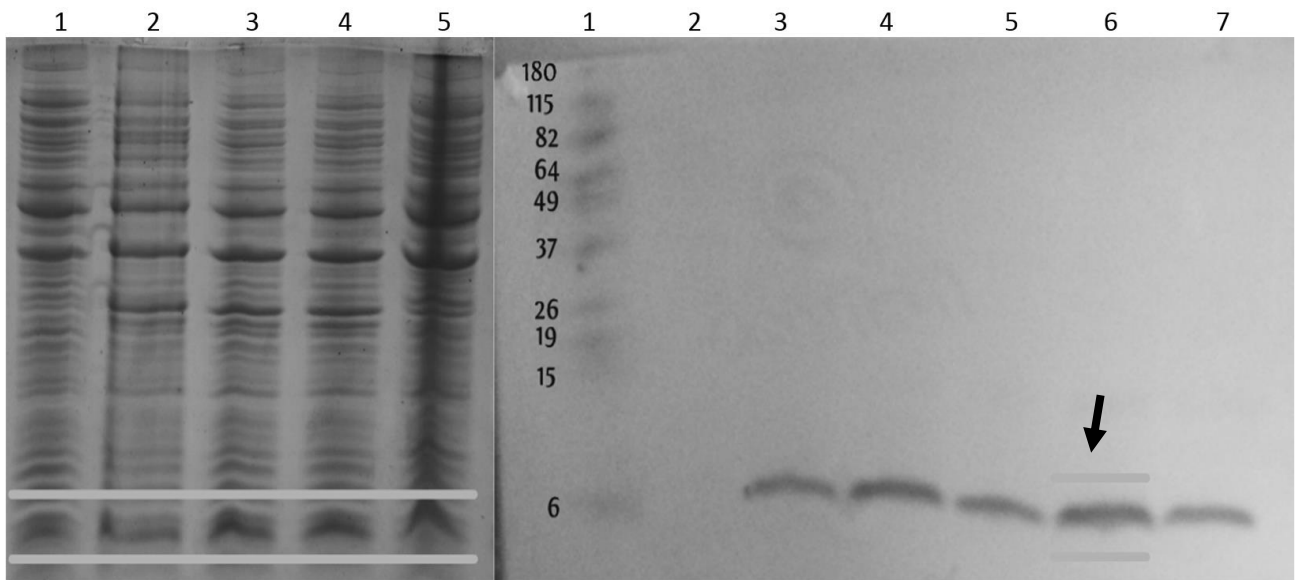
1. ELISA de la expresión del péptido Oxysfensina 1. Bajo dos temperaturas, cuatro concentraciones de IPTG y diez tiempos. Observando mayor expresión a las 20 horas post-inducción con 0,1mM de IPTG a 30°C.

2. Valores de absorbancia de la expresión del péptido Oxysfensina 1 a 30°C. Evaluando cuatro condiciones de IPTG (0,1;0,5;1 y 2mM), observando mayor expresión a las 20 horas post-inducción con 0,1mM de IPTG.

Figura 29. Expresión de la Oxysfensina 1 en *E. coli BL21*. 1. Placa de microtitulación con mayor intensidad de color en el tiempo 7 (20 horas) post-inducción a 30°C. 2. Valores de absorbancia a 30°C, con cuatro condiciones de IPTG (0,1;0,5;1 y 2mM), observando un pico de absorbancia de 0,6 (azul) a las 20 horas, 0,1mM de IPTG.

13.3. Visualización de la banda esperada (6Kd) después de la expresión de la Oxysfensina1

Las alícuotas recogidas en los diez tiempos fueron resuspendidas tal como se describe arriba en la metodología, obteniendo una banda aproximada de 6Kd en el gel de poliacrilamida al 12% para todos los tiempos señalado con rallas paralelas (Figura 30.1), no obstante se puso observar una banda mas pronunciada a la 20 horas a 37°C en la condición A de IPTG (0,1mM). En el Wester Blot se obtuvo la banda en el peso esperado para todos los tiempos excepto el tiempo 0 (0.0.A), sin embargo se observo una banda mas pronunciada a la 20 horas a 30°C en la condición A de IPTG (0,1mM) señalado en rallas paralelas (Figura 30.2).



1. Gel de poliacrilamida al 12%. Alícuotas recogidas después de la expresión con IPTG. Carril 1. hora 0, 37°C, 0,1mM IPTG. Carril 2. hora 9, 37°C, 2mM IPTG. Carril 3. hora 20, 37°C, 0,1mM IPTG. Carril 4. hora 9, 37°C, 0,1mM. Carril 5. hora 9, 30°C, 0,1 IPTG.

2. Membrana de PVDF después del Wester Blot con alícuotas de diferentes tiempos, después de la expresión de la Oxysfensina 1. Carril 1. Marcador de peso molecular (BenchMark; Pre-stained Protein Ladder, Life Technologies). Carril 2. tiempo 0, 30°C, 0,1mM IPTG. Carril 3. hora 9, 30°C, 0,1mM IPTG. Carril 4. hora 9, 30°C, 2mM IPTG. Carril 5. hora 9, 37°C, 0,1mM IPTG. Carril 6. hora 20, 30°C, 0,1mM IPTG. Carril 7. hora 20, 37°C, 0,1mM IPTG.

Figura 30. Visualización de la banda de la Oxysfensina 1 después del proceso de expresión. 1. Electroforesis en gel de Tricina al 12% de las alícuotas en diferentes tiempos de la Oxysfensina 1. Observando la banda del péptido en un peso aproximado de 6Kd. **2.** Wester blot de las alícuotas recogidas a la horas 0, 9 y 20, para 30°C y las mismas horas para 37°C.

13.4. Purificación de la Oxysfensina 1

Se logro purificar parcialmente la Oxysfensinas 1 recombinante, primero se paso el lisado, (preparado tal como se definio arriba en la metodología), este lisado se paso por la columna de Ni-Sepharosa (HisTrap HP*5mL. GE Healthcare Life Sciencies), luego se realizo un lavado de la columna con el buffer conteniendo 20mM de imidazol, esta fracción fue recogida y marcada como LAVADO, despues se paso por la columna el buffer de elusión que contenia 500mM de Imidazol, recojiendo 80 FR (FRACCIONES RETENIDAS), estas fracciones fueron marcadas de 1 – 76 y se leyeron en el espectrofotometro EPOCH (Biotek) a 280nm obteniendo un valor de concentración del péptido en (mg/mL), obteniendo fracciones entre la 15-20 con concentraciones del péptido desde 0,071mg/mL – hasta 0,137 mg/mL y las fracciones 18 – 26 con concentraciones entre 0,05 y 0,03mg/mL. La maxima concentración del péptido obtenida fue de 0,137 mg/mL en la fracción 17 (Figura 31). Algunas de estas fracciones fueron guadadas juntas para obtener mayor concentración del péptido , como las fracciones (15-17), (18-19) y (20-26).

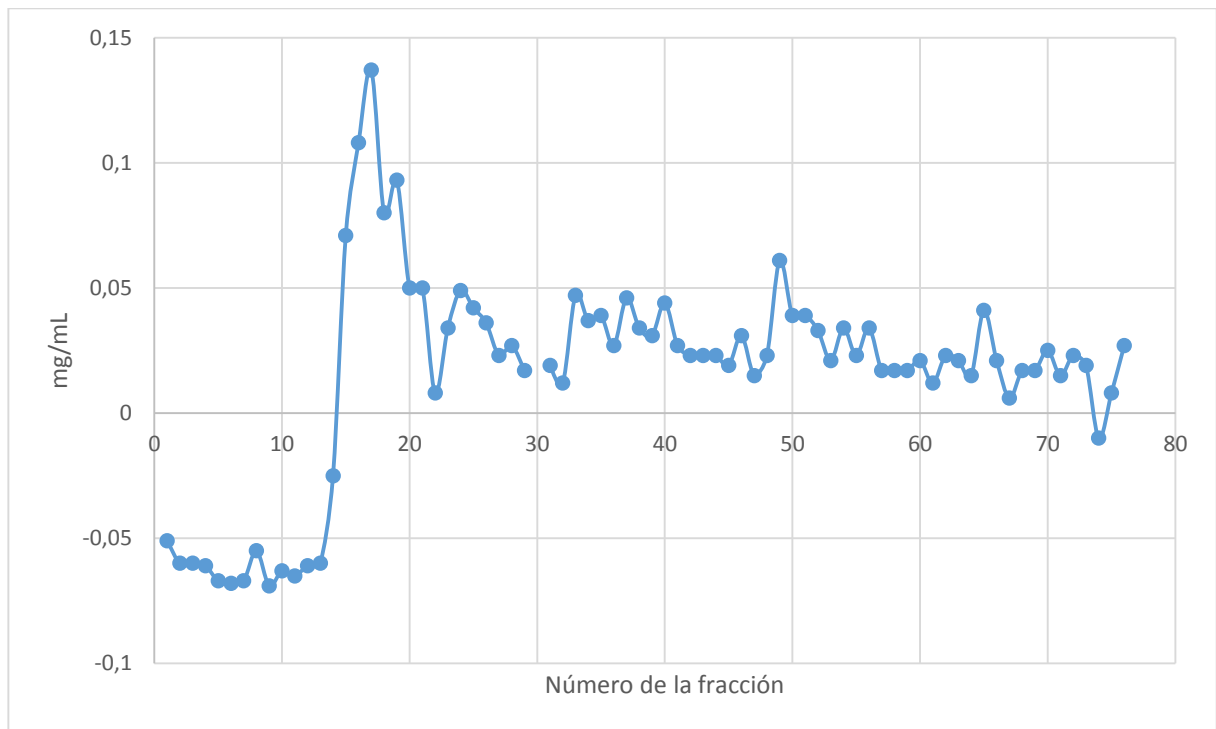


Figura 31. Concentración en mg/mL de las 76 fracciones retenidas (FR). Donde se observa un pico de concentración de la Oxysfensina 1 entre las fracciones 15-26. Algunas de las cuales fueron guardadas juntas.

Estas fracciones fueron confirmadas y visualizadas por electroforesis de tricina al 12% y Wester blot, tal como se explico en la metodología (Figura 32).

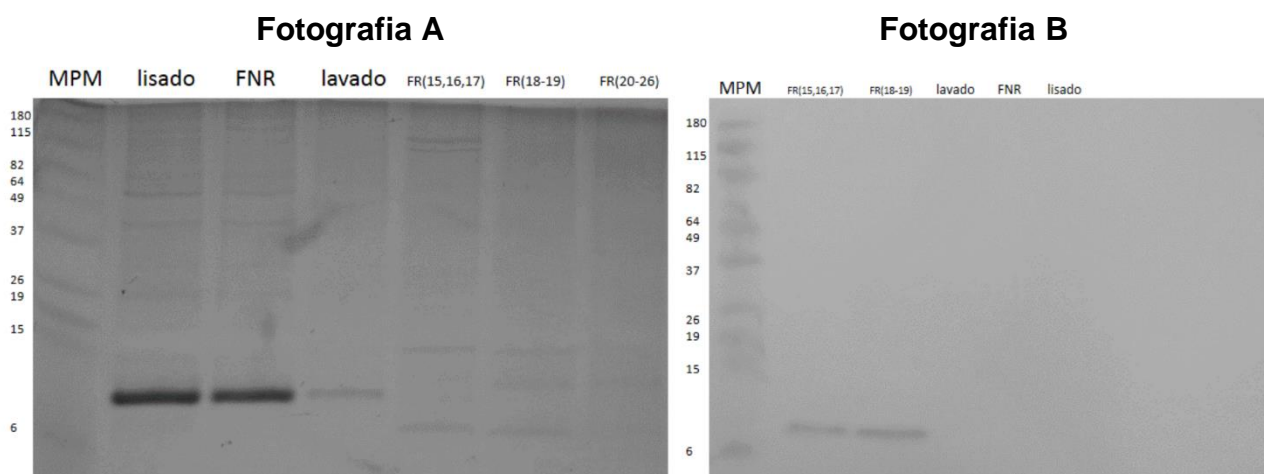


Figura 32. Electroforesis y Wester blot visualizando las fracciones retenidas (FR) 15-26. Fotografía A. carril 1. Marcador de peso molecular (MPM), carril 2. lisado, carril 3. fracción no retenida (FNR), carril 4. Lavado, carril 5. FR (15,16,17), carril 6. FR (18-19), carril 7. FR (20 – 26). **Fotografía B.** carril 1. Macador de peso molecular, carril 2. FR (15,16,17), carril 3. FR (18,19), carril 4. Lavado, carril 5. FNR, carril 6. Lisado.

9. DISCUSIÓN

En este estudio, nosotros identificamos las secuencias de dos genes de PAMs después de una inducción de la respuesta inmune en *Oxysternon conspicillatum*, uno de ellos, la Oxysterlina 1, activo contra bacterias Gram negativas y los caracterizamos dentro de dos grupos de PAMs de acuerdo a sus perfiles a sus perfiles. El cuerpo graso es un tejido adiposo unido a la superficie interna de la cutícula y distribuido en todos los segmentos del animal. Es un órgano biosintético, funcional, análogo al hígado de los mamíferos (Søndergaard L., 1993) y el responsable de la síntesis de péptidos antimicrobianos en los insectos (Samakovlis C, 1990), (Peter Vilmos, 1998). Por esta razón fue que utilizamos el cuerpo graso como muestra para la realización del transcriptoma de *Oxysternon conspicillatum* en el cual logramos identificar 14 secuencias de péptidos antimicrobianos de las familias de las defensinas, cecropinas y coleopterinas.

Los insectos y en particular los que pertenecen al Orden Coleoptera mantienen en un ambiente lleno de bacterias patógenas en donde otros seres vivos tendrían dificultades para sobrevivir, por lo tanto estos coleopteros presentan diferentes mecanismos fundamentales de reconocimiento de estos patógenos como los PAMs. En los invertebrados la producción de estos péptidos se caracteriza por su rápida síntesis y secreción hacia la hemolinfa después de una infección microbiana y sus genes están principalmente activos en el cuerpo graso y los hemocitos (Kaneko Y, 2007). El sistema inmune de los insectos se caracteriza, por un sistema innato con componentes tisulares y celulares como el cuerpo graso, ganglios linfáticos y hemocitos (Tepass U, 1994). Y un componente humoral, caracterizado por 3 principales procesos; melanización mediada por peroxidasas, serin proteasas, precursor de formación de quinonas y melanina; coagulación de la hemolinfa y síntesis de PAMs (Vilmos P, 1998).

En *Oxysternon conspicillatum* el efecto antimicrobiano se hace muy evidente, al ser excremento humano, porcino o bovino el ambiente donde este escarabajo desarrolla su ciclo vital (Cultid Carlos A, 2001). En este trabajo identificamos la presencia de varias secuencias putativas de PAMs y encontramos que el péptido Oxysterlina 1 se encuentra en el cuerpo graso de individuos adultos después de una infección con bacterias. Este resultado nos da a pensar que los individuos adultos del escarabajo coprofago *Oxysternon conspicillatum* tienen mecanismo de defensa que les permiten inducir una respuesta inmune con la producción de péptidos antimicrobianos en este caso demostrado con el péptido Oxysterlina 1. El hecho de haber hallado todas estas secuencias putativas de péptidos antimicrobianos nos permite concluir que estos PAMs, pueden estar implicados

como moléculas efectoras en la habilidad del escarabajo para matar algunas bacterias que están presentes en el ambiente de *Oxysternon conspicillatum*.

Los péptidos de la familia de las cecropinas son peptidos pequeños (31-39 aminoácidos) que exhiben un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. También pueden matar a algunos microorganismos patógenos en concentraciones nanomolares con poco efecto sobre las células eucarióticas normales. Hasta la fecha, cecropinas se han aislado de muchos insectos (D.G. Tamang M. S., 2006), (P. Bulet, 2005), (K.A. Brogden, 2003), (Yoe S, 2006). En el presente estudio hemos aislado una secuencia de una cecropina a partir de ADNc de *Oxysternon conspicillatum* (designado como Oxysterlina 1); además, analizamos su actividad contra diferentes bacterias. La Oxysterlina 1 sintética mostró alta actividad antibacterial (concentraciones de microgramos) contra bacterias Gram negativas y no presentó actividad contra *S.aureus* ni contra *Candida albicans*.

Los péptidos de la familia de las cecropinas están caracterizados por tener de 31 a 39 amino-ácidos, un extremo amino terminal anfipático y uno carboxilo terminal hidrofóbico y se han identificado características fisicoquímicas esenciales para la actividad antimicrobiana como la carga neta positiva a pH neutro, el momento hidrofóbico de las regiones alfa hélice y la presencia de una bisagra en la región central (Boman HG W. D., 1989), (WB & Jones VP, 2001). La actividad del péptido sintético Oxysterlina 1 se explica debido a que esta secuencia presenta las características fisicoquímicas (alto punto isoeléctrico, no tiene puentes disulfuro, estructura de alfa hélice sin láminas beta, una cara hidrofóbica y una hidrofílica) esenciales para esta actividad, además, al realizar un alineamiento con otras cecropinas de dípteros y de coleópteros, identificamos que este péptido se agrupa junto con la cecropina 2 del escarabajo *Tribolium castaneum*, en una rama aparte de los dípteros por lo que deducimos que tiene características similares a las cecropinas de otros coleópteros, esta actividad antimicrobiana, con una mínima actividad hemolítica y citotóxica convierte a la Oxysterlina 1, en un buen candidato para el desarrollo de nuevos compuestos, motivo por el cual nos propusimos desarrollar la secuencia de este péptido recombinante.

Hoy en día existe una necesidad urgente de desarrollo de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana dada la alta incidencia de infecciones nosocomiales y los perfiles de multi-drogo resistencia especialmente en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y del grupo de *Enterobacter* contra las cuales el grupo de medicamentos activos se ha ido reduciendo (Boucher HW, 2009). En este trabajo se logró identificar, sintetizar y

evaluar actividad contra bacterias gram negativas e incluso aislados clínicos de unidad de cuidados intensivos con perfiles de resistencia de Beta lactamasa de espectro extendido (ESBL), encontrando una MIC en un buen rango de actividad 6,25µg/mL comparado con otros trabajos donde evaluaron otros péptidos antimicrobianos contra aislados clínicos multi-drogo resistentes con una defensina con 25µg/ml y Ascaphin-8 (1-6µM) (Eley A, 2008), (Sahly H, 2006). La actividad antimicrobiana de la Oxysterlina 1 se puede explicar debido a que su estructura presenta un extremo anfipático amino terminal por donde el péptido podría interaccionar con las membranas bacterianas, esto concuerda con lo descrito para otras cecropinas donde reportan que este segmento es el principal responsable de la interacción con membranas, dado su momento hidrofóbico y polaridad (Boman, 1989).

Los péptidos de la familia de las cecropinas son un grupo diverso que se ha reportado no solo en insectos sino también en tunicados (Zhou W, 1996) y nematodos como el ascaris (Griffiths, 2005). Hasta la fecha, para el orden coleoptera, *Acalolepta luxuriosa* y *Tribolium castaneum*, son los únicos, en los cuales se han identificado secuencias de péptidos antimicrobianos de la familia de las cecropinas. El reporte de las secuencias encontradas en este trabajo amplía la base de datos de péptidos antimicrobianos en coleopteros, lo cual permite identificar una nueva diversidad de péptidos antimicrobianos de las defensinas y cecropinas dentro de este grupo de insectos, lo que facilitaría para otros trabajos la búsqueda de secuencias homologas a estas.

Las defensinas es una familia de péptidos antimicrobianos que presentan de 29-34 aminoácidos y contienen seis residuos conservados de cisteínas, ligadas a tres puentes disulfuro (Andreu & Ubach J, 1992). La evaluación fisicoquímica y estructural realizada por el programa ProParam y RaptorX, de las secuencias de las seis defensinas identificadas en este trabajo demostraron tener estas características, todas presentaron puentes disulfuro como en el caso de la Oxysfensina 1 que presentó estos puentes en la ubicación 19 y 50, todas presentaron un tamaño de 49- 62 aminoácidos y una estructura compuesta de alfa hélices y láminas beta.

En las cecropinas se ha reportado un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas y negativas, estos actúan sobre lípidos de membrana y generan una disrupción y desintegración por lo que producen una lisis bacteriana (Andreu et al., 1992), en este estudio se pudo comprobar la actividad de la Oxysterlina 1 contra bacterias Gram negativas, donde se inhibió el 100% de crecimiento a concentraciones del péptido por encima de la MIC (200-12,5µg/mL). La estructura de esta cecropina demostró ser una sola alfa hélice (no tiene bisagra), con un punto isoelectrico de 11,04 relativamente alto, presentó una mínima

actividad hemolítica y citotóxica, lo cual arrojó un índice terapéutico de 320 en el caso de *E. coli* ATCC.

10. RECOMENDACIONES

El secuenciamiento del transcriptoma demostró ser una técnica rápida, costo-efectiva, para la búsqueda de nuevos genes, en particular de péptidos antimicrobianos, en comparación con la búsqueda basada por PCR y diseño de primers degenerados basados en las secuencias de otros escarabajos como *Tribolium castaneum*, ya que en la primera fase de este estudio no logramos por esta técnica la identificación de ningún blanco (dato no presentado), mientras la técnica del secuenciamiento masivo nos permitió identificar 6 secuencias de péptidos antimicrobianos, además del hecho de que quedan muchos otros genes por analizar e identificar dentro del transcriptoma con cerca del 37% de los contigs sin ninguna función o descripción definida.

Para el ensayo de expresión es recomendable verificar la velocidad de agitación y realizar el ensayo en las mismas condiciones de aireación que para la producción a gran escala, ya que en este trabajo nos vimos en serias dificultades por tales razones.

11. CONCLUSIONES

- Se identificaron seis secuencias de péptidos antimicrobianos en el transcriptoma de *Oxysternon conspiciatum* homólogos de la familia de las defensinas y cecropinas.
- Se caracterizó por identidad las familias de péptidos antimicrobianos a los cuales pertenecieron las secuencias identificadas en el transcriptoma del escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum*.
- Las seis secuencias validadas por PCR arrojaron una banda menor de 200 pb, lo cual es el peso esperado debido al tamaño tan pequeño de estos péptidos.
- Fue posible clonar la secuencia de la Oxysfensina 1 en el plásmido pEXP5-CT.
- Se logró establecer las condiciones de expresión de la Oxysfensina 1 (30°C; 0,1 mM; 20H) en *E. coli BL21*.
- Se logró purificar parcialmente la Oxysfensina 1.
- El péptido sintético (Oxysterlina 1) inhibió el crecimiento bacteriano de *E. coli ATCC 35218*, *E. coli ESBL* y *Salmonella typhi*.
- Por lo tanto el péptido sintético es antibacteriano, para bacterias Gram negativas y hasta ahora no presenta actividad antimicótica ni antibacteriana contra bacterias Gram positivas.

12. PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

Este trabajo ha sido presentado en el IX Encuentro Nacional de Investigación en enfermedades infecciosas. Entre 15-17 de agosto del 2014 (anexo 9).

Congreso Latino-Americano de estudiantes de biología. Armenia 13-17 de octubre de 2014.

13. BIBLIOGRAFIA

- Altincicek B, V. A. (2007). Analysis of the immune-inducible transcriptome from microbial stress resistant, rat-tailed maggots of the drone fly *Eristalis tenax*. *BMC Genomics* , 8:326.
- Amézquita S. J., A. F. (1999). Comparación de la composición y riqueza de especies de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) en remanentes de bosque de la Orinoquia Colombia . *Acta Zoologica Mexicana* , 76: 113 –.
- Andersson, D. I. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews. Microbiology* , 8(4), 260–71.
- Andreu D, M. R. (1985). N-terminal analogues of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties. . *Biochemistry* . , 24:1683–1688.
- Andreu D, U. J. (1992). Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. . *FEBS Lett.*, 296:190–194.
- Arenas, G. G. (2009). A novel antifungal peptide designed from the primary structure of a natural antimicrobial peptide purified from *Argopecten purpuratus* hemocytes. *Peptides*, 30(8), 1405–11.
- Barbault F, L. C. (2003). Vovelle F: Solution structure of Alo-3: a new knottin-type antifungal peptide from the insect *Acrocinus longimanus*. . *Biochemistry* , 42:14434-14442.
- Boman HG, W. D. (1989). Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropinmelittin hybrids. *FEBS Lett.*, 259:103–106.
- Bornemissza GF, W. C. (1970). An effect of dung beetle activity on plant yield. . *Pedobiologia* , 10: 1-7. .
- Borth WB, J. V. (2001). Effects of synthetic cecropin analogs on in vitro growth of *Acholeplasma laidlawii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* , 45:1894–1895.
- Boucher HW, T. G. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. . *Clin Infect Dis.* , 48:1-12.
- Brogden, K. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nat Rev Microbiol.*, Mar;3(3):238-50.
- Bulet P, C. S. (1991). Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *J Biol Chem* , 266:24520-24525.
- Butel P, H. C. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function . *Developmental and Comparative Immunology* , 23:329-44.
- Cabrera, C. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos , antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Medica*, 38, 149–158.

- Cabrera, C. E. (2011). Epidemiology of nosocomial bacteria resistant to antimicrobials. *Colombia Medica*, 42(1), 117–125.
- Cerenius L, L. B. (2008). The ProPO-System: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in immunology*, 29:263-71.
- Chen HM, W. W. (1997). Effects of the antibacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. *Biochim. Biophys. , (acta 1336):171–179.*
- Chen, Y. M. (2005). Rational Design of α -Helical Antimicrobial Peptides with. *Journal Biology Chemistry*, 280(13), 12316–12329.
- Chicharro C, G. C. (2001). N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1–7)M (2–9), a cecropin-melittin hybrid peptide,. *Antimicrob. Agents Chemother. , 45:2441–2449.*
- Cuadrado-Ríos S, C.-V. K.-G.-M. (2014). Phylogenetic analysis of four dung beetle species of neotropical genus Oxytarnon (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) based on 28S and COI partial regions. . *Springer*, pp 213-219. Sp.
- Cuadrado-Ríos Sebastián, C.-V. K.-G.-M. (s.f.). Phylogenetic analysis of four dung beetle species of neotropical genus Oxytarnon (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) based on 28S and COI partial re.
- Cultid Carlos A, M. U. (2001). Listado de géneros de escarabajos coprófagos incluidos en esta clave (Modificado por Medina & Lopera). En F. N. Colombia., *escarabajos coprofagos del eje cafetero* (págs. 39-46). Bogota .
- D.G. Tamang, M. S. (2006). The cecropin superfamily of toxic peptides. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology , 94–103.*
- Díaz, A. (2011). MECHANISM OF ACTION OF CYCLIC ANTIMICROBIAL PEPTIDES. *Nature*, 389-395.
- Edmonds, W. &. (2004). Revision of the Neotropical dung beetle Genus Oxysternon (Scarabaeidae: Scarabaeinae: Phanaeini). *Folia Heyrovskyana, Supplementum , 11: 1-58.*
- Eley A, I. M. (2008). Activities of the frog skin peptide, ascaphin-8 and its lysine-substituted analogs against clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing bacteria. *Peptides*, 29:25-30.
- Escobar, F. &. (2000.). Distribución espacial y temporal en un gradiente de sucesión de la fauna de escarabajos coprófagos (Scarabainae, Aphodiinae) en un bosque tropical montano, Nariño – Colombia. . *Revista de Biología Tropical , 48: 961 – 975.*
- Escobar, F. (2000). Diversidad de coleópteros coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) en un mosaico de hábitat en la Reserva Natural Nukak, Guaviare, Colombia. *Acta Zool Mex (ns)*, 79: 103-121.
- Fincher, G. T. (1981). The potential value of dung beetles in pasture ecosystems. . *J. Ga. Entomol. Soc. , 16, 316 – 333. .*

- Fink J, B. A. (1989). synthesis and antibacterial activity of cecropin-like model peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* , 33:412–421.
- G., G. (2000). Forest use at the Pacific coast of Chocó, Colombia: A quantitative approach. *Economic Botany* , 54(3): 358-376.
- Germán Alberto Téllez, J. C.-O. (2014). Expression and purification of an active cecropin-like recombinant protein against multidrug resistance Escherichia coli,. *Protein Expression and Purification* , , Pages 48-53.
- Germán Alberto Téllez¹, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. Revisión de tema. . *Infectio.* , 14(1): 55-67. .
- Ghiselli R, G. A. (2004). Cecropin B enhances betalactams activities in experimental rat models of gram-negative septic shock. . *Ann Surg.* , 239:251–256.
- Gill, B. (1991). Dung beetles in tropical American forest. . En I. & Hanski, *Dung beetle ecology*. Princeton University Press. (págs. Pags. 211-229). Princeton, New Jersey. 475p.: Cambefort (Editores).
- Griffiths, B. S. (2005). A Comparison of Soil Microbial Community Structure. *Protozoa and Nematodes in Field Plots of Conventional and Genetically Modified Maize Expressing the Bacillus thuringiensis is CryIAb Toxin.*, 135-146.
- H. Steiner, D. A. (1988). Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects, . *Biochimica et Biophysica Acta* 939 , 260–266.
- H.G. Boman, D. W. (1989). Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropinmelittin hybrids. *FEBS Lett*, 259:103–6.
- Hancock. (2000). Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Invest Dis*, 9: 1723–29.
- Hancock RE, S. H. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. . *Nat Biotechnol.* , 24:1551-7.
- Hong SY, O. J. (1998). Identification and characterization of novel antimicrobial decapeptides generated by combinatorial chemistry. . *Antimicrob Agents Chemother.* , Oct;42(10):2534-41.
- Hultmark, D. (2003). Drosophila immunity: Path an patterns. *Current Opinion in immunology*, 15:12-9.
- Imler, J. B. (2005.). Antimicrobial peptides in Drosophila: structures, activities and gene regulation. *Chem. Immunol. Allergy* , 86, 1–21.
- Jacqueline, C. A.-F. (2004). In vivo efficacy of linezolid in combination with gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant Staphilococcus aureus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(4), 393–6.

- Ji-Won Park, C.-H. K.-H. (2010). BEETLE IMMUNITY. En K. Söderhäll., *Invertebrate Immunity* (págs. 163-180). Korea: Springer Science+Business Media.
- K.A. Brogden, M. A. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents* , 465–478.
- Kaneko Y, F. S. (2007). Expression of antimicrobial peptide genes encoding Enbocin and Gloverin isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. . *Biosci Biotechnol Biochem.*, Sep;71(9):2233-41.
- Laszlo Otvos. (2000). Antibacterial peptides isolated from insects,. *Journal of Peptide Science. An Official Publication of the European Peptide Society* 6, 497–511.
- Lavine MD, S. M. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* , 22:469-80.
- Lee, Y. C. (1996). Structure and expression of the tenecin 3 gene in *Tenebrio molitor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 218, 6–11.
- Lemaitre, B. N. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86: 973–983.
- Levy, S. (1998). The challenge of antibiotic resistance. *Sci. Am.*, 278: 46-53.
- Marr AK, G. W. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use:obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology* , 6: 468-472.
- Marshall, S. H. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3).
- Martín Piera, F. &. (1996). Coleópteros de la Sierra de Chiribiquete . *Elytron*, 10: 23-50.
- McKinney, G. T. (1975.). The agronomic role of introduced dung beetles in grazing systems. . *J. Appl. Ecol.* , 12, 831 – 837.
- Medina C, L. A. (2001). Escarabajos coprófagos (Coleóptero: Scarabaeidae: Scarabaeinae) de Colombia. . *Biota Colombiana* . , 2: 131-144.
- Medina C.A., G. K. (1996). Diversidad de Coleópteros coprófagos (Scarabaeidae) de la reserva natural de Escalereite Cespedesia . 21:89-102.
- Medina, C. A. (2002). Diversity, hábitat use of dung beetles in a restored Andean landscapes. . *Biotropica* . , 34: 181 – 187. .
- Meister M, H. C. (2000). The antimicrobial host defenses of *Drosophila*. In: Du Pasquier L, LitmanGW, eds. *Current topics in microbiology and immunity. Origin and evolutions of the vertebrate Immune system, Heidelberg:Springer_Verl*, Vol.248. Berlin:17-36.

- Moon, H. L. (1994). Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein from larvae of the coleopteran, *Tenebrio molitor*. . *J. Biochem*, 116, 53–58.
- Nappi AJ, O. E. (2002). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invetebrates . *Bioessays* , 22:469-80.
- Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Current Issues in Molecular Biology*, 8(1), 11–26.
- Pardo, L. (1997). Notas sobre los escarabajos Phanaeine (Col: Scarabaeidae) de Colombia con énfasis en la cuenca Calima – Bajo San Juan, valle, Choco. *Memorias XXIV Congreso Socolen, Pereira*, 132-141 pp.
- Peter Vilmos, E. K. (1998). Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* 62 , 59–66.
- Ramirez, C. G. (2007). Diseño, síntesis y estructura de dominios helicoidales, influencia de la introduccion de aminoacidos D. *tesis doctoral*, 62-102.
- Roh, K. K. (2009). Proteolytic cascade for the activation of the insect toll pathway induced by the fungal cell wall component. *J. Biol. Chem* , 284, 19474–19481.
- S.M. Yoe, C. K. (s.f.). Characterization and cDNA cloning of hinnavin II, a cecropin family antibacterial peptide from the cabbage butterfly, *Artogeia rapae*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* .
- Sagisaka A, M. A. (2001). Purification, characterization and gene expression of a glycine and proline-rich antibacterial protein family from larvae of a beetle, *Allomyrina dichotoma*. *Insects molecular biology*, Aug;10(4):293-302.
- Sahly H, S. S. (2006). Activity of human beta-defensins 2 and 3 against ESBL-producing *Klebsiella* strains. *J Antimicrob Chemother*, 57:562-5.
- Samakovlis C, K. D. (1990). THE IMMUNE RESPONSE IN DROSOPHILA. *PATTERN OF CECROPIN.*, 9(9): 2969–76.
- Sambrook, a. R. (2006). The Condensed Protocols. En D. W. Joseph Sambrook, *Molecular Cloning* (págs. 58-59). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scott MG, H. R. (2000). Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. . *Crit Rev Immunol* , 20: 407–31.
- Shin SY, K. J. (1999). Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides, . *J. Pept. Res.*, 53:82–90.
- Søndergaard L. (1993). Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends Genet.*, 9(6):193- 199.

- Steiner H, H. D. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity,. *Nature* 292 , 246–248.
- T. Ganz. (2001). The role of antimicrobial peptides in innate immunity, . *American Zoologist* 41 , 14-49.
- Tepass U, L. F. (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development.* , 120(7):1829-37.
- Thennarasu S, L. D. (2005). Antimicrobial activity and membrane selective interactions of a synthetic lipopeptide MSI-843. *Biochim Biophys Acta.* , Jun 1;1711(1):49-58.
- Vilmos P, E. a. (1998). Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Lettters.*, 62: 59-66.
- Waterer GW, W. R. (2001). Increasing threat of Gram-negative bacteria. *Crit Care Med* , 29 (suppl 4): N75–81.
- WB, B., & Jones VP, U. D. (2001). Effects of synthetic cecropin analogs on in vitro growth of *Acholeplasma laidlawii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45:1894–1895.
- Weber F. (1801). Observationes entomologicae, continentis novorum quae condidit generum characteres, et nuper detectarum specierum descriptiones. *Kiliae: Universit. Buchh.*, Xii 116 pp.
- Wiegand I, K. H. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (CIM) of antimicrobial substrates. *nature protocols*, 163-175.
- Willems, T. J. (2005). Global spread of Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect. Dis*, 11:821-828.
- Xie L, M. L. (2004). Lactacin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. . *Science.* , Jan 30;303(5658):679-81.
- Yeaman, M. R. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55.
- Yoe S, C. K. (2006). Characterization and cDNA cloning of hinnavin II, a cecropin family antibacterial peptide from the cabbage butterfly, *Artogeia rapae*., *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 199–205.
- Zhou W, J. Y. (1996). SIMULTANEOUS FORMATION OF PEPTIDES AND NUCLEOTIDES FROM N-PHOSPHOTHREONINE. 26(6):547-60.

14. ANEXOS

ANEXO 1. Permiso de colecta de escarabajos coprófagos en el eje cafetero, por parte de la CRQ.

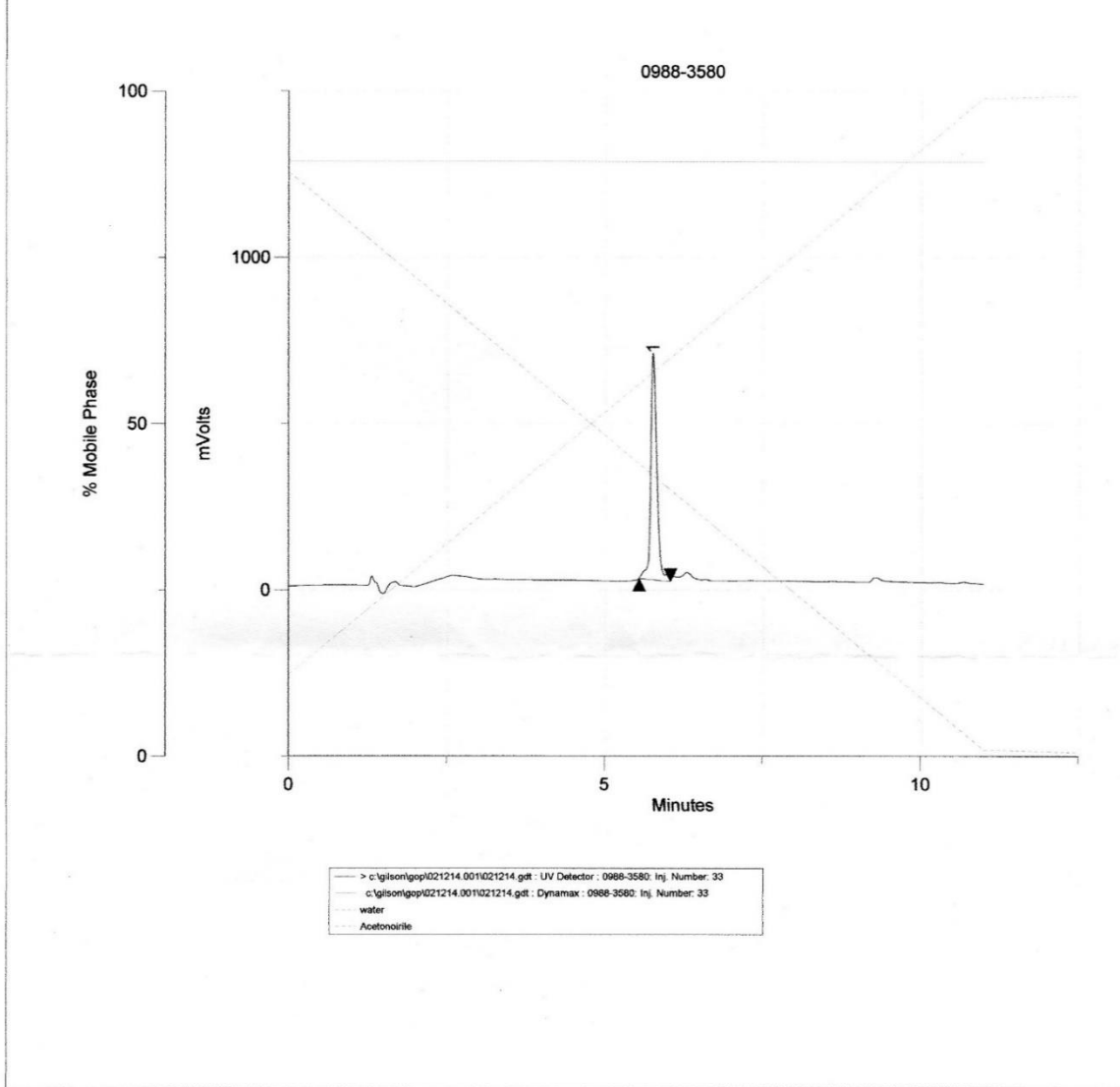


ANEXO 2. Grafica HPLC de síntesis de la Oxysterlina 1.

Fri Feb 14 2014 16:01:37

Results Report

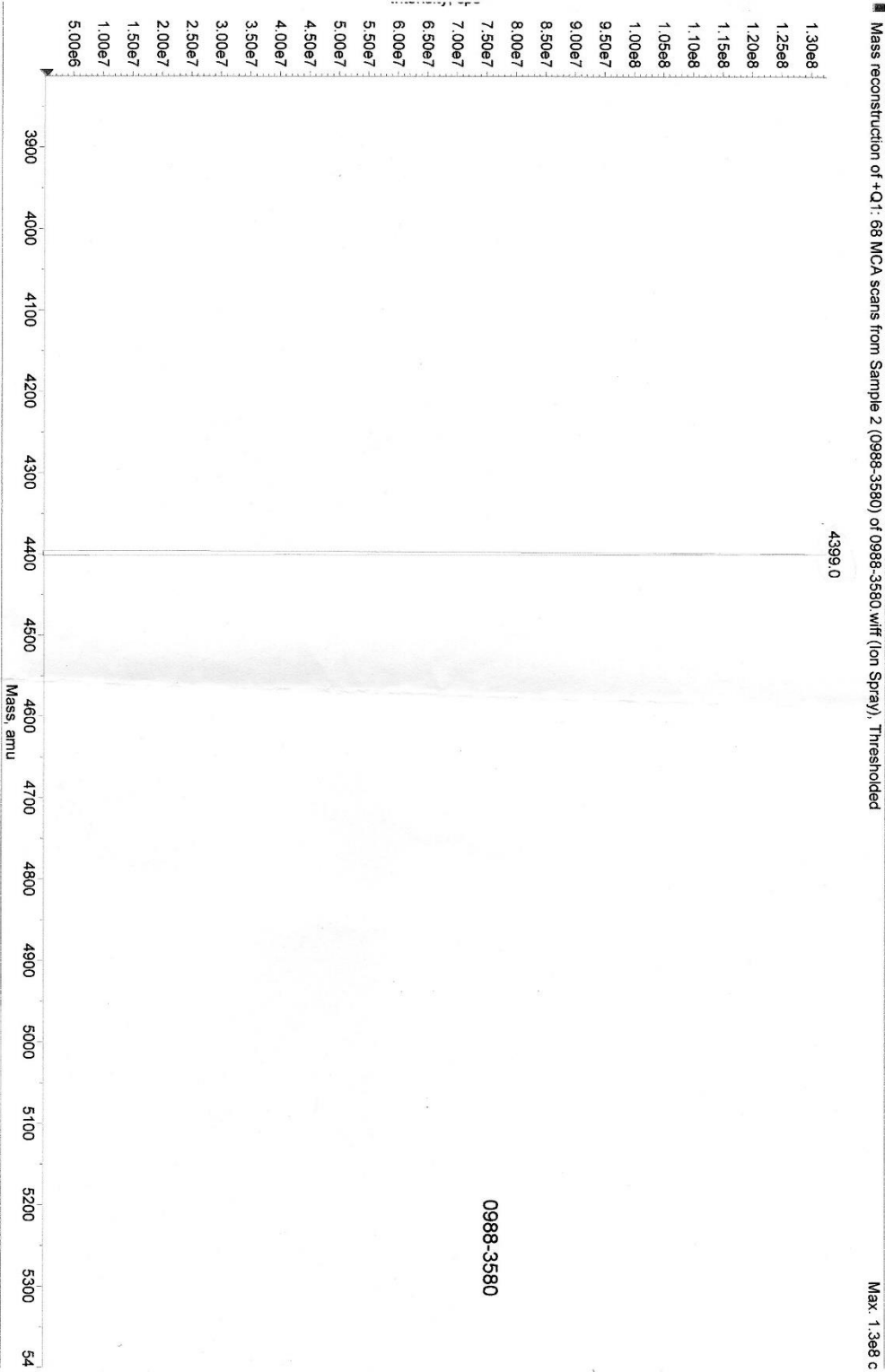
Page



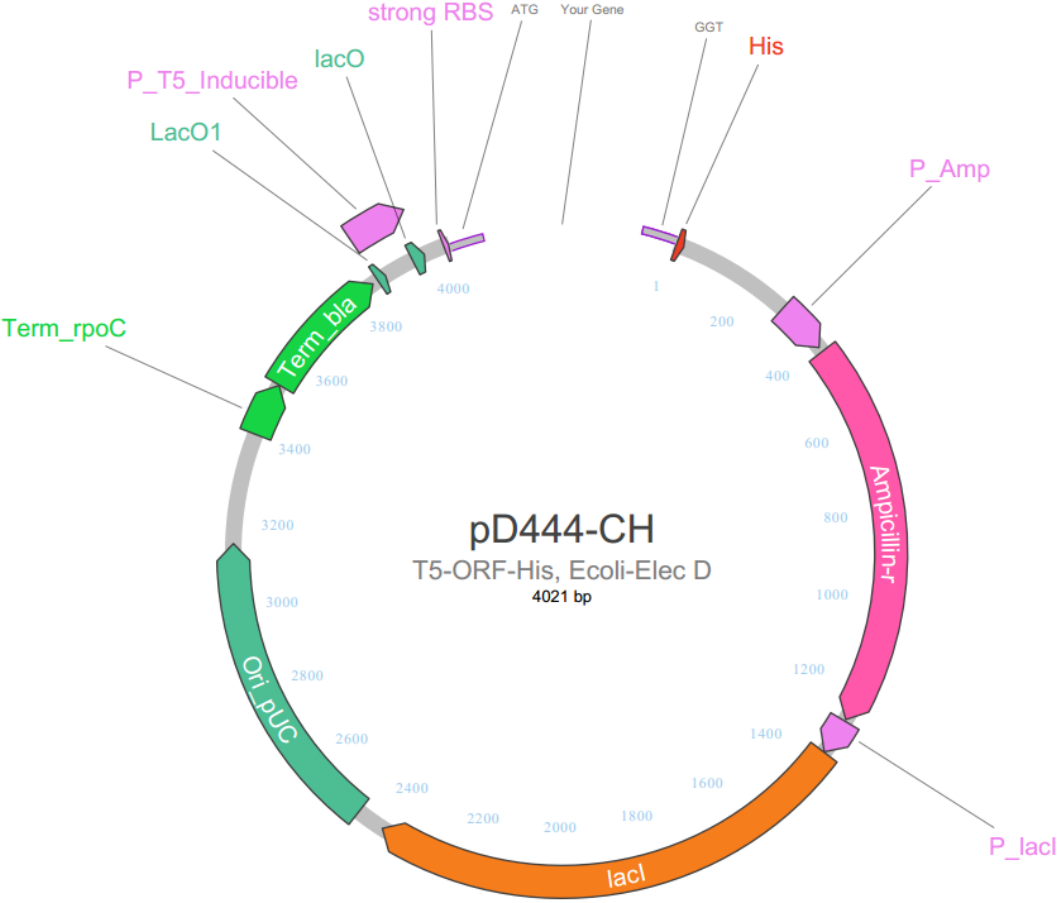
Inj. Number	Peak Name	R. Time	Area	Area %	Sample Descrip.	
1	33.00	*1	5.77	7658924.50	100.00	0988-3580

Data File: c:\gilson\gop\021214.001\021214.gdt
 Date acquired: Fri Feb 14 2014 15:37:51
 Control Method: C:\GILSON\METHODS\STO99.GCT
 Analysis Method: C:\GILSON\ANALYSIS\A&A.GAN
 Sample name: 0988-3580 Injection Number: 33 *Unknown*
 Analyzed on: Fri Feb 14 2014 16:01:30

ANEXO 2. Grafica de espectrometria de masas, mostrando la masa del peptido sintetico Oxysterlina 1.



ANEXO 3. Mapa del plasmido PD444-CH T5-ORF-His, Ecoli-Elec D en donde se inserto la secuencia del péptido antimicrobiano Oxysterlina 1.



ANEXO 4

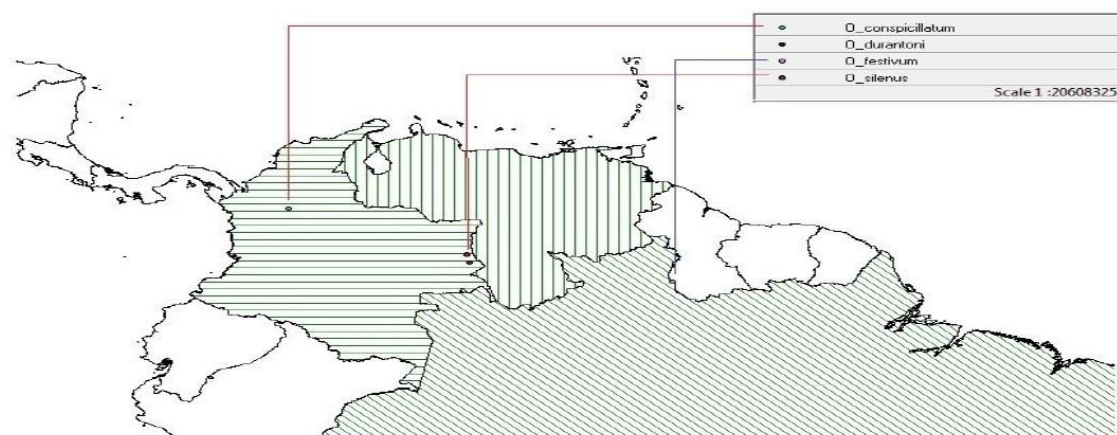


Figure 2. Distribution of *O. conspicillatum*, *O. durantoni*, *O. festivum* and *O. silenus* in South America according to data from SIB (biodiversity information system <http://data.sibcolombia.net/search/oxystemon> consulted 19-05-2013)