

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS
CECROPINAS SINTÉTICAS, SATANIN 1, 2 Y CURVICINA
IDENTIFICADAS EN *Dichotomius satanas* y *Onthophagus curvicornis*.**

Presentado por:
Diana Carolina Henao Arias

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

Universidad del Quindío
Facultad de Ciencias de la Salud
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Armenia, Quindío
2022

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS
CECROPINAS SINTÉTICAS, SATANIN 1, 2 Y CURVICINA
IDENTIFICADAS EN *Dichotomius satanas* y *Onthophagus curvicornis*.**

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

Tutor:

Germán Alberto Téllez Ramírez MD Ph.D

Co-tutor:

Jhon Carlos Castaño Osorio MD Ph.D

Comité tutorial:

Bruno Rivas Santiago MD. PhD

Julián Muñoz PhD

Carlos Fernando Prada PhD

Universidad del Quindío
Facultad de Ciencias de la Salud
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Armenia, Quindío

2022

**DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

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

 UNIVERSIDAD DE CALDAS LUMINA SPARGO	 UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO	 Universidad Tecnológica de Pereira	
SNIES: 54197	SNIES: 54197	SNIES: 54197	SNIES: 54197

Sin la publicación, la ciencia está muerta

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

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

FECHA: JUNIO 09 DE 2022

ESTUDIANTE: **DIANA CAROLINA HENAO**

DIRECTOR DEL TRABAJO: Doctor German Alberto Téllez

TITULO DEL TRABAJO:

“Caracterización estructural y funcional de las cecropinas sintéticas, Satanin 1,2 y Curvicina, identificadas en *D. satanas* y *O. curvicornis*”

EVALUACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN:

APLAZADO _____

APROBADO X

MERITORIO _____

LAUREADO _____

Jurado 1:

Doctora
ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA, PhD
Instituto de Ciencia, Tecnología e
Innovación del Estado de Michoacán

Jurado 2

Doctor
SERGIO ORDUZ PERALTA, PhD.
Universidad Nacional de Colombia



Jurado 3:

Doctor
JHON ALEJANDRO ACOSTA, PhD.
Universidad del Quindío
Armenia

Coordinadora del Doctorado:

Doctora
OLGA ALICIA NIETO CÁRDENAS PhD
Universidad del Quindío
Armenia

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

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

Agradecimientos

A Minciencias por la financiación de mis estudios de Doctorado bajo los proyectos de investigación: “Bioprospección de péptidos antimicrobianos en escarabajos coprófagos del paisaje cultural cafetero” convocatoria 744-2016 con código 111374455390 y “Desarrollo de nuevos péptidos antimicrobianos a partir de péptidos de defensa del hospedero (HDPs) de coleópteros de la familia Scarabaeidae y su evaluación frente a microorganismos causantes de infecciones asociadas a la atención en salud” de la convocatoria 844 del 2019 y código 111384466847.

A la Universidad del Quindío, al Centro de investigaciones biomédicas (CIBM), al grupo de inmunología molecular GYMOL y al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, por los espacios proporcionados que han permitido llevar a cabo mi trabajo de investigación y formación profesional.

A mi tutor, el Doctor Germán Alberto Téllez y cotutor, el doctor Jhon Carlos Castaño por transformar mi perspectiva profesional, académica y personal con sus contribuciones durante este proceso de formación.

A los integrantes del comité tutorial, el Doctor Bruno Rivas Santiago, de la Unidad de Investigación Médica, Zacatecas, el Doctor Julián Esteban Muñoz Henao, de la Universidad del Rosario, Bogotá y el Doctor Carlos Fernando Prada Quiroga, de la Universidad del Tolima, Ibagué, por sus valiosas apreciaciones que contribuyeron a la construcción y crecimiento de este proyecto de investigación.

Al laboratorio del doctor Bruno Rivas Santiago en la Unidad de Investigación Médica, en Zacatecas México y los integrantes de su grupo de investigación por todo el apoyo profesional y personal durante el desarrollo de la pasantía.

A los evaluadores, la Doctora Alejandra Ochoa Zarzosa del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, en México, al Doctor Sergio Ordúz de la Universidad Nacional de Colombia, Medellín, al Doctor John Alejandro Acosta del Grupo de Estudio en Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL) de la Universidad del Quindío.

Al director del CIBM, el Doctor Leonardo Padilla y a todos los integrantes de los grupos de Inmunología Molecular (GYMOL) y de Estudio en Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL), por su acompañamiento y apoyo durante estos años de formación.

A mis compañeros y amigos de la línea de investigación de péptidos antimicrobianos del grupo GYMOL (Lily Johana Toro y Germán Alberto Téllez) por enseñarme a superar retos con su acompañamiento, constancia y disciplina.

Finalmente, agradezco a la red de apoyo personal conformada por mi familia, amigos, y compañeros de laboratorio, que se consolidó durante estos años para brindarme su acompañamiento y motivación durante todo el proceso académico y personal que viví en esta formación de posgrado.

Resumen

La farmacorresistencia es el aumento de supervivencia de los microorganismos ante tratamientos con antibióticos, que causa miles de muertes anuales; actualmente, esta problemática pone en riesgo la salud humana a nivel global. Por lo tanto, existe una urgente necesidad de buscar nuevos agentes antimicrobianos y estrategias que permitan combatirla o mitigarla. Algunas de las búsquedas, se han enfocado en péptidos antimicrobianos (AMPs) o péptidos de defensa del hospedero (HDPs), ya que se ha demostrado que tienen un amplio espectro de actividades directas contra microorganismos, acción antiinflamatoria y curación de heridas en modelos animales. Por otro lado, tienen baja toxicidad y diversos mecanismos de acción que implican baja tendencia a generar resistencia.

Satanin 1, 2 y Curvicina son HDPs identificados en los escarabajos coprófagos *O. curvicornis* y *D. satanas*, para los que no se conocen sus actividades y posibles aplicaciones clínicas. En este trabajo, caracterizamos, las propiedades fisicoquímicas, estructurales, antimicrobianas y citotóxicas de dichos péptidos. Para esto, se describieron las características fisicoquímicas de los péptidos y se hizo la predicción de sus estructuras secundarias, usando herramientas bioinformáticas, que se contrastaron luego con análisis de dicroísmo circular. Luego, se evaluó la actividad antimicrobiana por ensayos in vitro de microdilución en placa frente a bacterias Gram negativas, Gram positivas, *Candida parapsilosis*, y micobacterias; la actividad citotóxica fue evaluada frente a células no tumorales y tumorales. Adicionalmente, se evaluó la producción de TNF alfa en PBMCs estimulados con lipopolisacárido de *E.*

coli (LPS) y la liberación de calceína de LUVs con lípidos POPC:POPG (80:20). Los análisis con herramientas bioinformáticas, evidenciaron que Satanin 1, 2 y Curvicina son péptidos catiónicos, anfipáticos, alfa hélice, con PI por encima de 10 (es decir a pH 7 están cargados positivamente), mientras que los ensayos *in vitro* nos mostraron que los péptidos tienen actividad antimicrobiana principalmente hacia bacterias Gram (-) y tienen baja toxicidad con índices terapéuticos altos en PBMCs, eritrocitos humanos, células VERO y HaCaT. Además, inhibieron la actividad metabólica de las células tumorales THP-1 desde bajas concentraciones. Por otro lado, se evidenció que los péptidos pueden bloquear la producción de TNF alfa en PBMCs estimulados con LPS, y que Satanin 1 permite la liberación del 30% de calceína de LUVs con lípidos de modelos de membranas bacterianas (POPC:POPG), pero no libera el 100% a las concentraciones evaluadas. Estos resultados sugieren que Satanin 1, 2 y Curvicina son péptidos alfa hélice de la familia de las cecropinas de escarabajos coprófagos, que poseen múltiples actividades biológicas, con posibles aplicaciones clínicas; para los que se desconocen sus blancos y mecanismos de acción.

Abstract

Drug resistance is the increased survival of microorganisms in the face of treatment with antibiotics, which causes thousands of deaths per year; this problem is currently endangering human health worldwide. Therefore, there is an urgent need to search for new antimicrobial agents and strategies to combat it. Some of the searches have focused on antimicrobial peptides (AMPs) or host defense peptides (HDPs), since as a new class of antimicrobial agents they have been shown to have a broad spectrum of direct activities against microorganisms, anti-inflammatory action and wound healing in animal models. On the other hand, they have low toxicity and diverse mechanisms of action and they have a low tendency to generate resistance. Thus, their potential in clinical applications goes beyond the treatment of multidrug-resistant pathogen infections. Satanin 1, 2 and curvicin are HDPs identified in dung beetles, *O. curvicornis* and *D. satanas*; in this work, we characterized their physicochemical, structural, antimicrobial and cytotoxic properties. For this purpose, the physicochemical characteristics of the peptides and their secondary structures were predicted using bioinformatics tools, which were then contrasted with circular dichroism analysis. Then, the antimicrobial activity was evaluated by *in vitro* microdilution plate assays against Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria, *Candida parapsilosis*, and *Mycobacterium tuberculosis*; and cytotoxic activity against non-tumor and tumor cells was made by microdilution plate assays too. Additionally, TNF alpha production in PBMCs stimulated with *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) and evaluation of calcein release from LUVs with POPC:POPG (80:20) lipids were evaluated. Analysis with bioinformatics tools showed that Satanin 1, 2 and curvicin are cationic, amphipathic, alpha-helical peptides with PI above 10, while *in vitro* assays showed that the peptides have antimicrobial activity mainly towards Gram (-) bacteria and have low toxicity with high therapeutic indexes in PBMCs, human erythrocytes, VERO and HaCaT cells. In addition, they inhibited the

metabolic activity of THP-1 tumor cells at low concentrations. On the other hand, it was evidenced that the peptides inhibited TNF alpha production in PBMCs stimulated with LPS. Also, Satanin 1 allows the release of 30% of calcein from LUVs with bacterial membrane model lipids (POPC:POPG), but does not release 100% at the concentrations tested. These results suggest that Satanin 1, 2 and curvicin are alpha-helix peptides from the cecropin family of dung beetles, possessing multiple biological activities, with potential clinical applications; for which their targets and mechanisms of action are unknown.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Resistencia a los antibióticos.....	4
2.2. Péptidos antimicrobianos (AMPs) o péptidos de defensa del hospedero (HDPs).....	5
2.3. Cecropinas o péptidos alfa hélice	8
2.4. Escarabajos coprófagos	10
2.4.1. Inmunidad de escarabajos coprófagos.....	12
2.5. Desventajas o limitaciones de los HDPs.....	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. METODOLOGÍA.....	16
Figura 1. Esquema general de la metodología (Falta el numeral 3 en la figura 1). 16	
4.1. Análisis <i>in silico</i> de propiedades fisicoquímicas y estructurales de los péptidos	17
4.2. Síntesis química y análisis <i>in vitro</i> de estructura secundaria de Satanin 1, 2 y Curvicina.	18
4.2.1. Síntesis química.....	18
4.2.2. Dicroísmo circular	18
4.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina	19
4.3.1. Evaluación de actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y <i>Candida</i>	20
4.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (ATCC 25618) y cepas Multidrogorresistentes (MDR) de aislados clínicos.....	21
4.3.3. Evaluación de actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a <i>M. tuberculosis</i> H37Rv intracelular en células THP-1 y A549 infectadas.....	22
4.4. Obtención de PBMCs humanos.....	23

4.5. Evaluación de actividad citotóxica de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a células no tumorales y tumorales.	24
4.6. Controles de citotoxicidad de Satanin 1, 2 y Curvicina en líneas de células tumorales y no tumorales.	25
Tabla 1. Medios de cultivo y cantidad de células utilizadas en ensayos de citotoxicidad. Células no tumorales: PBMCs humanos, HaCaT ATCC PCS200011, VERO ATCC®CCL-81™; y células tumorales: CaCo2 ATCC® HTB-37, MCF7 ATCC® HTB22 y THP-1 ATCC® TIB-202.	25
4.7. Análisis de los datos de Unidades Relativas de Fluorescencia (URFs) en los ensayos de citotoxicidad.....	26
4.8. Evaluación de la actividad hemolítica de Satanin 1, 2 y Curvicina	27
4.9. Cálculos de concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) e índice terapéutico (IT) de Satanin 1, 2 y Curvicina.	28
4.10. Producción de TNF-α en PBMCs humanos estimulados con LPS y Satanin 1, 2 y Curvicina.	28
4.11. Evaluación del efecto de Satanin 1 en modelo de membrana de bacterias, usando vesículas unilamelares grandes (sigla en inglés LUVs) con calceína encapsulada.....	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Características estructurales y fisicoquímicas de Satanin 1, 2 y Curvicina.	30

Tabla 2. Predicción de propiedades fisicoquímicas de los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina. ID: código del GenBank, Da: daltons, pl: punto isoeléctrico y $\langle \mu H \rangle$: momento hidrofóbico.	31
---	----

Figura 2. Alineamiento global de las secuencias de las cecropinas Satanin 1 (GHMA01330254), 2 y Curvicina (GHMD01061568).	32
---	----

Figura 3. Características estructurales de Satanin 1, 2 y Curvicina. A. Modelamiento estructural de los péptidos en representación de “cintas” (*ribbon*), en la parte superior y superficie en la parte inferior, los colores se encuentran de acuerdo a la hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos, dónde rojo es el color que representa a los más hidrofóbicos, azul a todos los polares o cargados y blanco a los a.a neutros

o no cargados; B. Análisis de dicroísmo circular; los péptidos fueron disueltos en PBS con 30% de TFE y sus espectros fueron adquiridos en el espectrofotómetro JASCO.

33

Tabla 3. Matriz de porcentaje de identidad de Satanin 1, 2, Curvicina, Oxysterlinas 1, 2 y 3; fue calculada usando *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). 34

Figura 4. Dendrograma de similaridad Neighbor-joining (10000 réplicas) de cecropinas. Las secuencias de péptidos maduros de Diptera, Lepidoptera y Coleoptera fueron alineadas por homología, donde Satanin 1, 2 y Curvicina se encuentran marcadas con asteriscos. Las cecropinas están marcadas por códigos de colores de la siguiente manera: las cecropinas de Diptera están en verde, las de Lepidoptera en verde menta, y las de Coleoptera en color azul..... 35

5.2. Síntesis de Satanin 1, 2 y Curvicina 36

5.3. Actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina..... 36

Figura 5. Evaluación de actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina (25; 12,5 y 6,25 µg/mL) frente a las líneas celulares A549 (A) THP-1 (B), infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv durante 24 horas. Los controles del ensayo fueron control de inhibición de crecimiento con Rifampicina (Rifam) a 8 µg/mL y Estreptomina (Stp) a 1 µg/mL (stp), y control de crecimiento de *M. tuberculosis* sin antibióticos (0). Kruskal-Wallis con p-valor de 0,045..... 37

Figura 6. Mapa de calor de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones bactericidas mínimas (CBM) en microgramos por mililitro (µg/mL) de Satanin 1, 2, y Curvicina frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, *C. parapsilosis* ATCC 22019, y *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) extracelular. 38

5.4. Ensayos de citotoxicidad y hemólisis de Satanin 1, 2 y Curvicina..... 39

Figura 7. Toxicidad de Satanin 1, 2 y Curvicina en células no tumorales, eritrocitos humanos (A), células VERO (B), PBMCs humanos (C), y células HaCaT (D). Los datos son mostrados con media y desviación estándar (n=3). CT= células incubadas

con Tritón X-100 a 0,5% y cada número corresponde a las concentraciones evaluadas para cada uno de los péptidos en $\mu\text{g/mL}$ (tratamientos $\mu\text{g/mL}$)..... 40

5.5. Satanin 1, 2 y Curvicina inhibieron la actividad metabólica de las líneas de células tumorales. 41

Figura 8. Toxicidad de Satanin 1, 2 y Curvicina en las células tumorales THP-1 (A), Caco2 (B), y MCF7 (C). Las células fueron tratadas con las cecropinas Satanin 1, 2 y Curvicina en un rango de concentraciones (500 a 3,9 $\mu\text{g/mL}$). Los controles fueron: células con tritón X-100 a 0,5% (CT) y células sin tratamiento (0,00). Los datos se muestran como la media con la desviación estándar; $n=6$ para THP-1 y $n=3$ para Caco2 y MCF7..... 41

5.6. Concentración mínima citotóxica, concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), e índice terapéutico (IT) 42

Tabla 4. Concentración mínima citotóxica (CCM), concentración inhibitoria media (IC_{50}), e índice terapéutico (IT) de Satanin 1, 2, y Curvicina en eritrocitos humanos, células VERO, HaCaT, THP-1, y Caco2 vs MIC de *E. coli* ATCC 25922. Se realizó un ANOVA de una sola vía con test de comparaciones múltiples de Dunnett's. 42

5.7. Las cecropinas de Scarabaeidae inhibieron la producción de $\text{TNF-}\alpha$ en PBMCs estimulados con LPS..... 44

Figura 9. Producción de $\text{TNF}\alpha$ en PBMCs humanos tratados con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) y cecropinas de Scarabaeidae. Las cecropinas fueron usadas a 3,12 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$, y el LPS a 0,04 $\mu\text{g/mL}$. Los controles fueron PBMCs con medio de cultivo (CC), PBMCs tratados con LPS a 0,04 $\mu\text{g/mL}$ (LPS), y PBMCs con cada uno de los péptidos a 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Se realizó un ANOVA con test de comparación múltiple usando el método de Dunnett's con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$), cuando se contrastaron cada uno de los grupos frente al control de LPS ($n=6$)..... 45

5.8. Satanin 1 libera calceína de los modelos de membrana de bacterias y mamíferos. 46

Figura 10. Porcentaje de liberación de calceína de las vesículas de POPC:POPG en presencia de Satanin 1 a las concentraciones de 0,27; 0,54; 1,08; 2,17; 4,35; 8,7; 17,4 $\mu\text{g/mL}$ (0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 y 4 μM). 46

6. DISCUSIÓN.....	47
Figura 11. Actividades biológicas y características relevantes de Satanin 1, 2 y Curvicina. En el centro se encuentran los modelos estructurales de los tres péptidos; al lado izquierdo en el recuadro rosado se encuentran sus actividades comunes, al lado derecho en recuadros azules se resumen las características y actividades exclusivas de Satanin 1, en recuadro rojo las actividades en común para Satanin 1 y 2 y por último en el recuadro verde las características y actividades exclusivas para Curvicina.	60
7. CONCLUSIONES.....	61
8. RECOMENDACIONES.....	62
9. RESULTADOS ADICIONALES.....	63
10. REFERENCIAS.....	64
11. ANEXOS.....	80
Anexo 1. Elipticidad molar ($[\theta]$ deg cm ² dmol ⁻¹) a $\lambda = 222$ nm, radios de elipticidades a $[\theta]_{222}$ y $[\theta]_{\max}$ para los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina.	80
Anexo 2. Contenido de hélice de Satanin 1, 2 y Curvicina a partir de los datos experimentales de Dicroísmo circular.	80
Anexo 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) de los péptidos Satanin 1, 2, y Curvicina frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, hongos, y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> extracelular. NI: no identificado.	82
Anexo 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) en micromolar (μM) de los péptidos Satanin 1, 2, y Curvicina frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, hongos, y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> extracelular. NI: no identificado.	83

Anexo 5. Índices terapéuticos (IT) de Satanin 1, 2, y Curvicina en eritrocitos humanos, células VERO y HaCaT, vs <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumonie</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E faecalis</i> y <i>C. parapsilosis</i> . IT ($\mu\text{g/mL}$) = $\text{IC}_{50}/\text{CMI}$ de bacterias, de acuerdo a cada péptido. 84	84
Anexo 6. Alineamiento de 40 secuencias alfa hélice de los órdenes Diptera, Lepidoptera and Coleoptera, incluyendo a Satanin 1, 2 y Curvicina. El patrón de color de los residuos es: Negro = Hidrofobicos, no polares y no cargados; Azul = positivos; Rojo = Negativos; Verde = Polares e hidrofílicos. 85	85
Anexo 7. Síntesis de Satanin 1 (A); Satanin 2 (B) y Curvicina (C). Perfiles de elución de péptidos sintéticos arriba y espectro de masas de péptidos puros abajo. Los péptidos fueron sintetizados a escala de 0,1 mmol en el sintetizador de <i>Protein Technologies, Inc, Tucson, AZ</i> usando síntesis de fase sólida (SPPS)..... 88	88
Anexo 8. Alineamiento de Satanin 1, 2 y Curvicina con otras cecropinas que conservan triptofáno (W), y fenilalanina (F) en el N-terminal. En el documento de Lee E <i>et al</i> , 2013, se ha asociado la cadena lateral de los residuos W y F en papiliocina y cecropina a interacciones con LPS. 88	88
Anexo 9. Artículos publicados 89	89
Anexo 10. Certificación de pasantía internacional. 90	90

Lista de tablas

Tabla 1. Medios de cultivo y cantidad de células utilizadas en ensayos de citotoxicidad. Células no tumorales: PBMCs humanos, HaCaT ATCC PCS200011, VERO ATCC®CCL-81™; y células tumorales: CaCo2 ATCC® HTB-37, MCF7 ATCC® HTB22 y THP-1 ATCC® TIB-202.25

Tabla 2. Predicción de propiedades fisicoquímicas de los péptidos Satanin 1, 2 y CCurvicina. ID: código del GenBank, Da: daltons, pI: punto isoeléctrico y $\langle\mu\text{H}\rangle$: momento hidrofóbico.³¹

Tabla 3. Matriz de porcentaje de identidad de SSatanin 1, 2, Curvicina, Oxysterlina 1, 2 y 3; fue calculada usando *clustal omega* .³⁴

Tabla 4. Concentración mínima citotóxica (CCM), concentración inhibitoria (IC_{50}), e índice terapéutico (IT) de Satanin 1, 2, y CCurvicina en eritrocitos humanos, células VERO, HaCaT, THP-1, y CaCo2 vs MIC de *E. coli* ATCC 25922. Se realizó un ANOVA de una sola vía con test de comparaciones múltiples de Dunnett's.⁴²

Lista de figuras

Figura 1. Esquema general de la metodología.16

Figura 2. Alineamiento global de las secuencias de las cecropinas Satanin 1 (GHMA01330254), 2 y Curvicina (GHMD01061568).32

Figura 3. Características estructurales de Satanin 1, 2 y Curvicina. A. Modelamiento estructural de los péptidos en representación de “cintas” (*ribbon*), en la parte superior y superficie en la parte inferior, los colores se encuentran de acuerdo a la hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos, donde rojo es el color que representa a los más hidrofóbicos, azul a todos los polares o cargados y blanco a los a.a neutros o no cargados; B. Análisis de dicroísmo circular; los péptidos fueron disueltos en PBS con 30% de TFE y sus espectros fueron adquiridos en el espectrofotómetro JASCO.33

Figura 4. Dendrograma de similaridad Neighbor-joining (10000 réplicas) de cecropinas. Las secuencias de péptidos maduros de Diptera, Lepidoptera y Coleoptera fueron alineadas por homología, donde Satanin 1, 2 y Curvicina se encuentran marcadas con asteriscos. Las cecropinas están marcadas por códigos de colores de la siguiente manera: las cecropinas de Diptera están en verde, las de Lepidoptera en verde menta, y las de Coleoptera, en color azul.35

Figura 5. Evaluación de actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina (25; 12,5 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) frente a las líneas celulares A549 (A) THP-1 (B), infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv durante 24 horas. Los controles del ensayo son: control de inhibición de crecimiento con Rifampicina (Rifam) a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Estreptomina (stp) a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (stp), y control de crecimiento de *M. tuberculosis* sin antibióticos (0). Kruskal-Wallis con p-valor de 0,045.37

Figura 6. Mapa de calor de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones bactericidas mínimas (MBC) en microgramos por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de Satanin 1, 2, y Curvicina frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, y *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) extracelular.38

Figura 7. Toxicidad de Satanin 1, 2 y Curvicina en células no tumorales, eritrocitos humanos (A), células VERO (B), PBMCs humanos (C), y células HaCaT (D). Los datos son mostrados con media y desviación estándar (n=3). CT= células incubadas con Tritón X-100 a 0,5% y cada número corresponde a las concentraciones evaluadas para cada uno de los péptidos en µg/mL (tratamientos µg/mL).40

Figura 8. Toxicidad de Satanin 1, 2 y Curvicina en las células tumorales THP-1 (A), CaCo2 (B), y MCF7 (C). Las células fueron tratadas con las cecropinas Satanin 1, 2 y Curvicina en un rango de concentraciones (500 a 3,9 µg/mL). Los controles fueron: células con tritón X-100 a 0,5% (CT) y células sin tratamiento (0,00). Los datos se muestran como la media con la desviación estándar; n=6 para THP-1 y n=3 para Caco2 y MCF7.41

Figura 9. Producción de TNFα en PBMCs humanos tratados con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) y cecropinas de Scarabaeidae. Las cecropinas fueron usadas a 3,12 y 6,25 µg/mL, y el LPS a 0,04 µg/mL. Los controles fueron PBMCs con medio de cultivo (CC), PBMCs tratados con LPS a 0,04 µg/mL (LPS), y PBMCs con cada uno de los péptidos a 6,25 µg/mL. Se realizó un ANOVA con test de comparación múltiple usando el método de Dunnett's con diferencias estadísticamente significativas (p<0,0001), cuando se contrastaron cada uno de los grupos frente al control de LPS (n=6).45

Figura 10. Porcentaje de liberación de calceína de las vesículas de POPC:POPG en presencia de Satanin 1 a las concentraciones de 0,27; 0,54; 1,08; 2,17; 4,35; 8,7; 17,4 µg/mL (0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 y 4 µM).46

Figura 11. Actividades biológicas y características relevantes de Satanin 1, 2 y Curvicina. En el centro se encuentran los modelos estructurales de los tres péptidos; al lado izquierdo en el recuadro rosado se encuentran sus actividades comunes, al lado derecho en recuadros azules se resumen las características y actividades exclusivas de Satanin 1, en recuadro rojo las actividades en común para Satanin 1 y 2 y por último en el recuadro verde las características y actividades exclusivas para Curvicina.60

Lista de anexos

Anexo 1. Elipticidad molar ($[\theta]$ deg cm² dmol⁻¹) a $\lambda = 222$ nm, radios de elipticidades a $[\theta]_{222}$ y $[\theta]_{\max}$ para los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina.80

Anexo 2. Contenido de hélice de Satanin 1, 2 y Curvicina a partir de los datos experimentales de Dicroísmo circular.80

Anexo 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) de los péptidos Satanin 1, 2, y Curvicina frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, hongos, y *Mycobacterium tuberculosis* extracelular. NI: no identificado.82

Anexo 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) en micromolar (μM) de los péptidos Satanin 1, 2, y Curvicina frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, hongos, y *Mycobacterium tuberculosis* extracelular. NI: no identificado.83

Anexo 5. Índices terapéuticos (IT) de Satanin 1, 2, y Curvicina en eritrocitos humanos, células VERO y HaCaT, vs *E. coli*, *P.aeruginosa*, *K.pneumonie*, *S.aureus*, *E faecalis* y *C. parapsilosis*. IT ($\mu\text{g/mL}$) = IC₅₀/CMI de bacterias, de acuerdo a cada péptido.84

Anexo 6. Alineamiento de 40 secuencias alfa hélice de los órdenes Diptera, Lepidoptera and Coleoptera orders, incluyendo a Satanin 1, 2 y Curvicina. El patrón de color de los residuos es: Negro = Hidrofobicos, no polares y no cargados; Azul = positivos; Rojo = Negativos; Verde = Polares e hidrofílicos.85

Anexo 7. Síntesis de Satanin 1 (A); Satanin 2 (B) y Curvicina (C). Perfiles de elución de péptidos sintéticos arriba y espectro de masas de péptidos puros abajo. Los péptidos fueron sintetizados a escala de 0,1 mmol en el sintetizador de *Protein Technologies, Inc, Tucson, AZ* usando síntesis de fase sólida (SPPS).88

Anexo 8. Alineamiento de Satanin 1, 2 y Curvicina con otras cecropinas que conservan triptofáno (W), y fenilalanina (F) en el N-terminal. En el documento de Lee

E *et al*, 2013, se ha asociado la cadena lateral de los residuos W y F en papiliocina y cecropina a interacciones con LPS.88

Anexo 9. Artículos publicados89

Anexo 10. Certificación de pasantía internacional.90

Lista de símbolos y abreviaciones

HDP	<i>“Host Defense Peptides”</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
μl	microlitros
mL	mililitros
μg	microgramos
μM	micromolar
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
CCM	Concentración citotóxica mínima
IT	Índice terapéutico
CMI	Concentración inhibitoria mínima
CBM	Concentración Bactericida mínima
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa y Enterobacter spp.</i>
TB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
AMP	<i>Antimicrobial Peptides</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
APD	<i>Antimicrobial peptide database</i>
KDa	Kilodaltons
SFB	Suero Fetal Bovino
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>

PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
TFE	Tetrafluoroetileno
POPC	Fosfatidilcolina
POPG	Fosfatidilglicerol

1. INTRODUCCIÓN

La farmacorresistencia es un problema global y complejo que ocurre especialmente con la emergencia y propagación de microorganismos resistentes a múltiples fármacos, como bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y *M. tuberculosis* (TB) multidrogo resistente (MDR) (1,2). A nivel mundial ocurren 700.000 muertes al año, a causa de infecciones por microorganismos multidrogoresistentes y se cree que al no tomar medidas preventivas o que permitan mitigar el incremento de bacterias multidrogoresistentes, el número de muertes anuales podría incrementar a 10 millones de muertes para el 2050 (3). Por lo tanto, existe una urgente necesidad por identificar y caracterizar nuevas moléculas que pueden ayudar a desarrollar nuevas estrategias antimicrobianas para contrarrestar estas infecciones (4–7). Algunas de las búsquedas, se han basado en terapia con fagos, anticuerpos, probióticos, estimulación del sistema inmune o incluso varias líneas de evidencia demuestran como potenciales candidatos a los péptidos antimicrobianos (AMPs) o péptidos de defensa del hospedero (HDPs) (3,8,9).

Algunas de las razones por las que los HDPs tienen potencial terapéutico es debido a que son moléculas de corta longitud (<50 residuos), son efectoras del sistema inmune innato, además se sintetizan en todos los seres vivos, incluyendo organismos unicelulares y multicelulares (animales, plantas, bacterias, etc) (10); incluso, hacen parte de la maquinaria celular de la respuesta inmune innata en donde cumplen funciones relacionadas con la defensa ante patógenos, y potencian estilos de vida simbióticos (11–14); lo que les confiere una naturaleza multifuncional que les permite mediar en un amplio rango de procesos biológicos, como inmunomodulación (15), actividad anti-biofilm (16), antiviral (17), antifúngica (18), antiparasitaria (19),

anticancerígena (20), o incluso pueden tener un rol en cicatrización (21), como adyuvantes para vacunas (22) o como biomarcadores de ciertas enfermedades (23,24). Entre los HDPs, existen más de 3000 moléculas descritas (<https://aps.unmc.edu/>), que se ha clasificado según su secuencia y estructura en: 1) péptidos alfa hélice (cecropinas, catelicidinas, etc); 2) péptidos ricos en aminoácidos como prolina o glicina (atacinas); y 3) péptidos ricos en cisteína (defensinas) (25). De acuerdo con las múltiples funciones de los péptidos y numerosas secuencias, se han realizado avances en el estudio de la relación secuencia, estructura y actividad biológica, que permitirán ampliar el conocimiento y la comprensión de los HDPs como nuevos agentes antimicrobianos y sus mecanismos de acción (26–29). En la actualidad, se ha hipotetizado que los péptidos en mención actúan principalmente en la permeabilidad y ruptura de membranas (30,31).

Dentro de las fuentes de búsqueda de HDPs, los insectos y específicamente el orden Coleoptera, se consideran grupos con una gran cantidad de péptidos potenciales por explorar. Por ejemplo, son pocos los 325 HDPs reportados para insectos comparado con los más de 3000 péptidos de otros seres vivos publicados en la base de datos APD3 (<http://aps.unmc.edu/AP>) (32). Lo interesante de estos seres vivos es que son altamente diversos, representando un 58,5% (insectos) y 22% (Coleoptera) de la diversidad total de las especies (33), tienen un mecanismo de defensa basado en inmunidad innata, donde resaltan sus HDPs, se han adaptado a sobrevivir en ambientes hostiles y microbiológicamente complejos estableciendo por ejemplo un estilo de vida en simbiosis con microorganismos potencialmente patógenos para otros seres vivos (11,34–37). En el caso de los escarabajos coprófagos (Scarabaeidae), éstos se han adaptado para aprovechar las heces de otros seres vivos, convirtiéndolas en su alimento y su nido, siendo organismos muy importantes para el ecosistema en el ciclado de nutrientes (35,36,(38–41), y para los investigadores como fuentes de búsqueda de diversas moléculas asociadas a

su defensa inmune con potencial como nuevos agentes antimicrobianos (42). Sin embargo, para Coleóptera y la familia Scarabaeidae es poco lo que se conoce sobre la diversidad, dominios, estructuras y otros efectos de moléculas asociadas a su sistema inmune, así que son pocos los péptidos que han sido caracterizados en la actualidad (42,43). Por este motivo, y con el ánimo de identificar la diversidad y actividad de HDPs expresados en escarabajos coprófagos (familia Scarabaeidae), nuestro grupo de investigación (GYMOL) realizó un análisis transcriptómico que buscaba identificar nuevos HDPs, para ello se ensamblaron *de novo* los transcriptomas de dos especies ampliamente distribuidas en la región del eje cafetero, *Dichotomius satanas* y *Onthophagus curvicornis*; en dichos transcriptomas se identificaron 6 nuevas cecropinas, dentro de las cuales, Satanin 1, 2 y Curvicina representaban secuencias potenciales a evaluar (42).

Para el caso de los péptidos que conforman la familia de las cecropinas, se considera que tienen un potencial como candidatos para desarrollar nuevos fármacos; y se ha descrito que se caracterizan por tener estructura α -hélice, carga neta positiva, anfipaticidad, radios hidrofóbicos alrededor de 0,4, alta atracción electrostática con moléculas cargadas negativamente como LPS u otros lípidos aniónicos, múltiples blancos y mecanismos de acción (25,42). A diferencia, de los órdenes Díptera y Lepidóptera, para el Orden Coleóptera se conocen las siguientes 8 cecropinas: Cec AI (*Acalolepta luxuriosa*), sarcotoxina Pd (*Paederus dermatitis*), Cec 1 - 3 (*Tribolium castaneum*), de las cuales 3 fueron identificadas en el escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum* (Oxysterlinas 1 - 3) (44–47). Con el fin de ampliar el conocimiento de las cecropinas de Coleópteros a nivel de características fisico-químicas, estructurales y sus potenciales actividades y aplicaciones, en este trabajo se caracterizaron y evaluaron las cecropinas sintéticas Satanin 1, 2 y Curvicina previamente identificadas en el transcriptoma de los escarabajos coprófagos del eje cafetero *D. satanas* y *O. curvicornis*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Resistencia a los antibióticos

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas y han tenido un impacto enorme en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y en procedimientos invasivos como la cirugía y la quimioterapia. Sin embargo, la farmacorresistencia bacteriana, amenaza con revertir este progreso, ya que dichas bacterias mutan en respuesta al uso de éstos fármacos para sobrevivir; y a su vez causan infecciones en el ser humano y en los animales difíciles de tratar (48). La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública que lleva a que se incrementen los costos médicos, se prolonguen las estancias hospitalarias, se reduzcan las opciones terapéuticas y se incremente el riesgo de muerte. Actualmente, a nivel mundial se presentan cerca de 700.000 muertes al año a causa de este fenómeno, y de no hacerse algo al respecto, se prevé que esto incremente a 10 millones de muertes para el 2050 (49,50).

La crisis de la resistencia a antibióticos ha sido atribuida a el uso excesivo o al uso inadecuado de los esquemas terapéuticos con estos medicamentos, así como también a la falta de desarrollo de nuevas drogas por la industria farmacéutica debido a reducidos incentivos económicos y a los desafiantes requisitos reglamentarios solicitados por los entes regulatorios (50–61). Se considera que los patógenos resistentes a fármacos son una amenaza para la salud humana (50). Estos presentan un riesgo urgente en la carga clínica y economía de

pacientes, familias y el sistema de salud público (50,54,62,63).

Con el fin de enfocar y guiar el desarrollo de nuevos fármacos, en el 2017, la organización mundial de la salud (OMS) publicó una lista de patógenos para los que se requiere urgentemente desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos; entre estos se encuentran los patógenos del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter species*) (64).

Entre las potenciales moléculas para buscar y desarrollar nuevos fármacos, los AMP o HDPs son un blanco potencial, debido a sus diversos mecanismos de acción antimicrobiana, actividad en múltiples fases de la inmunidad del hospedero y la poca capacidad de las bacterias para generar resistencia contra ellos (65).

2.2. Péptidos antimicrobianos (AMPs) o péptidos de defensa del hospedero (HDPs)

Los AMP o HDPs son moléculas del sistema inmune innato que actúan como primera línea de defensa contra las infecciones patógenas y se ha encontrado que son producidas por un amplio rango de especies, desde organismos unicelulares hasta multicelulares complejos (8,9,66). Además, se han observado como una opción atractiva para desarrollar nuevos compuestos.

Debido a que los organismos vivos se encuentran constantemente expuestos a microorganismos potencialmente patógenos, estos han desarrollado mecanismos que conforman el sistema inmune tanto

innato como adaptativo. Por ejemplo, en las ninfas de los insectos, en los neutrófilos humanos y en la piel de las ranas, se han encontrado péptidos que pueden matar bacterias en cultivo; se han referido a éstos como péptidos catiónicos antimicrobianos, que además de la habilidad de matar microorganismos directamente, pueden reclutar y promover otros elementos de la inmunidad innata (67). La inducción de la síntesis de los HDPs, aunque es prevalente en insectos y ha sido particularmente estudiada en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*; también se ha observado en vertebrados y plantas (68).

A diferencia de los organismos vertebrados, los invertebrados sólo cuentan con el sistema inmune innato en el que se producen sustancias antimicrobianas en células y secreciones. Entre estas sustancias se destacan los péptidos antimicrobianos (PAM), que en su mayoría contienen menos de 200 aminoácidos y dependiendo del organismo están presentes de forma constitutiva o inducible en el momento de la infección (69). Éstas moléculas son inmunomoduladoras, y se activan en respuesta a lesiones sépticas, actuando directamente sobre microorganismos patógenos o cumpliendo diversas funciones biológicas relacionadas con activación de la inflamación, control de la inflamación, quimiotaxis, efecto antitumoral, angiogénesis, citotoxicidad, entre otras (24,70).

Los HDPs pueden ser aniónicos, aunque la mayoría de los que se han descrito son catiónicos (71), estos últimos se caracterizan por tener 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), esta característica puede ser reforzada por una amidación en el extremo C terminal. Frecuentemente estos HDPs adoptan estructuras

anfipáticas (72) con extremos hidrofóbicos encarando otro hidrofílico, y se clasifican de acuerdo a su estructura secundaria como péptidos lineales (indolicina), alfa hélice (cecropinas, magaininas, etc), o péptidos con hojas beta plegadas con puentes disulfuro (defensinas); o de acuerdo a la composición de aminoácidos como los ricos en prolina, arginina o cisteínas (73). Otro grupo existente de péptidos con potente actividad antimicrobiana, son los sintetizados extraribosomalmente con modificaciones postraduccionales, que contienen aminoácidos no nativos y/o estructuras no peptídicas como la polimixina, dermaseptina, KSL (bactericida y fungicida) (74), ornitina MSI-843 (75), y péptidos cíclicos que contienen combinaciones de D y L aminoácidos (72).

Así como se ha estudiado el papel fisiológico de los HDPs en la inmunidad de los seres vivos, incluyendo los insectos, también se ha estudiado su potencial como agentes antimicrobianos para mitigar la problemática de resistencia bacteriana a los fármacos convencionales (36,76,77), y se ha reportado que tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiano siendo efectivos contra bacterias (Gram-negativas, Gram-positivas, y algunas cepas multidrogo-resistentes) (78–80), hongos (levaduras y filamentosos) (81,82), parásitos (83), virus (17) y células tumorales (84,85); sin embargo, los mecanismos de acción por los cuales los péptidos tienen múltiples funciones aún siguen siendo explorados, ya que se ha descrito que éstos pueden interactuar e insertarse en las paredes celulares aniónicas y fosfolípidos de las membranas de microorganismos debido principalmente a su carácter catiónico y anfipaticidad, además se ha observado que pueden ser autopromotores de captación, y/o pueden presentar una acción detergente y/o de poro sobre la membrana celular (86).

Las propiedades biológicas de los HDPs y sus derivados sintéticos

sugieren que son moléculas con un potencial clínico para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos convencionales, los cuales poseen una baja probabilidad de generar nuevas resistencias bacterianas a corto plazo. Sin embargo, se requiere mayor investigación antes de llegar a futuras aplicaciones clínicas (65,78,87).

2.3. Cecropinas o péptidos alfa hélice

Las cecropinas fueron uno de los primeros HDPs identificados, y fueron inicialmente aislados de la polilla de seda *Hyalophora cecropia* (25,88). Análogos de la cecropinas han sido aisladas de una variedad de especies de insectos y también se han hallado en mamíferos. La mayoría de éstas moléculas son catiónicas, con estructura secundaria α -hélice sin modificaciones postraduccionales, que contienen de 31 a 39 aminoácidos en su secuencia de péptido maduro, bajo peso molecular (<4 kDa), y anfipáticas con un dominio N-terminal hidrofílico y un dominio C-terminal hidrofóbico; que según observaciones es fundamental en su actividad antimicrobiana (25).

En insectos, las cecropinas forman una de las familias más abundantes (77), y han mostrado un potente y amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*), Gram positivas (*Staphylococcus aureus* o *S. epidermidis*) y otros patógenos humanos de interés (89,90). Cabe resaltar que esta actividad se ha reportado principalmente frente a bacterias Gram negativas incluidas cepas bacterianas MDR (91). También, muestran una buena actividad contra protozoos como *Leishmania* (73), levaduras como *Candida albicans*, y parásitos como *Plasmodium falciparum* (92,93); y

en otros campos de investigación, se han diseñado plantas transgénicas que expresan cecropinas para aumentar la resistencia contra bacterias y hongos fitopatógenos (94).

Por otro lado, se ha observado toxicidad *in vitro* contra varias líneas de células tumorales (95,96) y una baja toxicidad hacia las células no tumorales de mamíferos (97,98). Entre otras funciones descritas, se ha observado actividad anti-inflamatoria en un modelo de sepsis bacteriana por Gram-negativos en rata, donde el tratamiento con cecropina B sola o en combinación con betalactámicos redujo significativamente los niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y otras endotoxinas, logrando disminuir la carga infecciosa y mejorando la sobrevida (99).

El uso clínico o en investigación de estos péptidos se ha visto obstaculizado por la inestabilidad estructural, la degradación proteolítica, la toxicidad *in vivo* (100) y los altos costos de producción a gran escala comparados con los costos de las pequeñas estructuras de los antibióticos (36,101). Sin embargo, las cecropinas y sus análogos presentan ventajas de síntesis química con respecto a las demás familias de péptidos como opción de producción, ya que son HDPs con bajo peso molecular (<4 kDa) y una estructura α -hélice, la cual no requiere modificaciones post-traduccionales (101).

Finalmente, cabe resaltar que dentro del orden Coleóptera, aunque se han descrito y caracterizado 19 HDPs a partir de 13 especies de escarabajos coprófagos (Scarabeidae), la mayoría pertenecen al grupo de las coleopterinas y defensinas y únicamente se han descrito 8 cecropinas en las especies *T. castaneum*, *A. luxuriosa*, *P. dermatitis* y *O. conspicillatum* (45,46,76,102,103).

2.4. Escarabajos coprófagos

Los insectos y los escarabajos son uno de los grupos de animales con mayor diversidad, ya que comprenden más del 50% de especies de animales conocidos y 1 de cada 4 tipos de animales es un escarabajo. La diversidad de los escarabajos está probablemente relacionada con un conjunto de características que les ha permitido adaptarse para habitar espacios reducidos y ocultos (por ejemplo, bajo tierra), conservando la capacidad de volar y a su vez a aprovechar cualquier recurso como fuente de alimento (33).

La familia Scarabaeidae es la más grande del orden, con 28000 especies, y está clasificada dentro de un sistema de subfamilias; donde una de las más famosas es Scarabaeinae, la de los escarabajos coprófagos. La denominación del grupo se debe a que el ciclo de vida de la mayoría de las especies depende del excremento de vertebrados, principalmente mamíferos (104). En este sentido, los escarabajos coprófagos presentan notables adaptaciones morfológicas (104,105); por ejemplo, los adultos tienen piezas bucales especializadas, con un labrum rugoso y mandíbulas reducidas para alimentarse de fluidos (33).

Además, la coprofagia en Scarabaeinae se origina a partir de hábitos alimenticios basados en el consumo de humus y sustratos acuosos ricos en microorganismos (105). El cambio de sapofragia a coprofagia es considerado como uno de los eventos más importantes en la evolución de los escarabajos estercoleros, la cual se dio a principios de la era Cenozoica o Terciaria (menos de 145 millones de años) (104).

Los escarabajos coprófagos son ubicuos, y pueden vivir tanto en bosques tropicales como en desiertos, pero ellos son muy diversos en praderas donde la fauna de ungulados es diversa, como ocurre particularmente en África. Sin embargo, en donde ellos se encuentren la competencia por estiércol fresco es feroz, y los escarabajos coprófagos son unos de los primeros insectos en llegar, a veces son miles (106). La competencia por estiércol fresco es tan intensa aquí que algunas especies de *Onthophagus*, han evolucionado a tarsos prensiles, que son usados para aferrarse al pelo alrededor del ano de los ualabíes (33).

Ecológicamente son un grupo indicador de perturbación antrópica (107), ya que juegan un papel importante en la fertilidad y aireación de los suelos, lo que en consecuencia lleva a la proliferación de bacterias responsables de la mineralización de materia orgánica en el suelo (108), su actividad se ha asociado a la dispersión de semillas (108,109), por lo tanto estudios relacionados con cambios en la estructura de sus comunidades neotropicales, reflejan el estado de perturbación de los ecosistemas (38). Esta característica ha sido aprovechada durante los últimos 25 años en Colombia para evaluar el impacto de la actividad humana sobre regiones de alta prioridad para la conservación y manejo de la diversidad biológica.

El género *Onthophagus* incluye especies pequeñas y medianas (4 – 12 mm), con distribución mundial y cosmopolita con especies de bosque y hábitats abiertos (cultivos y potreros), en Colombia se pueden encontrar en regiones del eje cafetero. Las especies están estrechamente asociadas al excremento de ganado vacuno y, sin embargo, algunas especies pueden usar otros sustratos como frutos y hongos en descomposición; para el caso de *O. curvicornis* se ha descrito que es

una especie muy abundante, registrada al interior de fragmentos de bosque, plantaciones forestales, potreros, cafetales de sol y cultivos de caña. Por otro lado, los escarabajos del género *Dichotomius* tienen un tamaño de 10 a 35 mm, su cuerpo es robusto, son negros, opacos o lustrosos; las especies como *Dichotomius satanas* se encuentran dentro de las más comunes de este género y su hábitat se distribuye en interior del bosque continuo, pero más abundante en parches de bosque y en bosques de cañadas; también se ha encontrado en plantaciones forestales de eucalipto, cafetales de sol, potreros y ocasionalmente en cultivos de caña; es de actividad nocturna y se ha asociado a excremento humano (38).

2.4.1. Inmunidad de escarabajos coprófagos

La mayoría de estudios realizados en escarabajos coprófagos, se han enfocado en el conocimiento sobre su importancia ecológica y las adaptaciones corporales que los han llevado a sobrevivir en ambientes hostiles, y no con respecto a su sistema inmune y/o moléculas asociadas; sin embargo, el sistema inmune de los escarabajos coprófagos es comparable al de otros insectos estudiados como el de *D. melanogaster*, el cual está conformado por una respuesta innata con componentes humorales y celulares; entendiendo como defensas humorales, las moléculas efectoras solubles, tales como los HDPs, proteínas similares al complemento y productos generados por cascadas proteolíticas complejas, como la vía de la fenoloxidasa (PO) (110–113). Mientras que las defensas celulares son fagocitosis, encapsulación, y coagulación la cual está directamente mediada por los hemocitos (114–117).

Entre otros hallazgos de inmunidad de invertebrados, incluyendo insectos, se conoce que pueden producir respuestas inmunes con memoria, inespecíficas o específicas (118,119). Tienen una respuesta inmune innata “adaptativa” llamada “cebado inmunológico” (120) y pueden transferir inmunidad a su descendencia a través de una respuesta llamada “cebado inmunológico transgeneracional” (118,121).

La mayoría de estudios relacionados con el sistema inmune de insectos y específicamente con respecto a HDPs está enfocado a Lepidóptera y Díptera (76), con pocos datos disponibles para Coleóptera. Sin embargo, los insectos y específicamente los escarabajos coprófagos representan una fuente importante de HDPs debido a que son altamente diversos, se han adaptado a sobrevivir en ambientes hostiles y rodeados de microorganismos potencialmente patógenos, y su capacidad de responder ante infecciones está basada principalmente en inmunidad innata. Sin embargo, la exploración de su sistema inmunológico y moléculas asociadas, ha sido poco estudiada. Para el caso de los HDPs, en insectos se han caracterizado 310 de los 3160 reportados en la base de datos APD (APD; <http://aps.unmc.edu/AP>) (32), y de este número, sólo 19 se han identificado y caracterizado de escarabajos coprófagos, dando como resultado péptidos que pertenecen en su mayoría al grupo de las coleopterinas y defensinas y únicamente se han descrito 8 cecropinas en las especies *T. castaneum*, *A. luxuriosa*, *P. dermatitis* y *O. conspiciatum* (76).

2.5. Desventajas o limitaciones de los HDPs

Las limitaciones de los HDPs, están ligadas a un alto costo de síntesis, baja actividad *in vivo*, baja toxicidad y difícil biodisponibilidad, que se requiere abordar con estrategias que sobrepasen éstas limitaciones y que permitan desarrollar nuevos HDPs con fines terapéuticos. El costo de la síntesis química puede ser minimizado por disminución del tamaño de los HDPs a través de nuevos diseños (122) o emplear producción recombinante a gran escala (123).

Por otro lado, la degradación proteolítica posiblemente, es la mayor causa de la corta vida media que tienen los HDPs *in vivo*, y se han implementado estrategias de estabilidad de HDPs como son? péptidos cíclicos (124), introducción de puentes disulfuro y enlaces covalentes entre las cadenas laterales (125–127). Aproximaciones alternativas para minimizar el clivaje proteolítico, incluyen producción de HDPs sintéticos con D-aminoácidos (128), y otros aminoácidos no naturales (129).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y determinar las actividades de las cecropinas sintéticas, Satanin 1, 2 y Curvicina identificadas en *D. satanas* y *O. curvicornis*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir las características fisicoquímicas y estructurales de Satanin 1, 2 y Curvicina.
- Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a microorganismos de importancia en salud (ESKAPE y *Mycobacterium tuberculosis*).
- Determinar la actividad citotóxica *in vitro* de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a células no tumorales y tumorales.
- Evaluar el efecto de los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina sobre la producción de TNF alfa en PBMCs estimulados con LPS.

4. METODOLOGÍA

La metodología general de este trabajo se resume en la descripción de las características fisicoquímicas y estructurales de Satanin 1, 2 y Curvicina utilizando las herramientas bioinformáticas descritas en el apartado 4.1; las cuales a nivel de estructura se pudieron contrastar con análisis de dicroísmo circular para complementar información sobre la composición mayoritaria de los péptidos. Posteriormente, se evaluaron algunas actividades biológicas de los péptidos sintéticos: como actividad antimicrobiana, citotóxica, y anti-endotoxina, descritas en los apartados 4.3 a 4.9 y en el esquema metodológico de la **Figura 1**.

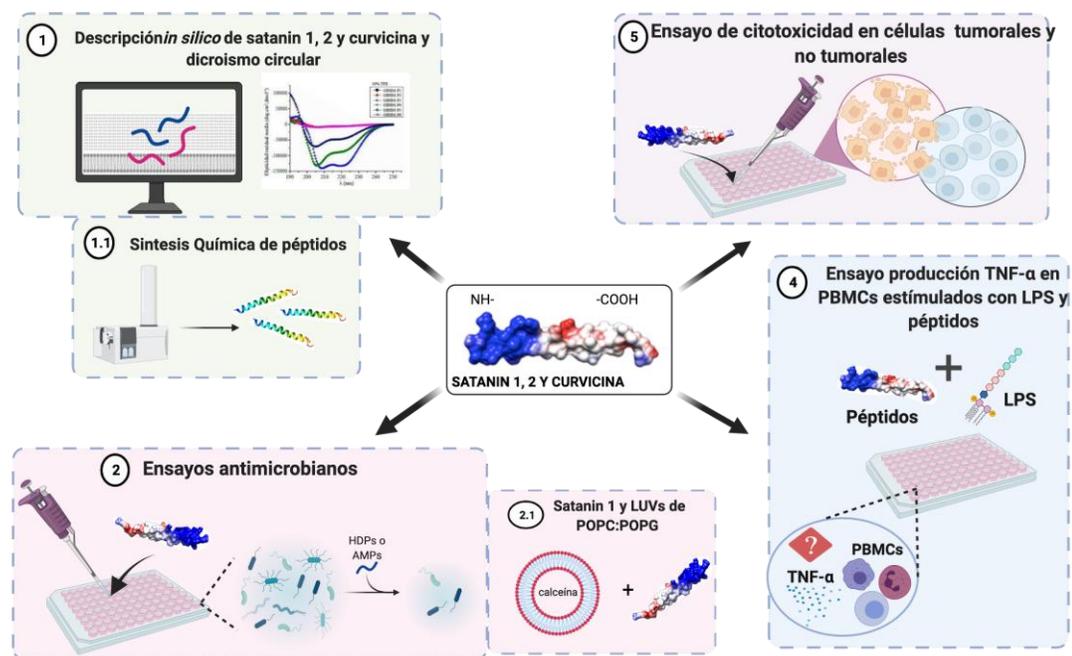


Figura 1. Esquema general de la metodología

4.1. Análisis *in silico* de propiedades fisicoquímicas y estructurales de los péptidos

El análisis de las propiedades fisicoquímicas de Satanin 1, 2 y Curvicina, se realizó con las siguientes herramientas bioinformáticas: a) para calcular peso molecular, punto isoeléctrico, y longitud de aminoácidos se utilizó PROTPARAM (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) (130); b) para calcular la carga neta y el momento hidrofóbico se utilizaron APD3 (http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php) y 3D-HM (<http://www.ibg.kit.edu/HM/?page=index>), respectivamente (131); c) la hidrofobicidad media, los momentos hidrofóbicos helicoidales medios y los diagramas netos fueron calculados usando el servidor web Heliquest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) o NetWheels (<https://github.com/molx/NetWheels>) (132,133); d) para la predicción de las estructuras secundarias y terciarias, se utilizaron PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (134), JPRED (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>) (135), y AlphaFold2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) (136,137); éstas estructuras fueron visualizadas en CHIMERA (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (138); y finalmente, para el análisis de homologías de secuencias entre péptidos alfa hélice de la familia de las cecropinas, se realizaron alineamientos y dendrogramas con el programa Quiagen *CLC Main Workbench* 7.9.1.

4.2. Síntesis química y análisis *in vitro* de estructura secundaria de Satanin 1, 2 y Curvicina.

4.2.1. Síntesis química

La síntesis química de los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina, fue solicitada como servicio técnico al laboratorio del grupo de investigación en Proteómica y Química de Proteínas de la Universidad Pompeu Fabra (Barcelona – España), allí se elongó la cadena de cada uno de los péptidos desde el extremo C-terminal al N-terminal, se usaron los protocolos del grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) y la resina *H-Rink-amide ChemMatrix*, en fase sólida (SPPS) a una escala de 0,1 nmol en el sintetizador *Prelude Peptide Synthesizer* (Protein Technologies, Inc, Tucson, AZ). Los péptidos fueron analizados por RP-HPLC (del inglés *Reverse Phase - High pressure liquid chromatography*) en una columna preparativa Luna C18, 100Å (250 mm × 21.2 mm, 10 µm; H17-218793) y por LC – MS (*Liquid chromatography - Mass spectrometry*) usando una columna XBridge C18 (4,6 mm × 150 mm, 3,5 µm, Waters, Cerdanyola del Vallès, España) y el equipo LC – MS 2010EV (Shimadzu).

4.2.2. Dicroísmo circular

Con el fin de determinar la estructura conformacional de los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina y estimar el porcentaje del contenido α -hélice, se realizó la prueba de dicroísmo circular (CD) en colaboración con la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). Los péptidos fueron preparados a una concentración de 100 µM en una solución acuosa al 30% de Tetrafluoroetileno (TFE). El espectro de dicroísmo circular fue medido en una celda de cuarzo con longitud de 1 cm en el espectrofotómetro Jasco J-810. El espectro de

dicroísmo circular, resultó del promedio de 4 escaneos obtenidos en intervalos de 0,2 nm desde 190 a 260 nm a temperatura ambiente (139). El porcentaje α -hélice fue determinado de los valores de la media de elipticidad a 222 nm $[\theta]_{222}$ (deg cm² dmo⁻¹), corregido por número de residuos usando la ecuación de Baldwin modificada por Fairlie (140,141), donde el porcentaje de helipticidad se calculó como $[\theta]_{222} / [\theta]_{\max}$, donde $[\theta]_{\max} = [(-44000 + 250 T) (1 - k/n)]$; donde T=25°C, k=4 es la corrección de longitud finita usada para péptidos no bloqueados), y n= al número de residuos. Los cálculos de elipticidad fueron realizados con los programas de CONTIN-LL y SELCON3 usando la base de datos 4,7 y SP175 accesible en DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) (142).

4.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina

La actividad antimicrobiana de los péptidos en mención fue evaluada frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y *Mycobacterium tuberculosis*, realizando ensayos de microdilución en placa siguiendo el método clásico de *National Committee of Laboratory Safety and Standards* (NCLSS) (143), modificado con respecto a la lectura de la placa, ya que en lugar de leer la densidad óptica del crecimiento de los microorganismos, se cuantificó la fluorescencia de la resazurina reducida a resorufin, por los microorganismos metabólicamente activos (144–146).

Para calcular la concentración mínima inhibitoria (MIC) de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a las cepas evaluadas, el valor de la MIC fue definido como la concentración mínima del péptido a la cual el crecimiento bacteriano fue inhibido completamente, después de un periodo de incubación de 24 horas a 37°C.

4.3.1. Evaluación de actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y Candida.

Para calcular la MIC de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a las cepas de *E. coli* ATCC® 25922, *P. aeruginosa* ATCC® 105663, *K. pneumoniae* ATCC® BAA 170513, *S. aureus* ATCC® 29213, *E. faecalis* ATCC® 29212; y la levadura *C. parapsilosis* ATCC® 22019; se realizaron ensayos de microdilución modificados, como se describe previamente en la literatura (145), donde los microorganismos fueron inoculados en medio líquido Mueller Hinton (MH) (Ref 02-136-500, Scharlau), e incubados en agitación (250 rpm) durante toda la noche a 37°C, al día siguiente se refrescaron los inóculos y se ajustaron las absorbancias por espectrofotometría en un volumen de 100 µL usando el espectrofotómetro EPOCH (Biotek), a una densidad óptica de 0,1 medida a 570 nm, lo cual es equivalente a $3-5 \times 10^8$ UFC/mL. El inóculo fue ajustado a $3-5 \times 10^5$ UFC/mL en una dilución final de 1:1000 en MH; luego se mezcló con los péptidos por triplicado en una placa de 96 pozos, en cada pozo se adicionaron 45 µL de inóculo y 5 µL de cada uno de los péptidos; éstos se evaluaron en un rango de 10 diluciones seriadas de 100 a 0,19 µg/mL (concentraciones finales). El ensayo fue incubado a 37°C por un periodo de 16 a 18 horas; pasado este tiempo se agregó el colorante resazurina (Acros Organics 418900050, Geel, Belgium) a 44 µM como indicador redox de metabolismo celular e incubó durante 2 horas a 37°C; el resorufin reducido por las células metabólicamente activas fue cuantificado midiendo su fluorescencia a una longitud de onda de 565/10 nm (excitación) y 600/40 nm (emisión) en el fluorómetro Synergy HTX (Biotek).

Para calcular la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los péptidos, con respecto a la actividad metabólica de los microorganismos, se seleccionó la concentración en la cual no se evidenció señal de fluorescencia de resorufina. El valor promedio de las unidades relativas de fluorescencia (URF) de los blancos (controles con medio MH sin bacterias) fue extraído de cada uno de

los pozos del ensayo, con el fin de normalizar los datos.

4.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) y cepas Multidrogorresistentes (MDR) de aislados clínicos.

El ensayo colorimétrico de microtitulación con resazurina (REMA del inglés *Resazurin microtiter assay*) fue realizado en placas de 96 pozos para determinar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618 y aislados clínicos MDR frente a los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina, como lo describe Rodríguez *et al.*, 2019 (147). Brevemente, en este experimento, ambas cepas de *M. tuberculosis* se cultivaron en medio 7H9 con 10% de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa, y catalasa; Becton-Dickinson, Sparks, Maryland) (BD, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), donde los inóculos para el ensayo fueron ajustados a 1 en la escala de Mcfarland (OD de 0,76 a 600 nm) en medio de cultivo 7H9-OADC a partir de un cultivo bacteriano de 14 días en fase logarítmica, y diluidos en proporción 1:20 (inóculo bacteriano de trabajo); los antibióticos empleados como control de inhibición de crecimiento micobacteriano fueron: etambutol, isoniazida, estreptomina y rifampicina a concentración final de 32, 8, 1, y 2 µg/mL, respectivamente; y los péptidos evaluados, Satanin 1, 2 y Curvicina fueron preparados en medio de cultivo 7H9/OADC haciendo 6 diluciones seriadas a concentraciones finales en un rango de 100 a 3,125 µg/mL (tratamientos); los péptidos y los antibióticos fueron diluidos en medio de cultivo 7H9-OADC. El ensayo se incubó durante 6 días a 37°C en una placa de 96 pozos con 100 µL de inóculo y 100 µL de péptidos de cada una de las concentraciones (200 µL volumen final). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de los péptidos frente a las cepas de *M. tuberculosis*, fue definida como la concentración más baja del péptido que previene la reducción de la resazurina a resorufin por cambio de coloración de azul a rojo, después de agregar resazurina a una concentración final de 44 µM (20 µl) e incubar durante 24

horas a 37°C.

4.3.3. Evaluación de actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a *M. tuberculosis* H37Rv intracelular en células THP-1 y A549 infectadas.

Para evaluar el efecto antimicrobiano de los péptidos en un modelo *in vitro* de células infectadas con micobacterias, se cultivaron las líneas celulares: carcinoma de pulmón A549 (ATCC® CCL 185) y leucemia monocítica aguda THP-1 (ATCC® TIB-202) diferenciadas a macrófagos con *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) a 10 µM (20 ng/mL) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) durante 24 horas; las células A549 se cultivaron en medio RPMI 1640 libre de antibióticos (Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco BRL, Grand Island, NY) y las THP-1 en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%, L-glutamina a 2 mM y antibióticos, ambas líneas celulares se mantuvieron en una atmósfera a 37°C con 5% de CO₂. Los inóculos de *M. tuberculosis* H37Rv (*Mtb* H37Rv ATCC® 25618) se obtuvieron a partir de un cultivo en fase logarítmica a una concentración de 1 x 10⁷ células/mL, crecido a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ en frascos de cultivo de 25 cm² en medio líquido Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI, USA) suplementado con glicerol al 0,2 %, ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa al 10 % (OADC enrichment media, BBL, Becton Dickinson) (148).

Para la infección celular *in vitro*, las células THP-1 y A549 fueron sembradas en microplacas de 96 pozos a una concentración de 1 x 10⁵ células/pozo en medio RPMI 1640 libre de antibióticos con 1% de SFB e incubadas durante 48 horas; el inóculo de micobacterias (1 x 10⁷ células/mL), fue agregado a una multiplicidad de la infección (del inglés *Multiplicity of Infection*: MOI) de 5:1 (proporción bacteria : célula) por pozo para incubar en una atmósfera a 37°C

con 5% de CO₂ durante 2 horas; para eliminar las bacterias extracelulares se hicieron lavados con RPMI 1640. Los tratamientos de los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina fueron realizados por triplicado a las concentraciones finales de 25, 12,5 y 6,25 µg/, e incubados durante 24 horas a 37°C con CO₂ al 5%. Como controles de inhibición de crecimiento de *Mtb*, se agregaron los antibióticos penicilina/estreptomicina y rifampicina. Posterior a los tratamientos con péptidos e infección con micobacterias, las células fueron lisadas durante 10 minutos con SDS al 0,1% para evaluar el crecimiento de UFCs de micobacterias, la reacción fue parada con BSA (del inglés "Bovine Serum Albumin) al 20%. Se realizaron 4 diluciones seriadas (1:10) del lisado celular, que se cultivaron en placas (10 µl en cada pozo) con agar Middlebrook 7H10 (Difco, Detroit, MI, USA) suplementado con OADC (Beckton Dickinson, MD, USA). Las placas fueron cultivadas a 37°C con CO₂ al 5% durante 21 días y luego las UFCs fueron contadas.

4.4. Obtención de PBMCs humanos

Para evaluar la citotoxicidad de los péptidos y su efecto en la producción de TNF- α frente a PBMCs humanos, fue necesario realizar extracción y cultivo de estas células (149). Brevemente, se extrajeron 4 mL de sangre de venas periféricas de un voluntario humano sano, mediante punción con vacutainer con EDTA a 2 mM, luego la sangre fue diluida 1:1 en solución A [NaCl a 0,85% (p/v), Hepes a 10 mM-NaOH a pH 7,4], posteriormente se agregaron 6 mL de sangre diluida sobre 3 mL de una barrera de densidad de 1,077 g/mL (iodixanol 13,63% en solución A) en un tubo cónico de 15 mL, esta mezcla fue centrifugada a 700 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente; la interfase que contenía los PBMCs fue extraída y diluida 1:1 con solución A y centrifugada a 150 x g durante 10 minutos, el precipitado de las células fue resuspendido en medio de cultivo celular RPMI 1640 con antibiótico-

antimicótico al 1 X (10,000 unidades/mL penicilina-estreptomicina y 2.5 µg/mL de anfotericina B) (150).

4.5. Evaluación de actividad citotóxica de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a células no tumorales y tumorales.

La actividad citotóxica de los péptidos fue evaluada utilizando el ensayo de microdilución en placa modificado (144), en donde se utiliza como indicador de metabolismo celular la resazurina. Este ensayo se realizó frente a las líneas celulares no tumorales de riñón de mono verde africano (VERO ATCC®CCL-81™), queratinocitos inmortales aneuploides de piel humana adulta (HaCaT ATCC PCS200011) y células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMCs). También se realizó frente a las líneas tumorales de adenocarcinoma colorrectal de epitelio humano heterogéneo (Caco2 ATCC® HTB-37), células derivadas de tumor de leucemia monocítica aguda (THP-1 ATCC® TIB-202), y adenocarcinoma epitelial de glándula mamaria (MCF7 ATCC® HTB22). Brevemente, en una atmósfera de 37°C y 5% de CO₂ se cultivaron las células en microplacas de 96 pozos (Cellstar, Greiner Bio-One, cat-No. 655180), durante 18 a 24 horas, a una confluencia del 80%, el número de células por pozo y los medios de cultivo utilizados para cada línea celular se especifican en la **Tabla 1**. Posteriormente, se adicionaron por triplicado los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina, preparados en diluciones seriadas a las concentraciones de 3,9; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; y 500 µg/mL; éstos tratamientos se dejaron incubando durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Finalmente, para visualizar el efecto de los péptidos en el metabolismo celular, se utilizó el fluorómetro SYNERGY HTX (Biotek) a una longitud de onda de 565/10 nm (excitación) y 600/40 nm (emisión); para cuantificar las URFs del resorufin obtenido a partir de la resazurina a 44 µM reducida durante 2 horas, en cada uno de los pozos.

4.6. Controles de citotoxicidad de Satanin 1, 2 y Curvicina en líneas de células tumorales y no tumorales.

Los controles utilizados para los ensayos de citotoxicidad de los péptidos frente a las líneas no tumorales y tumorales, consisten en cuantificar la actividad metabólica, a través de la fluorescencia del resorufin obtenido a partir de la resazurina en células 100% activas, lo cual fue equivalente a células incubadas con medio de cultivo (CC) y en células con 0% de actividad metabólica, equivalente a células tratadas con tritón a una concentración final de 0,05% (CT).

Tabla 1. Medios de cultivo y cantidad de células utilizadas en ensayos de citotoxicidad. Células no tumorales: PBMCs humanos, HaCaT ATCC PCS200011, VERO ATCC®CCL-81™; y células tumorales: CaCo2 ATCC® HTB-37, MCF7 ATCC® HTB22 y THP-1 ATCC® TIB-202.

Reactivos cultivo celular	PBMCs humanos	HaCaT ATCC PCS200011	VERO ATCC®CCL-81™	CaCo2 ATCC® HTB-37	MCF7 ATCC® HTB22	THP-1 ATCC® TIB-202
Células por pozo evaluadas en cada ensayo	250000	25000	20000	25000	25000	30000
Medio	RPMI 1640 (11875-093 Gibco)	<i>Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)</i> (Life Technologies 12100-046, New York, USA)		Medio esencial mínimo (MEM) (ref 4150-034 GIBCO)		RPMI 1640 (11875-093 Gibco)
Suero fetal Bovino (CVFSVF00-01, Eurobio, Les Ulis, France)	-	20%	10%	20%	20%	10%
Bicarbonato de sodio (ref S8761, SIGMA)	-	0,37%	0,37%	0,15%	0,15%	-

Penicilina-estreptomicina (ref 15240-062 GIBCO)	10,000 unidades/mL de penicilina-estreptomicina y 2,5 µg/mL de anfotericina B					
Glutamina (GLL01, caisson labs)	-	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Piruvato de sodio (CSTVAT00-0U, Eurobio)	-	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	-
Insulina (12585-014 GIBCO)	-	-	-	-	10 µg/mL	-
β-Mercaptoetanol (M7154, SIGMA)	-	-	-	-	-	0,05 mM
Dextrosa (USP baxter)	-	-	-	-	-	2,5 g/L

4.7. Análisis de los datos de Unidades Relativas de Fluorescencia (URFs) en los ensayos de citotoxicidad

Los valores de unidades relativas de fluorescencia (URFs) en los ensayos con células VERO, HaCaT, PBMCs humanos, CaCo2, MCF7 y THP-1, fueron usados para calcular la actividad metabólica celular con la siguiente fórmula: % de actividad metabólica = $X \cdot 100 / CC$; donde X corresponde a las URFs de cada pozo, 100 es el 100% de actividad metabólica y CC corresponde a las URFs de las células sin tratamiento o control positivo de actividad metabólica. Para este ensayo se espera que el promedio de las URFs del control CC correspondan al 100% de actividad metabólica y las URFs del CT a 0%. Las concentraciones tóxicas mínimas fueron definidas como la concentración del péptido mínima a la que no se observa metabolismo celular, la cual fue definida con un ANOVA de una sola vía, y test de comparaciones múltiples de Dunnett's (*Dunnett's multiple comparisons test*, p-value < 0.05), comparando la media de cada tratamiento con el control de células sin tratamiento (CC); mientras que

la concentración a la que se inhibe el 50% de metabolismo celular IC₅₀), fue calculada con una curva dosis respuesta, según como se indica en el ítem 4.7.

4.8. Evaluación de la actividad hemolítica de Satanin 1, 2 y Curvicina

Para evaluar la actividad hemolítica de los péptidos, los eritrocitos humanos se obtuvieron a partir de 4 mL de sangre con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) al 1 mM (anticoagulante) (Sigma-Aldrich. E6758. USA), se centrifugaron a 800 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, para obtener células precipitadas. Los eritrocitos fueron lavados tres veces con PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, NaHPO₄ 10,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) y diluidos en PBS 1X a una proporción 1:250; la suspensión de células fue agregada a microplacas de 96 pozos (referencia NOR-701001, NEST) y se dejó estabilizar durante 12 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, se realizó un ensayo de microdilución en placa modificado (151), en donde se montaron controles de hemólisis negativos y positivos, que consistían en células no tratadas o incubadas con PBS 1X (CC) y células tratadas con tritón X-100 (CT) a una concentración final de 0,05%. La suspensión de eritrocitos obtenida como se describió previamente fue agregada a microplacas de 96 pozos en una proporción 1:10 frente a los péptidos e incubada durante 2 horas a 37°C y 5% CO₂; luego, la microplaca fue centrifugada a 800 x g durante 15 minutos y la hemoglobina liberada fue cuantificada por la absorbancia de los sobrenadantes a 540 nm en el espectrofotómetro EPOCH (Biotek).

Las absorbancias obtenidas fueron usadas para calcular el porcentaje de hemólisis de los péptidos con la siguiente fórmula: % de hemólisis = $((X-CC)*100/(CT-CC))$; donde X es igual a los valores de absorbancia de cada uno de los pozos, CC corresponde a los valores de absorbancia de los controles negativos de hemólisis, 100 corresponde al 100% de hemólisis y CT corresponde a la absorbancia del control positivo de hemólisis.

4.9. Cálculos de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) e índice terapéutico (IT) de Satanin 1, 2 y Curvicina.

Para calcular la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) de los péptidos frente a la actividad metabólica de las células se hicieron curvas sigmoidales de dosis respuesta con el software del paquete estadístico GraphPad Prism 7; y para hallar el índice terapéutico (IT), se cuantificó un radio entre los IC₅₀ de PBMCs, eritrocitos humanos, líneas celulares VERO (ATCC® CCL-81) y HaCaT (ATCC® HB-241), y la concentración inhibitoria mínima (CMI) del crecimiento de *E. coli* (ATCC® 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 105663), *K. pneumoniae* (ATCC BAA 170513), *S. aureus* (ATCC 29213), *E. faecalis* (ATCC 29212), *C. parapsilosis* (ATCC 22019); dónde $IT = IC_{50} / CMI$ (152).

4.10. Producción de TNF- α en PBMCs humanos estimulados con LPS y Satanin 1, 2 y Curvicina.

El ensayo para evaluar la producción de TNF- α en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas, estimuladas con los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina, fue realizado como se describió previamente en la literatura (153,154). Brevemente, se obtuvieron, cultivaron y dejaron estabilizar 250.000 PBMCs por pozo, con medio RPMI 1640 en una microplaca de 96 pozos (Cellstar, Greiner Bio-One, cat-No. 655180) durante 16 a 18 horas en una atmósfera de 37°C con 5% de CO₂; posteriormente, los tratamientos de lipopolisacárido (LPS) (*Escherichia coli*, LPS 026: B6, Sigma Aldrich L 2654) a 0,04 $\mu\text{g/mL}$ (40 ng/mL) con Satanin 1, 2 y Curvicina a concentraciones finales de una y dos veces la CMI (3,12 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$), fueron agregados a cada uno de los pozos, después de ser pre-incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente; posteriormente las microplacas, fueron incubadas durante 12 horas adicionales a 37°C y 5% de CO₂. Como controles del ensayo se incubaron

células sin tratamiento (CC), estimuladas con LPS a 0,04 µg/mL (LPS) y células estimuladas con Satanin 1, 2 y Curvicina a 6,25 µg/mL. El TNF-α producido, con los estímulos se cuantificó en los sobrenadantes colectados, utilizando un ELISA (Human TNFα ELISA MAX, Ref: 430204, BioLegend) que se realizó siguiendo las condiciones del fabricante (155,156). Finalmente, para verificar la actividad metabólica de los PBMCs, se agregó a cada uno de los pozos una solución con resazurina a 44 µM, y se cuantificó la fluorescencia del resorufin en el fluorómetro Synergy HTX (Biotek).

4.11. Evaluación del efecto de Satanin 1 en modelo de membrana de bacterias, usando vesículas unilamelares grandes (sigla en inglés LUVs) con calceína encapsulada.

Para estudiar la acción de Satanin 1 en un modelo *in vitro* de membrana bacteriana, se evaluó la liberación de calceína de vesículas de compartimentos internos. Se utilizaron vesículas unilamelares grandes (sigla en inglés LUVs), conformadas con los fosfolípidos: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (POPG), como componentes mayoritarios de la membrana de bacterias, en una relación POPC:POPG (80:20), con calceína encapsulada. Este experimento se hizo con un n=2, como servicio técnico en el laboratorio del Instituto de Ciencias Físicas de la Universidad Autónoma Nacional de México (ICF-UNAM), (Cuernavaca, Morelos). Allí los LUVs se reconstituyeron en 150 µL de una solución de calceína a 80 mM, y buffer con KCl a 70 mM y HEPES a 10 mM (pH 7,2), por hidratación de una película seca de lípidos; se logró una concentración aproximada de 10 µM, con un tamaño aproximado de 150 a 200 nm. La liberación de calceína de los LUVs fue monitoreada, mientras se adicionaron concentraciones constantes del péptido hasta llegar a saturación (6, 4, 2, 1, 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 µM). La fluorescencia de la

calceína fue medida a la longitud de onda de excitación y emisión de 520 y 490 nm, en el equipo AMINCO Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer (USA). El porcentaje de ruptura fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Ruptura} = \frac{[F-F_0]}{[F_{\text{max}} - F_0]} \times 100$$

La intensidad de fluorescencia máxima (Fmax) fue determinada al adicionar Tritón X-100 a una concentración final de 0,05%, (F0) representa la intensidad de fluorescencia inicial de la vesícula intacta, y (F) representa la intensidad de fluorescencia posterior a la incubación con el péptido.

5. RESULTADOS

5.1. Características estructurales y fisicoquímicas de Satanin 1, 2 y Curvicina.

En este trabajo, se encontró que los péptidos Satanin 1 (GHMA01330254), Satanin 2 (GHMA01330259) y Curvicina (GHMD01061568), identificados previamente en los transcriptomas de *Dichotomius satanas* (*D. satanas*) y *Onthophagus curvicornis* (*O. curvicornis*) (42); son péptidos de tamaño corto con menos de 40 aminoácidos, peso molecular alrededor de 4 kDa, alto momento hidrofóbico (μH) con valores de 35 a 47 ÅkT/e, alto punto isoeléctrico ($\text{pI} > 10$) y catiónicos con una carga neta de +6 o mayor (**Tabla 2**).

Tabla 2. Predicción de propiedades fisicoquímicas de los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina. ID: código del GenBank, Da: daltons, pI: punto isoeléctrico y $\langle \mu\text{H} \rangle$: momento hidrofóbico.

Péptidos	ID (genbank)	Peso molecular (Da)	pI	Carga neta	$\langle \mu\text{H} \rangle$ (ÅkT/e)	Ángulo entre vector HM y eje Z
Satanin 1	GHMA01330254	4349,259	11,17	+9	51,299	90,923°
Satanin 2	GHMA01330259	4313,104	10,62	+6	42,586	93,758°
Curvicina	GHMD01061568	4413,22	10,69	+6	38,827	94,872°

En el análisis de estructura primaria, se encontró que los péptidos maduros de Satanin 1, 2 y Curvicina tienen un porcentaje de homología de secuencia, entre sí superior al 70%. Con un dominio N-terminal altamente catiónico (residuos 1 al 20) con 4 diferencias en la secuencia (R1G, K4R, I8F y K18E) y C-terminal hidrofóbico con 7 cambios en los aminoácidos (I26V, A30V, T31G, I32V, V33A, G34T y -39K) (**Figura 2**); Satanin 2 comparte el C-terminal con Satanin 1 y el N-terminal con Curvicina las diferencias en la composición de los a.a, se ven reflejadas tanto en las características fisicoquímicas antes mencionadas; como

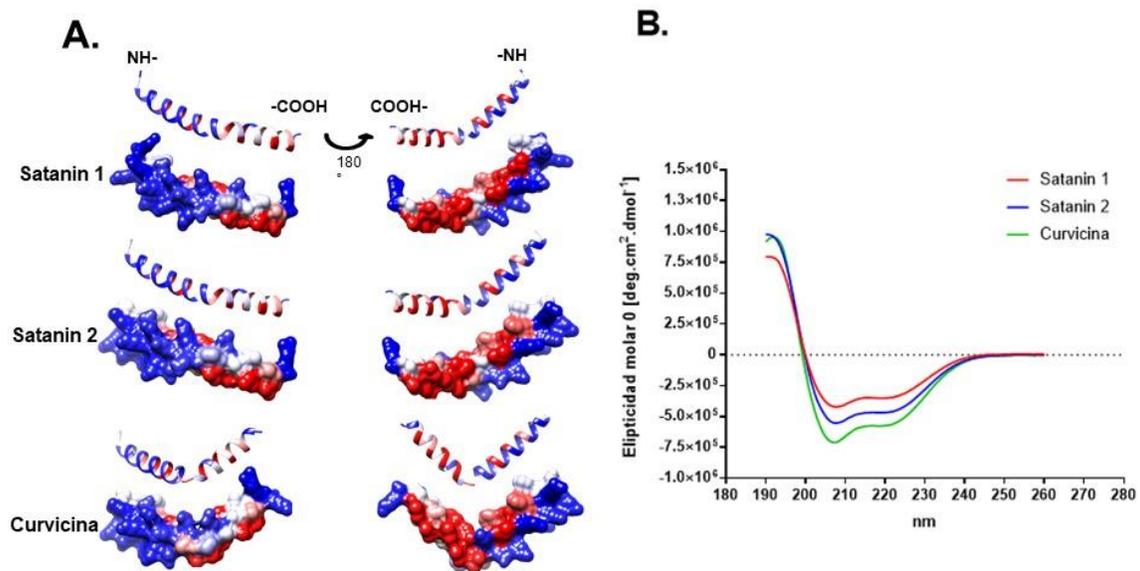


Figura 3. Características estructurales de Satanin 1, 2 y Curvicina. A. Modelamiento estructural de los péptidos en representación de “cintas” (*ribbon*), en la parte superior y superficie en la parte inferior, los colores se encuentran de acuerdo a la hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos, dónde rojo es el color que representa a los más hidrofóbicos, azul a todos los polares o cargados y blanco a los a.a neutros o no cargados; B. Análisis de dicroísmo circular; los péptidos fueron disueltos en PBS con 30% de TFE y sus espectros fueron adquiridos en el espectrofotómetro JASCO.

Se encontró que a nivel de homología de secuencia, Satanin 1, 2 y Curvicina tienen una estrecha relación con péptidos alfa hélice descritos en otros Coleopteros de la familia Scarabaeidae (Oxysterlinas 1, 2 y 3), con un porcentaje de identidad por encima del 70% (**Tabla 3**); y a su vez muestran en su secuencia diferencias considerables, cuando son comparados con

cecropinas o péptidos alfa hélice de otras especies de insectos de los órdenes Diptera y Lepidoptera (**Figura 4 y Anexo 6**).

Tabla 3. Matriz de porcentaje de identidad de Satanin 1, 2, Curvicina, Oxystelinas 1, 2 y 3; fue calculada usando *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Péptidos	Satanin 1	Satanin 2	Curvicina	Oxystelina 1	Oxystelina 2	Oxystelina 3
Satanin 1	100,00	89,47	73,68	73,68	84,21	73,68
Satanin 2	89,47	100,00	84,21	84,21	81,58	92,11
Curvicina	73,68	84,21	100,00	94,87	69,23	79,49
Oxystelina 1	73,68	84,21	94,87	100,00	71,79	82,05
Oxystelina 2	84,21	81,58	69,23	71,79	100,00	84,62
Oxystelina 3	73,68	92,11	79,49	82,05	84,62	100,00

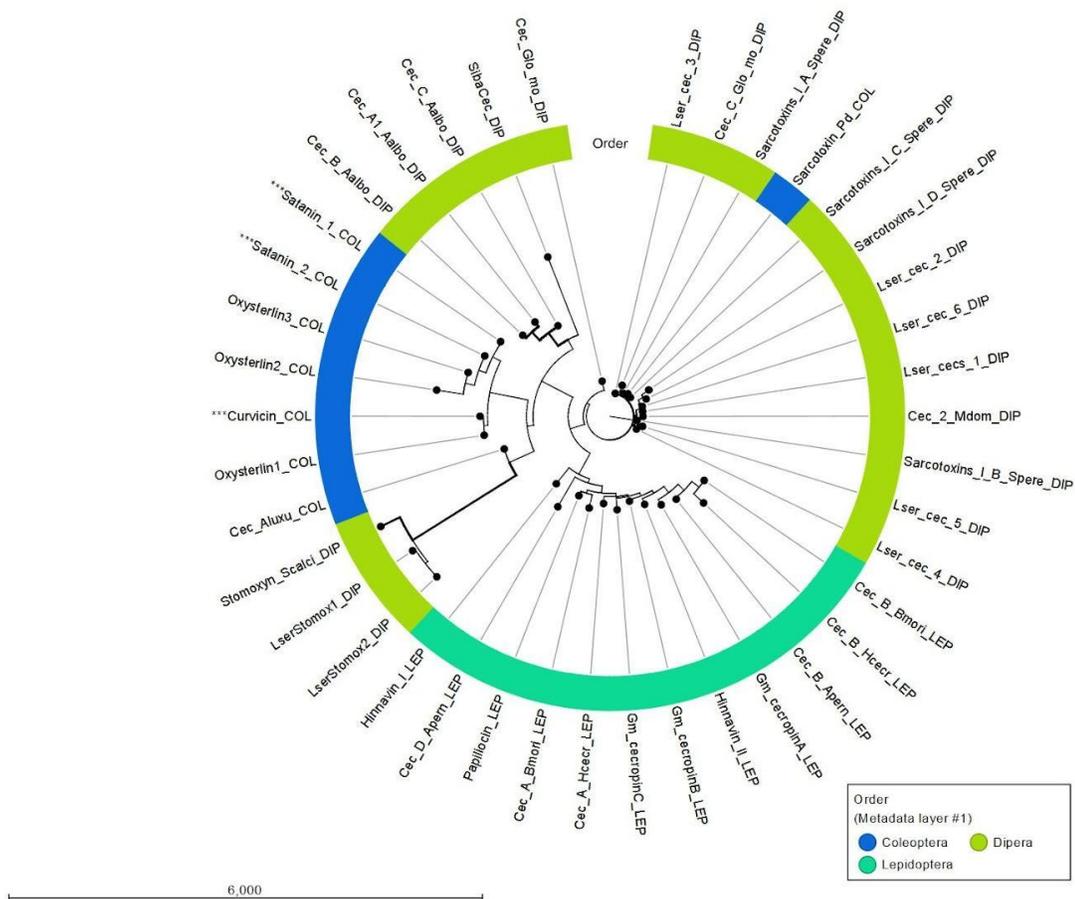


Figura 4. Dendrograma de similaridad Neighbor-joining (10000 réplicas) de cecropinas. Las secuencias de péptidos maduros de Diptera, Lepidoptera y Coleoptera fueron alineadas por homología, donde Satanin 1, 2 y Curvicina se encuentran marcadas con asteriscos. Las cecropinas están marcadas por códigos de colores de la siguiente manera: las cecropinas de Diptera están en verde, las de Lepidoptera en verde menta, y las de Coleoptera en color azul.

5.2. Síntesis de Satanin 1, 2 y Curvicina

Se sintetizaron y liofilizaron aproximadamente 5 mg de cada uno de los péptidos con una pureza mayor a 95% (**Anexo 7**), éstos luego fueron diluidos en agua estéril a una concentración de 5 mg/mL y almacenados a -80°C hasta su uso.

5.3. Actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina

La actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina fue evaluada frente a cepas de referencia ATCC y aislados clínicos con perfiles de resistencia a antibióticos conocidos; los microorganismos utilizados fueron bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, y *K. pneumoniae*), bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*), *Candida parapsilosis*, y *Mycobacterium tuberculosis* cepas H37Rv y MDR (multidrogo-resistente). Satanin 1, 2 y Curvicina tuvieron actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram-negativas, con CMI para las cepas ATCC desde 0,71 a 1,45 μ M (3,12 a 6,25 μ g/mL) y CMI para el aislado clínico de *K. pneumoniae* de 1,4 ó 2,9 μ M (6,25 ó 12,5 μ g/mL) (**Figura 6, Anexos 3 y 4**). Sin embargo, se observó que de los péptidos evaluados Satanin 1 fue el péptido con mayor espectro de actividad antimicrobiana, ya que presentó actividad frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y una levadura con CMI de 5,74 y 11,49 μ M (25 y 50 μ g/mL) (Tabla 3). Finalmente, se observó que los péptidos no tienen actividad frente a micobacterias extra e intracelulares.

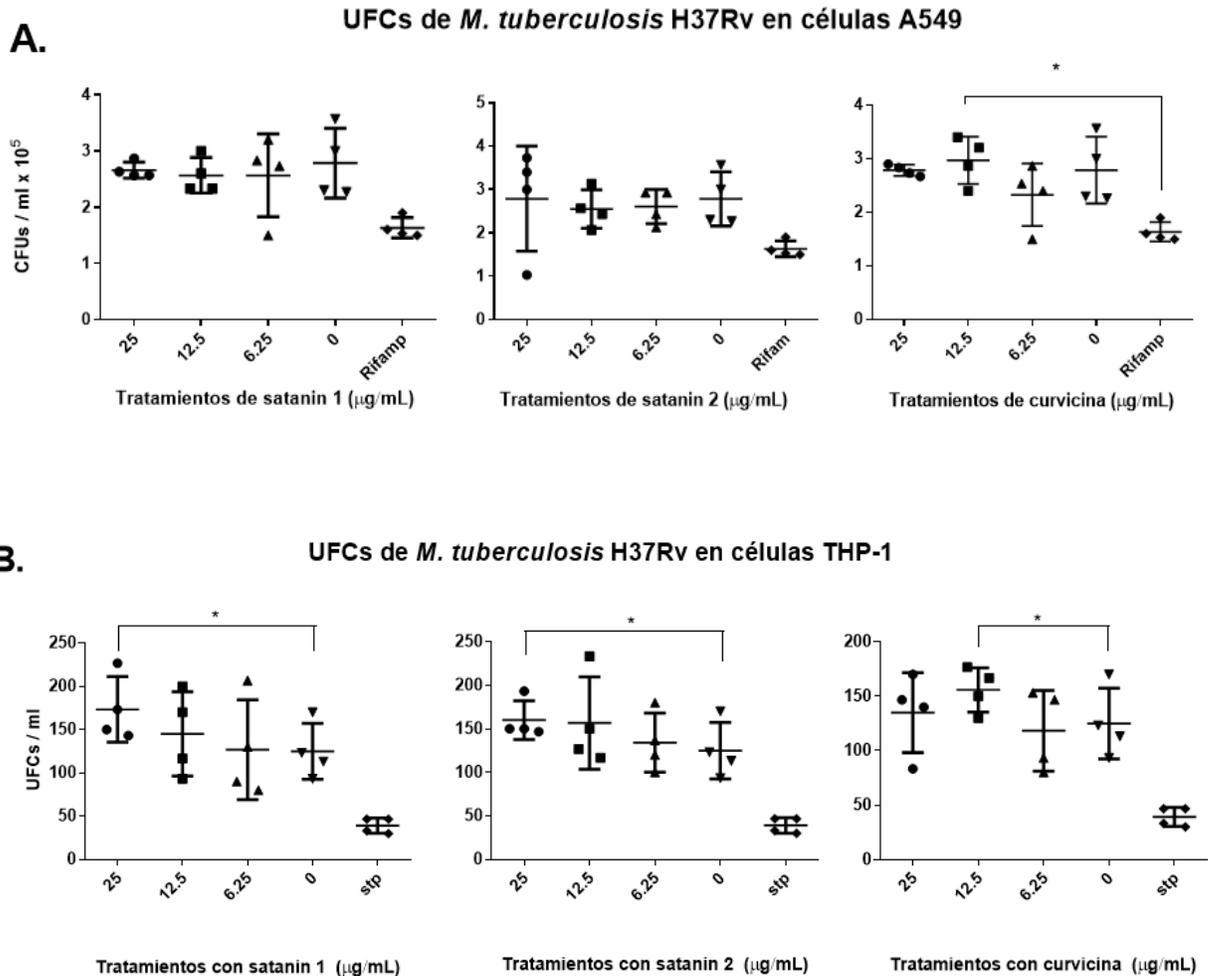


Figura 5. Evaluación de actividad antimicrobiana de Satenin 1, 2 y Curvucina (25; 12,5 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$) frente a las líneas celulares A549 (A) THP-1 (B), infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv durante 24 horas. Los controles del ensayo fueron control de inhibición de crecimiento con Rifampicina (Rifam) a 8 $\mu\text{g/mL}$ y Estreptomicina (Stp) a 1 $\mu\text{g/mL}$ (stp), y control de crecimiento de *M. tuberculosis* sin antibióticos (0). Kruskal-Wallis con p-valor de 0,045.

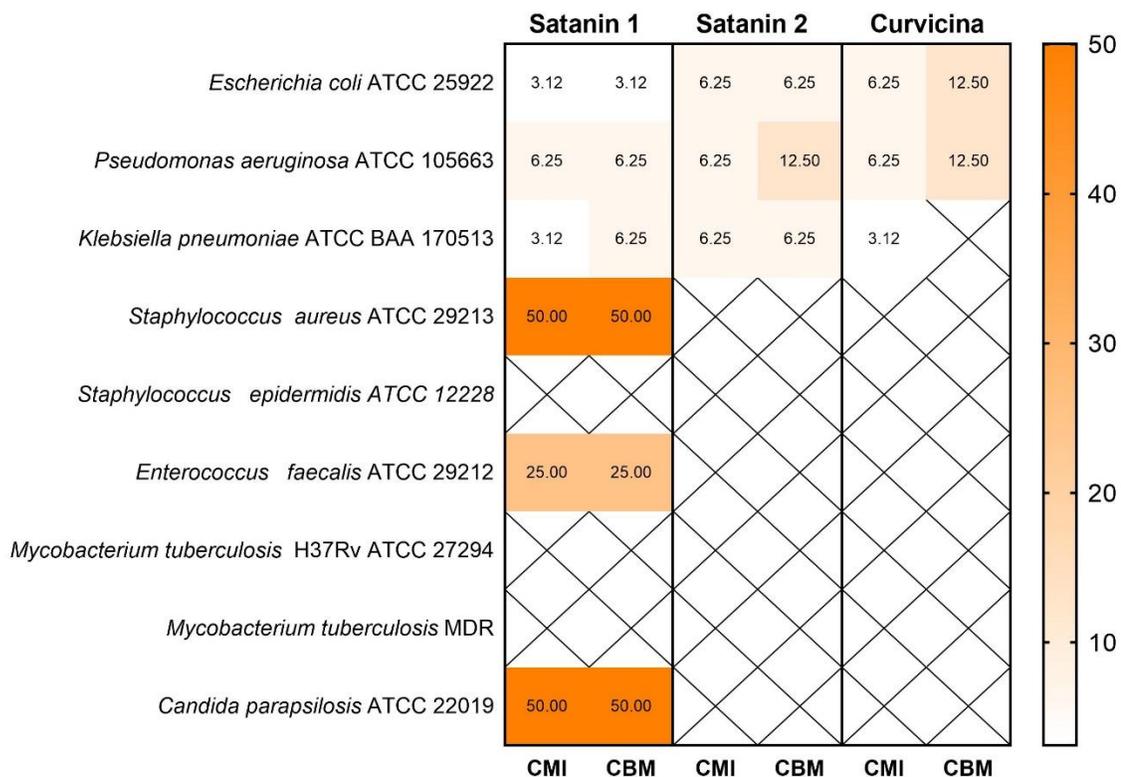


Figura 6. Mapa de calor de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones bactericidas mínimas (CBM) en microgramos por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de Satanin 1, 2, y Curvicia frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, *C. parapsilosis* ATCC 22019, y *M. tuberculosis* (*Mtb*) extracelular.

5.4. Ensayos de citotoxicidad y hemólisis de Satanin 1, 2 y Curvicina

Las actividades hemolíticas y citotóxica de los péptidos fueron evaluadas *in vitro* en eritrocitos humanos y en las siguientes líneas celulares: mononucleares de sangre periférica de humanos (PBMCs), epiteliales inmortalizadas de riñón del mono verde africano (VERO ATCC®CCL-81™) y queratinocitos aneuploides inmortales de piel humana (HaCaT ATCC PCS200011). Los tres péptidos tuvieron un efecto de toxicidad dosis dependiente, en donde se observa que a mayor concentración hay mayor inhibición de la actividad metabólica en cada una de las líneas evaluadas (**Figura 7A-D**). En contraste, se observó que los péptidos tienen una tendencia a incrementar la actividad metabólica de las células HaCaT a concentraciones por debajo de 62,5 µg/mL, lo cual se mantiene en aumento para las concentraciones más altas evaluadas de Curvicina y decae en las concentraciones más altas evaluadas de Satanin 1 y 2 (125, 250 y 500 µg/mL) (**Figura 7D**), esto sugiere que los péptidos evaluados, tienen el potencial de estimular la proliferación *in vitro* de las células HaCaT a concentraciones específicas.

Los resultados obtenidos indican que los péptidos pueden tener diversos blancos celulares que se ven reflejados en diferentes efectos, ya que fueron más tóxicos contra células humanas como eritrocitos, o PBMCs y menos tóxicos para células de piel como HaCaT o de otros animales como Vero; Satanin 1 fue el péptido con mayor toxicidad, seguido por Satanin 2 mientras que Curvicina se muestra como el péptido menos tóxico. Los IC₅₀ y CCM con datos de p-valor se encuentran detallados en la **tabla 4**.

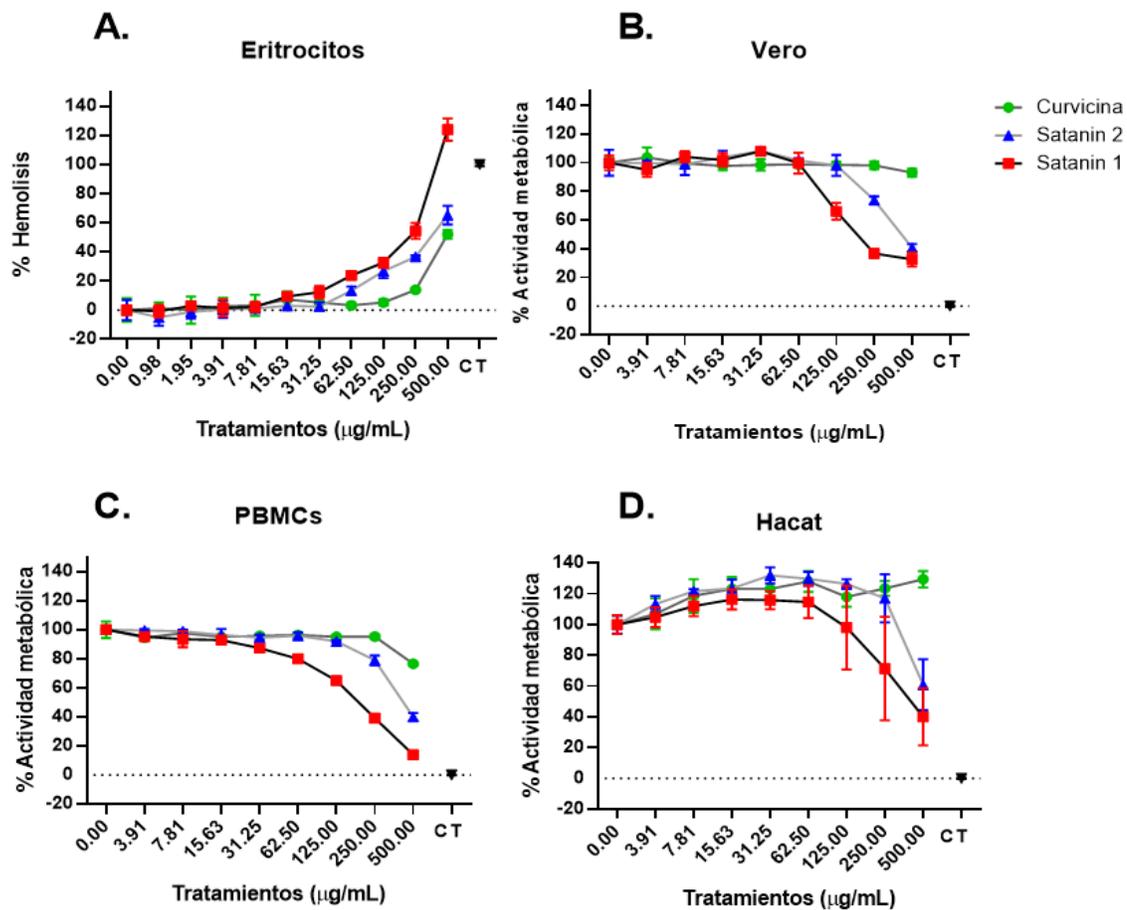


Figura 7. Toxicidad de Satanin 1, 2 y Curvicia en células no tumorales, eritrocitos humanos (A), células VERO (B), PBMCs humanos (C), y células HaCaT (D). Los datos son mostrados con media y desviación estándar (n=3). CT= células incubadas con Tritón X-100 a 0,5% y cada número corresponde a las concentraciones evaluadas para cada uno de los péptidos en µg/mL (tratamientos µg/mL).

5.5. Satanin 1, 2 y Curvicina inhibieron la actividad metabólica de las líneas de células tumorales.

Curvicina inhibió la actividad metabólica de las células THP-1 a 500 µg/mL, mientras que Satanin 1 y 2 inhibieron mayor porcentaje de actividad metabólica de esta misma línea celular (60% y 80%) a menores concentraciones de 3,91 and 31,25 µg/mL, respectivamente (**Figura 8A**); las mismas cecropinas (Satanin 1 y 2) inhibieron el 50% y 40% de actividad metabólica de las células Caco2 a las concentraciones de 250 y 500 µg/mL (**Figura 8B**). Finalmente, también se observó que no hubo actividad antitumoral frente a las células MCF7 (**Figura 8C**). Los IC₅₀ y CCM con datos de p-valor se encuentran detallados en la **tabla 4**.

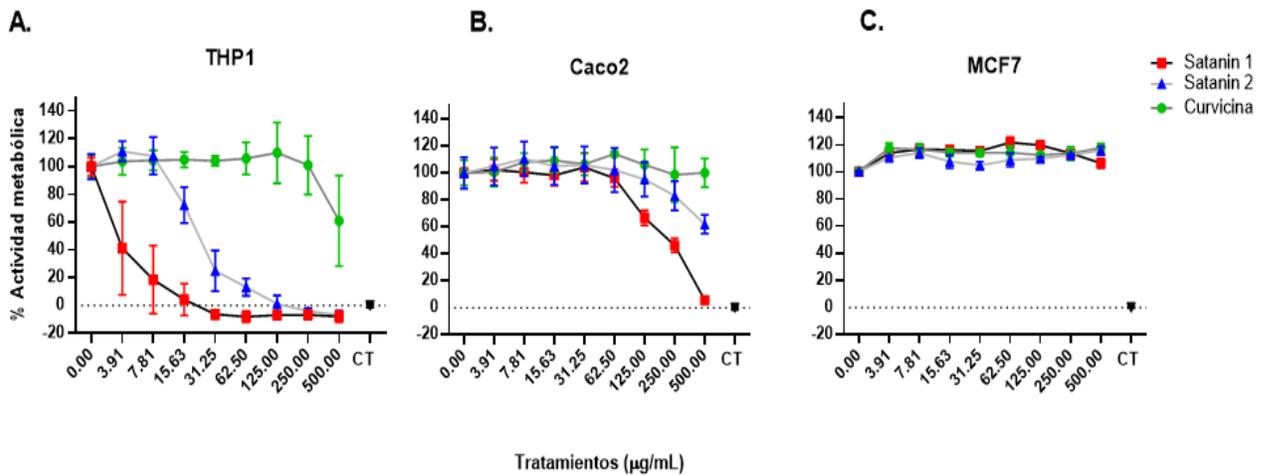


Figura 8. Toxicidad de Satanin 1, 2 y Curvicina en las células tumorales THP-1 (A), Caco2 (B), y MCF7 (C). Las células fueron tratadas con las cecropinas Satanin 1, 2 y Curvicina en un rango de concentraciones (500 a 3,9 µg/mL). Los controles fueron: células con tritón X-100 a 0,5% (CT) y células sin tratamiento (0,00). Los datos se muestran como la media con la desviación estándar; n=6 para THP-1 y n=3 para Caco2 y MCF7.

5.6. Concentración mínima citotóxica, concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), e índice terapéutico (IT)

Los IC₅₀ de actividad antimicrobiana de los péptidos frente a *E. coli* ATCC® 25922 calculados como se explica previamente fueron similares o cercanos a las CMI calculadas experimentalmente, los valores obtenidos fueron: 1,642 µg/mL (R square: 0,9957) para Satanin 1, 3,524 µg/mL (R square: 0,9899) para Satanin 2, y 3,175 µg/mL (R square: 0,9726) para Curvicina. En general, Satanin 1, 2 y Curvicina tuvieron una mayor selectividad por *E. coli* ATCC® 25922 con valores de IT altos, ya que las CMI fueron bajas y las concentraciones citotóxicas frente a células no tumorales fueron altas (**Tabla 4 y Anexo 5**). Por otro lado, Satanin 1 y 2 también fueron tóxicas para la línea tumoral THP-1 a bajas concentraciones, lo cual se ve reflejado en bajos IT (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración mínima citotóxica (CCM), concentración inhibitoria media (IC₅₀), e índice terapéutico (IT) de Satanin 1, 2, y Curvicina en eritrocitos humanos, células VERO, HaCaT, THP-1, y Caco2 vs MIC de *E. coli* ATCC 25922. Se realizó un ANOVA de una sola vía con test de comparaciones múltiples de Dunnett's.

Línea celular	Péptidos	Concentración citotóxica mínima citotóxica (CCM) (µg/mL)	p-valor de CCM Intervalo de confianza de 95% (IC ₉₅)	IC ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confianza de 95% (IC ₉₅) con respecto a IC ₅₀	IT (µg/mL) = IC ₅₀ /CMI de <i>E. coli</i> ATCC 25922
Eritrocitos humanos	Satanin 1	31,3	0,0124 (-20,86 a -1,968)	187,5	138,9 a 261,5	60,096

	Satanin 2	62,5	0,0078 (-23,69 a -2,858)	321,1	282,1 a 368,7	51,376
	Curvicina	250	0,0186 (-26,62 a -1,848)	496,8	458,4 a 548,5	79,488
Células Vero	Satanin 1	125	<0,0001 (22,84 a 44,90)	124,1	113,8 a 139,1	39,776
	Satanin 2	250	<0,0001 (14,34 a 37,74)	268,4	239,6 a 498,3	42,944
	Curvicina	>500	NA	>500	NA	>80
PBMCs humanos	Satanin 1	7,8	0,0079 (1,495 a 11,84)	172,7	158,0 a 188,9	55,3
	Satanin 2	125	0,0019 (2,698 a 13,40)	424,9	401,0 a 452,5	67,9
	Curvicina	500	<0,0001 (18,18 a 28,41)	>500	NA	>80
Células HaCaT	Satanin 1	250	0,0219 (2,981 a 54,14)	406,5	2,517 a 2,721	130,2
	Satanin 2	500	<0,0001 (25,96 a 52,37)	>500	NA	>80
	Curvicina	>500	NA	>500	NA	>80
Células THP1	Satanin 1	3,9	< 0,0001 (38,61 a 82,99)	3,551	2,857 a 4,276	1,1

	Satanin 2	15,6	0,0121 (3,344 a 37,62)	22,36	20,04 a 25,00	3,5
	Curvicina	500	0,0005 (14,26 a 63,82)	>500	NA	>80
Células Caco2	Satanin 1	125	< 0,0001 (18,02 a 48,52)	226,2	166,7 a 310,6	72,5
	Satanin 2	500	0,0071 (8,926 a 67,20)	>500	NA	>80
	Curvicina	>500	NA	>500	NA	>80

5.7. Las cecropinas de Scarabaeidae inhibieron la producción de TNF- α en PBMCs estimulados con LPS.

Satanin 1, 2 y Curvicina a las concentraciones 3,12 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$, inhibieron significativamente la producción de TNF- α en PBMCs estimulados con LPS a 0,04 $\mu\text{g/mL}$ comparado con las células control inducidas solamente con LPS (LPS) (**Figura 9**).

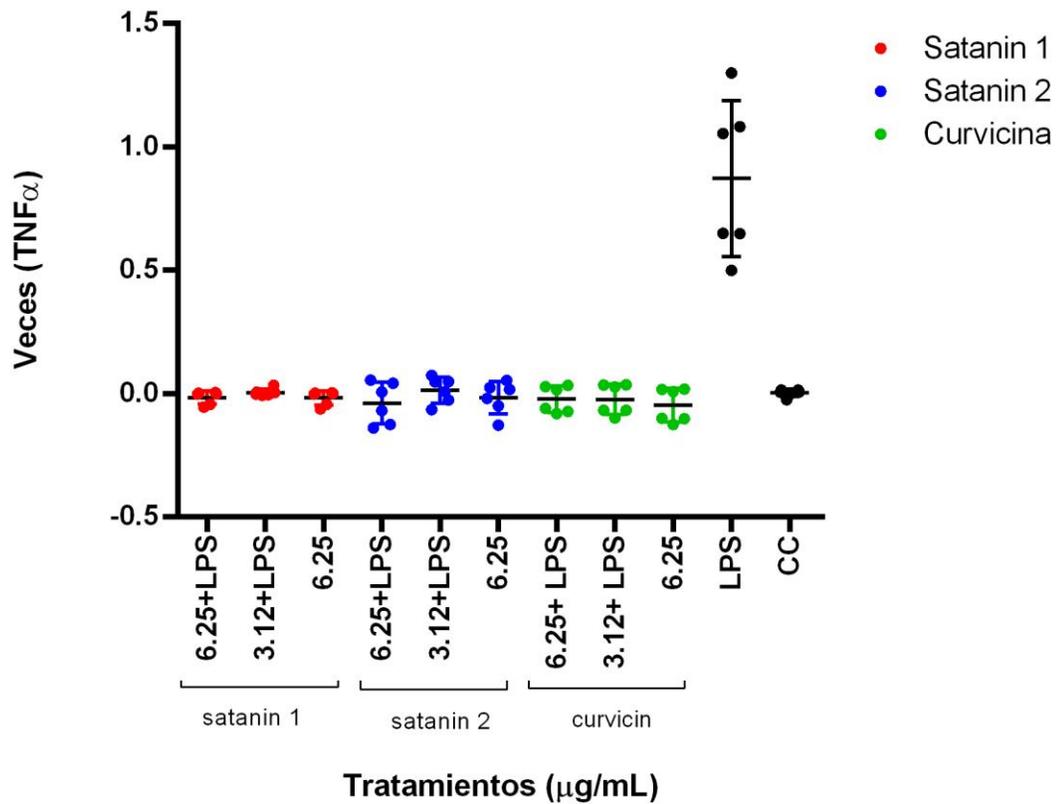


Figura 9. Producción de TNF α en PBMCs humanos tratados con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) y cecropinas de Scarabaeidae. Las cecropinas fueron usadas a 3,12 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y el LPS a 0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los controles fueron PBMCs con medio de cultivo (CC), PBMCs tratados con LPS a 0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LPS), y PBMCs con cada uno de los péptidos a 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se realizó un ANOVA con test de comparación múltiple usando el método de Dunnett's con diferencias estadísticamente significativas ($p = <0,0001$), cuando se contrastaron cada uno de los grupos frente al control de LPS ($n=6$).

5.8. Satanin 1 libera calceína de los modelos de membrana de bacterias y mamíferos.

El modelo de membrana evaluado, fue el de bacterias representado por POPC:POPG, en una proporción 80:20, donde Satanin 1 presentó actividad en la liberación del 30% de calceína (**Figura 10**). En general, se pudo evidenciar que bajo las condiciones evaluadas Satanin 1 no tiene como blanco principal membranas conformadas mayoritariamente con los lípidos evaluados, ya que no se evidenció la liberación del 100% de calceína.

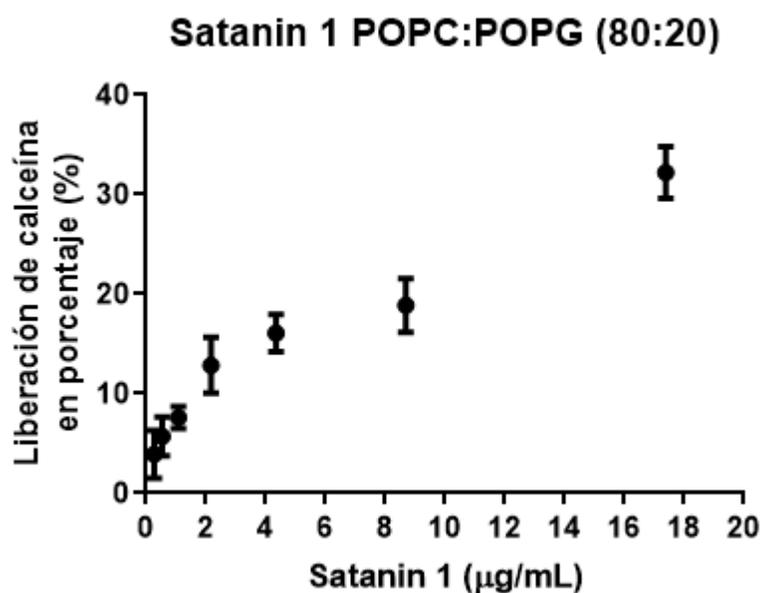


Figura 10. Porcentaje de liberación de calceína de las vesículas de POPC:POPG en presencia de Satanin 1 a las concentraciones de 0,27; 0,54; 1,08; 2,17; 4,35; 8,7; 17,4 µg/mL (0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 y 4 µM).

6. DISCUSIÓN

En este trabajo, se amplía el conocimiento sobre las características funcionales de las cecropinas, satanin 1, 2 y curvicina identificadas en los escarabajos coprófagos *D. satanas* y *O. curvicornis* (42), éstos péptidos tienen características consistentes con las descritas para cecropinas de otros insectos e incluso para las descritas en otras especies de Scarabaeidae como las oxysterlinas, entre las que se presenta longitud de aminoácidos (a.a), peso molecular de aproximadamente 4 kDa, carga neta positiva, alto punto isoeléctrico (pI), estructura secundaria de hélices α confirmada experimentalmente conforme a lo modelado *in silico*, anfipaticidad dada por el extremo N-terminal compuesto por aminoácidos catiónicos e hidrofílicos y el extremo C-terminal conformado por la mayoría de aminoácidos hidrofóbicos (42,157–159).

En las secuencias de satanin 1, 2 y curvicina, los a.a hidrofóbicos están regularmente distribuidos uno en medio de cada 2 ó 3 a.a polares en la región del N-terminal, por cada vuelta de hélice, permitiendo así que la hélice presente dos caras con características químicas diferentes: una cara hidrofóbica y una cara polar (figura 2). Debido a ésta segregación, es posible que la hélice se extiende paralela a la interfaz de la membrana bacteriana y de pie para que físicamente su anclaje sea posible, los residuos hidrofóbicos pueden interactuar con el centro hidrofóbico de la membrana, facilitando interacciones con las cadenas grasas de los grupos acil, como ha sido descrito por otros autores para péptidos alfa hélice (160,161), mientras que los a.a hidrofílicos/cargados de regiones como el N-terminal, pueden interactuar con los grupos polares lipídicos de membranas bacterianas como el LPS para el caso de Gram-negativos (162); sin embargo los a.a que conforman la región C-terminal son en su mayoría hidrofóbicos y rompen con el patrón de vueltas hélice, llevando a este extremo a ser más desordenado; en esta región

podemos evidenciar que los péptidos son anfipáticos y que el de mayor anfipaticidad es satanin 1, lo que a su vez se ve reflejado en un alto valor de momento hidrofóbico, como ha sido descrito en otros péptidos con esta característica, correlacionando con una actividad antibacteriana potenciada (73,163–165).

Las altas cargas netas y altos pI de Satanin 1, 2 y Curvicina, nos indican que son péptidos solubles en medios acuosos con baja probabilidad de autoagregación por pérdida de carga en las cadenas laterales a pH fisiológico (166). Además, se observó con Satanin 1 (comparado con Satanin 2 y curvicina) que a mayor carga neta y mayor momento hidrofóbico, presenta una mejor actividad antimicrobiana frente a un mayor número de especies como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonie* (Gram-negativas), *S. aureus*, *E. faecalis* (Gram-positivas) y *Candida parapsilosis* (**Figura 6**); ésto puede estar asociado a su carga neta alta, la cual está relacionada con la atracción electronegativa por membranas cargadas negativamente, la cual se ve afectada al disminuir dicha carga (167,168). Sin embargo, también se ha observado que la posición, más que el número de residuos cargados positivamente afecta las propiedades biofísicas y selectividad del péptido, como fue el caso de análogos de AR-23 (169).

Entre otras características fisicoquímicas de los péptidos, y dado que las bacterias Gram-negativas como *E. coli* tienen un total de 60-80% del fosfolípido cargado negativamente, fosfoetanolamina (PEs) y un 15-20% del fosfolípido zwitterion fosfatidilglicerol (PGs); mientras que las Gram-positivas tienen una concentración menor de PEs comparada con la mencionada para Gram-negativas (170,171); se pudo observar para satanin 1 que los fosfolípidos zwitteriónicos y aniónicos, POPC:POPG (80:20) no son blancos específicos en las condiciones evaluadas, esto nos permite inferir que se requieren más componentes de membrana bacteriana como por ejemplo,

fosfatidiletanolamina (POPE), el cual es crucial para la sensibilidad de las bacterias a agentes antimicrobianos (172). Además, es posible que los blancos de actividad del péptido pueden estar relacionados con otros blancos del interior bacteriano, y que desconocemos con la evidencia experimental que hay hasta el momento. Sin embargo, no se descarta que Satanin 1 tenga múltiples blancos que dependen del tipo de célula (171,173,174).

Sumado a las características descritas anteriormente, es posible que la presencia de dos o más aminoácidos cargados positivamente y una gran proporción de residuos hidrofóbicos, reflejados en altos valores de momentos hidrofóbicos (35 a 47 kTÅ/e), lleven al plegamiento de los péptidos en estructuras secundarias con cierta anfipaticidad como se observa en los modelos predichos y con los datos de dicróismo circular. Los datos de estructura secundaria obtenidos son considerados una característica típica de la familia de las cecropinas y son similares a lo reportado para otras cecropinas como las oxysterlinas 1-3 (46,77,175–178); generalmente, este grupo de péptidos en solución acuosa puede tener una estructura aleatoria, con tendencia a adoptar conformaciones alfa hélice cuando interactúan con membranas microbianas, donde ejercen un efecto lítico (159,179,180), ya que pueden intercalarse en membranas bacterianas y formar poros para traslocar dentro de las células bacterianas (181), teniendo como posible blanco su interacción electrostática con los grupos aniónicos de fosfolípidos en membranas bacterianas (73,182) o blancos intracelulares en el ADN o componentes proteicos, seguidos por un proceso de muerte celular no lítica (183–185). Sin embargo, se necesitan experimentos adicionales que confirmen este tipo de interacción de nuestros péptidos con membranas bacterianas.

A nivel de secuencia, se encontró alta homología entre satanin 1, 2, curvicina y oxysterlinas 1-3, con más del 70% de similitud (**Tabla 3 y Figura 4**), una de

las principales características es que los péptidos, conservan un dominio N-terminal con alta frecuencia de aminoácidos KR, previamente descrito para la familia de cecropinas de Scarabaeidae, [GR]-[SW]-K-[RKG]-[WL]-R-K-[FIL]-E-[KR]-[RKA]-[VSG]- [KR]-[KR] (42,46), el cual resulta en una secuencia con características principalmente catiónicas e hidrofílicas (186). Así mismo, se observó que entre las secuencias de satanin 1, 2 y curvicina se observaron 6 cambios conservados y 5 no conservados en sus aminoácidos, en dónde los cambios no conservados en la posición 1, 18 y 39K (adición en curvicina) de la región N-terminal son los que se relacionan principalmente con cambios en sus propiedades físicas como carga neta de +9 en satanin 1 y +6 en satanin 2 y curvicina y anfipaticidad o momento hidrofóbico de 51,299 en satanin 1 (**Tabla 2**).

Dichos cambios son similares a lo reportado para análogos del péptido AR-23 (169), en donde se ve reflejado que la posición, más que el número de residuos cargados positivamente, afecta las propiedades biofísicas y selectividad del péptido. De esta manera, vemos que satanin 1 con los residuos catiónicos arginina y lisina en las posiciones 1 y 18 (R1 y K18) es el más catiónico con una carga neta de +9 y con mayor momento hidrofóbico (51,299 ÅkT/e Tabla 2), seguido de satanin 2 y curvicina, donde los cambios en las posiciones 1 y 18 son cambios no conservados con respecto a satanin 1 por un residuo neutro con cadena lateral pequeña (G1) y un residuo con carga negativa de carácter ácido (E18); además en el C-terminal de curvicina se encuentra un aminoácido catiónico adicional en la posición 39 (-39K), los cuales disminuyen tanto carga neta como momento hidrofóbico en ambos péptidos (satanin 2 y curvicina).

Actividad antimicrobiana de Satanin 1, 2 y Curvicina

Con respecto a la actividad antimicrobiana de satanin 1, 2 y curvicina, se observó que los tres péptidos presentan una selectividad por bacterias Gram-negativas como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Sin embargo, con satanin 1 se evidenció un mayor espectro de actividad antimicrobiana a concentraciones más altas, eliminando también bacterias Gram-positivas y levaduras como *S. aureus*, *E. faecalis* y *Candida parapsilosis*. Se cree que la diferencia en las actividades de los péptidos está relacionada con las variaciones en las envolturas celulares externas entre Gram-positivas y Gram-negativas, ya que las membranas internas o citoplasmáticas son similares (187). Actividades similares contra bacterias Gram-negativas están referenciadas para cecropinas identificadas en órdenes como dípteros, lepidópteros y coleópteros (76), entre los que están cecropina B, cecropina A (CMI aproximada de de 1 a 16,7 μM), sarcotoxina Pd (CMI aproximada de 1,69 a 2,86 μM) y oxysterlinas 1, 2 y 3 (CMI desde 0,7 a 7,9 μM) (157,188). En cecropinas catiónicas, como Satanin 1, 2 y Curvicina, se ha observado que la actividad antimicrobiana, ha sido atribuída a interacciones electrostáticas con las moléculas aniónicas expuestas en la superficie de membrana en Gram-negativas como el LPS (principales componentes de ésta superficie celular), ésto podría ocasionar acumulación de péptidos que recubren la superficie creando agujeros en membrana, que actúan de forma similar a los detergentes formando micelas y lisis celular, como es el caso de la ovisprina, cecropinas y caerina 1.1 (189–191), sin embargo, aún no tenemos evidencia de los mecanismos por los cuales los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina tienen actividad antibacteriana.

Adicionalmente, en otros trabajos se ha mencionado que el incremento de los residuos cargados positivamente es beneficioso para las interacciones electrostáticas entre HDPs y componentes de membrana bacteriana cargados

negativamente imponiendo así la selectividad (192,193), lo que podría explicar el caso de satanin 1, el cual tuvo alta selectividad aunque mayor toxicidad, comparado con satanin 2 y curvicina; éstos últimos tienen menor proporción de a.a positivos en el N-terminal, y específicamente curvicina posee una R adicional en el a.a 39, en lugar de la R en la posición 1 comparada con satanin 1. Un caso similar, reportado en la literatura es el de los análogos del péptido AR23, en éstos se observó que el incremento de su anfipaticidad fue generado por la sustitución de residuos cargados positivamente en la cara polar, lo cual al parecer desencadenó la actividad antimicrobiana del péptido; sin embargo la disminución de la anfipaticidad del mismo con la sustitución de a.a cargados positivamente en la cara no polar generó lo opuesto (disminución de la actividad antibacteriana) (169). Otros autores ha reportado que la interrupción de la anfipaticidad no interrumpe la actividad antimicrobiana (194–197), pero puede llevar a disminuir su espectro de actividad, como es el caso de curvicina y satanin 2 comparados con satanin 1.

Por otro lado, la restringida actividad de los péptidos frente a Gram-positivas fue similar a lo observado en cecropinas como sarcotoxin Pd (CMI 4,48 hasta 5,31 μM) y oxysterlinas (2,8 a 11,22 μM) (47,76,157,188), dónde satanin 1 tuvo actividad frente a dos especies de Gram-positivas a concentraciones más altas (CMI 5,75 y 11,49 μM). Ésta diferencia se ha asociado a que la superficie de membrana externa de las Gram positivas está compuesta por una capa de peptidoglicano reticulado con ácido teicoico cargado negativamente que rodea la membrana citoplasmática, formando una gruesa matriz que mantiene la rigidez de la célula bacteriana (187). Así que es probable, que se requiera mayor concentración de los péptidos, para que éstos puedan atravesar la matriz de peptidoglicano, e interactuar con la membrana citoplasmática cargada negativamente. La incapacidad de permeabilizar o interrumpir la membrana externa es el resultado de pérdida de actividad antimicrobiana (86).

Por otro lado, los HDPs cargados positivamente, tienden a interactuar con los sitios divalentes de unión catiónica, cargados negativamente del LPS, expuestos en la superficie celular y permite el paso de los péptidos a través de la membrana externa, este mecanismo es llamado “autopromoción de la captación” o “*self-promoted uptake*”; a través de este mecanismo también es cómo ocurre la actividad anti-endotoxina de los HDPs catiónicos (198), sin embargo, aún queda por explorar si éste es el caso de satanin 1, 2 y curvicina.

Citotoxicidad de Satanin 1, 2 y Curvicina frente a células no tumorales

Satanin 1, 2 y curvicina tienen baja toxicidad en células no tumorales, reflejada en valores altos de IC₅₀ e IT, similar a lo observado para otras cecropinas como las oxysterlinas 1-3, (125 a 500 µg/mL) (46), y cecropina B (400 µg/mL) (199). La baja toxicidad observada en eritrocitos humanos, puede estar asociada a una disminuida atracción electrostática entre los péptidos y los componentes aniónicos de las membranas celulares como la fosfatidilserina (PS); debido a que los lípidos de la membrana con carga negativa se encuentran ubicados en la cara interna de la misma y recubiertos por una barrera de otros componentes como colesterol, zwitterion de fosfatidilcolina (PC), esfingomielinina (SM), y fosfatidiletanolamina (PE), que le dan grosor y densidad a dicha estructura (200–202). Así mismo, la baja toxicidad de satanin 1, 2 y curvicina, observada frente a las células VERO, HaCaT y PBMCs humanos; podría radicar en que las acciones selectivas de los HDPs dependen de las diferencias en la composición de membranas de células hospederas (animales y plantas), y patógenos (bacterias y hongos) (86). Sin embargo, la tendencia a aumentar la actividad metabólica de los tres péptidos en la línea celular HaCaT a concentraciones inferiores a las citotóxicas, nos permite inferir que tienen un efecto fenotipo-específico de incremento en el metabolismo, similar a lo descrito en cecropinas con potencial de cicatrización como HB-107 (203).

Se ha observado que la actividad hemolítica *in vitro* frente a eritrocitos humanos, como la observada a las concentraciones más altas evaluadas para satanin 1 (carga neta +9 y momento hidrofóbico de 47), en otros trabajos se encuentra asociada a la hidrofobicidad y polaridad de los HDPs; se ha observado que los péptidos más hidrofóbicos, son los más hemolíticos mientras que los más polares son los menos tóxicos (204,205). Así que la capacidad de formar estructuras anfipáticas en solución incrementa la actividad hemolítica, una vez el umbral de hidrofobicidad es alcanzado (206,207). Como en el caso de péptidos análogos de AR-23, en los que la sustitución de aminoácidos hidrofóbicos por a.a polares catiónicos (A1R, A8R, I17K), disminuyó su hidrofobicidad y anfipaticidad; lográndose baja hemólisis e incremento del IT (169,208–211). Si comparamos las sustituciones naturales entre curvicina y satanin 1 podemos observar un fenómeno similar de reducción de anfipaticidad e hidrofobicidad en curvicina con los cambios en las posiciones G1R, K18E y -39K, que a su vez se ven reflejados en un alto IT.

La destrucción o interrupción de la cara no polar de un péptido podría dramáticamente disminuir la hidrofobicidad, anfipaticidad, helicidad y actividad de penetración de membrana contra células humanas (193); así se podría disminuir actividad hemolítica, y mantener o disminuir levemente la actividad antimicrobiana; este es el caso de los péptidos análogos de AR23, dónde se realizaron sustituciones de aminoácidos hidrofóbicos por a.a polares catiónicos como A(A1R, A8R, I17K) y A(A1R, A8R, I17K), lográndose baja hemólisis e incremento de IT (169,208–211); este puede ser el caso de curvicina al compararla con satanin 1, en donde las sustituciones ocurridas naturalmente en ambos, nos muestran que el reemplazo en curvicina de R1 por G1, K18 por E18 y una K39 adicional reflejan disminución en espectro de actividad antibacteriana (actividad frente a Gram-negativas evaluadas), menor momento hidrofóbico (anfipaticidad e hidrofobicidad menor) y baja hemólisis

pero incrementó en selectividad o IT ($IT > 80$). Tanto los resultados de este trabajo, como los reportados para los péptidos análogos de AR-23 (169), ponen de manifiesto que el aumento de los residuos cargados positivamente en posiciones apropiadas puede mejorar el IT de un péptido antimicrobiano. Además, la actividad hemolítica de los péptidos se ha asociado con características como hidrofobicidad, tamaño de las cadenas hidrofóbicas alifáticas e interacciones de hidrofobicidad (212–214).

Por lo tanto, las potenciales aplicaciones terapéuticas de satanin 1, 2 y curvicina dependen de la capacidad de eliminar células bacterianas a bajas concentraciones, sin exhibir citotoxicidad hacia células de mamíferos a las mismas concentraciones (215). Este potencial se ve reflejado en los resultados observados con respecto a los índices terapéuticos de los péptidos reportados en la tabla 4 y en la tabla del anexo 4.

Citotoxicidad en líneas de células tumorales

Se observó una alta toxicidad de satanin 1 y 2 frente a la línea celular tumoral THP-1 con IC₅₀ de 3,551 y 22,36 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; con alta selectividad al comparar el efecto frente a PBMCs humanos donde se presentaron IC₅₀ de 172,7 y 424,9 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Es de resaltar, que se han hallado efectos tóxicos similares en péptidos como las cecropinas A y B en cáncer de vejiga (IC₅₀ desde 97,9 a 185 $\mu\text{g/mL}$), o cecropinas A y CB1A en células de leucemia HL-60 (IC₅₀ de 28 a 120 $\mu\text{g/mL}$) (156,216,217). Se cree que una de las razones por las que HDPs tienen toxicidad y alta selectividad frente a células tumorales está relacionada con la composición de la superficie de la membrana celular, ya que a diferencia de las células normales, las tumorales pierden asimetría de distribución de fosfolípidos entre las capas exteriores o interiores de la membrana plasmática

y exponen fosfatidilserinas (PS) cargadas negativamente del interior al exterior celular (85); la presencia de PS en su superficie, es causada por altos niveles de ROS e hipoxia que modifica el microambiente tumoral e induce la desregulación de fosfolípidos de membrana (218). Además, éstas células tienen menor proporción de lípidos zwitteriónicos como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomielina (SM) y mayor exposición en la superficie celular de moléculas cargadas negativamente, como glicoproteínas y glicosaminoglicanos (32,32,202,219,220).

Uno de los mecanismos propuestos para los HDPs con actividad citotóxica frente a células cancerígenas, está relacionado con interacciones electrostáticas entre los HDPs cargados positivamente y las moléculas negativas de la membrana celular, lo cual muestra una selectividad por blancos tumorales a través de la capacidad que tienen los HDPs de unirse a los fosfolípidos negativos por la cabeza polar de las fosfatidilserinas (PS) o fosfatidilglicerol, expresados en la superficie de las membranas de las células cancerígenas, de ésta manera se pueden abrir poros permeabilizando la célula y causando apoptosis o necrosis celular; este es el caso reportado para el péptido LL37 (20,221–224). Sin embargo, el anterior mecanismo de acción, relacionado con la alteración de la membrana, aunque es similar al descrito para otros péptidos con actividades antimicrobianas (225), no ha sido detallado a nivel de cada péptido o familia, y en nuestro caso se hacen necesarios futuros estudios que permitan contrastar o confirmar estas actividades e interacciones.

Algunos cambios entre las secuencias de los péptidos satanin 1, 2 y curvicina originan efectos en la citotoxicidad frente a células tumorales THP-1, vemos como satanin 1 y 2 tienen toxicidad frente a éstas células, mientras que curvicina pierde ésta actividad. Teniendo en cuenta que los cambios de la secuencia entre satanin 2 y curvicina se originan en el C-terminal, podemos

inferir que tanto la adición de lisina en la posición 39 de curvicina como los cambios en las posiciones: I26V, A30V, T31G, I32V, V33A, G34T y -39K son los responsables de la pérdida dicha actividad. Además observamos, que los cambios adicionales presentes solo en satanin 1 en las posiciones R1G y K18E, junto con los mencionados en el C-terminal, se reflejan en actividades del péptido más tóxicas comparadas con los otros 2 péptidos evaluados. Sin embargo, el modo exacto de acción para estos péptidos es aún pobremente entendido.

Actividad antiendotoxina de Satanin 1, 2 y Curvicina.

La inhibición de la producción de TNF-alfa, es un efecto que se ha observado de manera similar en otras cecropinas como la B, DH y AeaCec 1-5 a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M (226,227) y a la de péptidos con capacidad de neutralizar el LPS, como la observada en fowlicidina (228), MAP29 (229), pardaxina (230), temporinas (231) y análogos de magainina (232). Dicho efecto se ha relacionado con la capacidad de los HDPs de interactuar con las toxinas y con las bacterias como posibles moléculas que previenen el síndrome de shock séptico ocasionado por infecciones de bacterias Gram-negativas, neutralizando el LPS y a su vez disminuyendo citoquinas proinflamatorias como el TNF α (233–236), ya que los tratamientos de la sepsis con anticuerpos anti-LPS o anti-TNF- α tienen efectividad limitada (237,238).

Se cree que la potencial actividad anti-endotoxina de HDPs como Satanin 1, 2 y Curvicina, radica en su capacidad de inhibir la producción de TNF- α ; a través de una posible modulación de la respuesta de reconocimiento a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como el LPS, debido al bloqueo de ésta molécula y de la activación de la ruta de señalización iniciada por los receptores celulares TLR4 (receptor especializado para la detección de LPS extracelular), en células fagocíticas (239,240), que desencadena en la

activación de la transcripción de genes pro inflamatorios como TNF α , CXCL8, IL-6, entre otras (241), que aunque eliminan la infección, al mismo tiempo pueden causar inflamación sistémica y daños colaterales en el hospedero (242,243).

Aunque, la naturaleza o el mecanismo por el cual ocurren las interacciones entre HDPs y LPS o citoquinas proinflamatorias es desconocida (244,245), hasta la fecha se han reportado cecropinas y análogos con capacidad de unirse al LPS, que resultan en propiedades anti-inflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo* (76); y se infiere que las actividades antimicrobianas y anti endotoxina pueden estar relacionadas con hidrofobicidad, permeabilidad de membrana y contenido alfa hélice del péptido (246). Algunos mecanismos de interacción entre HDPs y LPS han sido descritos para péptidos como cecropina A de *Hyalophora cecropia* (91) papiolicina de *Papilio xuthus* (179,234,247), cecropina B de *Bombyx mori* (199), e incluso péptidos sintéticos derivados del LL37 (248), en donde se ha descrito que la capacidad de los mismos para intervenir en el proceso inflamatorio ocasionado por endotoxinas, ocurre por atracciones electrostáticas entre la hélice catiónica y anfipática del N-terminal y la región del LPS cargada negativamente, lo que a su vez facilita que la hélice hidrofóbica del C-terminal se inserte en la región del lípido A del LPS por interacciones hidrofóbicas. De esta manera, se propicia la inhibición de la inflamación generada por el LPS, a causa del bloqueo de la región del lípido A y formación de vesículas agregadas de LPS (249–251).

Dichas interacciones han sido asociadas a regiones del N-terminal similares a las de satanin 1, 2 y curvicina que tienen aminoácidos con radicales aromáticos como el triptófano (W), y la fenilalanina (F), ó básicos y cargados positivamente como la arginina (R) y lisina (K), que han sido reportados en otros péptidos como sarcotoxina IA, papiiocina y cecropina A por contribuir en la interacción

electrostática de éstos con membranas cargadas negativamente y específicamente con moléculas aniónicas de los microorganismos como el LPS de *E. coli* o incluso el ADN (**Anexo 8**); lo que se ha reportado es que dichos aminoácidos en las posiciones K4, K5, G1-W2 o F del N-terminal, ejercen intensas señales de interacción con el lípido A del LPS de *E. coli* (153,177,252,253); y en otros péptidos, como los análogos de temporinas se ha observado que 6 residuos de aminoácidos aromáticos y catiónicos como **WKRRKF**, pueden formar una estructura de “boomerang”, implicada en eliminar las agregaciones inducidas por el LPS externo de Gram-negativos (254,255). Estos resultados, nos demuestran que es importante continuar explorando el potencial terapéutico y protectorio de satanin 1, 2 y curvicina.

Aquí, nosotros describimos, sintetizamos y caracterizamos funcionalmente tres HDPs identificados en los escarabajos coprófagos; *O. curvicornis* y *D. satanas*. Se observó que éstos péptidos tienen aplicaciones potencialmente terapéuticas como agentes antimicrobianos y anti-inflamatorios o anti-endotoxinas, por capacidad de matar bacterias sin exhibir citotoxicidad significativa para las células de mamíferos (alta selectividad) e inhibir la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , en presencia de LPS, en un modelo *in vitro* con PBMCs (**Figura 11**). Por lo tanto, las cecropinas satanin 1, 2 y curvicina son interesantes candidatos para explorar su potencial terapéutico y mecanismos de acción en futuras investigaciones.

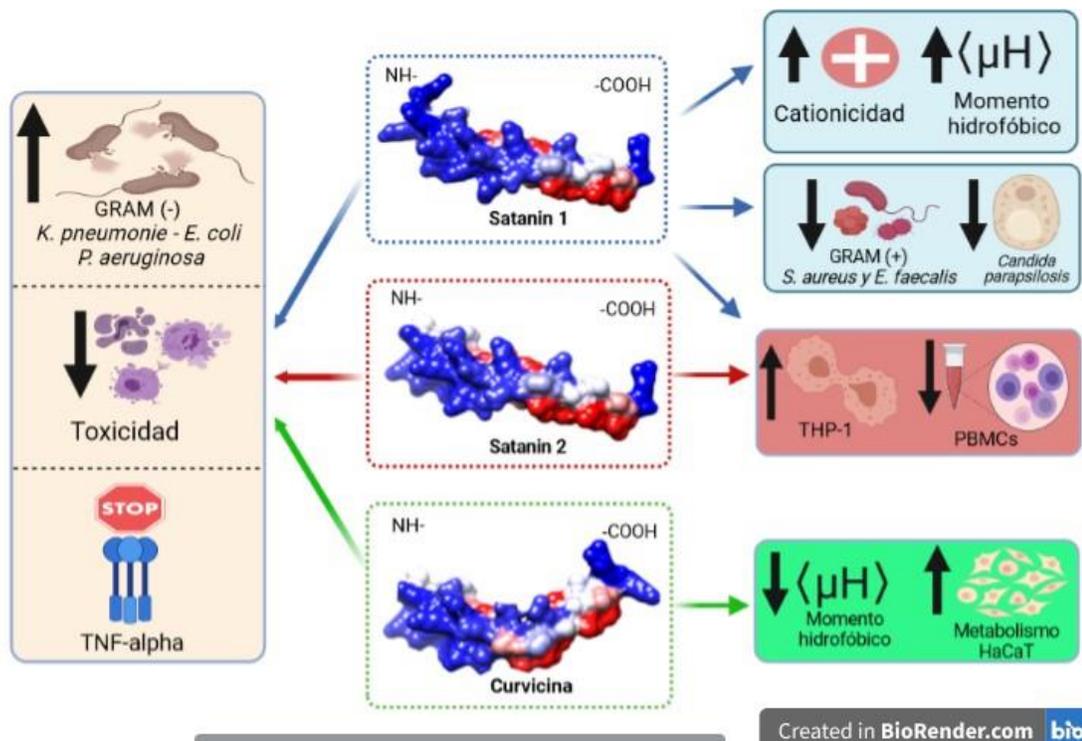


Figura 11. Actividades biológicas y características relevantes de Satanin 1, 2 y Curvicina. En el centro se encuentran los modelos estructurales de los tres péptidos; al lado izquierdo en el recuadro rosado se encuentran sus actividades comunes, al lado derecho en recuadros azules se resumen las características y actividades exclusivas de Satanin 1, en recuadro rojo las actividades en común para Satanin 1 y 2 y por último en el recuadro verde las características y actividades exclusivas para Curvicina.

7. CONCLUSIONES

- Satanin 1, 2 y Curvicina son cecropinas de Scarabaeidae con actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-negativas.
- Satanin 1 presentó mayor espectro de actividad antimicrobiana comparado con Satanin 2 y Curvicina.
- Satanin 1, 2 y Curvicina tienen selectividad por bacterias Gram-negativas y no por células NO tumorales.
- Satanin 1 es tóxico para la línea de células tumorales THP-1 (monocitos aislados de sangre periférica de un paciente con leucemia monocítica aguda).
- Los péptidos evaluados tienen potencial anti-endotoxina, ya que inhibieron la producción de TNF-alfa en PBMCs humanos, al mezclarse con LPS.

8. RECOMENDACIONES

- Evaluar con nuevos péptidos sintéticos, si las regiones de N-terminal o C-terminal de Satanin 1, 2 o Curvicina están asociadas a las actividades antimicrobianas y citotóxicas observadas.
- Explorar el potencial antitumoral de Satanin 1 y 2 frente a enfermedades como la leucemia.
- Evaluar el potencial de los péptidos en migración celular, en modelos *in vitro* con la línea celular HaCat, ya que ninguno fue tóxico para este tipo de células a bajas concentraciones.
- Explorar el potencial antiinflamatorio de los péptidos evaluando la producción de otras citoquinas proinflamatorias, mediante estimulación con otros agentes inflamatorios
- Evaluar si el mecanismo de los péptidos para inhibir la producción de TNF-alfa en PBMCs humanos está asociado a actividad antiendotoxina o a otros blancos celulares.

9. RESULTADOS ADICIONALES

● **Publicaciones (Anexo 9)**

- Téllez Ramirez GA, Osorio-Méndez JF, Henao Arias DC, Toro S LJ, Franco Castrillón J, Rojas-Montoya M, et al. New Insect Host Defense Peptides (HDP) From Dung Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) Transcriptomes. J Insect Sci Online. 1 de julio de 2021;21(4):12.

- Henao Arias DC, Toro LJ, Téllez Ramirez GA, Osorio-Méndez JF, Rodríguez-Carlos A, Valle J, Marín-Luevano SP, Rivas-Santiago B, Andreu D, Castaño Osorio JC. Novel antimicrobial cecropins derived from *O. curvicornis* and *D. satanas* dung beetles. Peptides. 2021 Nov;145:170626.

● **Pasantía internacional (Anexo 10)**

Laboratorio del Dr Bruno Rivas-Santiago en la Unidad de Investigación Médica, en Zacatecas México, durante el periodo de Mayo 2019-Agosto 2019.

10. REFERENCIAS

1. Paterson DL, Isler B, Stewart A. New treatment options for multiresistant gram negatives. *Curr Opin Infect Dis.* 2020;33(2):214-23.
2. Jonas, Olga B, Irwin, Alec, Berthe, Franck Cesar Jean, Le Gall, Francois G, Marquez, Patricio V. Drug-resistant infections : a threat to our economic future (Vol. 2) : final report (English) [Internet]. 2017. Disponible en: <http://documents1.worldbank.org/curated/en/323311493396993758/pdf/final-report.pdf>
3. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations [Internet]. Government of the United Kingdom; 2016 may [citado 5 de abril de 2021]. Disponible en: <https://apo.org.au/node/63983>
4. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol.* 2019;10:539.
5. Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceño DF, et al. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* enero de 2011;17(1):52-6.
6. Escobar Pérez JA, Olarte Escobar NM, Castro-Cardozo B, Valderrama Márquez IA, Garzón Aguilar MI, Martínez de la Barrera L, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(4):1957-60.
7. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* abril de 2010;8(4):260-71.
8. Zhang LJ, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Curr Biol CB.* 11 de enero de 2016;26(1):R14-19.
9. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules.* 018;8(1).
10. Shafee TMA, Lay FT, Phan TK, Anderson MA, Hulett MD. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cell Mol Life Sci CMLS.* febrero de 2017;74(4):663-82.
11. Kingsolver MB, Huang Z, Hardy RW. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *J Mol Biol.* 2013;425(24):4921-36.
12. Li Y, Wang Y, Liu X. The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. *Clin Dev Immunol.* 2012:791392.
13. Shin DM, Jo EK. Antimicrobial Peptides in Innate Immunity against Mycobacteria. *Immune Netw.* octubre de 2011;11(5):245-52.
14. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol.* octubre de 2006;6(5):468-72.
15. Hancock REW, Haney EF, Gill EE. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol.* mayo de 2016;16(5):321-34.
16. Pletzer D, Hancock REW. Antibiofilm Peptides: Potential as Broad-Spectrum Agents. *J Bacteriol.* 1 de octubre de 2016;198(19):2572-8.
17. Gwyer Findlay E, Currie SM, Davidson DJ. Cationic host defence peptides: potential as antiviral therapeutics. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther.* octubre de 2013;27(5):479-93.

18. van der Weerden NL, Bleackley MR, Anderson MA. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cell Mol Life Sci CMLS*. octubre de 2013;70(19):3545-70.
19. Bhattacharjya S, Ramamoorthy A. Multifunctional host defense peptides: functional and mechanistic insights from NMR structures of potent antimicrobial peptides. *FEBS J*. noviembre de 2009;276(22):6465-73.
20. Gaspar D, Veiga AS, Castanho MARB. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Front Microbiol*. 1 de octubre de 2013;4:294.
21. Mangoni ML, McDermott AM, Zasloff M. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. *Exp Dermatol*. 2016;25(3):167-73.
22. Nicholls EF, Madera L, Hancock REW. Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. *Ann N Y Acad Sci*. diciembre de 2010;1213:46-61.
23. Silva ON, Porto WF, Ribeiro SM, Batista I, Franco OL. Host-defense peptides and their potential use as biomarkers in human diseases. *Drug Discov Today*. septiembre de 2018;23(9):1666-71.
24. Haney EF, Straus SK, Hancock REW. Reassessing the Host Defense Peptide Landscape. *Front Chem*. 2019;7:43.
25. Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell*. febrero de 2010;1(2):143-52.
26. Koehbach J. Structure-Activity Relationships of Insect Defensins. *Front Chem*. 2017;5:45.
27. Lo SC, Xie ZR, Chang KY. Structural and Functional Enrichment Analyses for Antimicrobial Peptides. *Int J Mol Sci*. enero de 2020;21(22):8783.
28. Torres MDT, Pedron CN, Higashikuni Y, Kramer RM, Cardoso MH, Oshiro KGN, et al. Structure-function-guided exploration of the antimicrobial peptide polybia-CP identifies activity determinants and generates synthetic therapeutic candidates. *Commun Biol*. 2018;1:221.
29. Wu PS, Lai SJ, Fung KM, Tseng TS. Characterization of the structure–function relationship of a novel salt-resistant antimicrobial peptide, RR12. *RSC Adv*. 19 de junio de 2020;10(40):23624-31.
30. Beckage N. *Insect immunology*. First edition. London: Academic Press; 2008. 360 p.
31. Baltzer SA, Brown MH. Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2011;20(4):228-35.
32. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*. 4 de enero de 2016;44(D1):D1087-1093.
33. Grimaldi D, Engel MS, Engel MS, Engel SC and PMS. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press; 2005. 788 p.
34. Berenbaum MR, Eisner T. Ecology. Bugs' bugs. *Science*. 3 de octubre de 2008;322(5898):52-3.
35. Dossey AT. Insects and their chemical weaponry: new potential for drug discovery. *Nat Prod Rep*. enero de 2010;27(12):1737-57.
36. Tonk M, Vilcinskis A. The Medical Potential of Antimicrobial Peptides from Insects. *Curr Top Med Chem*. 2017;17(5):554-75.
37. Douglas AE. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu Rev Entomol*. 7 de enero de 2015;60:17-34.

38. Cultid C, Medina C, Constantino LM, Bedir Martinez, Escobar AF. Escarabajos coprófagos (Scarabaeinae) del eje cafetero: Guía para el estudio ecológico (Field Guide) [Internet]. Cenicafé, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia and Wild life Conservation Society; 2012 [citado 20 de abril de 2020]. Disponible en: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.1.1013.9049>
39. Carlos A, Lobo JM, MEDINA CA, GONZÁLEZ FA, ESCOBAR F, CHACÓN DE ULLOA P. Completitud del inventario de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) en la Ecorregión del Eje Cafetero, Colombia. *Rev Colomb Entomol.* 2014;40:111-9.
40. Ari Noriega J, M. Palacio J, Monroy-G. J copyright D, Valencia E. Estructura de un ensamblaje de escarabajos coprófagos (Coleoptera: scarabaeinae) en tres sitios con diferente uso del suelo en Antioquia, Colombia. *Actual Biológicas.* 2012;34:43-54.
41. Medina CA, Lopera-Toro A, Vítolo A, Gill B. Escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) de Colombia [Internet]. 2001.^a-11.^a-01 ed. Vol. 2, Biota Colombiana. 2001. Disponible en: <http://revistas.humboldt.org.co/index.php/biota/article/view/95>
42. Téllez Ramirez GA, Osorio-Méndez JF, Henao Arias DC, Toro S LJ, Franco Castrillón J, Rojas-Montoya M, et al. New Insect Host Defense Peptides (HDP) From Dung Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) Transcriptomes. *J Insect Sci Online.* 1 de julio de 2021;21(4):12.
43. Brady D, Grapputo A, Romoli O, Sandrelli F. Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci.* 22 de noviembre de 2019;20(23):5862.
44. Ntwasa M, Goto A, Kurata S. Coleopteran antimicrobial peptides: prospects for clinical applications. *Int J Microbiol.* 2012;2012:101989.
45. Saito A, Ueda K, Imamura M, Atsumi S, Tabunoki H, Miura N, et al. Purification and cDNA cloning of a cecropin from the longicorn beetle, *Acalolepta luxuriosa*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1 de noviembre de 2005;142(3):317-23.
46. Toro Segovia LJ, Téllez Ramírez GA, Henao Arias DC, Rivera Duran JD, Bedoya JP, Castaño Osorio JC. Identification and characterization of novel cecropins from the *Oxysternon conspicillatum* neotropic dung beetle. van Raaij MJ, editor. *PLOS ONE.* 29 de noviembre de 2017;12(11):e0187914.
47. Memarpour-Yazdi M, Zare-Zardini H, Asoodeh A. A Novel Antimicrobial Peptide Derived from the Insect *Paederus dermatitis*. *Int J Pept Res Ther.* 1 de junio de 2013;19(2):99-108.
48. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet Lond Engl.* 12 de febrero de 2022;399(10325):629-55.
49. Klevens RM, Edwards JR, Gaynes RP, National Nosocomial Infections Surveillance System. The impact of antimicrobial-resistant, health care-associated infections on mortality in the United States. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 de octubre de 2008;47(7):927-30.
50. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019 [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); 2019 nov [citado 17 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>
51. Gould IM, Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help

- overcome microbial resistance. *Virulence*. 15 de febrero de 2013;4(2):185-91.
52. Wright GD. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can J Microbiol*. marzo de 2014;60(3):147-54.
 53. Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol*. 2013;4:47.
 54. Lushniak BD. Antibiotic resistance: a public health crisis. *Public Health Rep Wash DC* 1974. agosto de 2014;129(4):314-6.
 55. Viswanathan V. Off-label abuse of antibiotics by bacteria. *Gut Microbes*. 1 de enero de 2014;5(1):3-4.
 56. Read AF, Woods RJ. Antibiotic resistance management. *Evol Med Public Health*. 28 de octubre de 2014;2014(1):147.
 57. The antibiotic alarm. *Nature*. 14 de marzo de 2013;495(7440):141.
 58. Gross M. Antibiotics in crisis. *Curr Biol*. 16 de diciembre de 2013;23(24):R1063-5.
 59. Piddock LJV. The crisis of no new antibiotics--what is the way forward? *Lancet Infect Dis*. marzo de 2012;12(3):249-53.
 60. Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. mayo de 2013;56(10):1445-50.
 61. Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management. *Front Public Health [Internet]*. 16 de septiembre de 2014 [citado 17 de febrero de 2021];2. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4165128/>
 62. Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries*. 13 de febrero de 2014;8(2):129-36.
 63. Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol*. octubre de 2014;18:56-60.
 64. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*. 15 de abril de 2008;197(8):1079-81.
 65. Hilchie AL, Wuerth K, Hancock REW. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol*. diciembre de 2013;9(12):761-8.
 66. Haney EF, Mansour SC, Hancock REW. *Antimicrobial Peptides: An Introduction*. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1548:3-22.
 67. Scott MG, Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol*. 2000;20(5):407-31.
 68. Meister M, Hetru C, Hoffmann JA. The antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;248:17-36.
 69. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol*. septiembre de 2000;8(9):402-10.
 70. Ntwasa M, Goto A, Kurata S. Coleopteran antimicrobial peptides: prospects for clinical applications. *Int J Microbiol*. 2012;2012:101989.
 71. Brown KL, Hancock REW. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol*. febrero de 2006;18(1):24-30.
 72. Harris F, Dennison SR, Phoenix DA. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci*. diciembre de 2009;10(6):585-606.
 73. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. marzo de 2005;3(3):238-50.

74. Groenink J, Walgreen-Weterings E, van 't Hof W, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. Cationic amphipathic peptides, derived from bovine and human lactoferrins, with antimicrobial activity against oral pathogens. *FEMS Microbiol Lett.* 1 de octubre de 1999;179(2):217-22.
75. Bradshaw J. Cationic antimicrobial peptides : issues for potential clinical use. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther.* 2003;17(4):233-40.
76. Brady D, Grapputo A, Romoli O, Sandrelli F. Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci.* 22 de noviembre de 2019;20(23):5862.
77. Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* julio de 2014;98(13):5807-22.
78. Anaya-López JL, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Crit Rev Microbiol.* mayo de 2013;39(2):180-95.
79. Moghaddam MM, Aghamollaei H, Kooshki H, Barjini KA, Mirnejad R, Choopani A. The development of antimicrobial peptides as an approach to prevention of antibiotic resistance. *Rev Res Med Microbiol.* julio de 2015;26(3):98-110.
80. Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol.* 1 de junio de 2017;133:117-38.
81. Lyu Y, Yang Y, Lyu X, Dong N, Shan A. Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and *Candida*. *Sci Rep.* 2 de junio de 2016;6(1):27258.
82. Stensen W, Turner R, Brown M, Kondori N, Svendsen JS, Svenson J. Short Cationic Antimicrobial Peptides Display Superior Antifungal Activities toward Candidiasis and Onychomycosis in Comparison with Terbinafine and Amorolfine. *Mol Pharm.* 3 de octubre de 2016;13(10):3595-600.
83. Fieck A, Hurwitz I, S.Kang A, Durvasula R. Trypanosoma cruzi: Synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to T. cruzi and potential bacterial hosts. *Exp Parasitol.* agosto de 2010;125(4):342-7.
84. Kuzmin DV, Emel'yanova AA, Kalashnikova MB, Panteleev PV, Ovchinnikova TV. In Vitro Study of Antitumor Effect of Antimicrobial Peptide Tachyplesin I in Combination with Cisplatin. *Bull Exp Biol Med.* junio de 2018;165(2):220-4.
85. Felício MR, Silva ON, Gonçalves S, Santos NC, Franco OL. Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Front Chem.* 2017;5:5.
86. Ciumac D, Gong H, Hu X, Lu JR. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *J Colloid Interface Sci.* 1 de marzo de 2019;537:163-85.
87. Saugar JM, Rodríguez-Hernández MJ, de la Torre BG, Pachón-Ibañez ME, Fernández-Reyes M, Andreu D, et al. Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: molecular basis for the differential mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother.* abril de 2006;50(4):1251-6.
88. Riedl S, Zweytick D, Lohner K. Membrane-active host defense peptides--challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chem Phys Lipids.* noviembre de 2011;164(8):766-81.
89. Lu X, Shen J, Jin X, Ma Y, Huang Y, Mei H, et al. Bactericidal activity of *Musca domestica* cecropin (Mdc) on multidrug-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* agosto de 2012;95(4):939-45.
90. Wei L, Huang C, Yang H, Li M, Yang J, Qiao X, et al. A potent anti-inflammatory peptide from the salivary glands of horsefly. *Parasit Vectors.* 24 de octubre de

- 2015;8:556.
91. Lee E, Shin A, Kim Y. Anti-inflammatory activities of cecropin A and its mechanism of action. *Arch Insect Biochem Physiol.* enero de 2015;88(1):31-44.
 92. Xie L, Miller LM, Chatterjee C, Averin O, Kelleher NL, van der Donk WA. Lactacin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science.* 30 de enero de 2004;303(5658):679-81.
 93. Hong SY, Oh JE, Kwon M, Choi MJ, Lee JH, Lee BL, et al. Identification and characterization of novel antimicrobial decapeptides generated by combinatorial chemistry. *Antimicrob Agents Chemother.* octubre de 1998;42(10):2534-41.
 94. S T, Dk L, A T, U PK, A R. Antimicrobial activity and membrane selective interactions of a synthetic lipopeptide MSI-843. *Biochim Biophys Acta [Internet].* 6 de enero de 2005 [citado 3 de febrero de 2022];1711(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15904663/>
 95. Andreu D, Merrifield RB, Steiner H, Boman HG. N-terminal analogues of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties. *Biochemistry.* 26 de marzo de 1985;24(7):1683-8.
 96. Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature.* 16 de julio de 1981;292(5820):246-8.
 97. Lee JK, Seo CH, Luchian T, Park Y. Antimicrobial Peptide CMA3 Derived from the CA-MA Hybrid Peptide: Antibacterial and Anti-inflammatory Activities with Low Cytotoxicity and Mechanism of Action in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* enero de 2016;60(1):495-506.
 98. Hilchie AL, Hoskin DW, Power Coombs MR. Anticancer Activities of Natural and Synthetic Peptides. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1117:131-47.
 99. Chicharro C, Granata C, Lozano R, Andreu D, Rivas L. N-Terminal Fatty Acid Substitution Increases the Leishmanicidal Activity of CA(1-7)M(2-9), a Cecropin-Melittin Hybrid Peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2001;45(9):2441-9.
 100. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 29 de septiembre de 2011;8(10):785-6.
 101. Peng J, Xu J. RaptorX: exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins.* 2011;79 Suppl 10:161-71.
 102. Zou Z, Evans JD, Lu Z, Zhao P, Williams M, Sumathipala N, et al. Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Genome Biol.* 2007;8(8):R177.
 103. Zare-Zardini H, Fesahat F, Anbari F, Halvaei I, Ebrahimi L. Assessment of spermicidal activity of the antimicrobial peptide sarcotoxin Pd: A potent contraceptive agent. *Eur J Contracept Reprod Health Care Off J Eur Soc Contracept.* 2016;21(1):15-21.
 104. Halffter Salas G, Edmonds WD. The nesting behavior of dung beetles (Scarabaeinae): an ecological and evolutive approach. México: Instituto de Ecología; 1982. 176 p. (Publication).
 105. Hieke F. Halffter, Gonzalo, and Matthews, Eric G.: The Natural History of Dung Beetles of the Subfamily Scarabaeinae (Coleoptera, Scarabaeidae) – In: *Folia Entomologica Mexicana* México, D. F. (Soc. Mexicana de Entomología), Nr. 12–14, 1966; 312 S., 52 Abb. *Mitteilungen Aus Dem Mus Für Naturkunde Berl Zool Mus Inst Für Spez Zool Berl.* 1969;45(2):426-7.

106. Bailey W, Ridsdill-Smith TJ. Reproductive Behaviour of Insects: Individuals and populations. Springer Netherlands; 1991. 354 p.
107. Nichols E, Larsen T, Spector S, Davis AL, Escobar F, Favila M, et al. Global dung beetle response to tropical forest modification and fragmentation: A quantitative literature review and meta-analysis. *Biol Conserv.* 1 de junio de 2007;137(1):1-19.
108. Nichols E, Spector S, Louzada J, Larsen T, Amezcua S, Favila ME. Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. *Biol Conserv.* 1 de junio de 2008;141(6):1461-74.
109. Giraldo C, Escobar F, Chará JD, Calle Z. The adoption of silvopastoral systems promotes the recovery of ecological processes regulated by dung beetles in the Colombian Andes. *Insect Conserv Divers.* 2011;4(2):115-22.
110. Blandin S, Levashina EA. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Mol Immunol.* febrero de 2004;40(12):903-8.
111. Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev.* abril de 2004;198:116-26.
112. Imler JL, Bulet P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem Immunol Allergy.* 2005;86:1-21.
113. Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol.* junio de 2004;25(6):289-94.
114. Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol.* 1997;42:611-43.
115. Irving P, Ubeda JM, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, et al. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol.* marzo de 2005;7(3):335-50.
116. Lackie AM. Haemocyte Behaviour. En: Evans PD, Wigglesworth VB, editores. *Advances in Insect Physiology* [Internet]. Academic Press; 1988 [citado 4 de febrero de 2022]. p. 85-178. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006528060860123X>
117. Strand MR, Pech LL. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu Rev Entomol.* 1995;40:31-56.
118. Milutinović B, Kurtz J. Immune memory in invertebrates. *Semin Immunol.* agosto de 2016;28(4):328-42.
119. Boraschi D, Italiani P. Innate Immune Memory: Time for Adopting a Correct Terminology. *Front Immunol.* 2018;9:799.
120. Little TJ, Kraaijeveld AR. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends Ecol Evol.* febrero de 2004;19(2):58-60.
121. Moret Y. «Trans-generational immune priming»: specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc Biol Sci.* 7 de junio de 2006;273(1592):1399-405.
122. Wenzel M, Chiriac AI, Otto A, Zweytick D, May C, Schumacher C, et al. Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 de abril de 2014;111(14):E1409-1418.
123. Ishida H, Nguyen LT, Gopal R, Aizawa T, Vogel HJ. Overexpression of Antimicrobial, Anticancer, and Transmembrane Peptides in *Escherichia coli* through a Calmodulin-Peptide Fusion System. *J Am Chem Soc.* 7 de septiembre de 2016;138(35):11318-26.

124. Abdel Monaim SAH, Somboro AM, El-Faham A, de la Torre BG, Albericio F. Bacteria Hunt Bacteria through an Intriguing Cyclic Peptide. *ChemMedChem*. 2019;14(1):24-51.
125. Wang G. Post-translational Modifications of Natural Antimicrobial Peptides and Strategies for Peptide Engineering. *Curr Biotechnol*. febrero de 2012;1(1):72-9.
126. Ting DSJ, Beuerman RW, Dua HS, Lakshminarayanan R, Mohammed I. Strategies in Translating the Therapeutic Potentials of Host Defense Peptides. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [citado 20 de marzo de 2022];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00983>
127. Mourtada R, Herce HD, Yin DJ, Moroco JA, Wales TE, Engen JR, et al. Design of stapled antimicrobial peptides that are stable, nontoxic and kill antibiotic-resistant bacteria in mice. *Nat Biotechnol*. octubre de 2019;37(10):1186-97.
128. Kumar P, Pletzer D, Haney EF, Rahanjam N, Cheng JTJ, Yue M, et al. Aurein-Derived Antimicrobial Peptides Formulated with Pegylated Phospholipid Micelles to Target Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Skin Infections. *ACS Infect Dis*. 8 de marzo de 2019;5(3):443-53.
129. Hicks RP, Abercrombie JJ, Wong RK, Leung KP. Antimicrobial peptides containing unnatural amino acid exhibit potent bactericidal activity against ESKAPE pathogens. *Bioorg Med Chem*. 1 de enero de 2013;21(1):205-14.
130. Garg VK, Avashthi H, Tiwari A, Jain PA, Ramkete PWR, Kayastha AM, et al. MFPPI – Multi FASTA ProtParam Interface. *Bioinformatics*. 10 de abril de 2016;12(2):74-7.
131. Reißer S, Strandberg E, Steinbrecher T, Ulrich AS. 3D Hydrophobic Moment Vectors as a Tool to Characterize the Surface Polarity of Amphiphilic Peptides. *Biophys J*. junio de 2014;106(11):2385-94.
132. Gautier R, Douguet D, Antony B, Drin G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*. 15 de septiembre de 2008;24(18):2101-2.
133. Mól AR, Castro MS, Fontes W. NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections [Internet]. *Bioinformatics*; 2018 sep [citado 24 de septiembre de 2020]. Disponible en: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/416347>
134. Buchan DWA, Minneci F, Nugent TCO, Bryson K, Jones DT. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res*. 1 de julio de 2013;41(W1):W349-57.
135. Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res*. 1 de julio de 2015;43(W1):W389-94.
136. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. agosto de 2021;596(7873):583-9.
137. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold - Making protein folding accessible to all [Internet]. *bioRxiv*; 2022 [citado 23 de abril de 2022]. p. 2021.08.15.456425. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.08.15.456425v3>
138. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera A visualization system for exploratory research and

- analysis. *J Comput Chem.* octubre de 2004;25(13):1605-12.
139. Provencher SW, Gloeckner J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry.* 6 de enero de 1981;20(1):33-7.
 140. Miles AJ, Wallace BA. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. *Chem Soc Rev.* 12 de septiembre de 2016;45(18):4859-72.
 141. Shepherd NE, Hoang HN, Abbenante G, Fairlie DP. Single Turn Peptide Alpha Helices with Exceptional Stability in Water. *J Am Chem Soc.* 9 de marzo de 2005;127(9):2974-83.
 142. Lobley A, Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics.* 1 de enero de 2002;18(1):211-2.
 143. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 de diciembre de 2009;49(11):1749-55.
 144. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity: Resazurin as a cytotoxicity assay. *Eur J Biochem.* septiembre de 2000;267(17):5421-6.
 145. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* febrero de 2008;3(2):163-75.
 146. Ramírez GAT. MICRO-DILUCIÓN EN PLACA PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN 50 uL. 9 de febrero de 2020 [citado 4 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://www.protocols.io/view/micro-diluci-n-en-placa-para-la-evaluaci-n-de-la-a-8xmhxk6>
 147. Rodríguez A, Pedersen MØ, Villegas E, Rivas-Santiago B, Villegas-Moreno J, Amero C, et al. Antimicrobial activity and structure of a consensus human β -defensin and its comparison to a novel putative hBD10. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* enero de 2020;88(1):175-86.
 148. Torres-Juarez F, Touqui L, Leon-Contreras J, Rivas-Santiago C, Enciso-Moreno JA, Hernández-Pando R, et al. RNase 7 but not psoriasin nor sPLA2-IIA associates with Mycobacterium tuberculosis during airway epithelial cell infection. *Pathog Dis [Internet].* 1 de marzo de 2018 [citado 21 de mayo de 2020];76(2). Disponible en: <https://academic.oup.com/femspd/article/doi/10.1093/femspd/fty005/4810750>
 149. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Investig Suppl.* 1968;97:77-89.
 150. Axis-Shield Density Gradient Media. Isolation of mononuclear cells from human blood by sedimentation on to a density barrier [Internet]. Alere Technologies AS; Disponible en: <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/C03.pdf>
 151. Shin SY, Kang JH, Hahm KS. Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J Pept Res.* enero de 1999;53(1):82-90.
 152. Di YP, Lin Q, Chen C, Montelaro RC, Doi Y, Deslouches B. Enhanced therapeutic index of an antimicrobial peptide in mice by increasing safety and activity against multidrug-resistant bacteria. *Sci Adv.* 1 de mayo de

- 2020;6(18):eaay6817.
153. Browne K, Chakraborty S, Chen R, Willcox MD, Black DS, Walsh WR, et al. A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. *Int J Mol Sci*. 24 de septiembre de 2020;21(19):E7047.
 154. Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacol Rep PR*. agosto de 2016;68(4):802-8.
 155. Cavallarin L, Andreu D, San Segundo B. Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI*. marzo de 1998;11(3):218-27.
 156. Suttman H, Retz M, Paulsen F, Harder J, Zwergel U, Kamradt J, et al. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urol*. 3 de marzo de 2008;8(1):5.
 157. Lee E, Jeong KW, Lee J, Shin A, Kim JK, Lee J, et al. Structure-activity relationships of cecropin-like peptides and their interactions with phospholipid membrane. *BMB Rep*. mayo de 2013;46(5):282-7.
 158. Mishra AK, Choi J, Moon E, Baek KH. Tryptophan-Rich and Proline-Rich Antimicrobial Peptides. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem [Internet]*. 2 de abril de 2018 [citado 3 de agosto de 2020];23(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017362/>
 159. Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. Insect Immunity. Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*. 3 de marzo de 2005;106(1):7-16.
 160. Boman. Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate Immunity: An Update Review. *Scand J Immunol*. julio de 1998;48(1):15-25.
 161. Romoli O, Mukherjee S, Mohid SA, Dutta A, Montali A, Franzolin E, et al. Enhanced Silkworm Cecropin B Antimicrobial Activity against *Pseudomonas aeruginosa* from Single Amino Acid Variation. *ACS Infect Dis*. 12 de 2019;5(7):1200-13.
 162. Mojsoska B, Jenssen H. Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design. *Pharm Basel Switz*. 13 de julio de 2015;8(3):366-415.
 163. Yin LM, Edwards MA, Li J, Yip CM, Deber CM. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *J Biol Chem*. 2 de marzo de 2012;287(10):7738-45.
 164. Giménez-Andrés M, Čopič A, Antonny B. The Many Faces of Amphipathic Helices. *Biomolecules*. 5 de julio de 2018;8(3):45.
 165. Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*. 23 de septiembre de 1982;299(5881):371-4.
 166. Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol*. junio de 2012;32(2):143-71.
 167. Wiradharma N, Sng MYS, Khan M, Ong ZY, Yang YY. Rationally designed α -helical broad-spectrum antimicrobial peptides with idealized facial amphiphilicity. *Macromol Rapid Commun*. 11 de enero de 2013;34(1):74-80.
 168. Edwards IA, Elliott AG, Kavanagh AM, Zuegg J, Blaskovich MAT, Cooper MA. Contribution of Amphipathicity and Hydrophobicity to the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of β -Hairpin Peptides. *ACS Infect Dis*. 10 de junio de 2016;2(6):442-50.

169. Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT, Hodges RS. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* abril de 2007;51(4):1398-406.
170. Hong J, Oren Z, Shai Y. Structure and Organization of Hemolytic and Nonhemolytic Diastereomers of Antimicrobial Peptides in Membranes. *Biochemistry.* 1 de diciembre de 1999;38(51):16963-73.
171. Giangaspero A, Sandri L, Tossi A. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *Eur J Biochem.* noviembre de 2001;268(21):5589-600.
172. Tossi A, Scocchi M, Skerlavaj B, Gennaro R. Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett.* 14 de febrero de 1994;339(1-2):108-12.
173. Zhang SK, Song JW, Gong F, Li SB, Chang HY, Xie HM, et al. Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. *Sci Rep.* 8 de junio de 2016;6:27394.
174. Huijbregts RP, de Kroon AI null, de Kruijff B null. Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 10 de marzo de 2000;1469(1):43-61.
175. Epand RM, Epand RF. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta.* enero de 2009;1788(1):289-94.
176. Epand RM, Epand RF. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *J Pept Sci Off Publ Eur Pept Soc.* mayo de 2011;17(5):298-305.
177. Wydro P, Flasiński M, Broniatowski M. Molecular organization of bacterial membrane lipids in mixed systems—A comprehensive monolayer study combined with Grazing Incidence X-ray Diffraction and Brewster Angle Microscopy experiments. *BBA - Biomembr.* 2012;7(1818):1745-54.
178. Epand RM, Rotem S, Mor A, Berno B, Epand RF. Bacterial membranes as predictors of antimicrobial potency. *J Am Chem Soc.* 29 de octubre de 2008;130(43):14346-52.
179. Marshall SH, Arenas G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron J Biotechnol.* 15 de diciembre de 2003;6(3):0-0.
180. Wang YP, Lai R. Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation: Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation. *Zool Res.* 4 de mayo de 2010;31(1):27-34.
181. Lee E, Kim JK, Jeon D, Jeong KW, Shin A, Kim Y. Functional Roles of Aromatic Residues and Helices of Papiliocin in its Antimicrobial and Anti-inflammatory Activities. *Sci Rep.* 9 de julio de 2015;5:12048.
182. Efimova SS, Medvedev RYa, Chulkov EG, Schagina LV, Ostroumova OS. Regulation of the Pore-Forming Activity of Cecropin A by Local Anesthetics. *Cell Tissue Biol.* 1 de julio de 2018;12(4):331-41.
183. Fjell CD, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov.* 16 de diciembre de 2011;11(1):37-51.
184. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* marzo de 2003;55(1):27-55.
185. Raheem N, Straus SK. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Front Microbiol.* 12 de diciembre de

- 2019;10:2866.
186. Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 6 de marzo de 1998;244(1):253-7.
 187. Kobayashi S, Chikushi A, Tougu S, Imura Y, Nishida M, Yano Y, et al. Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. *Biochemistry.* 14 de diciembre de 2004;43(49):15610-6.
 188. Ramirez GAT, Osorio-Méndez JF, Arias DCH, Toro S LJ, Castrillón JF, Rojas-Montoya M, et al. Identification of new insect Host Defense Peptides (HDP) from Dung Beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) transcriptomes [Internet]. *Molecular Biology*; 2020 jun [citado 6 de agosto de 2020]. Disponible en: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.06.15.152363>
 189. Meroueh SO, Bencze KZ, Heseck D, Lee M, Fisher JF, Stemmler TL, et al. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 de marzo de 2006;103(12):4404-9.
 190. Moore AJ, Beazley WD, Bibby MC, Devine DA. Antimicrobial activity of cecropins. *J Antimicrob Chemother.* 1996;37(6):1077-89.
 191. Teixeira V, Feio MJ, Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog Lipid Res.* abril de 2012;51(2):149-77.
 192. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 15 de diciembre de 1999;1462(1):55-70.
 193. Ruiz N, Kahne D, Silhavy TJ. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Microbiol.* enero de 2006;4(1):57-66.
 194. Campoccia D, Montanaro L, Speziale P, Arciola CR. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials.* septiembre de 2010;31(25):6363-77.
 195. Takahashi D, Shukla SK, Prakash O, Zhang G. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie.* septiembre de 2010;92(9):1236-41.
 196. Mihajlovic M, Lazaridis T. Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* mayo de 2012;1818(5):1274-83.
 197. Hawrani A, Howe RA, Walsh TR, Dempsey CE. Origin of low mammalian cell toxicity in a class of highly active antimicrobial amphipathic helical peptides. *J Biol Chem.* 4 de julio de 2008;283(27):18636-45.
 198. Chen Y, Mant CT, Farmer SW, Hancock REW, Vasil ML, Hodges RS. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *J Biol Chem.* 1 de abril de 2005;280(13):12316-29.
 199. Jiang Z, Vasil AI, Gera L, Vasil ML, Hodges RS. Rational design of α -helical antimicrobial peptides to target Gram-negative pathogens, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: utilization of charge, «specificity determinants,» total hydrophobicity, hydrophobe type and location as design parameters to improve the therapeutic ratio. *Chem Biol Drug Des.* abril de 2011;77(4):225-40.

200. Hancock RE. Peptide antibiotics. *The Lancet*. 8 de febrero de 1997;349(9049):418-22.
201. Wang J, Ma K, Ruan M, Wang Y, Li Y, Fu YV, et al. A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties. *PeerJ*. 25 de julio de 2018;6:e5369.
202. Fujimoto T, Parmryd I. Interleaflet Coupling, Pinning, and Leaflet Asymmetry-Major Players in Plasma Membrane Nanodomain Formation. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:155.
203. Rothman JE, Kennedy EP. Rapid transmembrane movement of newly synthesized phospholipids during membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mayo de 1977;74(5):1821-5.
204. Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. febrero de 2008;1778(2):357-75.
205. Lee PHA, Rudisill JA, Lin KH, Zhang L, Harris SM, Falla TJ, et al. HB-107, a nonbacteriostatic fragment of the antimicrobial peptide cecropin B, accelerates murine wound repair. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. junio de 2004;12(3):351-8.
206. Matsuzaki K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 1 de agosto de 2009;1788(8):1687-92.
207. Greco I, Emborg AP, Jana B, Molchanova N, Oddo A, Damborg P, et al. Characterization, mechanism of action and optimization of activity of a novel peptide-peptoid hybrid against bacterial pathogens involved in canine skin infections. *Sci Rep*. 6 de marzo de 2019;9(1):3679.
208. Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, Handel L, Maloy WL, MacDonald DL, et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett*. 17 de febrero de 1997;403(2):208-12.
209. Lee DL, Hodges RS. Structure-activity relationships of de novo designed cyclic antimicrobial peptides based on gramicidin S. *Biopolymers*. 2003;71(1):28-48.
210. Kondejewski LH, Jelokhani-Niaraki M, Farmer SW, Lix B, Kay CM, Sykes BD, et al. Dissociation of antimicrobial and hemolytic activities in cyclic peptide diastereomers by systematic alterations in amphipathicity. *J Biol Chem*. 7 de mayo de 1999;274(19):13181-92.
211. Kondejewski LH, Lee DL, Jelokhani-Niaraki M, Farmer SW, Hancock REW, Hodges RS. Optimization of microbial specificity in cyclic peptides by modulation of hydrophobicity within a defined structural framework. *J Biol Chem*. 4 de enero de 2002;277(1):67-74.
212. Mant CT, Jiang Z, Gera L, Davis T, Nelson KL, Bevers S, et al. De Novo Designed Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides Incorporating Dab and Dap Residues on the Polar Face To Treat the Gram-Negative Pathogen, *Acinetobacter baumannii*. *J Med Chem*. 11 de abril de 2019;62(7):3354-66.
213. Jiang Z, Kullberg BJ, van der Lee H, Vasil AI, Hale JD, Mant CT, et al. Effects of Hydrophobicity on the Antifungal Activity of α -Helical Antimicrobial Peptides. *Chem Biol Drug Des*. diciembre de 2008;72(6):483-95.
214. Hollmann A, Martínez M, Noguera ME, Augusto MT, Disalvo A, Santos NC, et al. Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide-membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids Surf B Biointerfaces*. mayo de 2016;141:528-36.

215. Muller PY, Milton MN. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* octubre de 2012;11(10):751-61.
216. Cerón JM, Contreras-Moreno J, Puertollano E, de Cienfuegos GÁ, Puertollano MA, de Pablo MA. The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase-independent cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Peptides.* agosto de 2010;31(8):1494-503.
217. Wu JM, Jan PS, Yu HC, Haung HY, Fang HJ, Chang YI, et al. Structure and function of a custom anticancer peptide, CB1a. *Peptides.* mayo de 2009;30(5):839-48.
218. Baxter AA, Lay FT, Poon IKH, Kvensakul M, Hulett MD. Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. *Cell Mol Life Sci.* 1 de octubre de 2017;74(20):3809-25.
219. Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 1 de abril de 2010;135(1):1-11.
220. Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol.* septiembre de 2004;2(9):727-38.
221. Beloribi-Djefaffia S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis.* 25 de enero de 2016;5:e189.
222. Wodlej C, Riedl S, Rinner B, Leber R, Drechsler C, Voelker DR, et al. Interaction of two antitumor peptides with membrane lipids – Influence of phosphatidylserine and cholesterol on specificity for melanoma cells. *PLOS ONE.* 25 de enero de 2019;14(1):e0211187.
223. Buri MV, Domingues TM, Paredes-Gamero EJ, Casaes-Rodrigues RL, Rodrigues EG, Miranda A. Resistance to degradation and cellular distribution are important features for the antitumor activity of gomesin. *PloS One.* 2013;8(11):e80924.
224. Ting CH, Huang HN, Huang TC, Wu CJ, Chen JY. The mechanisms by which pardaxin, a natural cationic antimicrobial peptide, targets the endoplasmic reticulum and induces c-FOS. *Biomaterials.* 1 de abril de 2014;35(11):3627-40.
225. Kuroda K, Okumura K, Isogai H, Isogai E. The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 and Mimics are Potential Anticancer Drugs. *Front Oncol.* 2015;5:144.
226. Chu HL, Yip BS, Chen KH, Yu HY, Chih YH, Cheng HT, et al. Novel Antimicrobial Peptides with High Anticancer Activity and Selectivity. *PLoS ONE.* 13 de mayo de 2015;10(5):e0126390.
227. Wang J, Ma K, Ruan M, Wang Y, Li Y, Fu YV, et al. A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties. *PeerJ.* 25 de julio de 2018;6:e5369.
228. Wei L, Yang Y, Zhou Y, Li M, Yang H, Mu L, et al. Anti-inflammatory activities of *Aedes aegypti* cecropins and their protection against murine endotoxin shock. *Parasit Vectors.* 14 de agosto de 2018;11(1):470.
229. Bhunia A, Mohanram H, Bhattacharjya S. Lipopolysaccharide bound structures of the active fragments of fowlicidin-1, a cathelicidin family of antimicrobial and antiendotoxic peptide from chicken, determined by transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy. *Biopolymers.* 2009;92(1):9-22.
230. Tack BF, Sawai MV, Kearney WR, Robertson AD, Sherman MA, Wang W,

- et al. SMAP-29 has two LPS-binding sites and a central hinge. *Eur J Biochem.* febrero de 2002;269(4):1181-9.
231. Bhunia A, Domadia PN, Torres J, Hallock KJ, Ramamoorthy A, Bhattacharjya S. NMR structure of pardaxin, a pore-forming antimicrobial peptide, in lipopolysaccharide micelles: mechanism of outer membrane permeabilization. *J Biol Chem.* 5 de febrero de 2010;285(6):3883-95.
 232. A B, R S, H M, MI M, S B. NMR structures and interactions of temporin-1Tl and temporin-1Tb with lipopolysaccharide micelles: mechanistic insights into outer membrane permeabilization and synergistic activity. *J Biol Chem [Internet].* 7 de agosto de 2011 [citado 28 de febrero de 2022];286(27). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21586570/>
 233. Bhunia A, Ramamoorthy A, Bhattacharjya S. Helical hairpin structure of a potent antimicrobial peptide MSI-594 in lipopolysaccharide micelles by NMR spectroscopy. *Chem Weinh Bergstr Ger.* 2009;15(9):2036-40.
 234. Scott MG, Vreugdenhil AC, Buurman WA, Hancock RE, Gold MR. Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de enero de 2000;164(2):549-53.
 235. Kim J, Jacob B, Jang M, Kwak C, Lee Y, Son K, et al. Development of a novel short 12-meric papiliocin-derived peptide that is effective against Gram-negative sepsis. *Sci Rep.* 7 de marzo de 2019;9(1):3817.
 236. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Viticchi C, Mocchegiani F, Riva A, et al. Effect of mono-dose intraperitoneal cecropins in experimental septic shock. *Crit Care Med.* septiembre de 2001;29(9):1666-9.
 237. Mizgerd JP. Competing benefits of tumor necrosis factor-alpha for bacteria and for host defense. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de diciembre de 2003;168(12):1410-1.
 238. Rachoin JS, Schorr CA, Dellinger RP. Targeting endotoxin in the treatment of sepsis. *Subcell Biochem.* 2010;53:323-38.
 239. Fisher CJ, Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmerman JL, Nightingale P, et al. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med.* marzo de 1993;21(3):318-27.
 240. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 21 de septiembre de 1990;249(4975):1431-3.
 241. Kobayashi M, Saitoh S, Ichiroh, Tanimura N, Takahashi K, Kawasaki K, Nishijima M, et al. Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de mayo de 2006;176(10):6211-8.
 242. Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, Adcock I, Kirkham PA. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and Gα dependent PI-3kinase signalling. *J Inflamm Lond Engl.* 12 de enero de 2012;9(1):1.
 243. Wong HR, Odoms K, Sakthivel B. Divergence of canonical danger signals: the genome-level expression patterns of human mononuclear cells subjected to heat shock or lipopolysaccharide. *BMC Immunol.* 30 de mayo de 2008;9:24.
 244. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects.

- Diabetes Care. abril de 2010;33(4):861-8.
245. Draper LA, Cotter PD, Hill C, Ross RP. The two peptide lantibiotic lactacin 3147 acts synergistically with polymyxin to inhibit Gram negative bacteria. *BMC Microbiol.* 26 de septiembre de 2013;13:212.
 246. Naghmouchi K, Baah J, Hober D, Jouy E, Rubrecht C, Sané F, et al. Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* junio de 2013;57(6):2719-25.
 247. Andrä J, Koch MHJ, Bartels R, Brandenburg K. Biophysical characterization of endotoxin inactivation by NK-2, an antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. *Antimicrob Agents Chemother.* mayo de 2004;48(5):1593-9.
 248. Kim JK, Lee E, Shin S, Jeong KW, Lee JY, Bae SY, et al. Structure and function of papiliocin with antimicrobial and anti-inflammatory activities isolated from the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *J Biol Chem.* 2 de diciembre de 2011;286(48):41296-311.
 249. Chu HL, Chih YH, Peng KL, Wu CL, Yu HY, Cheng D, et al. Antimicrobial Peptides with Enhanced Salt Resistance and Antiendotoxin Properties. *Int J Mol Sci.* 16 de septiembre de 2020;21(18):6810.
 250. Domingues MM, Castanho MARB, Santos NC. rBPI(21) promotes lipopolysaccharide aggregation and exerts its antimicrobial effects by (hemi)fusion of PG-containing membranes. *PloS One.* 22 de diciembre de 2009;4(12):e8385.
 251. Chih YH, Lin YS, Yip BS, Wei HJ, Chu HL, Yu HY, et al. Ultrashort Antimicrobial Peptides with Antiendotoxin Properties. *Antimicrob Agents Chemother.* agosto de 2015;59(8):5052-6.
 252. Domingues MM, Inácio RG, Raimundo JM, Martins M, Castanho MARB, Santos NC. Biophysical characterization of polymyxin B interaction with LPS aggregates and membrane model systems. *Biopolymers.* 2012;98(4):338-44.
 253. Wiesner J, Vilcinskis A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence.* octubre de 2010;1(5):440-64.
 254. Boparai JK, Sharma PK. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein Pept Lett.* 2020;27(1):4-16.
 255. Bhunia A, Mohanram H, Domadia PN, Torres J, Bhattacharjya S. Designed beta-boomerang antiendotoxic and antimicrobial peptides: structures and activities in lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 14 de agosto de 2009;284(33):21991-2004.
 256. Mohanram H, Bhattacharjya S. Resurrecting inactive antimicrobial peptides from the lipopolysaccharide trap. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):1987-96.

11. ANEXOS

Anexo 1. Elipticidad molar ($[\theta]$ deg cm² dmol⁻¹) a $\lambda = 222$ nm, radios de elipticidades a $[\theta]_{222}$ y $[\theta]_{\max}$ para los péptidos Satanin 1, 2 y Curvicina.

Peptides	$[\theta]_{222}$	$[\theta]_{\max}$	$[\theta]_{222} / [\theta]_{\max}$	% helicity
Satanin 1	-343997	-33776.32	10,184	1018
Satanin 2	-458998	-33776.32	13,589	1358
Curvicina	-561445	-33878.21	16,572	1657

Anexo 2. Contenido de hélice de Satanin 1, 2 y Curvicina a partir de los datos experimentales de Dicroísmo circular.

PEPTIDO/ALGORITMO/ BASE DE DATOS	NRMS D	HÉLIC E1	HÉLI CE 2	HEBR A 1	HEBR A 2	VUELT AS	SIN ORDE N
SATANIN 1/Selcon3/dataset SP175	0,807	0,547	0,213	-0,002	-0,001	0,093	0,141
SATANIN 1/Selcon3/dataset SMP180	0,547	0,213	-0,003	-0,001	0,093	0,143	0,879
SATANIN 1/Selcon3/dataset7	0,713	0,583	0,222	-0,002	-0,001	0,050	0,141
SATANIN 1/Selcon3/dataset 4	0,703	0,584	0,222	-0,002	-0,001	0,049	0,140
SATANIN 1/Contin- LL/datasetSP175	0,375	0,944	0,000	0,000	0,051	0,001	0,000
SATANIN 1/Contin- LL/dataset 7	0,304	0,794	0,194	0,000	0,012	0,000	0,000

SATANIN 1/Contin-LL/dataset 4	0,304	0,957	0,013	0,000	0,030	0,000	0,000
SATANIN 2/Selcon3/dataset SP175	0,821	0,546	0,213	-0,002	-0,001	0,093	0,141
SATANIN 2/Selcon3/dataset SMP180	0,891	0,548	0,212	-0,002	-0,002	0,093	0,142
SATANIN 2/Selcon3/dataset7	0,722	0,583	0,222	-0,002	-0,001	0,050	0,141
SATANIN 2/Selcon3/dataset 4	0,713	0,583	0,221	-0,002	-0,001	0,050	0,141
SATANIN 2/Contin-LL/datasetSP175	0,316	0,000	0,000	0,082	0,572	0,346	0,000
SATANIN 2/Contin-LL/dataset 7	0,286	0,940	0,052	0,008	0,000	0,000	0,000
SATANIN 2/Contin-LL/dataset 4	0,286	0,000	0,000	0,000	0,448	0,552	0,000
CURVICINA/Selcon3/dataset SP175	0,714	0,583	0,221	-0,001	-0,001	0,050	0,141
CURVICINA/Selcon3/dataset SMP180	0,892	0,548	0,212	-0,002	-0,002	0,093	0,142
CURVICINA/Selcon3/dataset7	0,724	0,583	0,222	-0,001	-0,001	0,051	0,142
CURVICINA/Selcon3/dataset 4	0,724	0,583	0,221	-0,001	-0,001	0,051	0,142
CURVICINA/Contin-LL/datasetSP175	0,341	0,727	0,273	0,000	0,000	0,000	0,000

CURVICINA/Contin-LL/dataset 7	0,320	0,000	0,001	0,041	0,220	0,738	0,000
CURVICINA/Contin-LL/dataset 4	0,320	0,000	0,170	0,054	0,305	0,470	0,000

Anexo 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) en microgramos por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los péptidos Satanin 1, 2, y Curvicina frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, hongos, y *Mycobacterium tuberculosis* extracelular. NI: no identificado.

Microorganismos		Satanin 1 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Satanin 2 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Curvicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
		CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3,12	3,12	6,25	6,25	6,25	12,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 105663	6,25	>6,25	6,25	12,5	6,25	12,5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 170513	3,125	>6,25	6,25	>6,25	3,125	NI
Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	50	>50	>100	NI	>100	NI
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	25	>25	>100	NI	>100	NI

Levadura	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	50	>50	>100	NI	>100	NI
Mtb Extracelular	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294	>100	NI	>100	NI	>100	NI
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> MDR	>100 or >22,99	NA	>100 or >23,18	NA	>100 or >22,66	NA

Anexo 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) en micromolar (μM) de los péptidos Satanin 1, 2, y Curvicina frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, hongos, y *Mycobacterium tuberculosis* extracelular. NI: no identificado.

Microorganismos		Satanin 1 (μM)		Satanin 2 (μM)		Curvicin (μM)	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Gram-negativas	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,7173	0,7173	1,45	1,45	1,4161	2,83
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 105663	1,43	>1,43	1,45	2,9	1,4162	2,83
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA 170513	0,7173	>1,43	1,45	>1,45	0,7069	NI
Gram-positivas	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	11,49	>11,49	>23,18	NI	>22,66	NI
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	5,75	>5,75	>23,18	NI	>22,6	NI
Levadura	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	11,49	>11,49	>23,18	NI	>22,66	NI

Extracellular mycobacterium	<i>M. tuberculosis</i> <i>H37Rv</i> ATCC® <i>27294</i>	>22,99	NI	>23,18	NI	>22,66	NI
	<i>M. tuberculosis</i> <i>MDR</i>	>22,99	NI	>23,18	NI	>22,66	NI

Anexo 5. Índices terapéuticos (IT) de Satanin 1, 2, y Curvicina en eritrocitos humanos, células VERO y HaCaT, vs *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E faecalis* y *C. parapsilosis*. IT ($\mu\text{g/mL}$) = $\text{IC}_{50}/\text{CMI}$ de bacterias, de acuerdo a cada péptido.

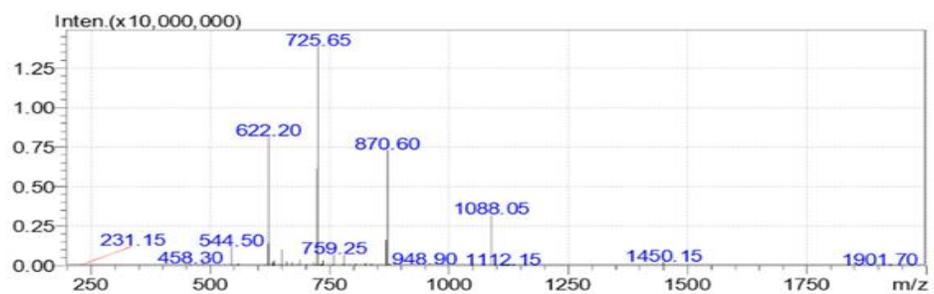
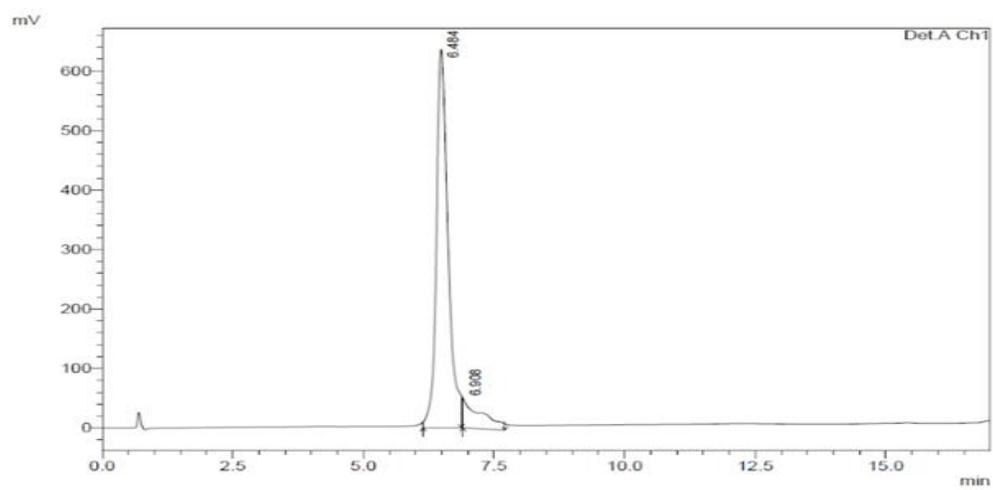
Línea celular	Péptidos	IT de <i>E. coli</i> ATCC 25922 ($\mu\text{g/mL}$)	IT de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 105663	IT de <i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA 170513	IT de <i>S. aureus</i> ATCC 29213	IT de <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	IT de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
Eritrocitos humanos	Satanin 1	60,096	30	60,0961	7,5	7,5	3,75
	Satanin 2	51,376	51,376	51,376	NA	NA	NA
	Curvicina	79,488	79,488	159,230	NA	NA	NA
Células Vero	Satanin 1	39,776	19,856	39,775	4,964	4,964	2,482
	Satanin 2	42,944	42,944	42,944	NA	NA	NA
	Curvicina	>80	80	160,256	NA	NA	NA
PBMCs humanos	Satanin 1	55,3	27,632	55,3525	6,908	6,908	3,454
	Satanin 2	67,9	67,984	67,984	NA	NA	NA
	Curvicina	>80	80	160,256	NA	NA	NA

Células HaCaT	Satanin 1	130,2	65,04	130,288	16,26	16,26	8,13
	Satanin 2	>80	80	80	NA	NA	NA
	Curvicina	>80	80	160,256	NA	NA	NA

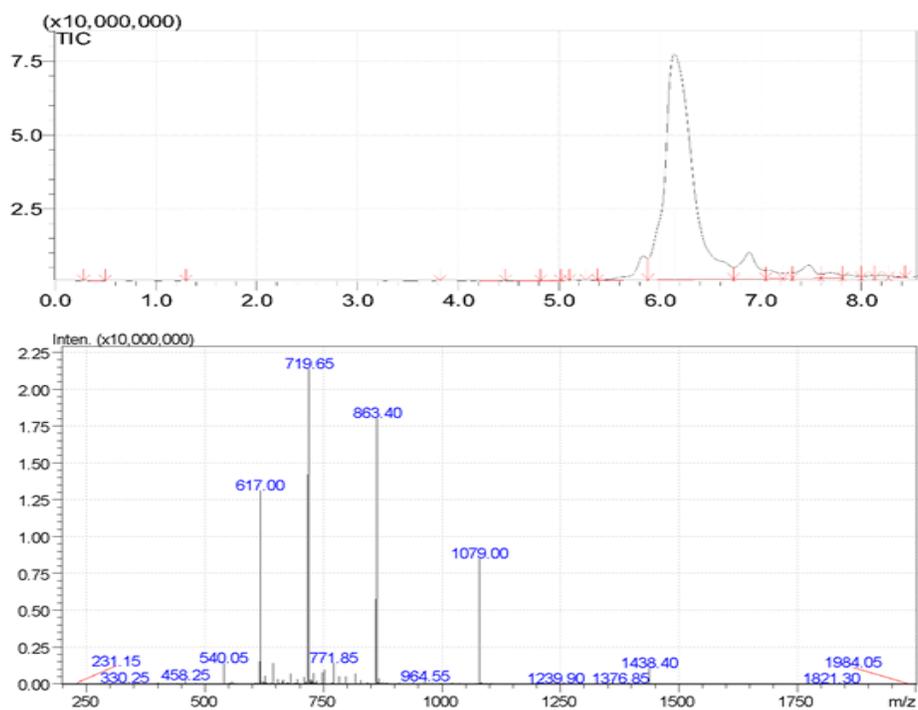
				20		40		
Sarcotoxins_I_A_Spere_DIP	G---WLKKIG	K-KIERVQGH	TRDATI	----	QG---	LGIAQQAANV	A-ATAR	39
Sarcotoxins_I_C_Spere_DIP	G---WLKKIG	K-KIERVQGH	TRDATI	----	QV---	LGIAQQAANV	A-ATAR	39
Sarcotoxins_I_B_Spere_DIP	G---WLKKIG	K-KIERVQGH	TRDATI	----	QV---	IGVAQQAANV	A-ATAR	39
Lser_cec_3_DIP	G---WLKKIG	K-KIERVQGH	TRDATI	----	QV---	LGVAQQAANV	A-ATARG	40
Sarcotoxin_Pd_COL	G---WLKKIG	K-KIERVQGH	TR	----	G---	LGIAQIAANV	A-ATAR	34
Cec_2_Mdom_DIP	G---WLKKIG	K-KIERVQGH	TRDATI	----	QT---	IGVAQQAANV	A-ATLK	39
Lser_cec_1_DIP	G---WLKKIG	K-KIERVQGH	TRDATI	----	QT---	IGVAQQAANV	A-ATLK	40
Lser_cec_6_DIP	G---WLKKFG	K-KIERVQGH	TRDATI	----	QA---	IGVAQQAANV	A-ATLK	40
Lser_cec_2_DIP	G---WLRDFG	K-RIERVQGH	TRDATI	----	QA---	IGVAQQAANV	A-ATVR	40
Lser_cec_4_DIP	G---WLKKIG	K-KIERVQGH	TRDASI	----	QA---	IGIAQQAANV	A-ATARG	40
Lser_cec_5_DIP	G---LVKKIG	K-KIERVQGH	TRDASI	----	QA---	IGIAQQAANV	A-ATARG	40
Cec_C_Glo_mo_DIP	G---WLKKLG	K-RIERIQGH	TRDATI	----	QG---	LGIAQQAANV	A-ATAR	39
Cec_Glo_mo_DIP	G---WLKKIG	K-KIERVQGH	TRDATV	----	KG---	LEVAQQAANV	A-ATVR	39
Sarcotoxins_I_D_Spere_DIP	G---WIRDFG	K-RIERVQGH	TRDATI	----	QT---	IAVAQQAANV	A-ATLK	40
Gm_cecropinB_LEP	K---W--KFF	K-KIERVQGH	IRDGLI	----	KAGPA	VQVVGQAATI	Y-KG-K	39
Hinnavin_II_LEP	K---W--KIF	K-KIEHMGQN	IRDGLI	----	KAGPA	VQVVGQAATI	Y-KG--	38
Gm_cecropinA_LEP	K---W--KIF	K-KIEKAGRN	IRDGLI	----	KAGPA	VSVVGEAATI	Y-KT-G	39
Papiliocin_LEP	R---W--KIF	K-KIEKVGRN	VRDGI	----	KAGPA	VAVVQQAATV	V-K---	37
Cec_A_Hcecr_LEP	K---W--KLF	K-KIEKVGQN	IRDGLI	----	KAGPA	VAVVQQAATQI	A-K---	37
Cec_B_Hcecr_LEP	K---W--KVF	K-KIEKMGRN	IRNGIV	----	KAGPA	IAVLGEAKAI	L-S----	37
Cec_B_Bmori_LEP	R---W--KIF	K-KIEKMGRN	IRNGIV	----	KAGPA	IEVLGSAKAI	-----	35
Cec_B_Apern_LEP	K---W--KIF	K-KIEKVGRN	IRNGI	----	KAGPA	VAVLGEAKAL	-----	35
Cec_A_Bmori_LEP	R---W--KLF	K-KIEKVGRN	VRDGLI	----	KAGPA	IAVIGQAKSL	-----	35
Gm_cecropinC_LEP	R---W--KVF	K-KIERMGQH	IRDGLI	----	KAGPA	VAVVQQAATI	I-SG---	38
Hinnavin_I_LEP	G---W--KIG	K-KLEHHGQN	IRDGLI	----	SAGPA	VFAVQQAATI	Y-AAAK-	40
Satanin_1_COL	RSKKW-RKIE	K-RVKK----	-----	----	IFEETKEA	LPVIQGVATI	VGAVGR	38
Satanin_2_COL	GSKRW-RKFE	K-RVKK----	-----	----	IFEETKEA	LPVIQGVATI	VGAVGR	38
Curvicin_COL	GSKRW-RKFE	K-RVKK----	-----	----	IFEETKEA	LPVVQGVVGV	ATAVGR	39
Oxysterlin1_COL	GSKRW-RKFE	K-RVKK----	-----	----	IFEETKEA	LPVVQGVVAV	ATAVGR	39
Oxysterlin3_COL	GSKRW-RKFE	K-RVKK----	-----	----	VFETKEA	LPVIQGVATV	VGAVGR	39
Oxysterlin2_COL	GSKRW-RKFE	K-KVKKAL	ED	AKELQEERV	QKIVEHTKEA	LPVIKAVATV	VGAVGR	55
Cec_Aluxu_COL	-----KNFF	K-RIEKVGKN	IRNA	-----	AERS	LPVTVGYAGV	AKQI---	35
Cec_D_Apern_LEP	---W--NPF	K-ELERAGQR	VRDAI	----	SAGPA	VATVAQATAL	A-----K	36
Cec_A1_Aalbo_DIP	GG---LKKLG	K-KLEGVGR	VFKA	----	SEKA	LPVAVGIKAL	G-----K	36
Cec_B_Aalbo_DIP	GG---LKKLG	K-KLEGVGR	VFKA	----	SEKA	LPVLTGYKAI	G-----	35
Cec_C_Aalbo_DIP	GG---LKKLG	K-KLEGAGKR	VFNA	----	AEKA	LPVVAGAKAL	G-----	35
LserStomox1_DIP	AG--FRKRFN	K-LVKKVKHT	IKET	----	ANVSKD	VAIVAG-SGV	AVGAAMG	43
LserStomox2_DIP	-G--FRKRFN	K-LVKKVKHT	IKET	----	ANVSKD	VAIVAG-SGV	AVGAAMG	42
Stomoxyn_Scalci_DIP	RG--FRKHFN	K-LVKKVKHT	ISSET	----	AHVAKD	TAVIAG-SGA	AVVAAT-	42
SibaCec_DIP	G-----KLT	KDKLKRGA	ALNV	----	ASKV	APIVAAGASI	A-----R	34
Consensus	G---W-KKIG	K-KIERVQGH	TRDAI	----	XA--A	LGVXQAANV	A-AT-R-	

Anexo 6. Alineamiento de 40 secuencias de péptidos alfa hélice de los órdenes Diptera, Lepidoptera and Coleoptera, incluyendo a Satanin 1, 2 y Curvicina. El patrón de color de los residuos es: Negro = Hidrofobicos, no polares y no cargados; Azul = positivos; Rojo = Negativos; Verde = Polares e hidrofílicos.

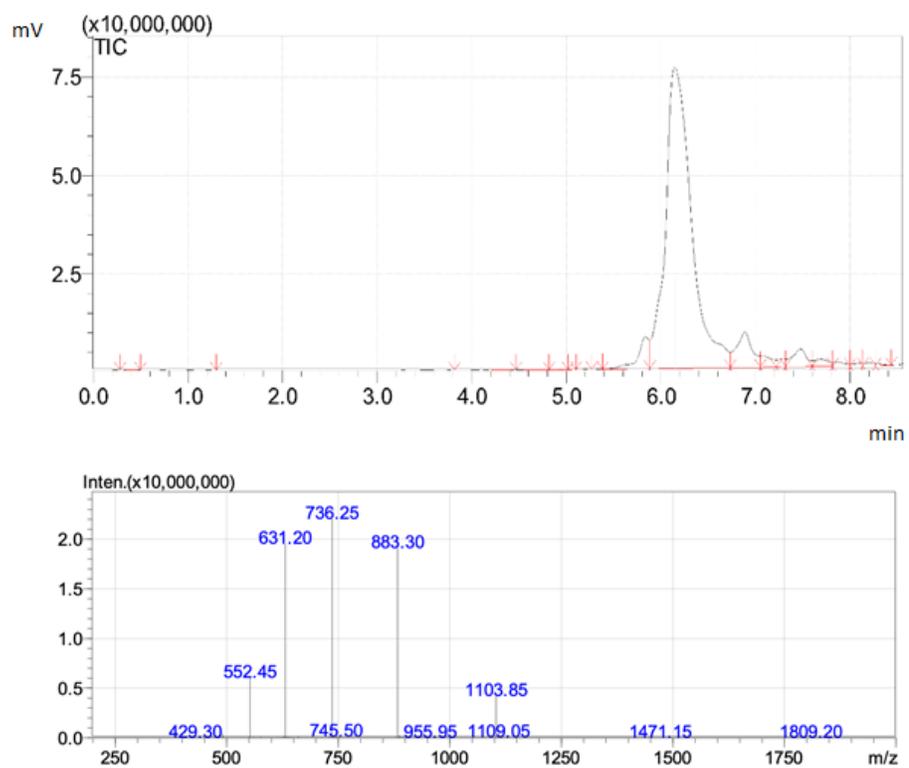
A.



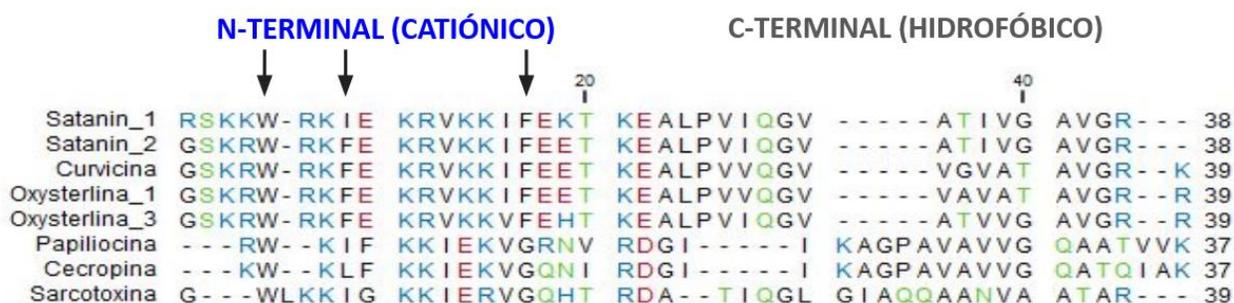
B.



C.



Anexo 7. Síntesis de Satanin 1 (A); Satanin 2 (B) y Curvicina (C). Perfiles de elución de péptidos sintéticos arriba y espectro de masas de péptidos puros abajo. Los péptidos fueron sintetizados a escala de 0,1 mmol en el sintetizador de *Protein Technologies, Inc, Tucson, AZ* usando síntesis de fase sólida (SPPS).



Anexo 8. Alineamiento de Satanin 1, 2 y Curvicina con otras cecropinas que conservan triptofano (W), y fenilalanina (F) en el N-terminal. En el documento de Lee E *et al*, 2013, se ha asociado la cadena lateral de los residuos W y F en papiliocina y cecropina a interacciones con LPS.

Anexo 9. Artículos publicados

“Novel antimicrobial cecropins derived from *O. curvicornis* and *D. satanas* dung beetles”

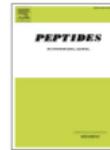
Peptides 145 (2021) 170626



Contents lists available at ScienceDirect

Peptides

journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides



Novel antimicrobial cecropins derived from *O. curvicornis* and *D. satanas* dung beetles

Diana Carolina Henao Arias^a, Lily Johana Toro^a, Germán Alberto Téllez Ramírez^{a,*},
Juan Felipe Osorio-Méndez^a, Adrián Rodríguez-Carlos^b, Javier Valle^c,
Sara Paulina Marín-Luevano^b, Bruno Rivas-Santiago^b, David Andreu^c,
Jhon Carlos Castaño Osorio^a

^a Center of Biomedical Research, Group of Molecular Immunology, Universidad del Quindío, Cra, 15 calle 12 norte, Armenia, Quindío, Colombia

^b Medical Research Unit Zacatecas, IMSS, Interior de la Alameda #45, col. Centro, Zacatecas, Cp. 98000, Mexico

^c Proteomics and Protein Chemistry Unit, Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona Biomedical Research Park Dr Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain

“New Insect Host Defense Peptides (HDP) From Dung Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) Transcriptomes”

Journal of Insect Science, (2021) 21(4): 12; 1–20

<https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab054>

Research



ENTOMOLOGICAL
SOCIETY OF AMERICA
SHARING INSECT SCIENCE GLOBALLY

OXFORD

New Insect Host Defense Peptides (HDP) From Dung Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) Transcriptomes

Germán Alberto Téllez Ramírez,^{1,*} Juan Felipe Osorio-Méndez,²
Diana Carolina Henao Arias,² Lily Johanna Toro S.,² Juliana Franco Castrillón,²
Maribel Rojas-Montoya,² and Jhon Carlos Castaño Osorio²

Center of Biomedical Research, Group of Molecular Immunology, Universidad del Quindío, Carrera 15 and Calle 12 Norte, Armenia, Quindío, Colombia and ¹Corresponding author, e-mail: gatellez@uniquindio.edu.co

Subject Editor: Daniel Swale

Received 5 April 2021; Editorial decision 15 July 2021

Anexo 10. Certificación de pasantía internacional.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Zacatecas, 21 de Agosto de 2019

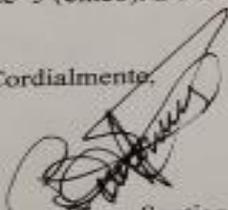
Doctora
Olga Alicia Nieto Cárdenas MD, PhD
Coordinadora Doctorado en Ciencias Biomédicas
Universidad del Quindío

Estimada, Doctora Olga Alicia

De la manera más atenta me dirijo a usted para informar que la estudiante del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Quindío, Diana Carolina Henao identificada con C.C 1.094.889.213, ha culminado su estancia de doctorado en mi grupo de Investigación en la Unidad de Investigación Médica Zacatecas – IMSS, la cual se llevó a cabo durante el periodo del 6 de Mayo del 2019 hasta el 6 de Agosto del 2019.

Durante el periodo mencionado de la estancia, la estudiante logró evaluar el efecto directo de péptidos antimicrobianos identificados en escarabajos coprófagos *D. curvicornis* y *D. satanas* en el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv y el efecto de estos mismos péptidos en líneas celulares THP-1 diferenciadas a macrófagos (Macrófagos derivados de monocitos humanos) y A549 (adenocarcinoma humano alveolar de células epiteliales basales), ambas infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv. Posteriormente, fue necesario extender la estancia, por un periodo que comprende el 6 de Agosto hasta el 28 de Agosto de 2019, con el fin de continuar realizando experimentos relacionados con la expresión de algunas citoquinas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias en la presencia de tratamientos con los péptidos antimicrobianos de los escarabajos en las células infectadas con *M. tuberculosis* o estimuladas con LPS. Hasta el momento se han llevado a cabo las actividades experimentales por parte de la estudiante y se ha estado cumpliendo con los objetivos planteados en la estancia de doctorado, y adicionalmente la estudiante ha asistido a los seminarios realizados en nuestro grupo de investigación. La calificación de la estudiante es de 5 (cinco). De antemano le agradezco su atención.

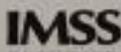
Cordialmente,



Bruno Brvas Santiago Ph.D
Investigador Titular C
Unidad de Investigación Médica Zacatecas – IMSS
www.uinmz-imss.org
Tel. +52-492-9226019



UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA
BIOMÉDICA DE ZACATECAS



IMSS
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL