

Péptidos antimicrobianos producidos por coleópteros: Una alternativa médica

Amaro-Morín Guillermo Oswaldo, González-Cruz Aldo Omara, González-Santillán Francisco Javiera, Granados-Ortíz José Alejandro.

Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, N.L. Facultad de Ciencias Biológicas

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son proteínas cortas con actividad antimicrobiana que forman parte del sistema natural de inmunidad innata de los organismos. Una gran parte de los AMPs conocidos se originan de insectos y dentro de este grupo, se ha establecido una clasificación en base a sus características bioquímicas y estructurales. El presente trabajo menciona esta clasificación y describe algunos de los AMPs obtenidos de insectos del orden Coleoptera que son relevantes debido a su potencial de aplicación en el área médica como agentes terapéuticos, dichos péptidos son la coprisina de *Copris tripartitus*, la tenecina 1 de *Tenebrio molitor*, las holotricinas de *Holotrichia diomphalia*, las acaloleptinas de *Acalolepta luxuriosa* y las protaetinas 1, 2 y 3 de *Protaetia brevitarsis*. Además, se presenta una breve descripción de la forma en que estos AMPs son aislados, purificados y caracterizados, así como del mecanismo de acción que les otorga su actividad contra patógenos y se discuten las perspectivas a futuro de su aplicación terapéutica.

Introducción.

Los organismos biológicos han desarrollado diversas estrategias a lo largo del tiempo, con el fin de evadir enfermedades, una de ellas es sintetizar un tipo de péptido con actividad antimicrobiana el cual es parte de su sistema natural de inmunidad innata. Los péptidos antimicrobianos (AMP, del inglés “anti-microbial peptides”) se constituyen generalmente de 15 a 14 residuos de aminoácidos, presentando características hidrofóbicas y una carga positiva, permitiéndoles alterar la bicapa lipídica de los organismos, provocando un efecto similar al producido por las proteínas canal [1].

Los AMP han tomado mucho interés debido a que también constituyen una parte indispensable de la inmunidad innata del humano, presentando la característica de matar extremadamente rápido a cualquier organismo susceptible, despertando así el interés por AMPs de varios orígenes con propiedades anti-bacteriales y anti-fúngicas para su uso en ensayos clínicos y/o la industria agrícola [2].

En este trabajo se abarcan los diversos tipos de AMPs que podemos encontrar en insectos, más específicamente AMPs presentes en coleópteros, su modo de acción, un enfoque sobre su caracterización, así como usos en las áreas medica/agrícola.

Tipos de AMPs.

De una manera general estos péptidos pueden clasificarse o agruparse en base a sus características químicas y bioquímicas, pero principalmente por su estructura, sin embargo, teniendo en cuenta el enfoque tomado se presentarán las clases de AMPs en insectos como un punto de partida. Los AMPs derivados de insectos pueden clasificarse como AMPs de α -Helice, AMPs estabilizados por puentes de disulfuro (mejor conocidos como defensinas), AMPs ricos en prolina y polipéptidos ricos en glicina (Tabla1).

Los AMPs α -Helice son péptidos lineales, helicoidales sin Cis con o sin bisagra, en donde las cecropinas junto con las sarcotoxinas, la hifancina, la enbocina y la espodopsina y otros

péptidos similares a la cecropina representan la familia más abundante. Los AMP estabilizados por puentes disulfuro típicamente contienen tres enlaces disulfuro, pero también se conocen péptidos con cuatro, estos son comúnmente referidos como defensinas de los insectos debido a sus estructuras generales similares a las α - y β -defensinas de mamíferos ya que también hay de un solo enlace. Los AMP ricos en prolina y los polipéptidos ricos en glicina son péptidos que se encuentran enriquecidos específicamente por un aminoácido, por ejemplo en el caso de los ricos en prolina, esta se asocia típicamente en dobletes o tripletes con residuos básicos, más frecuentemente con arginina. Hablando específicamente sobre los AMPs ricos en glicina tenemos que estos pueden variar entre 8 kDa y 30 kDa y se han obtenido de coleópteros péptidos como la coleopterina, holotricina 2 y 3, tenecina, y acaloleptinas A, los cuales algunos son de los más conocidos [2].

Tabla 1. Tipos de AMP en insectos [2].

Tipos de AMPs	Ejemplos
Péptidos catiónicos lineales de hélice alfa	Cecropina A y B, Sarcotoxina, Hifancina, Enbocina y Espodopsina.
Péptidos estabilizados por puentes disulfuro	Thanatina, Sapecina, Heliomicina, Defensina A, Termicina.
Péptidos ricos en prolina	Apidaecina, drosocina, Abaecina, Formaecina.
Polipéptidos ricos en glicina	Diptericina, gloverina, Coleopterina, Holotricina 2 y 3.

AMPs de Coleópteros.

Copris tripartitus - Coprisin (Coprisina).



Figura 1. *Copris tripartitus* [23].

En 2009 fue aislado el cDNA de la coprisina, el cual es un péptido de tipo defensina, se compone de 43 aminoácidos y es producido por el escarabajo *Copris tripartitus* [3]. Este péptido tiene una estructura anfipática α -helicoidal y 2 láminas- β . La secuencia aminoacídica de este péptido maduro, se encontró idéntica en un 79.1% y 67.4% a los péptidos de tipo defensina de *Anomala cuprea* y *Allomyrina dichotoma*, respectivamente [4].

Tenebrio molitor - Tenecina 1 (Tenecina 1).



Figura 2. *Tenebrio molitor* [24].

La Tenecina 1 es una proteína antibacteriana secretada por la larva del escarabajo molinero *Tenebrio molitor*, la cual tiene un largo loop N-terminal y características estructurales comunes de la familia de defensinas de insectos correspondiente al motivo α/β estabilizado con cisteína [5].

Holotrichia diomphalia – Holotricin (Holotricina).



Figura 5. *Holotrichia diomphalia* [25].

La holotricina es una proteína presente en la hemolinfa de la larva de *Holotrichia diomphalia*. Se analizó su cDNA y se encontró que es similar a una proteína antifúngica de *Sarcophaga peregrina* en términos de tamaño molecular y alto contenido de residuos de histidina y glicina [6].

Acalolepta luxuriosa – Acaloleptin (Acaloleptina)



Figura 4. *Acalolepta luxuriosa* [26].

Existen 3 AMPs relacionados estructuralmente y con una masa molecular de 8 kDa (acaloleptinas A1, A2 y A3) en la hemolinfa de larvas inmunizadas del escarabajo de cuerno largo Udo, *Acalolepta luxuriosa*. Estos péptidos tienen los mismos 6 aminoácidos N-terminales, y se cree que son isoformas. A1 consiste de 71 aminoácidos y comparte una similaridad significativa en su secuencia con la coleopterina y holotricina 2 de otros insectos coleópteros, además los 29 residuos C-terminales de A1 tienen un 40% de identidad con los 30 residuos C-terminales de la himenoptaecina encontrada en las abejas [7].

Protaetia brevitarsis – Protaetín (proatetinas) 1, 2 y 3.



Figura 6. *Protaetia brevitarsis* [27].

Las proatetinas 1, 2 y 3 son AMPs aislados de la hemolinfa de *Protaetia brevitarsis*, una plaga de árboles frutales en Corea. La homología en la secuencia aminoacídica de la proatetina 1 con holotricina 2 (de *Holotrichia diomphalia*) mostró un 99% de identidad. Un análisis de Northern blot mostró que el gen de la proatetina 1 está fuertemente expresado en el cuerpo graso después de una inyección de *Escherichia coli* al organismo, también se expresó en el intestino, pero mucho más débil después de la inmunización [8].

Producción, purificación y caracterización molecular.

Desde el descubrimiento del primer péptido antimicrobiano en insectos, una gran variedad de técnicas ha sido utilizada para lograr estos fines, sin embargo, en este apartado se mencionan los pasos generales y técnicas más comunes en relación a los péptidos mencionados. El primer paso consiste en inducir la producción del péptido en la hemolinfa, a través de la inyección de 10^4 - 10^6 células de bacterias vivas, muertas con calor o de componentes de su pared celular. A pesar de que la inyección de dosis subletales de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas produce una inducción más completa, los péptidos incluidos en esta revisión fueron inducidos a través de los primeros 3 métodos [9]. En coleópteros, luego de 24 horas de la inyección se extrae la hemolinfa de larvas en sus últimos instares para luego centrifugarla y así separar el plasma de los hemocitos. Posteriormente se realiza una pre purificación, que comienza con un tratamiento con calor o con la acidificación con ácido tricloroacético o ácido acético, seguida de una elución gradual, con un porcentaje bajo, medio y alto de acetonitrilo a través de una columna de extracción sólida en fase reversa (C18). Sales, azúcares y la mayoría de las proteínas hidrofílicas son eliminadas durante los ciclos de lavado, mientras que los lípidos y la mayoría de proteínas hidrofóbicas quedan retenidas en la fase sólida [9, 10]. Luego de esto los extractos son concentrados por liofilización o en centrifugas de vacío y resuspendidos en buffers específicos. La principal técnica de purificación es la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa o RP-HPLC y la cromatografía por exclusión de tamaño o de tamiz molecular, adicionalmente, la pureza suele comprobarse empleando la técnica de SDS-PAGE [9, 7].

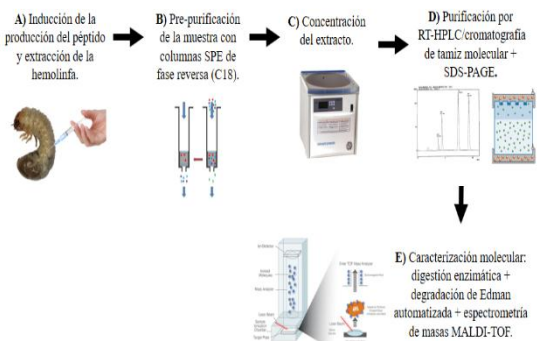


Figura 7. Esquema general de los pasos para la producción, purificación y caracterización molecular de péptidos antimicrobianos de insectos [9]

En cuanto a la caracterización de los péptidos mencionados, esta se ha realizado principalmente por una combinación de escisión enzimática, degradación de Edman automatizada y espectrometría de masas MALDI-TOF [7].

Mecanismo de acción de los AMPs y actividad contra patógenos

En la actualidad se han propuesto varios modelos de acción antimicrobiana de los AMPs, los cuales explican que estos péptidos actúan de manera selectiva perturbando la membrana celular por medio de la alteración del arreglo estructural anfipático [11], esto también puede lograr la formación de canales iónicos que aumentan la permeabilidad de la membrana [12].

Entre estos modelos se encuentran los denominados “Barrel-Stave”, “Carpet” y “Toroidal” [11, 13] (como se observa en la Figura 2), donde en el primero los péptidos se agregan e insertan en la bicapa lipídica de manera que las regiones hidrófobas del péptido se alinean con la región de núcleo del lípido y de esta manera las regiones hidrófobas del péptido forman un poro en la membrana [14]; en el modelo “Carpet” los péptidos alteran la membrana orientándose paralelamente a la superficie de la bicapa lipídica y formando una capa o alfombra extensa [16]. En el caso del modelo “Toroidal” los péptidos se agregan e inducen a las monocapas lipídicas a doblarse continuamente a través del poro de manera que el núcleo de agua se alinea tanto por los péptidos insertados como por la cabeza de los grupos lipídicos [16].

Un modelo adicional a los anteriormente mencionados es el modelo “Detergent” el cual es similar al modelo “Carpet”, como su nombre lo indica el modo de acción se asemeja al de la lisis celular por detergentes, donde se reduce la homogeneidad de la membrana provocando su ruptura o disolución [17].

Las hipótesis más recientes acerca de la bioactividad de los AMPs proponen que dichos péptidos activan moléculas involucradas en cascadas de autólisis bacteriana [11, 18].

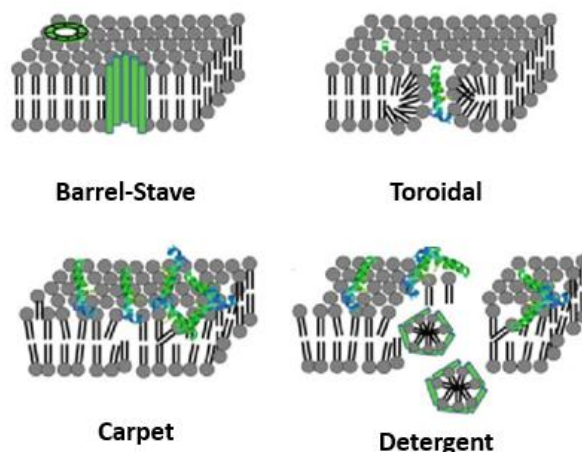


Figura 2. Esquematización general de los principales modelos propuestos para la acción de AMPs sobre la membrana celular [13, 18].

Tabla 2. AMPs aislados a partir de coleópteros, los cuales tienen una actividad inhibitoria de alto espectro [11, 19, 20, 4, 21].

AMPs obtenidos de coleópteros	Actividad antimicrobiana
Coprisina	G (-), G (+), H
Tenecina 1	G (-), G (+)
Holotricina	G (-), G (+)
Acaloleptina	G (-), G (+)
Protaetina 2	G (-), G (+)

G (-): Bacterias gram negativas. G (+): Bacterias gram positivas. H: Hongos.

Los AMPs producidos por insectos presentan un espectro variado de blancos, pueden inhibir tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, e incluso algunos son capaces de afectar a otra clase de microorganismos como hongos [19]. El grupo de los coleópteros ha

mostrado especial atención debido a que la mayoría tienen el potencial de producir AMPs con un espectro amplio de acción, abarcando en su mayoría a una gran cantidad de bacterias Gram negativas y Gram positivas [20] (así como se muestra en la Tabla 2).

Potencial terapéutico de los AMPs.

Durante décadas, las perspectivas de los péptidos antimicrobianos como una clase alternativa de antibióticos han presentado gran atención para el tratamiento de infecciones [11]. La incapacidad para validar de manera exacta el mecanismo de acción en términos físico-químicos es un obstáculo para futuras aplicaciones de los AMPs como fármacos clínicamente útiles [20]. Actualmente existen programas clínicos basados en este tipo de péptidos en las áreas de infección, dermatología, cáncer e inflamación [19]. La probabilidad de éxito clínico de los fármacos terapéuticos basados en AMPs aumenta a medida que surgen opciones para una gama más amplia de indicaciones clínicas [22].

Conclusión.

La variedad de ambientes en la que los coleópteros habitan, ha permitido que cada especie desarrolle diferentes estrategias de defensa contra agentes microbianos que comprometerían su supervivencia, por lo que los péptidos antimicrobianos representan una línea de defensa muy importante para ellos, y que dado su poder de defensa, podría ser de utilidad en el área clínica para tratar infecciones microbianas, pues se ha encontrado que algunos de estos AMPs tienen actividad antimicrobiana con un amplio espectro de actividad y algunos no representan un peligro para la salud humana, sin embargo se necesitan realizar las pruebas clínicas previas a su aplicación terapéutica.

Literatura Consultada.

1. Villarruel, R., Huizar, R., Corrales, M., Sánchez, T., & Islas, A. (2004). Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune.
2. Vilcinskas, A. (Ed.). (2010). *Insect biotechnology* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
3. Hwang, J. S., Lee, J., Kim, Y. J., Bang, H. S., Yun, E. Y., Kim, S. R., ... & Kim, I. (2009).

- Isolation and characterization of a defensin-like peptide (coprisin) from the dung beetle, *Copris tripartitus*. *International journal of peptides*, 2009.
4. Lee, E., Kim, J. K., Shin, S., Jeong, K. W., Shin, A., Lee, J., ... & Kim, Y. (2013). Insight into the antimicrobial activities of coprisin isolated from the dung beetle, *Copris tripartitus*, revealed by structure-activity relationships. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(2), 271-283.
 5. Lee, K. H., Hong, S. Y., & Oh, J. E. (1998). Synthesis and structure-function study about tenecin 1, an antibacterial protein from larvae of *Tenebrio molitor*. *FEBS letters*, 439(1), 41-45.
 6. MOON, H., 倉田, 祥一朗, 名取, 俊二, & LEE, B. (1995). Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 18(8), 1049-1052.
 7. Imamura, M., Wada, S., Koizumi, N., Kadotani, T., Yaoi, K., Sato, R., & Iwahana, H. (1999). Acaloleptins A: inducible antibacterial peptides from larvae of the beetle, *Acalolepta luxuriosa*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 40(2), 88-98.
 8. Yoon, H. S., Lee, C. S., Lee, S. Y., Choi, C. S., Lee, I. H., Yeo, S. M., & Kim, H. R. (2003). Purification and cDNA cloning of inducible antibacterial peptides from *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera). *Archives of insect biochemistry and physiology*, 52(2), 92-103.
 9. Hetru, C., & Bulet, P. (1997). Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *Antibacterial Peptide Protocols*, 35-49.
 10. Moon, H. J., Lee, S. Y., Kurata, S., Natori, S., & Lee, B. L. (1994). Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein from larvae of the coleopteran, *Tenebrio molitor*. *Journal of biochemistry*, 116(1), 53-58.
 11. Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International journal of antimicrobial agents*, 24(6), 536-547.

12. Neubacher, H., Mey, I., Carnarius, C., Lazzara, T. D., & Steinem, C. (2014). Permeabilization assay for antimicrobial peptides based on pore-spanning lipid membranes on nanoporous alumina. *Langmuir*, 30(16), 4767-4774.
13. Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.
14. Wimley, W. C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS chemical biology*, 5(10), 905-917.
15. Oren, Z. & Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic α - helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47, 451-463.
16. Huang, H.W. (2004). Molecular mechanism of peptide induced pores in membranes. *Phys. Rev. Lett.* 92, 198304-1 – 198304-4.
17. Chang, W. K., Wimley, W. C., Searson, P. C., Hristova, K., & Merzlyakov, M. (2008). Characterization of antimicrobial peptide activity by electrochemical impedance spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(10), 2430-2436.
18. Leiter, É., Gáll, T., Csernoch, L., & Pócsi, I. Biofungicide utilizations of antifungal proteins of filamentous ascomycetes: current and foreseeable future developments. *BioControl*, 1-14.
19. Dathe, M., & Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1), 71-87.
20. Wimley, W. C., & Hristova, K. (2011). Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *The Journal of membrane biology*, 239(1-2), 27-34.
21. Yoon, H. S., Lee, C. S., Lee, S. Y., Choi, C. S., Lee, I. H., Yeo, S. M., & Kim, H. R. (2003). Purification and cDNA cloning of inducible antibacterial peptides from *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera). *Archives of insect biochemistry and physiology*, 52(2), 92-103.
22. Zhang, L., & Falla, T. J. (2006). Antimicrobial peptides: therapeutic potential. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 7(6), 653-663
23. Péliissié, G. (31 de marzo de 2017). *Copris tripartitus* set 5 pcsA- Tibet COPTRIPS1. Recuperado de: http://www.insecta.fr/es/copris-tripartitus-xml-2390_2391_2412-15131.html
24. Storey, M. (31 de marzo de 2017). *Tenebrio molitor*- Yellow mealworm – Discover Life. Recuperado de: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Tenebrio+molitor>
25. Хрущ дальневосточный чёрный (*Holotrichia diomphalia* Bates, 1888). (31 de marzo de 2017). Recuperado de: http://coleop123.narod.ru/coleoptera/Scarabaeidae/Holotrichia_diomphalia.htm
26. *Lamiinae Lamiini Acalolepta luxuriosa* – Worldwide Cerambycidae Photo Gallery. (31 de marzo de 2017). Recuperado de: <http://www.cerambycoidea.com/foto.asp?Id=795>
27. Magnus, M. (31 de marzo de 2017). *Protaetia brevitarsis brevitarsis* Lewis, 1879 (3019456898) - *Protaetia brevitarsis* – Wikispaces. Recuperado de: [https://species.wikimedia.org/wiki/Protaetia_brevitarsis#/media/File:Protaetia_brevitarsis_brevitarsis_Lewis,_1879_\(3019456898\).jpg](https://species.wikimedia.org/wiki/Protaetia_brevitarsis#/media/File:Protaetia_brevitarsis_brevitarsis_Lewis,_1879_(3019456898).jpg)