



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Químico-Biológicas

**ESTUDIO PROTEÓMICO DEL EFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO
RESPONSABLE DEL BLANQUEAMIENTO DE ARRECIFES CORALINOS EN
EL HOLOBIONTE DEL “CORAL DE FUEGO” *Millepora complanata*.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Químico-Biológicas

Presenta:

QFB. Esteban de Jesús Alcantar Orozco

Dirigida por:

Dra. Ma. Alejandra Rojas Molina

Dra. Ma. Alejandra Rojas Molina
Presidente

Dr. César Ibarra Alvarado
Secretario

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez
Vocal

Dra. Juana Isela Rojas Molina
Suplente

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro
Enero, 2020
México

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que de alguna manera han colaborado en este trabajo, y que gracias a ellos, hoy puedo presentarlo con orgullo y satisfacción.

Agradezco a CONACYT, por brindarme el soporte económico que me ayudó a lograr este objetivo tan importante para mi formación académica.

A mi directora de tesis, la Dra. Alejandra Rojas Molina, por darme la oportunidad de incorporarme a este proyecto y poder desarrollarlo con usted, por ayudarme a encontrar mi pasión en la investigación, por su confianza, su paciencia y por compartir su conocimiento conmigo.

A mi familia, agradezco a mis padres que me apoyaron en todo a lo largo de este camino, por educarme y formarme, ya que ustedes han sacrificado toda su vida por el progreso de sus hijos, y es a ustedes a quienes les debo lo que soy.

Gracias a mis hermanos, que fueron una enorme inspiración para continuar en el camino de la ciencia, que siempre me mostraron su apoyo y además son mi mayor motivación profesional.

A mis sobrinos, que aun en los momentos más difíciles, supieron como dibujar una sonrisa en mi rostro y me hacen ver día con día lo valioso que es disfrutar el presente.

A mis maestros, por haberme brindado los conocimientos y guiarme durante todo el camino hasta el día de hoy.

A mis amigos, que me acompañaron a lo largo de este proceso y que fueron mi soporte en muchas situaciones a lo largo de mi formación escolar y personal.

DEDICATORIA

A mis padres que me han apoyado siempre y por su apoyo incondicional en este trabajo.

A mis hermanos y mis sobrinos, por su apoyo, sus consejos y su motivación.

A mis maestros, por sus enseñanzas y el conocimiento que me transmitieron.

A mis amigos, por acompañarme a lo largo de mi formación académica y personal.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABSTRACT	8
RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	15
2.1 Proteómica y proteoma	15
2.2. Aplicación de las técnicas proteómicas.....	15
2.3 Proteómica de organismos marinos.....	16
2.4 Filo Cnidaria	17
2.4.1 Generalidades del filo Cnidaria	17
2.4.2 Cnidocitos y nematocistos	18
2.5 Estudios proteómicos del filo Cnidaria	19
2.5.1 Toxinas de cnidarios	19
2.5.2 Otras proteínas de cnidarios.....	20
2.6 Cnidarios del género <i>Millepora</i>	20
2.6.1 Hidrocorales del género <i>Millepora</i> como holobiontes	20
2.6.2 Simbiosis del género <i>Millepora</i>	21
2.7 Blanqueamiento de arrecifes coralinos	23
2.8 Impacto de las ómicas en el estudio del blanqueamiento	27
2.8.1 Estudios relacionados con el blanqueamiento	27
2.8.2 Estudios transcriptómicos relacionados al blanqueamiento.....	28
2.8.3 Estudios proteómicos relacionados al blanqueamiento	28
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	32
5. HIPÓTESIS	32
6. OBJETIVOS	33
6.1 Objetivo General	33
6.2 Objetivos específicos	33
7. MATERIALES Y MÉTODOS	33

7.1. Material de estudio.....	33
7.2 Equipos.....	33
7.3 Estándares.....	34
7.4 Métodos.....	34
7.4.4 Selección del método óptimo de extracción del proteoma de <i>M. complanata</i>	40
7.5 Análisis estadístico.....	42
7. RESULTADOS.....	43
8.1 Obtención de especímenes de <i>M. complanata</i> normales y blanqueados <i>in situ</i>	43
8.2 Comparación de los fragmentos obtenidos de <i>M. complanata</i> en las diferentes condiciones para la realización del estudio proteómico.....	43
8.3 Obtención del proteoma total de <i>M. complanata</i> para el estudio proteómico.....	44
8.3.1 Método por limado.....	44
8.3.2 Método por molienda.....	45
8.3.3 Método por rayado.....	46
8.3.4 Selección del método de extracción de proteínas totales de <i>M. complanata</i>	48
8.4 Determinación de la concentración de proteína de los extractos.....	51
8.5 Electroforesis bidimensional en tiras de 7 cm con rango de pH 3 – 7.....	53
8.6 Electroforesis bidimensional en tiras de 11 cm con rango de pH 3 – 10.....	53
8. DISCUSIÓN.....	61
10. CONCLUSIONES.....	74
9. REFERENCIAS.....	75
ANEXOS.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos propuestos para la pérdida o liberación de los endosimbiontes de los tejidos de los cnidarios hospederos (Gates et al., 1992)	27
Tabla 2. Cantidades obtenidas del muestreo de especímenes de <i>M. complanata</i>	43
Tabla 3. Comparación de los fragmentos obtenidos de <i>M. complanata</i> en las diferentes condiciones.....	44
Tabla 4. Conteo de bandas totales a través de los métodos de disrupción de tejido y de las metodologías para extracción de proteínas totales.....	48
Tabla 5. Concentración de proteínas totales en extractos acuosos de Mc N y Mc B.	51
Tabla 6. Concentración de proteínas totales en extractos liofilizados de Mc N y Mc B.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de los cnidarios (Modificado de Curtis and Schnek, 2006)...	18
Figura 2. Cnidocito y nematocisto (Özbek, 2011).....	19
Figura 3. Ejemplos de organismos del género <i>Millepora</i> (Lozoya, 1994).....	21
Figura 4. Localización de las zooxantelas en los cnidarios (Hoegh-Guldberg <i>et al.</i> , 2007).....	22
Figura 5. Proceso del blanqueamiento de un coral y mecanismos implicados (Modificado de Weis, 2008).....	24
Figura 6. Proceso del blanqueamiento de un coral y mecanismos implicados (Modificado de Weis, 2008).....	26
Figura 7. Comparación de perfiles de los extractos realizados con la metodología de limado. Gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 18 % teñido con colorante azul de Coomassie.	45
Figura 8. Comparación de perfiles de los extractos obtenidos mediante la metodología de molienda.....	46
Figura 9. Comparación de perfiles de los extractos obtenidos mediante la metodología de rayado.....	47
Figura 10. Comparación de la concentración ($\mu\text{g/g}$ de muestra) de los extractos obtenidos a partir de <i>M. complanata</i>	49
Figura 11. Comparación de perfiles de los extractos de proteínas totales obtenidos mediante los métodos de Tris-HCl y TCA-Acetona.....	50
Figura 12. Comparación de perfiles de los extractos de proteínas totales de <i>M. complanata</i> normal y <i>M. complanata</i> blanqueado.....	51
Figura 13. Concentración de proteína presente en los extractos de <i>M. complanata</i> normal (Mc N) y <i>M. complanata</i> blanqueado (Mc B). * indica diferencia significativa ($P \leq 0.05$) por la prueba de t de student.....	52
Figura 14. Perfil bidimensional de <i>M. complanata</i> normal en 7 cm.....	53
Figura 15. Primer perfil bidimensional de <i>M. complanata</i> en 11 cm (M1).....	54
Figura 16. Segundo perfil bidimensional de <i>M. complanata</i> en 11 cm (M2).....	55
Figura 17. Tercer perfil bidimensional de <i>M. complanata</i> en 11 cm (M3).....	56
Figura 18. Gel maestro obtenido mediante el Software PDQuest.....	57
Figura 19. Spots seleccionados de M1.....	57
Figura 20. Spots seleccionados de M3.....	58

ABSTRACT

Hydrocorals are extremely important cnidarians for ocean homeostasis and a large number of marine species directly dependent on them. In recent years, there has been an increase in the phenomenon known as "bleaching", in which hydrocorals expel their endosymbiotic algae (family Symbiodiniaceae) leaving exposed their exoskeleton constituted by CaCO_3 . This phenomenon occurs when organisms undergo stress conditions such as a rise in ocean water temperature, which is derived from global warming. After bleaching, hydrocorals end up in a state of high vulnerability caused by the loss of their food source, which leads them, in most cases, to death. A proteomic study is an excellent strategy to analyze the mechanisms involved in the etiology of hydrocoral bleaching and the consequences of thermal stress on these cnidarians. Therefore, the objective of this work was to develop a method for obtaining the total proteome from hydrocorals of the genus *Millepora* and to preliminarily analyze the proteome of bleached specimens in order to assess the effect of thermal stress on this cnidarian. In the present study, a comparison was made between ten extraction methods to standardize the appropriate conditions for obtaining the total proteome. The results obtained showed that Tris-HCl buffer method allowed obtaining a protein profile with a greater abundance of bands in SDS-PAGE (15 in normal specimens of *M. complanata* (Mc N) and 9 in bleached hydrocorals (Mc B) and a higher protein concentration (62.05 $\mu\text{g/g}$ of lyophilisate in Mc N and 59.77 $\mu\text{g/g}$ of lyophilisate in Mc B). Subsequently, separation by molecular weight and isoelectric point was performed by two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) of the proteins contained in the proteome from Mc N. The proteome from Mc B was analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry and 25 proteins were identified, of which the early endosome antigen 1 and the F_0 subunit of the ATP synthase were highlighted, since they are membrane proteins, indicating that the membrane proteins were achieved. The method we selected to obtain the proteome from *M. complanata* allowed extraction of proteins from both insoluble and soluble fractions from the total proteome. On the other hand, we were able to identify 10 proteins contained in the proteome obtained from bleached hydrocorals. These proteins have been previously reported in studies related to bleaching and thermal stress: Green fluorescent protein-Calmodulin chimera, leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase, serine/threonine-protein kinase 36-like isoform X1, four predicted proteins of *Nematostella vectensis*, polyamine oxidase 1, ATP synthase F_0 subunit 6 (mitochondrion) and early endosome antigen 1. Although it was not possible to carry out a differential expression analysis to assess the effect of thermal stress on *M. complanata*, the present study represents a valuable contribution to perform proteomic studies of

reef-building hydrozoans, and constitutes a starting point for studying the effects of bleaching caused by thermal stress on the proteome of *Millepora* species.

Keywords: *Millepora complanata*, coral bleaching, proteomics, hydrocorals.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

RESUMEN

Los hidrocorales son cnidarios sumamente importantes para la homeostasis de los océanos, ya que representan unos de los principales organismos constructores de arrecifes coralinos, los cuales constituyen el sustento de un gran número de especies que dependen directamente de ellos. En los últimos años se ha observado un aumento en el fenómeno conocido como “blanqueamiento”, en el cual los hidrocorales expulsan sus algas endosimbiontes (familia Symbiodiniaceae) dejando expuesto su exoesqueleto constituido por CaCO_3 . Este fenómeno, tan dañino para los arrecifes, ocurre cuando los cnidarios formadores de arrecifes se someten a condiciones de estrés, tales como el aumento de la temperatura del océano, derivado del calentamiento global. Los hidrocorales blanqueados quedan en un estado de alta vulnerabilidad al perder su principal fuente de alimento, lo cual los conduce, en la mayoría de los casos, a la muerte. Las investigaciones que involucran enfoques “ómicos”, tales como los estudios proteómicos, permiten analizar, desde una perspectiva más completa los mecanismos implicados en la etiología del blanqueamiento de los hidrocorales y las consecuencias del estrés térmico en estos cnidarios. En este contexto, el objetivo de este trabajo consistió en realizar un estudio proteómico en el hidrocoral *Millepora complanata* en condiciones normales (Mc N) y blanqueado *in situ* (Mc B). En el presente estudio se realizó una comparación entre diversos métodos de extracción para estandarizar las condiciones adecuadas para la obtención del proteoma total de los hidrocorales. Los resultados obtenidos mostraron que el método de extracción empleando amortiguador Tris-HCl permitió la obtención de un perfil proteico con una mayor abundancia de bandas en SDS-PAGE (15 bandas en el caso de MC N y 9 en el caso de Mc B) y una mayor concentración de proteína (62.05 $\mu\text{g/g}$ de liofilizado obtenido a partir Mc N y 59.77 $\mu\text{g/g}$ del liofilizado obtenido de Mc B). Posteriormente, se realizó la separación por peso molecular y punto isoeléctrico, mediante electroforesis bidimensional, de las proteínas presentes en los extractos de *M. complanata*. El extracto de Mc B fue analizado por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas y se identificaron 25 proteínas. Entre las proteínas identificadas destacaron el antígeno endosómico temprano 1 y la subunidad F_0 de la ATP sintasa, ya que son proteínas de membrana, lo cual indica que se logró la extracción tanto de proteínas de la fracción insoluble del proteoma como de la fracción soluble del proteoma. Por otra parte, se logró la identificación de 10 proteínas que han sido reportadas anteriormente en estudios relacionados al blanqueamiento y estrés térmico: proteína fluorescente verde-quimera de calmodulina, serina/treonina-proteína quinasa de repetición rica en leucina, serina/treonina-proteína quinasa 36 isoforma X1, cuatro proteínas predichas de *Nematostella vectensis*, poliamina oxidasa 1, subunidad 6 de la ATP sintasa F_0 mitocondrial y antígeno endosómico temprano 1. A pesar de que no se pudo realizar el análisis de expresión diferencial debido a la falta de la identificación de las

proteínas de los extractos de Mc N, el presente estudio es un aporte metodológico sumamente valioso para el estudio proteómico de organismos hidrozoos constructores de arrecifes, y un punto de partida para el estudio proteómico diferencial de los efectos del blanqueamiento provocado por estrés térmico sobre el proteoma de *M. complanata*.

Palabras clave:

Millepora complanata, blanqueamiento de arrecifes de coral, proteómica, hidrocorales.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente los estudios multidisciplinarios con enfoques "ómicos" y de biología de sistemas están tomando gran relevancia a nivel mundial. Gracias a estas nuevas metodologías es posible obtener información clave para abordar problemáticas importantes en distintas áreas como la farmacología, la patología, la ecología, etc. Dentro de las ciencias ómicas encontramos a la proteómica, la cual se dedica al estudio del conjunto de proteínas totales que se expresan en un organismo en un momento determinado o bajo ciertas condiciones ambientales. La proteómica permite obtener información sobre proteínas que se expresan diferencialmente cuando los organismos atraviesan distintas etapas del desarrollo, durante el padecimiento de una enfermedad o cuando se encuentran sometidos a variaciones en sus condiciones ambientales (Aracil et al., 2011; DeSalvo et al., 2012).

El estudio de organismos marinos es un campo muy amplio debido a la gran cantidad de especies que habitan en los ecosistemas oceánicos, además, son de gran interés para la comunidad científica al ser, muchos de ellos, organismos desconocidos o novedosos. Un grupo muy importante de organismos marinos es el filo Cnidaria, el cual está conformado aproximadamente por unas 10,000 especies, entre las cuales los más representativos son medusas, corales, hidras e hidrocorales. Los Cnidarios son organismos de gran relevancia desde un punto de vista toxinológico, farmacológico y biotecnológico debido a que poseen células llamadas cnidocitos, las cuales contienen orgánulos, llamados nematocistos, que son especializados en la producción de sustancias urticantes o tóxicas. Por esta razón, las especies del filo Cnidaria son fuentes potenciales de nuevas entidades químicas con interesantes propiedades farmacológicas (Alamo and Rivas, 2007; Slattery et al., 2012).

Los corales e hidrocorales son cnidarios formadores de arrecifes coralinos, los cuales son ecosistemas sumamente importantes, ya que un gran número de especies marinas depende de ellos. Los corales e hidrocorales viven en simbiosis con algas fotosintéticas de la familia Symbiodiniaceae. Estas algas se alojan en la capa gastrodérmica de los corales e hidrocorales y establecen, junto con los cnidarios hospederos una simbiosis mutualista. En esta relación simbiótica las algas producen metabolitos primarios como azúcares y aminoácidos a partir de la fotosíntesis. Estos productos fotosintéticos son suministrados al cnidario, y éste a cambio, les proporciona a sus simbiontes compuestos de desecho como bióxido de carbono y nitrógeno inorgánico. Mediante esta vía de alimentación autótrofa, los endosimbiontes suministran aproximadamente el 90 % de los requerimientos nutricionales del hospedero. Adicionalmente, los cnidarios sintetizan toxinas de naturaleza proteica que son empleadas para la captura de presas como una manera

de obtención de energía de forma heterótrofa (Barott et al., 2015; Fransolet et al., 2012; Hoegh-Guldberg et al., 2007; Lozoya, 1994).

Desde hace un par de décadas los corales han sido afectados por el fenómeno conocido como “blanqueamiento”, el cual se produce cuando factores de estrés presentes en el medio ambiente provocan la ruptura de la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae. Los principales estresores que detonan el blanqueamiento son: aumento de la temperatura superficial del océano, aumento en la radiación UV, y cambios en la salinidad y pH del agua. Durante un episodio de blanqueamiento, se presenta un estado de estrés oxidativo, generando por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. La presencia de especies reactivas de oxígeno generan principalmente fotoinhibición, relacionada con daños estructurales a proteínas de los cloroplastos y del sistema fotosintético de las zooxantelas, y la consecuente expulsión de las algas del huésped, por lo cual, dada la ausencia de las algas y sus pigmentos fotosintéticos, el exoesqueleto (principalmente constituido por carbonato de calcio) de los corales se torna visible, y los cnidarios adquieren un aspecto blanco (Hoegh-Guldberg et al., 2007; Obura, 2009; Veron et al., 2009).

Los hidrocorales del género *Millepora* (clase Hydrozoa) son cnidarios formadores de arrecifes coralinos susceptibles a blanqueamiento. Se conocen 13 especies que pertenecen a este género y son comúnmente conocidos como “corales de fuego” debido a la capacidad que tienen de producir sustancias urticantes. En estudios proteómicos realizados por nuestro grupo de investigación sobre *Millepora complanata*, se observó la presencia de toxinas de naturaleza proteica, entre ellas fosfolipasas A2 y hemolisinas (Rojas et al., 2002; Ibarra-Alvarado et al., 2007; García-Arredondo et al., 2015). Así mismo, en 2017 se llevó a cabo un estudio proteómico diferencial de la fracción soluble del proteoma de *Millepora complanata*, obtenida a partir de especímenes normales y blanqueados *in situ*. Dicha investigación mostró que los hidrocorales blanqueados mostraron la expresión diferencial de 35 proteínas. El blanqueamiento, provocado por estrés térmico, indujo un aumento en la expresión de 15 proteínas y una disminución en la expresión de 20 proteínas. De estas 35 proteínas se identificó la secuencia parcial de aminoácidos de 15, entre las cuales se encontraban 4 toxinas, 2 proteínas de metabolismo primario, una proteína de citoesqueleto, una proteína de señalización, 2 proteínas que participan en la reparación del ADN, una proteína de respuesta al estrés, una proteína de homeóstasis redox y una proteína de exocitosis. El blanqueamiento provocado por estrés térmico aumentó la expresión de algunas proteínas que presentaron secuencias de aminoácidos que muestran similitud con las estructuras primarias de toxinas (Hernández-Elizárraga, 2017). Sin embargo, dicho estudio se centró únicamente en la fracción soluble del proteoma y específicamente en las toxinas expresadas diferencialmente en *M. complanata*. A pesar de los estudios realizados sobre el género *Millepora*, hasta la fecha no se ha

realizado ningún estudio sobre el proteoma total de los hidrocorales y sobre el efecto del estrés térmico sobre dicho proteoma.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2. ANTECEDENTES

2.1 Proteómica y proteoma.

Los procesos biológicos y celulares son increíblemente complejos y resultan de una serie de eventos interconectados, en los cuales participa un gran número de moléculas y biomoléculas que juegan papeles clave. De manera particular, las proteínas desempeñan funciones catalíticas y estructurales importantes. El término “proteoma” deriva de las palabras “proteína” y “genoma” refiriéndose así al conjunto total de proteínas expresadas por un genoma en un determinado momento o etapa de desarrollo (Aracil et al., 2011). El estudio celular y molecular de la expresión de las proteínas y sus funciones recibe el nombre de “Proteómica”, y abarca un amplio rango de técnicas y herramientas de análisis (He and Chiu, 2003).

El proteoma es una entidad dinámica sujeta a numerosas modificaciones post-traduccionales con consecuentes implicaciones en su función. Por esta razón es necesario contar con procedimientos de alta resolución que permitan realizar su análisis (Moxon et al., 2009). Las herramientas proteómicas permiten la extracción, separación e identificación de proteínas. Dentro de las herramientas proteómicas clásicas y de mayor utilidad se encuentran la electroforesis bidimensional (para la separación de proteínas) y la espectrometría de masas (para la identificación) (Rabilloud and Lelong, 2011; Wang et al., 2014).

2.2. Aplicación de las técnicas proteómicas.

La proteómica puede ser aplicada en distintas ciencias y disciplinas, para conocer los efectos de factores ambientales sobre determinados procesos celulares. Para llevar a cabo dichos estudios se emplean distintas técnicas, entre las más reconocidas se encuentra la electroforesis bidimensional, la cual es una de las más utilizadas en la proteómica. Esta técnica resulta de gran utilidad para la separación de mezclas muy complejas de proteínas, ya que permite la separación de las proteínas por su punto isoeléctrico (primera dimensión) y por su peso molecular (segunda dimensión).

Otra técnica de separación de gran utilidad es la cromatografía líquida multidimensional, en la cual la identificación de las proteínas contenidas en el proteoma se realiza mediante espectrometría de masas (Aebbersold y Mann, 2003). Para la identificación de las proteínas se realizan cortes enzimáticos, generalmente con tripsina, con el objetivo de romper algunos de los enlaces peptídicos y de esta manera generar numerosos péptidos de tamaño adecuado para poder ser secuenciados, mediante espectrometría de masas en tándem. Estos péptidos se convierten en iones en fase gaseosa por técnicas de ionización suave y son identificados por diferentes analizadores de masas. Si la muestra es sólida se usa la ionización por desorción láser asistida con matriz (MALDI), mientras que si es

líquida se emplea la ionización por electrospray. La separación de iones por su relación masa/carga en un analizador de masas permite determinar las masas y obtener un espectro que refleja la abundancia de los iones frente al valor m/z . Usando un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS), que combina dos analizadores diferentes, se puede llevar a cabo la fragmentación de los iones peptídicos seleccionados (Aebersold and Mann, 2003; Torreblanca and Barea, 2005).

Estas técnicas son útiles al momento de estudiar las proteínas que constituyen un proteoma; algunos enfoques de los estudios proteómicos han permitido conocer la participación de las proteínas en diferentes vías y funciones celulares y analizar los efectos de algún agente tóxico o factor de estrés sobre el proteoma. Las herramientas proteómicas también han posibilitado estudiar cambios en la expresión de proteínas, lo cual ha permitido elucidar el mecanismo de acción del agente o condición que provocó dichos cambios. Dado que el proteoma responde de forma específica ante la presencia de determinados factores ambientales, esto permite estudiar el efecto de la exposición de un organismo a diferentes entornos y este conocimiento puede ser de utilidad para la identificación de biomarcadores (Torreblanca and Barea, 2005).

2.3 Proteómica de organismos marinos

La proteómica ofrece un campo de estudio muy amplio, aunque puede ser enfocado a una problemática específica. La proteómica estudia los cambios en el proteoma cuando un determinado organismo es sometido a factores de estrés, que van desde la interacción con especies depredadoras hasta cambios climáticos en su hábitat, este tipo de amenazas pueden generar cambios en la expresión y concentración de ciertas proteínas (Righetti et al., 2004). El estudio de organismos marinos es un campo de investigación prometedor, ya que es bien sabido que las especies marinas son mucho más abundantes que las terrestres, y esto se traduce en un espectro más amplio de nuevas moléculas y metabolitos por descubrir, que bien, pueden tener efectos biológicos o farmacológicos novedosos, y que en el mejor de los casos puedan ser candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos (Slattery et al., 2012).

Las técnicas proteómicas representan una excelente propuesta para el estudio de organismos marinos (Tomanek, 2011). Dentro de los datos que pueden ser obtenidos a partir de análisis proteómicos se encuentran patrones de expresión proteica, modificaciones post-traduccionales o mecanismos de interacción proteica, los cuales proporcionan información valiosa para el estudio de especies marinas (Moxon et al., 2009). Recientemente, se ha implementado el uso de las ciencias ómicas para obtener una mayor cantidad de información y las problemáticas en cuestión se han abordado desde distintos enfoques. El caso del estudio del proteoma de organismos marinos no es la excepción y los datos obtenidos de las

técnicas proteómicas son analizados mediante la bioinformática, más específicamente empleando bases de datos y software de alineamiento y comparación de proteínas, y por lo tanto, es posible elucidar su posible estructura tridimensional o su función (Riaño-Pachón et al., 2010).

2.4 Filo Cnidaria

El estudio de los organismos marinos es un campo bastante extenso debido a la gran variedad de especies que habitan el océano. Uno de los filos más interesantes dentro del ecosistema marino es el Cnidaria, del cual se han reportado aproximadamente 10,000 especies. Algunos organismos característicos de este filo son: medusas, anémonas, corales, hidrocorales, etc. Estos organismos son bien conocidos por la capacidad de sintetizar y secretar toxinas; sin embargo, no han sido estudiados a detalle como los animales terrestres (Alamo and Rivas, 2007).

2.4.1 Generalidades del filo Cnidaria

Los cnidarios se encuentran clasificados filogenéticamente en dos grandes subfilos: Anthozoa (anémonas de mar, corales y plumas de mar) que viven como pólipos sésiles y Medusozoa (medusas, avispas marinas e hidras) (Daly et al., 2007). La principal característica en las especies que conforman el filo Cnidaria es la presencia de células y orgánulos denominados cnidocitos y nematocistos, respectivamente, los cuales se encuentran localizados en sus tentáculos y cuya función es secretar sustancias urticantes empleadas para la defensa y la depredación. Un cnidocito contiene un nematocisto, formado por una cápsula con un tubo en espiral en su interior; al recibir un estímulo químico o mecánico, el tubo se evagina, la cápsula se abre y el tubo se everta; una vez que el cnidocito cumple su función, es reabsorbido y crece una célula nueva en su remplazo (Alamo and Rivas, 2007; Curtis and Schnek, 2006). Los cnidarios son organismos que poseen simetría corporal de tipo radial y en forma de saco, su aparato digestivo posee únicamente un orificio que cumple las funciones de boca, ano e incluso de expulsión de productos genitales; éste se encuentra generalmente rodeado por un cojinete de nematocistos que forman los tentáculos (Technau and Steele, 2011). Los cnidarios son diblásticos, es decir, que poseen epidermis y gastrodermis que se originan de dos tejidos embrionarios: ectodermo y endodermo; entre ambas capas se encuentra la mesoglea, una sustancia gelatinosa con una composición similar al colágeno y que les confiere la característica gelatinosa. La mesoglea puede consistir en una capa fina en el caso de los pólipos o la principal porción del cuerpo en el caso de las medusas (Figura 1) (Curtis and Schnek, 2006). Los cnidarios son organismos heterótrofos; sin embargo, existen especies que poseen la cualidad de ser autótrofos, debido a la presencia de organismos endosimbiontes que les proveen de alimento, tal es el caso de las (Frazão et al., 2017).

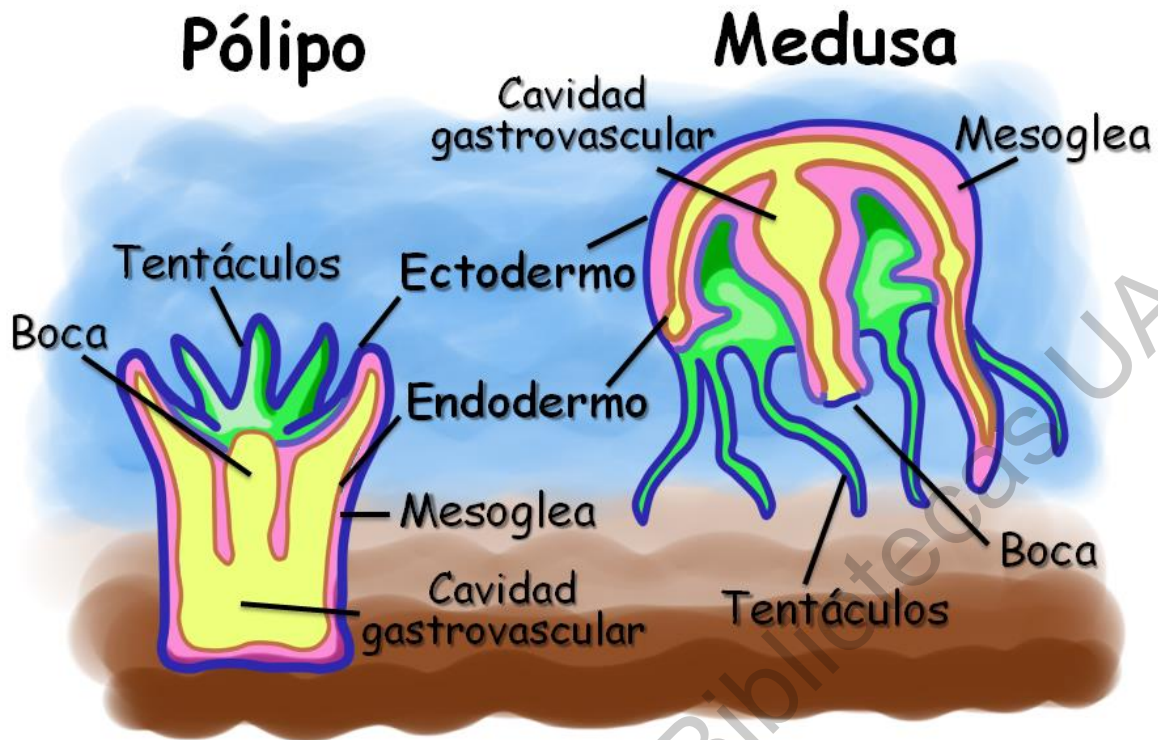


Figura 1. Morfología de los cnidarios (Modificado de Curtis and Schnek, 2006).

2.4.2 Cnidocitos y nematocistos

Los cnidarios son organismos heterótrofos gracias a la presencia de los cnidocitos, también denominados cnidoblastos. Varias especies del filo Cnidaria son depredadoras, y utilizan los orgánulos denominados cnidocistos para atacar a sus presas y también como defensa (Technau and Steele, 2011). Los cnidocistos o nematocistos son especialmente abundantes en los tentáculos y alrededor de la boca, y constan de una cápsula de naturaleza proteica que posee un largo filamento enrollado en su interior (filamento urticante). En el exterior existe un cilio o filamento sensitivo, el cnidocilio, que cuando es estimulado hace que se abra un pequeño opérculo y se dispare el filamento, descargando una sustancia que puede ser tóxica, urticante o pegajosa de acuerdo a la función y ubicación del nematocisto (Figura 2) (Curtis and Schnek, 2006; Özbek, 2011).

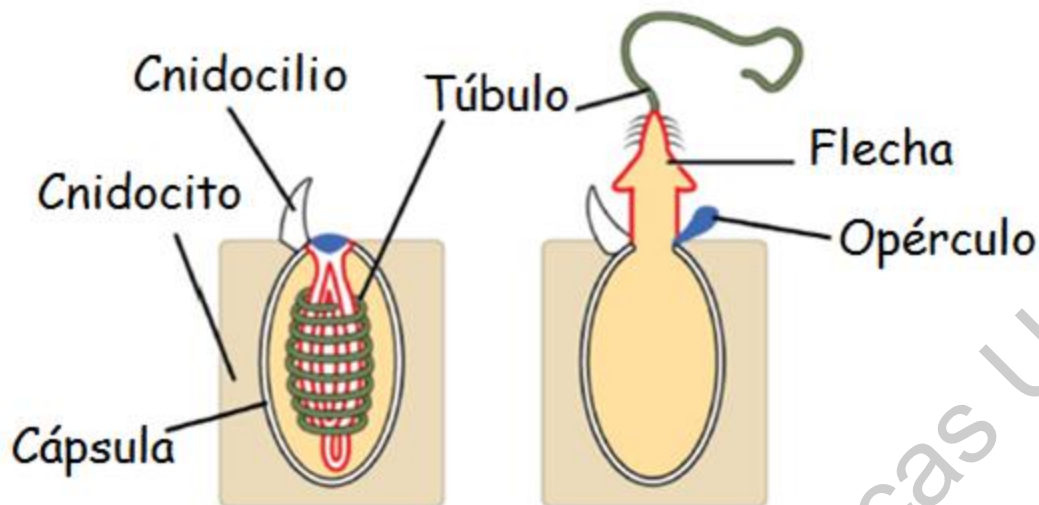


Figura 2. Cnidocito y nematocisto (Özbek, 2011).

2.5 Estudios proteómicos del filo Cnidaria

El proteoma, como se mencionó con anterioridad, es el conjunto total de proteínas de un organismo en un momento determinado; dicho de otra manera, son las proteínas expresadas y su concentración mientras el organismo se ve afectado por un factor de estrés externo o en alguna etapa de su ciclo de vida (Righetti et al., 2004). Existen escasos estudios sobre la caracterización del proteoma de algunos cnidarios, tales como *Acropora palmata* y *Pelagia noctiluca*, (Frazão et al., 2017; Lee et al., 2011; Ricaurte et al., 2016).

2.5.1 Toxinas de cnidarios

El filo Cnidaria se caracteriza por incluir especies animales sumamente venenosas, razón por la cual el estudio de la composición de sus toxinas resulta muy interesante, ya que estas moléculas son fuentes potenciales de entidades químicas novedosas para el desarrollo de nuevos fármacos y herramientas biotecnológicas y de investigación. Se estima que el veneno de los cnidarios está constituido por alrededor de 250 moléculas de naturaleza proteica (péptidos, enzimas, etc.); no obstante, también pueden estar incluidos compuestos de naturaleza no proteica (purinas y aminos biogénicas, por ejemplo). En este sentido es importante destacar que son muy pocas las estructuras tridimensionales de toxinas proteicas sintetizadas por cnidarios que han sido descritas en la literatura científica. Además, se tiene relativamente poca información respecto a los genes que codifican dichas toxinas (Frazão et al., 2017). El arsenal tóxico del veneno de los cnidarios incluye aminos biogénicas de bajo peso molecular (por ejemplo, serotonina, histamina, bunodosina y caissarona), neurotoxinas peptídicas (moduladores de canales iónicos, péptidos ricos en cisteína y otros), así como moléculas más grandes tales como enzimas (fosfolipasas y metaloproteasas), péptidos y proteínas formadores

de poros. (Anderluh et al., 2000; Frazão et al., 2017; Lee et al., 2011; Rosado et al., 2008). Las toxinas del veneno de los cnidarios se producen generalmente como pre-pro-toxinas (Brinkman et al., 2014).

2.5.2 Otras proteínas de cnidarios

Las toxinas resultan ser el principal objetivo de estudio de los científicos debido a que estas moléculas son entidades químicas interesantes y una gran parte de los estudios proteómicos de cnidarios se han enfocado precisamente en este tipo de proteínas. Sin embargo, no hay muchos estudios del proteoma completo de cnidarios, a pesar de ser una tendencia en el área de las ciencias ómicas. La información obtenida a partir de estudios proteómicos es muy valiosa. En 2016, Ricaurte *et al.*, publicaron un estudio proteómico diferencial del coral cuerno de alce (*Acropora palmata*) sometido a condiciones de estrés térmico, donde identificaron proteínas típicas del metabolismo, tales como proteínas asociadas a respuestas inmunológicas (sistema de complemento), ciclo celular, biomineralización, fosforilación oxidativa, citoesqueleto y enzimas.

2.6 Cnidarios del género *Millepora*

Las especies del género *Millepora* (clase Hydrozoa) se clasifican como hidrozoarios fijos o hidrocorales, algunos ejemplos de especies este género son *Millepora alcicornis*, *M. dichotoma*, *M. patyphylla* y *M. complanata* (Figura 3). Los hidrocorales son muy abundantes en todos los arrecifes de los mares tropicales y constituyen parte importante de los arrecifes coralinos debido a su exoesqueleto duro de carbonato de calcio. Las colonias de *Millepora* crecen como grandes placas o como formaciones incrustantes menos masivas que recubren la superficie de las rocas, su aspecto es laminar, digitiforme o arborescente. A menudo su superficie aparece recubierta de una fina pilosidad o pubescencia blanquecina, que se debe a los tentáculos extendidos de los diminutos pólipos, donde se encuentran las células urticantes. Estos hidrocorales son también conocidos como “Corales de fuego” o corales venenosos debido a las reacciones urticantes y pruriginosas que producen al tocarlos (Lozoya, 1994).

Los arrecifes de coral son fundamentales para la biología de nuestro planeta; en términos de biodiversidad, son el ecosistema marino más rico, complejo y productivo de la tierra. Por lo tanto, no es sorprendente que los organismos que constituyen estos ecosistemas produzcan una gran variedad de moléculas con características estructurales únicas que exhiben numerosas actividades biológicas, y se consideran una rica fuente de nuevos agentes bioactivos con gran potencial farmacéutico y biotecnológico (Cragg and Newman, 2013; Jain et al., 2008).

2.6.1 Hidrocorales del género *Millepora* como holobiontes

Los hidrocorales, al igual que otros cnidarios tales como corales y anemonas son un claro ejemplo de organismos holobiontes. Este término engloba al organismo

hospedero, a sus simbioses y sus microsimbioses. El término “holobionte” se refiere a entidades formadas por la asociación de diferentes especies que dan lugar a unidades ecológicas. Es decir, un holobionte es un organismo que sirve de hábitat o establece una asociación con más de un grupo taxonómico (que incluye a los microorganismos que conforman su microbiota) (Glasl et al., 2016). En los últimos años, el entendimiento de las asociaciones que establecen los corales con microorganismos ha cambiado radicalmente. En este sentido, se propone al coral como un holobionte. En cuanto a la microbiota característica de los corales se han reportado algunas bacterias asociadas a la mucosa, entre las cuales destacan las familias Endozoicimonaceae y Oxalobacteraceae. Por otra parte, el descubrimiento de una gran diversidad de microalgas endosimbioses de la familia Symbiodiniaceae ha llevado a la inclusión de la microbiología en la ecología de corales, y numerosos trabajos han sido realizados para identificar el papel que juegan estos microorganismos en la biología del coral. Por lo tanto, el hidrocoral como holobionte está constituido por cnidario-Symbiodiniaceae-microbiota (Bourne et al., 2008; Glasl et al., 2016).

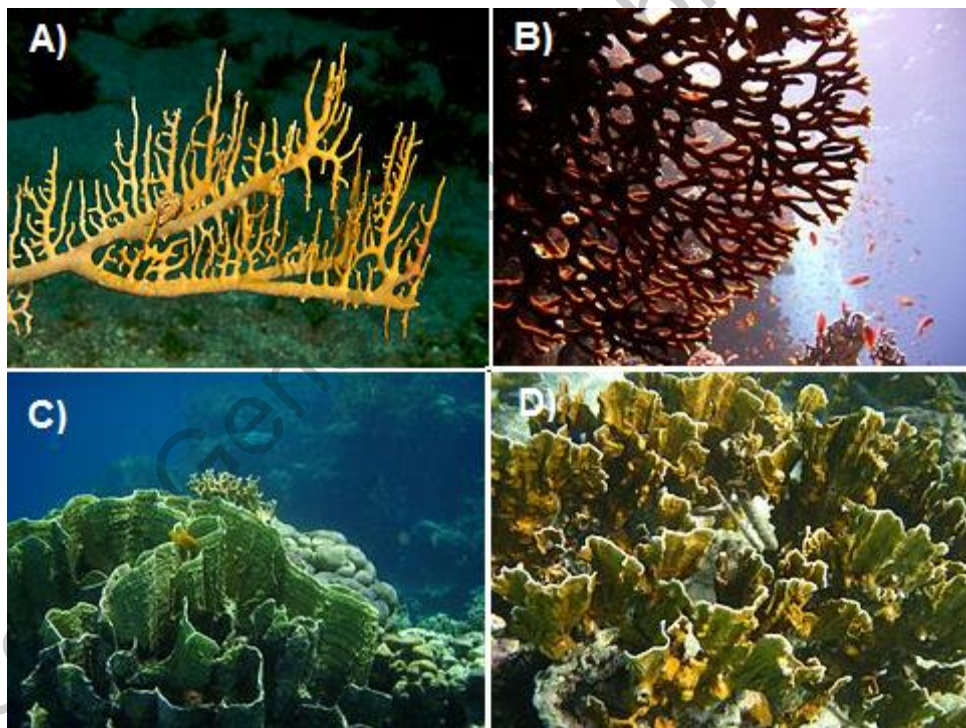


Figura 3. Ejemplos de organismos del género *Millepora*: A) *M. alcicornis*; B) *M. dichotoma*; C) *M. platyphylla*; D) *M. complanata* (Lozoya, 1994).

2.6.2 Simbiosis del género *Millepora*

Los corales e hidrocorales son holobiontes, cuya alimentación es tanto heterótrofa como autótrofa, predominando principalmente ésta última en un 70 a 90 %. Esta característica se debe a que estos organismos establecen una simbiosis mutualista

con algas de la familia Symbiodiniaceae, estas algas dinoflageladas se conocen comúnmente como zooxantelas. Generalmente son integradas a su hospedero por ingestión directa y se multiplican en los tejidos del anfitrión, específicamente en la capa gastrodérmica (Figura 4). Las algas proporcionan nutrientes variados a los hospederos mediante la producción fotosintética de oxígeno, azúcares, lípidos y aminoácidos, que son aprovechados por los pólipos. Adicionalmente, el oxígeno producido por las reacciones fotosintéticas ayuda a mantener los niveles de ATP necesarios para el proceso de calcificación. Las zooxantelas se alimentan de los productos del catabolismo del cnidario (fósforo y nitrógeno). En condiciones normales, la densidad de población de simbiosntes oscila entre 0.5 a 5×10^6 células por cm^2 de superficie (Hoegh-Guldberg et al., 2007; Fransolet et al., 2012; Barott et al., 2015).

Las zooxantelas son especies cruciales para los arrecifes coralinos, su impacto en la comunidad es extremadamente grande debido a la fracción del total de biomasa que representan. Los corales contienen diferentes géneros de Symbiodiniaceae, y son dependientes en gran medida de ellas provocando que el crecimiento del arrecife se limite a la zona fótica. Esta relación simbiótica es probablemente la responsable del gran éxito de los corales e hidrocorales como holobiontes constructores de arrecifes en las aguas tropicales; por tanto, también es clave para la supervivencia de la mayor parte de las especies coralinas, y, por consiguiente, de los propios arrecifes (Baker, 2003; Barott et al., 2015).

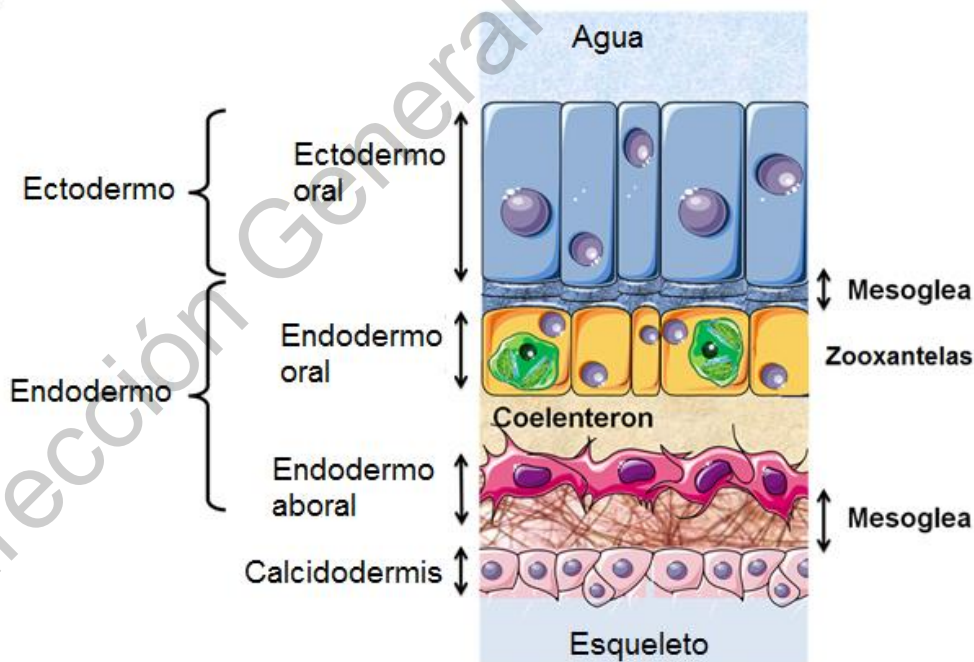


Figura 4. Localización de las zooxantelas en los cnidarios (Hoegh-Guldberg et al., 2007).

2.7 Blanqueamiento de arrecifes coralinos

Los arrecifes de coral son una parte sumamente importante de los ecosistemas marinos debido al gran número de especies que dependen directamente de ellos, a pesar de que solo constituyen alrededor del 0.1 % de la superficie del océano, son importantes fuentes de ingresos y recursos mediante el turismo, protección litoral, etc., además de que poseen un significativo valor cultural y espiritual para las comunidades costeras. Sin embargo, estas especies marinas se encuentran en estado de amenaza y en descenso debido a un fenómeno conocido como “blanqueamiento” (Veron et al., 2009).

Para abordar el tema del blanqueamiento es necesario comprender lo importante que es la temperatura ambiental en el hábitat de los corales; el calentamiento global ha provocado en los últimos años un aumento en las temperaturas de muchos ecosistemas, incluidos los sistemas oceánicos. La temperatura ambiental para los corales e hidrocorales es tan importante como la temperatura corporal para los seres humanos, de modo que, si la temperatura se ve alterada por uno o dos grados centígrados, puede tener repercusiones graves en la salud de estos holobiontes. A pesar de que la temperatura es probablemente el factor más importante en el fenómeno del blanqueamiento, cabe mencionar que también influyen significativamente los cambios en la salinidad del agua, la acidificación y la radiación UV (Anthony et al., 2008; Cao et al., 2007).

El blanqueamiento se refiere a la pérdida de la coloración característica de los corales; es bien sabido que los corales presentan coloraciones vivas y muchas tonalidades, que se deben básicamente a la pigmentación de sus organismos simbioses, las zooxantelas (Figura 5). Para que la simbiosis pueda perdurar, es necesario conservar ciertas condiciones que incluyen la temperatura, la salinidad del agua, etc. Cuando dichas condiciones no se mantienen los arrecifes entran en estado de estrés, lo que provoca que se rompa la homeostasis de la simbiosis entre los corales y las zooxantelas. Cuando se presenta esta disfunción, las zooxantelas sufren un desequilibrio en su metabolismo y para controlarlo llevan a cabo dos mecanismos: disminución de la clorofila y disminución de la biomasa relativa. La pérdida de estas algas representa un gran problema para los corales, ya que las zooxantelas aportan aproximadamente el 90 % de los nutrientes requeridos por éstos organismos, lo que los deja en un estado de alta vulnerabilidad (Hoegh-Guldberg et al., 2007; Obura, 2009).



Figura 5. Proceso del blanqueamiento de un coral y mecanismos implicados (Modificado de Weis, 2008).

Diversos estudios han demostrado que, tanto la temperatura como la alta radiación solar afecta negativamente la fotosíntesis de las zooxantelas y las conduce a un estado de estrés oxidativo donde hay un exceso en la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs), el cual puede ser provocado por fotoinhibición, además de haber daño en los cloroplastos y en el sistema fotosintético de los simbiontes, en al menos tres niveles (Weis, 2008):

1. Proteína D1: componente importante del fotosistema II (PSII), que consta de cinco hélices transmembranales y que está implicada en la fotólisis del agua.
2. RuBisCO: la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa, que cataliza dos procesos opuestos: la fijación del CO₂ a una forma orgánica y como oxigenasa del mismo sustrato.
3. Las membranas tilacoides: desacoplamiento energético del transporte de electrones en los dos fotosistemas (I y II), por lo cual se continúan generando electrones, pero se deja de producir ATP y NADP.

El exceso de electrones producidos reduce O₂ en lugar de NADP y produce el ion superóxido O₂⁻, que puede ser reducido por la superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que es menos reactivo, pero aún perjudicial y más estable. El H₂O₂ puede reaccionar con hierro ferroso (Fe²⁺) para formar una especie aún más reactiva, el radical hidroxilo (·OH). Además, el exceso de electrones puede reaccionar fotoquímicamente con pigmentos y O₂ para generar en última instancia, oxígeno atómico altamente reactivo (¹O₂) (Figura 6) (Weis, 2008).

Las EROs dañan biomoléculas de los endosimbiontes y desempeñan un papel clave en la transducción de señales de los mediadores del daño celular y en procesos tales como apoptosis, autofagia y necrosis (Bhagooli, 2013). Estas vías de respuesta al daño celular son importantes durante el blanqueamiento y dependen de la intensidad y duración del estrés. Además, se ha propuesto que el blanqueamiento en sí mismo es un mecanismo de control para minimizar los efectos nocivos causados por el desequilibrio metabólico en la simbiosis cnidario-alga (Weis, 2008; Wooldridge, 2013). Es importante mencionar que este fenómeno tiene gran impacto ecológico y económico. Una parte importante de la población mundial es ignorante de esta situación, ya que no está constantemente en contacto con los ecosistemas marinos; sin embargo, los corales son el hogar de más de una cuarta parte de todas las especies que habitan el océano, proporcionan protección costera, y apoyan a más de 10 millones de personas que viven en las costas tropicales. Los bienes económicos y los servicios ecosistémicos de los arrecifes de coral tienen un valor de más de US \$ 20 billones anuales (Anthony, 2016; Roth, 2014; Williams et al., 2017).

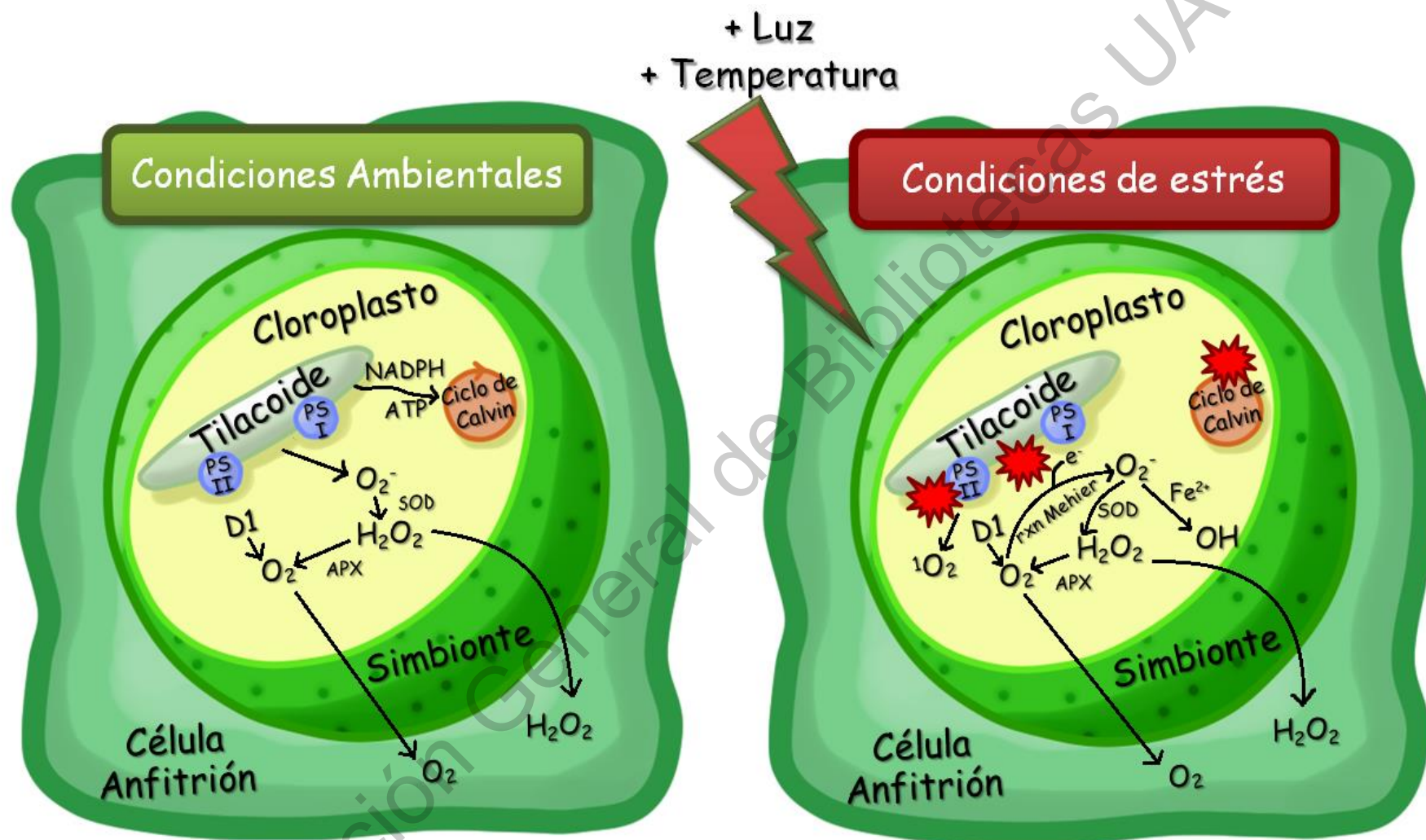


Figura 6. Proceso del blanqueamiento de un coral y mecanismos implicados (Modificado de Weis, 2008).

2.8 Impacto de las ómicas en el estudio del blanqueamiento

A pesar de la importancia que tiene el blanqueamiento de arrecifes coralinos, y lo necesario que son las propuestas para solucionar dicho problema, los mecanismos moleculares implicados en la etiología y las consecuencias de este fenómeno todavía no se comprenden en su totalidad. Es importante mencionar que las ciencias ómicas han sido de gran ayuda para abordar el estudio de esta problemática, ya que técnicas como la expresión génica (genómica) han contribuido a comprender la forma en que los seres vivos responden ante el estrés. Las diferentes disciplinas ómicas en su conjunto han posibilitado una comprensión más amplia de los mecanismos involucrados en la respuesta de los cnidarios constructores de arrecifes ante el aumento de la temperatura del agua de los océanos. Se ha demostrado, por ejemplo, que en los corales sometidos a estrés térmico se aumenta la expresión de proteínas antioxidantes y proteínas de choque térmico, ocurre una disminución del crecimiento, un desbalance en los mecanismos de homeostasis de calcio, desequilibrio en la organización del citoesqueleto y una señalización y transcripción alterada (Barshis et al., 2013; DeSalvo et al., 2012).

2.8.1 Estudios relacionados con el blanqueamiento

El blanqueamiento masivo de los corales representa la mayor amenaza a la integridad y funcionalidad de los arrecifes coralinos (Krueger et al., 2015). Existen cinco mecanismos propuestos para la pérdida o liberación de los endosimbiontes de los tejidos de los cnidarios hospederos, a causa del estrés térmico que provoca blanqueamiento (Gates et al., 1992):

Tabla 1. Mecanismos propuestos para la pérdida o liberación de los endosimbiontes de los tejidos de los cnidarios hospederos (Gates et al., 1992)

Mecanismos en la pérdida de endosimbiontes de los cnidarios	
Degradación in situ y digestión de los simbiontes	(Steen and Muscatine, 1987)
Exocitosis del simbiote	(Searle et al., 1982)
Separación de la célula hospedera del resto de las células de los tejidos del cnidario	(Searle et al., 1982)
Necrosis de la célula hospedera	(Glider, 1985)
Apoptosis del hospedero	(Gates et al., 1992)

Se encontrado evidencia que demuestra que existe una expresión aumentada de proteínas requeridas para la exocitosis en una fracción de simbiontes del coral *Stylophora pistillata*. Estas proteínas incluyen antagonistas vesiculares y proteínas SNAREs (por sus siglas en ingles “receptores de proteínas de fijación soluble de NSF”), que por análisis proteómico comparativo, usando la reciente publicación del proteoma de *Acropora digitifera*, pudieran ser codificadas por el hospedero

(SNAREs Blanco) o por el simbionte (SNAREs vesiculares). Se ha postulado que el ensamblado de las SNARE utiliza proteínas SNARE vesiculares del endosimbionte, de tal manera que se desencadena una señal iniciada por el estrés, para iniciar la salida del simbionte. De esta manera, resulta evidente que la expulsión del simbionte no es un proceso unilateral que depende exclusivamente del cnidario (Weston et al., 2015).

2.8.2 Estudios transcriptómicos relacionados al blanqueamiento

Al tratarse de una problemática alarmante, se han realizado estudios con distintos enfoques para proponer mecanismos implicados en la etiología y consecuencias del blanqueamiento y de la misma manera comenzar a generar soluciones. Entre los distintos estudios, se encuentran aquellos realizados empleando un enfoque transcriptómico. En un estudio llevado a cabo por Richier et al se sometió a estrés térmico y radiación UV a la anémona *Anthopleura elegantissima*. Se encontró una expresión diferencial de genes que codifican para proteínas del citoesqueleto, proteínas que participan en diversas rutas metabólicas, e proliferación celular, apoptosis y transporte (Richier et al., 2008).

En 2010, De Salvo et al., realizaron un estudio sobre de los efectos del blanqueamiento producido por estrés térmico en el coral *Acropora palmata*. Dicho estudio evidenció modificaciones en genes que codifican para proteínas chaperonas, de estabilización y reparación de ácidos nucleicos y de remoción de macromoléculas dañadas (DeSalvo et al., 2010). Por otro lado, De Salvo et al., en 2012 determinaron que, de manera similar a lo que ocurre con el estrés térmico, el estrés inducido por oscuridad induce modificaciones en la expresión de genes que codifican para proteínas chaperonas y de mecanismos antioxidantes en *A. palmata* (DeSalvo et al., 2012). Moya et al., en 2012 realizaron un estudio de los efectos del blanqueamiento en el organismo *Anemonia viridis* donde se observaron cambios y un aumento en la expresión de transcritos que participan en diversas vías de señalización de muerte celular y homeostasis del calcio (Moya et al., 2012).

2.8.3 Estudios proteómicos relacionados al blanqueamiento

El estudio de los efectos del blanqueamiento sobre cnidarios también se ha abordado con enfoques proteómicos. El proteoma soluble comprende todas aquellas proteínas hidrofílicas que se encuentran tanto en el interior como en el exterior de las células, incluyendo las toxinas en el caso de los organismos venenosos. En tanto que el proteoma total engloba tanto a las proteínas hidrofílicas como a las lipofílicas (aquellas que se incrustan en membranas lipídicas). Entre las investigaciones sobre el blanqueamiento realizadas mediante un enfoque proteómico, se reportó un estudio diferencial del proteoma total de *Acropora microphthalma* sometida a estrés térmico y lumínico. En esa investigación se encontró la expresión diferencial de proteínas involucradas en la homeostasis redox

y el metabolismo del calcio. De igual manera se observó un aumento en la expresión de la anhidrasa carbónica, posiblemente como un mecanismo para restaurar el pH intracelular disminuido por la pérdida de la actividad fotosintética de los simbiontes. Se encontró también un aumento en la expresión de calmodulina. No se detectaron proteínas de la familia de las caspasas asociadas a la apoptosis celular, con excepción de la chaperona mediadora de la autofagia HSP70, lo que sugiere que la expulsión de las algas y la disfunción fotosintética no fueron causadas por ruptura de la simbiosis mediada por el anfitrión (Weston et al., 2015).

En 2016, Ricaurte et al. realizaron un estudio de los efectos del blanqueamiento inducido por estrés térmico sobre el proteoma de *Acropora palmata*. En este cnidario se observó una sobreexpresión de proteínas relacionadas con la respuesta ante el estrés térmico, respuesta a radiación UV, apoptosis y ciclo celular (Ricaurte et al., 2016). Por otro lado, en 2017, Oakley et al. realizaron un estudio diferencial del proteoma total de *Aiptasia* spp., en dicho estudio se indujo blanqueamiento de la anemona mediante estrés térmico y se encontró una diferencia significativa en la abundancia de 104 proteínas relacionadas con la síntesis y el plegamiento de proteínas, homeostasis redox y metabolismo central (Oakley et al., 2017). En 2018, se realizó otro estudio diferencial de los efectos del estrés térmico en el proteoma total del coral *Pocillopora acuta*, en el cual se observó una expresión diferencial de 60 proteínas asociadas a distintas funciones como respuesta a estrés, inmunidad, reproducción y citoesqueleto (Mayfield et al., 2018).

Así mismo, en nuestro grupo de investigación también se llevó a cabo un estudio proteómico del efecto del blanqueamiento provocado por estrés térmico sobre el proteoma soluble del hidrocoral *Millepora alcicornis*. En ese trabajo se observó una expresión diferencial de 17 proteínas relacionadas a excitosis, homeostasis de calcio, organización del citoesqueleto y toxinas, entre las cuales se encontraban una metaloproteasa, una fosfolipasa A2 (PLA2) y una actitoxina (Olguín-López et al., 2019).

Por otra parte, nuestro grupo también realizó un estudio proteómico diferencial entre especímenes normales y blanqueados *in situ* de *Millepora complanata*. El blanqueamiento fue provocado por estrés térmico y éste indujo un aumento en la expresión de 15 proteínas y una disminución en la expresión de 20 proteínas. De éstas 35 proteínas se identificó la secuencia de aminoácidos de 15, entre las cuales se encontraban 4 toxinas, 2 proteínas de metabolismo primario, una proteína de citoesqueleto, una proteína de señalización, 2 proteínas que participan en la reparación del ADN, una proteína de respuesta al estrés, una proteína de homeostasis redox y una proteína de excitosis. El blanqueamiento provocado por estrés térmico aumentó la expresión de algunas proteínas que presentan secuencias de aminoácidos que muestran similitud con las estructuras primarias de

toxinas tales como: una PLA2, la echotoxina-2, la delta actitoxina y una toxina metaloproteasa tipo astacina 5, y por otra parte, disminuyó la expresión de una proteína que presenta homología con una (Hernández-Elizárraga et al., 2019). Sin embargo, dicho estudio se centró únicamente en proteoma soluble.

Los estudios sobre los efectos del estrés térmico sobre el proteoma soluble de cnidarios constructores de arrecifes son muy escasos y han puesto en evidencia que el aumento de la temperatura induce cambios significativos en el proteoma de corales e hidrocorales. Evidentemente, es necesario continuar investigando, mediante herramientas proteómicas, cual es el impacto del calentamiento global sobre los mecanismos celulares de supervivencia de los cnidarios.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

3. JUSTIFICACIÓN

El calentamiento global ha provocado un aumento del fenómeno conocido como “blanqueamiento” de arrecifes coralinos, y consecuentemente ha incrementado la muerte de estos ecosistemas; se estima que a la actualidad se ha perdido casi un 40 % de la gran barrera de coral en Australia, y aproximadamente un 20 % del arrecife mesoamericano. Esto ha provocado que el 75 % de las especies constructoras de arrecifes se encuentren amenazadas, lo cual afecta directamente al 25 % de especies marinas dependientes de estos ecosistemas. Otro sector que se ve sumamente afectado abarca las actividades económicas derivadas de los sistemas arrecifales, tales como la pesca y el turismo (Williams et al., 2017; TNCO, 2017; TNCO, 2018). Considerando el gran impacto negativo que el fenómeno del blanqueamiento está teniendo en el ecosistema marino global, es evidente que es necesario continuar con la investigación de esta problemática, mediante la realización de estudios inter y transdisciplinarios, a fin de tener una comprensión más amplia de los procesos celulares que se ven afectados en todos los organismos que componen el holobionte: Cnidario-Symbiodiniaceae-microbiota asociada. Se han realizado numerosos estudios sobre las consecuencias que provocan el estrés térmico y la alta radiación UV, principalmente en cnidarios de la clase Anthozoa, empleando enfoques transcriptómicos. Estas investigaciones han demostrado que, después de un evento de blanqueamiento, ocurren cambios en la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas a diversos procesos celulares, tales como ciclo celular, apoptosis, muerte celular, homeostasis redox, homeostasis del calcio, metabolismo central y transporte intracelular (Richier, et al., 2008; DeSalvo et al., 2010; Moya, et al., 2012). El blanqueamiento también ha sido estudiado mediante un enfoque proteómico. En este sentido, en un estudio realizado sobre *Acropora microphthalma* se encontró que, tras un evento de blanqueamiento, se observaron cambios en la expresión de proteínas relacionadas a la homeostasis del calcio y el estado redox. Mientras que en *Acropora palmata* se observó una sobreexpresión de proteínas relacionadas con el estrés térmico, respuesta a radiación UV, apoptosis, funciones de ciclo celular y caspasa 8 (Weston et al., 2015; Ricaurte et al., 2016). Por otro lado, con respecto a organismos del género *Millepora*, Olguín-López et al., reportó en 2019 la expresión diferencial de proteínas relacionadas a exocitosis, homeostasis de calcio, organización de citoesqueleto y toxinas en *Millepora alcicornis*. En cuanto a *Millepora complanata*, se realizó un estudio proteómico comparativo de los proteomas solubles obtenidos de especímenes normales y blanqueados de este hidrocoral. Este estudio mostró que el estrés térmico provocó la expresión diferencial de 35 proteínas, de las cuales se identificaron 15, entre ellas se encontraron 2 de metabolismo primario, 1 de citoesqueleto, 1 de señalización, 2 de reparación de ADN, 1 de respuesta al estrés, 1 de homeóstasis redox, 1 de exocitosis y 1 de homeostasis de calcio. Cuatro de

las proteínas, cuyos niveles fueron mayores en especímenes blanqueados, presentaron estructuras primarias similares a toxinas (2 toxinas formadoras de poro, 1 PLA2 de secreción y 1 metaloproteasa). Por otra parte, se observó una disminución de la expresión de una proteína que presenta homología con una iPLA2 (Hernández-Elizárraga et al., 2019). Es importante resaltar que el estudio realizado por Hernández-Elizárraga et al., se centró únicamente en la fracción soluble del proteoma. Además, cabe destacar que a la fecha se han publicado solo cuatro estudios proteómicos sobre el blanqueamiento en organismos de la clase Anthozoa y dos, realizados por nuestro grupo de trabajo, en cnidarios de la clase Hydrozoa (*M. alcicornis* y *M. complanata*). Resulta evidente que es muy importante continuar con el estudio acerca de las consecuencias del estrés térmico en organismos constructores de arrecifes de la clase Hydrozoa. En este contexto, se planteó el presente proyecto de investigación que tuvo como objetivo general desarrollar una metodología adecuada para la obtención del proteoma total de cnidarios del género *Millepora* a fin de posibilitar la realización de estudios proteómicos diferenciales para conocer el efecto del estrés térmico sobre los hidrocorales, de tal manera que se posibilite una comprensión más amplia de los procesos celulares que se ven afectados en condiciones de blanqueamiento, así como también si existe alguna relación filogenética o similitud entre las respuestas de organismos de distintas clases. Los estudios proteómicos realizados sobre el blanqueamiento de los hidrocorales contribuirán a proponer un modelo integral de los efectos del estrés térmico sobre los procesos celulares de supervivencia de los organismos del género *Millepora* y constituir la base para el diseño de estrategias que contribuyan a la conservación de estos organismos.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál la metodología más adecuada para obtener el proteoma total de cnidarios del género *Millepora* y cuál es el efecto del estrés térmico responsable del blanqueamiento de arrecifes coralinos sobre el proteoma del holobionte del “coral de fuego” *Millepora complanata*?

5. HIPÓTESIS

La disrupción de la simbiosis causada por el estrés térmico responsable del blanqueamiento produce cambios en proteoma del “coral de fuego” *Millepora complanata*.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Desarrollar una metodología para la obtención del proteoma total de organismos del género *Millepora* y explorar, de manera preliminar, el efecto de la disrupción de la simbiosis causada por el estrés térmico responsable del blanqueamiento sobre el proteoma total del “coral de fuego” *Millepora complanata*.

6.2 Objetivos específicos

- 1.- Obtener especímenes normales y blanqueados de *M. complanata*.
- 2.- Desarrollar una metodología que permita la obtención del proteoma total de especímenes normales y blanqueados de *M. complanata*.
- 3.- Obtener el proteoma total de especímenes normales y blanqueados de *M. complanata*.
- 4.- Analizar el perfil electroforético de los proteomas totales obtenidos a partir de especímenes normales y blanqueados de *M. complanata*, mediante electroforesis uni- y bi-dimensional.
- 4.- Determinar el efecto del estrés térmico responsable del blanqueamiento sobre la concentración de proteínas totales presentes en los proteomas totales obtenidos a partir de especímenes normales y blanqueados de *M. complanata*.
- 5.- Determinar la identidad de las proteínas contenidas en el proteoma total de especímenes blanqueados de *M. complanata*, mediante un sistema de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material de estudio

Fragmentos del hidrocoral *Millepora complanata* normal y blanqueado *in situ*.

7.2 Equipos

- Microscopio BA-210 (Motic)
- Cámara de isoelectroenfoco i12 Bio-Rad
- Foto-documentador Chemidoc Mp Bio-Rad

- Cortador de geles de electroforesis bidimensional EXQuest Spot Cutter Biorad
- Espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF 4800 (INMEGEN, Edo. De México)
- Citómetro de flujo EPICS Profile-II

7.3 Estándares

Marcadores de peso molecular (Bio-rad cat # 161-0318).

7.4 Métodos

7.4.1 Obtención de especímenes de *M. complanata*

La recolección de especímenes de *M. complanata* se llevó a cabo en la zona conocida como "La bocana chica" la cual pertenece al Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo, México, en 2015 y 2016 (Permiso no. PFP/DGOPA-139/15), para evitar el muestreo de clones idénticos, los especímenes se recolectaron de 3 colonias separadas por al menos 10 m de distancia. Para el corte de los fragmentos se utilizó cincel y martillo, y los especímenes fueron recolectados mediante inmersiones de buceo a profundidades de 4 a 6 metros por parte de técnicos especializados del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM (ICMyL). Una vez concluida la colecta, dichos especímenes fueron trasladados inmersos en nitrógeno líquido al Laboratorio de Investigación Química Farmacológica de Productos Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro para la realización de los estudios proteómicos.

7.4.2 Evaluación de diferentes métodos para la obtención del proteoma a partir de los especímenes de *M. complanata*

Debido a que no está reportada en la literatura la forma de obtención de proteoma total de organismos del género *Millepora*, fue necesario en primer término, estandarizar las condiciones de extracción que permitieran la obtención del mayor número posible y la mayor concentración de las proteínas contenidas en los proteomas totales de los hidrocorales.

7.4.2.1 Métodos para la obtención y disrupción de tejido

Se probaron un total de cuatro metodologías para la disrupción del tejido de los fragmentos de los hidrocorales.

A) Método por limado.

Se tomó un fragmento de hidrocoral normal de 4.12 g y se colocó en una cápsula de porcelana manteniendo una temperatura de 4 °C en hielo. Posteriormente, con una lima metálica se procedió a limar la superficie del fragmento. El tejido obtenido se recuperó en la cápsula de porcelana y se empleó para probar los diferentes métodos de extracción de proteínas totales.

B) Método por molienda

Se tomó un fragmento de hidrocoral normal de 6.64 g y se colocó en un mortero. Posteriormente se procedió a realizar una molienda empleando un pistilo y nitrógeno líquido. El material pulverizado obtenido fue utilizado para probar los diferentes métodos de extracción de proteínas totales.

C) Método por raspado

Se tomó un fragmento de hidrocoral normal de 4.78 g y se colocó en una caja de Petri estéril a 4 °C. Posteriormente, se agregó la solución de extracción a probar y se procedió a raspar la superficie del fragmento, empleando un rayador de vidrio Dremel Engraver. El extracto se recuperó en la caja de Petri y posteriormente, fue centrifugado a 10,000 g por 10 min a 4 °C para precipitar el exceso de CaCO₃ y los componentes celulares de mayor tamaño.

D) Método por raspado y liofilización del extracto

Se tomó un fragmento de hidrocoral normal de 27.82 g y se colocó en una caja de Petri estéril a 4 °C. Posteriormente, se agregó la solución de extracción a probar y se procedió a raspar la superficie del fragmento, el extracto se recuperó en la caja de Petri y fue centrifugado a 10,000 g por 40 min a 4 °C. Posteriormente, el sobrenadante recuperado se filtró utilizando acrodiscos Titan 3 NYLON de 0.45 µm y el filtrado fue liofilizado hasta eliminar por completo el agua. Después, el liofilizado fue resuspendido en 1 ml de agua destilada y desionizada para su posterior diálisis, empleando una membrana de diálisis con un diámetro de poro de 3 kDa durante 24 horas, realizando un recambio del agua destilada cada 6 - 8 hrs. La solución dializada fue liofilizada hasta eliminar por completo el agua. Finalmente, el liofilizado fue almacenado a -70 °C.

7.4.2.2 Obtención de proteoma mediante amortiguadores de extracción y soluciones de precipitación para proteínas totales

Se probaron un total de 10 sistemas de extracción distintos, previamente reportados en la bibliografía, para la obtención del proteoma total de *M. complanata*, los cuales diferían entre sí en la composición de las soluciones de extracción y de precipitación para proteínas.

A) Obtención del proteoma mediante precipitación con sulfato de amonio

El método para la obtención de proteoma mediante precipitación con sulfato de amonio fue previamente reportado para las semillas de plantas de los géneros *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae* y *Saxifragaceae*, por Osborn et al., en 1995. Para realizar la extracción, a cada muestra preparada mediante los diferentes métodos de disrupción de tejido previamente descritos, se le adicionó un amortiguador de fosfato con la siguiente composición: NaH₂PO₄ 1.5 %, KCl 1 mM, EDTA 2 mM y PVP al 1.5 %; pH = 7.5. Cada uno de los extractos obtenidos se dejó reposar a 4 °C toda la noche; después se centrifugaron a 10.000 g por 5 min a 4 °C.

A los sobrenadantes así obtenidos, se les agregó sulfato de amonio en polvo hasta obtener una suspensión al 50 % de esta sal y se dejó precipitar durante toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 g por 10 min a 4 °C y los pellets se re-suspendieron en amortiguador de fosfato y se almacenaron a 4 °C hasta su uso en los análisis de electroforesis.

B) Obtención del proteoma mediante precipitación con TCA-acetona

El método para la obtención de proteoma mediante precipitación con TCA-acetona fue previamente reportado en las semillas de la planta *Pentacalia nítida* por López-Quimbayo en 2012. Las muestras obtenidas a partir de los métodos de limado y molienda fueron homogenizadas adicionándoles 0.0025 g de PVP. A los homogenizados obtenidos se les adicionó acetona fría y se centrifugaron a 10.000 g por 3 min a 4 °C, este paso se realizó 3 veces. Posteriormente, a los homogenizados y a un fragmento de hidrocoral (método de raspado) se les adicionaron 10 mL de amortiguador de fosfatos con la siguiente composición: NaH₂PO₄ 1.5 % PVP, 10 mM KCl y 2 mM EDTA, pH 7.5. Los homogenizados se dejaron en extracción por 2 horas a 4 °C y después los extractos obtenidos se centrifugaron a 12.000 g por 20 min a 4 °C. Se recuperaron los sobrenadantes, a los cuales se les adicionó una solución de precipitación que contenía 10 % de ácido tricloroacético (TCA) y 0.07% de β-mercaptoetanol en 2 mL de acetona fría. Posteriormente, las muestras se dejaron precipitar toda la noche a -20 °C y después se centrifugaron a 12.000 g por 20 min a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes y a los pellets obtenidos se les adicionaron 400 µL de acetona fría y se centrifugaron a 10.000 g por 5 min a 4 °C, este procedimiento se realizó 3 veces. Finalmente, el remanente de acetona presente en los pellets se dejó evaporar y éstos se resuspendieron en amortiguador de fosfatos hasta su análisis mediante electroforesis.

C) Obtención del proteoma mediante amortiguador fenol-Tris

El método para la obtención de proteoma mediante amortiguador fenol-Tris fue previamente reportado en las semillas de la planta *Pentacalia nítida* por López-Quimbayo en 2012. Las muestras obtenidas a partir de los métodos de limado y molienda fueron homogenizadas adicionándoles 0.0025 g de PVP. Posteriormente a los homogenizados y a un fragmento de hidrocoral (método de raspado) se les adicionaron 2 mL de amortiguador de extracción que contiene: Tris-HCl 500 mM, EDTA 50 mM, sacarosa 700 mM, KCl 100 mM, 2 % de β-mercaptoetanol y Pefabloc 4 mM a un pH = 8. Después, los extractos obtenidos se agitaron en hielo por 5 min y posteriormente, se les agregaron 2 mL de amortiguador Tris saturado con fenol. Las soluciones se dejaron en reposo durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10.000 g por 10 min. Se recuperó la fase superior fenólica y se les adicionó 2 mL de amortiguador de extracción, se agitó y se centrifugó 10.000 g por 10 min. Posteriormente se recuperó la fase fenólica y se le adicionaron 4 volúmenes

de solución de precipitación que contiene: acetato de amonio 0.1 M en metanol, y se dejó en reposo toda la noche a -20°C. Por último, se centrifugó a 10.000 g por 10 min y los pellets fueron resuspendidos en amortiguador de fosfatos hasta su análisis mediante electroforesis.

D) Obtención del proteoma mediante amortiguador Tris-HCl

El método para la obtención de proteoma mediante amortiguador Tris-HCl fue previamente reportado en las hojas de la planta *Olea europaea* por Wang et al., en 2003. Para realizar la extracción, a las muestras obtenidas por los métodos de limado y molienda, y a un fragmento de hidrocoral (método de raspado) se les adicionó un amortiguador de extracción constituido por: Tris 50 mM, NaCl 0.1 M, EDTA 5 mM, β -mercaptoetanol 20 mM y llevado a un pH = 7.5 utilizando HCl. Los extractos se agitaron en hielo por 5 min y después, se centrifugaron a 10.000 g por 10 min. Posteriormente, se recuperaron los sobrenadantes y a éstos se les agregó el volumen necesario de acetona, previamente enfriada a 4 °C, para obtener al final una solución con una proporción del 80 % de acetona. Después, estas soluciones se dejaron reposar toda la noche a -20 °C y posteriormente, se centrifugaron a 10.000 g por 10 min. Finalmente, se recuperó el pellet y el remanente de acetona presente se dejó evaporar, por último, el pellet se resuspendió en amortiguador de fosfatos hasta su análisis mediante electroforesis.

E) Obtención del proteoma mediante amortiguador de rehidratación

El método para la obtención de proteoma mediante amortiguador de rehidratación fue previamente reportado en el coral *Acropora palmata* por Ricaurte et al., en 2016. Empleando la metodología de disrupción de tejido mediante raspado, se adicionó a un fragmento de hidrocoral un amortiguador de rehidratación constituido por: Urea 9.5 M, 3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato (CHAPS) 2 % y Ditiotreitól (DTT) 1 %. Posteriormente, el extracto fue centrifugado a 10,000 g por 10 min, y al sobrenadante recuperado se le agregó un volumen necesario de acetona, previamente enfriada a 4 °C, para obtener al final una solución con una proporción del 80 % de acetona. Después, esta solución se dejó reposar toda la noche a -20 °C y posteriormente, se centrifugó a 10.000 g por 10 min. Finalmente, se recuperó el pellet y el remanente de acetona presente se dejó evaporar, por último, el pellet se resuspendió en amortiguador de fosfatos hasta su análisis mediante electroforesis.

F) Obtención del proteoma mediante amortiguador con Urea 8 M

El método para la obtención de proteoma mediante amortiguador con Urea 8 M fue previamente reportado en el coral *Acropora microphthalmia* por Weston et al., en 2015. Empleando la metodología de disrupción de tejido mediante raspado, se adicionó a un fragmento un amortiguador de rehidratación constituido por: Urea 8 M, EDTA 0.5 M, SDS 2 %, DTT 1 %. El extracto fue posteriormente centrifugado a 10,000 g por 10 min y al sobrenadante recuperado se le agregó un volumen

necesario de acetona, previamente enfriada a 4 °C, para obtener al final una solución con una proporción del 80 % de acetona. Después, esta solución se dejó reposar toda la noche a -20 °C y posteriormente, se centrifugó a 10.000 g por 10 min. Finalmente, se recuperó el pellet y el remanente de acetona presente se dejó evaporar, por último, el pellet se resuspendió en amortiguador de fosfatos hasta su análisis mediante electroforesis.

G) Obtención del proteoma mediante amortiguador para fracción soluble y amortiguador para fracción insoluble.

El método para la obtención de proteoma mediante amortiguadores para fracción soluble e insoluble fue previamente reportado en la anemona *Bunodactis verrucosa* por Dominguez-Pérez et al., en 2018. Empleando la metodología de disrupción de tejido mediante raspado, se adicionó a un fragmento de hidrocoral un amortiguador para fracción soluble constituido por: Tris 40 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM y llevado a un pH = 7.5 utilizando HCl. El extracto fue posteriormente centrifugado a 10,000 g por 10 min, se recuperó el sobrenadante, el cual corresponde a la fracción soluble del proteoma y se almacenó a -20 °C. Por otra parte, el pellet fue recuperado y se resuspendió en un amortiguador para fracción insoluble constituido por: Urea 7 M, Tiourea 2 M, DTT 65 mM y CHAPS 4 %, posteriormente se centrifugó a 10,000 g por 10 min. Finalmente, se recuperó el pellet y se resuspendió en amortiguador de fosfatos hasta su análisis mediante electroforesis.

H) Obtención del proteoma mediante amortiguador base fenol

El método para la obtención de proteoma mediante amortiguador base fenol fue previamente reportado en los corales *Acropora hyacinthus*, *Acropora humilis*, *Acropora muricata* por Cheng et al., en 2018. Empleando la metodología de disrupción de tejido mediante raspado, se adicionó a un fragmento de hidrocoral un amortiguador base fenol constituido por: EDTA 10 mM, β-Mercaptoetanol 2 %, Na₂B₄O₇ 50 mM, Vitamina C 50 mM, Tritón X-100 1 %, Tris 10 mM y Sacarosa 30 %. Posteriormente, el extracto fue centrifugado a 10,000 g por 10 min, el sobrenadante fue recuperado y a éste se le agregó una suspensión de sulfato de amonio 50 % en metanol. Esta suspensión se dejó reposar toda la noche a -20 °C y posteriormente, se centrifugó a 10.000 g por 10 min. Finalmente, se recuperó el pellet y el remanente de metanol presente se dejó evaporar, por último, el pellet se resuspendió en amortiguador de fosfatos hasta su análisis mediante electroforesis.

I) Obtención del proteoma mediante amortiguador de ácido bórico

El método de amortiguador ácido bórico fue previamente reportado para la obtención de RNA de los frutos del cactus *Opuntia* spp por Valderrama-Cháirez et al., en 2002. Empleando la metodología de disrupción de tejido mediante raspado, se adicionó a un fragmento de hidrocoral un amortiguador de ácido bórico constituido por: Tris 150 mM, SDS 2%, β -mercaptoetanol 1%, EDTA 100 mM y saturado con H₃BO₃. El extracto fue posteriormente centrifugado a 10,000 g por 10

min y al sobrenadante recuperado se le agregó un volumen necesario de acetona, previamente enfriada a 4 °C, para obtener al final una solución con una proporción del 80 % de acetona. Después, esta solución se dejó reposar toda la noche a -20 °C y posteriormente, se centrifugó a 10.000 g por 10 min. Finalmente, se recuperó el pellet y el remanente de acetona presente se dejó evaporar, por último, el pellet se resuspendió en amortiguador de fosfatos hasta su análisis mediante electroforesis.

J) Obtención del proteoma mediante separación de simbioses

El método para la separación de los simbioses fue previamente reportado en el coral *Acropora aspera* por Hillyer et al., en 2017. Empleando la metodología de disrupción de tejido mediante raspado, se adicionó a un fragmento de hidrocoral agua destilada y desionizada. El extracto fue posteriormente centrifugado a 2,500 g por 5 min. El pellet y el sobrenadante fueron observados al microscopio para apreciar la presencia de zooxantelas y nematocistos, respectivamente, y de esta manera confirmar la separación de las células de los simbioses. Posteriormente, el sobrenadante fue alícuotado en tubos Eppendorf de 2 ml y almacenados a -20 °C. Posteriormente, se seleccionó una alícuota y se centrifugó a 10,000 g, el sedimento obtenido fue resuspendido en amortiguador de carga Laemli para su análisis por electroforesis unidimensional.

Por otra parte, se seleccionó otra alícuota del sobrenadante a la cual se le adicionaron 2 mL del amortiguador de extracción Tris-HCl previamente descrito, posteriormente se homogenizó y se le agregaron 1.2 ml de acetona previamente enfriada a 4 °C. Después, esta solución se dejó reposar toda la noche a -20 °C y posteriormente, se centrifugó a 10.000 g por 10 min. Finalmente, se recuperó el pellet y el remanente de acetona presente se dejó evaporar, por último, el pellet se resuspendió en amortiguador de fosfatos hasta su análisis mediante electroforesis.

7.4.3 Análisis de los proteomas obtenidos mediante los diferentes métodos de extracción, empleando SDS-PAGE en condiciones nativas

Se realizó el análisis electroforético de los proteomas de especímenes normales y blanqueados de *M. complanata* obtenidos mediante los diferentes métodos de extracción, utilizando como soporte geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio en condiciones nativas, según la metodología descrita previamente (Schägger y Von-Jagow, 1987). Se utilizaron geles de acrilamida al 18%, empleando como amortiguador de corrida Tris-glicina. Dichos geles se corrieron durante 20 min a 120 V y transcurrido este tiempo, a 150 V durante 1.5 h. Para la visualización de las bandas, se empleó la técnica de tinción de Coomassie. Para la determinación de los pesos moleculares, se utilizó un estándar preteñido de amplio peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standards Bio-Rad Cat. #161-0318; Hercules, CA, USA, Bio-Rad).

7.4.4 Selección del método óptimo de extracción del proteoma de *M. complanata*

Los criterios utilizados para la selección del método óptimo para la extracción del proteoma fueron el rendimiento de proteína, y el número y resolución de las bandas visualizadas en el gel de electroforesis unidimensional. Considerando estos criterios el método seleccionado fue disrupción del tejido por raspado y extracción del proteoma empleando amortiguador Tris-HCl.

7.4.5 Análisis del perfil electroforético del proteoma obtenido mediante el método seleccionado por electroforesis bidimensional

Se obtuvieron los proteomas correspondientes a tres fragmentos de hidrocorales, de tal manera que el análisis del proteoma de *M. complanata* se realizó por triplicado. Se utilizó 1 mg de cada una de las muestras de proteoma conteniendo 61 µg de proteína total. Las muestras se limpiaron, empleando el kit de limpieza “Readyprep 2D Clean up Kit” Bio-Rad Cat. # 163-2130 (Hercules, CA, USA); se utilizaron tiras IPG de 11 cm con un rango de pH lineal de 3-10 Bio-Rad Cat. # 163-2000 (Hercules, CA, USA). Las muestras limpias de proteoma de *M. complanata* se diluyeron en 125 µl del amortiguador “Readyprep Rehidratation/sample buffer” Bio-Rad Cat. # 163-2105 (Hercules, CA, USA). Cada muestra se cargó en las tiras IPG y se sometió a un corrimiento en una cámara de isoelectroenfoco “Protean i12 IEF system” Bio-Rad Cat. # 164-6000 (Hercules, CA, USA) con rehidratación activa durante 12 horas, empleando una corriente de 100 V. Posteriormente, las muestras se sometieron a isoelectroenfoco automático con cuatro pasos: 1) 250 V de forma lineal durante 20 min con una corriente máxima de 50 µA, 2) 8000 V de forma lineal durante 2.5 horas con una corriente máxima de 50 µA, 3) 8000 V de forma rápida con una corriente máxima de 50 µA hasta alcanzar 20,000 V/hora y 4) 750 V en “Hold”. Una vez terminado el enfoque isoelectroenfoco, las tiras que contenían las muestras adsorbidas se lavaron y se equilibraron, empleando amortiguadores de equilibrio “Equilibration buffer I y II” Bio-Rad cat. # 163-2105” (Hercules, CA, USA). Las tiras se colocaron en geles “pre-cast” de poliacrilamida al 18% y después, se corrieron en una cámara “Criterion” a 150 V durante aproximadamente 1.5 horas. La visualización de los “spots” que correspondían a las diferentes proteínas contenidas en las muestras de proteoma de *M. complanata* se realizó, empleando el sistema para captura de imágenes “ChemiDoc MP” asistido por el software “Imagelab” Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

7.4.7 Análisis de proteomas obtenidos a partir de especímenes blanqueados de *M. complanata* mediante cromatografía de líquidos acoplado a masas.

A) Procesamiento químico de las muestras

Las muestras fueron previamente reducidas con dithiothreitol (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquiladas con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) y digerida “in

solución” con Tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA). En el procesamiento de la muestra con tripsina se utilizó una solución de 50mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) y la incubación fue de 18 horas a temperatura de 37 °C.

B) Análisis espectrométrico

Los péptidos producidos por clivaje enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) compuesto de una bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher Co.; San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI).

La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, péptido Met-Arg-Phe-Ala y Ultramark 1621). Estos calibrantes se utilizan para calibrar el módulo LTQ Velos con trampa de iones (IT) y el módulo Orbitrap con detector de masas FT (Fourier Transform) en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina (73.14 Da) se incluye para extender la calibración de masas a menores valores de m/z. Este tipo de calibración permite determinaciones de masas moleculares con exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón).

En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 5-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) y solvente A (agua con 0.1 % de ácido fórmico) en 150 minutos utilizando una columna capilar hecha en casa (ID 0.75 μ m y 10cm largo RP-C18). El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/minuto.

El escaneo total de iones (Full Scan) fue realizado en el analizador Orbitrap con un poder de resolución de masas (Resolution Power; $RP=m/FWHM$) de 60,000. La fragmentación de los péptidos se realizó aplicando los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation). Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas (solamente se fragmento iones con carga z2+, z3+ y z4+) con un ancho de aislamiento de 2.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 70 segundos.

C) Búsqueda en PDB e identificación de proteínas

La identificación de proteínas se realizó con los datos espectrométricos en formato .raw en el programa Proteome Discoverer 1.4. (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) a través del motor de búsqueda Sequest HT y Mascot. Para la búsqueda de identidad se utilizó la base de datos de proteínas cnidaria.fasta (UniProt y NCBI) y all organisms.fasta (Swiss Prot). Se aplicó un FDR-False Discovery Rate (Mínimo) de 0.01 y FDR 0.05 (Máximo) además de la base de datos invertida (Decoy database) como herramienta del programa de validación "Percolator". La tolerancia máxima de diferencia de masas moleculares del ion precursor cuando comparados los valores teóricos contra experimentales (precursor mass tolerance) fue de 20 ppm y la tolerancia para los fragmentos obtenidos por disociación del ion precursor (fragment mass tolerance) fue de 0.6 Da. Para la búsqueda automática fueron establecidas las siguientes modificaciones: constantes carbamido-metilación de cisteínas (C) y variables, oxidación de metioninas (M) y deaminación de asparagina (N) y glutamina (Q). Posterior a la búsqueda automática se realizó la búsqueda manual de los espectros de MS/MS del archivo generado (.raw).

7.5 Análisis estadístico

A fin de determinar si existió diferencia significativa entre las concentraciones de proteína presente en las muestras de proteomas obtenidos mediante los diferentes métodos de extracción se empleó un análisis estadístico ANOVA de una vía, posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Tukey, con una $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

8.1 Obtención de especímenes de *M. complanata* normales y blanqueados *in situ*

La obtención de fragmentos de *M. complanata* se realizó utilizando cincel y martillo mediante inmersiones de buceo. Los resultados obtenidos del muestreo de especímenes de *M. complanata* en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo, México, se muestran en la Tabla 2. Fue posible la recolección de especímenes normales en noviembre del 2015 y especímenes normales y blanqueados *in situ* en noviembre del 2016 como resultado del fenómeno climatológico conocido como “El niño”.




Tabla 2. Cantidades obtenidas del muestreo de especímenes de *M. complanata*.

Espécimen	Año de colecta	Cantidad de peso en húmedo (Kg)	Condición	Etiqueta
<i>M. Complanata</i>	2015	1.5	Normal	MCN15
	2016	2	Normal	MCN16
	2016	2	Blanqueado <i>in situ</i>	MCBI

8.2 Comparación de los fragmentos obtenidos de *M. complanata* en las diferentes condiciones para la realización del estudio proteómico

En la Tabla 3 se muestra la comparación visual de los fragmentos de los hidrocorales normales (recolectas 2015 y 2016) y los hidrocorales blanqueados *in situ*. Fue apreciable en las condiciones de blanqueamiento *in situ* una disminución en la coloración característica de *M. complanata*. Se designaron las siguientes abreviaturas para hacer referencia a cada una de las condiciones. MC15 y MC16 corresponden a especímenes normales recolectados el 2015 y 2016 respectivamente, MCBI corresponden a fragmentos blanqueados *in situ*.

Tabla 3. Comparación de los fragmentos obtenidos de *M. complanata* en las diferentes condiciones

Etiqueta	Descripción	Fragmento
MC15	<i>M. complanata</i> normal 2015	
MC16	<i>M. complanata</i> normal 2016	
MCBI	<i>M. complanata</i> blanqueado <i>in situ</i>	

8.3 Obtención del proteoma total de *M. complanata* para el estudio proteómico.

Para la obtención del proteoma total se probaron un total de 4 metodologías distintas para la disrupción de tejido, en combinación con distintos métodos químicos para la extracción de proteínas totales. Los resultados de las pruebas hechas con los métodos para disrupción de tejido probados se presentan a continuación.

8.3.1 Método por limado.

El primer método para disrupción de tejido probado fue mediante limado. Con este método se lograron obtener aproximadamente 0.1 g de tejido. Cada uno de los primeros cuatro métodos químicos propuestos para extracción de proteínas totales (precipitación con sulfato de amonio, precipitación con TCA-Acetona, amortiguador fenol Tris y amortiguador Tris-HCl) partió de 0.1 g de tejido, los resultados de los perfiles de estos primeros 4 extractos se presentan en la figura 7.

En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular que abarca un rango de 6.5 a 200 kDa con sus respectivas bandas (Figura 7A). En el segundo carril se muestra el perfil del extracto obtenido empleando la metodología de precipitación con sulfato de amonio, en el cual no se observó la presencia de ninguna banda (Figura 7B). En el tercer, cuarto y quinto carril se muestran los perfiles de los extractos empleando las metodologías de TCA-Acetona, fenol-Tris y Tris-HCl, respectivamente (Figura 7C, D y E); al igual que en la metodología de sulfato de amonio, no se observó la presencia de ninguna banda, por lo que se decidió probar

a continuación el método de molienda de fragmentos, ya que el método de disrupción de tejido por limado no fue el adecuado para la obtención de proteínas.

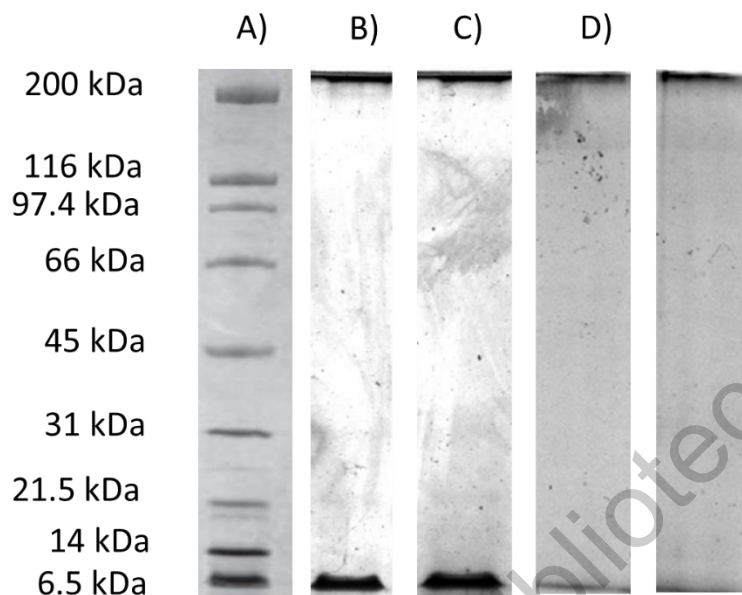


Figura 7. Comparación de perfiles de los extractos obtenidos mediante la metodología de limado. Gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 18 % teñido con colorante azul de coomassie. A) Marcador de peso molecular con rango 6.5 a 200 kDa, B) Perfil de extracto con sulfato de amonio, C) Perfil de extracto con TCA-Acetona, D) Perfil de extracto con amortiguador fenol Tris, E) Perfil de extracto con amortiguador Tris-HCl. CORRIGE TÍTULO EN EL ÍNDICE CORRESPONDIENTE

8.3.2 Método por molienda.

El segundo método para disrupción de tejido probado fue mediante molienda de los fragmentos. Con este método se logró obtener lo equivalente al peso inicial del fragmento utilizado, y se partió aproximadamente de 1 g de molienda para realizar las extracciones (precipitación con sulfato de amonio, precipitación con TCA-Acetona, amortiguador fenol Tris y amortiguador Tris-HCl). Los resultados de los perfiles de estos 4 extractos se presentan en la Figura 8.

En el primer carril se muestra el marcador de pesos moleculares que abarca un rango de 6.5 a 200 kDa con sus respectivas bandas (Figura 8A). En el segundo y tercer carril se muestran los perfiles de los extractos obtenidos empleando las metodologías de precipitación con sulfato de amonio y precipitación con TCA-acetona respectivamente, en los cuales se observó la presencia de una banda tenue alrededor de los 115 kDa en ambos (Figura 8B y C). En el cuarto carril correspondiente al perfil del extracto obtenido con la metodología del amortiguador fenol-Tris se observó la presencia de una banda alrededor de los 150 kDa y en el quinto carril correspondiente al perfil del extracto obtenido con la metodología del amortiguador Tris-HCl se observó la presencia de 2 bandas, un alrededor de los

190 kDa y otra alrededor de los 120 kDa (Figura 8D y E). A pesar de que se lograron observar bandas definidas a simple vista, los cuatro extractos obtenidos mostraron perfiles con una escasa abundancia de bandas, por lo que se decidió probar a continuación el método de rayado de fragmentos, ya que el método de disruptión de tejido por molienda de los fragmentos no fue el adecuado para la obtención de proteínas totales.

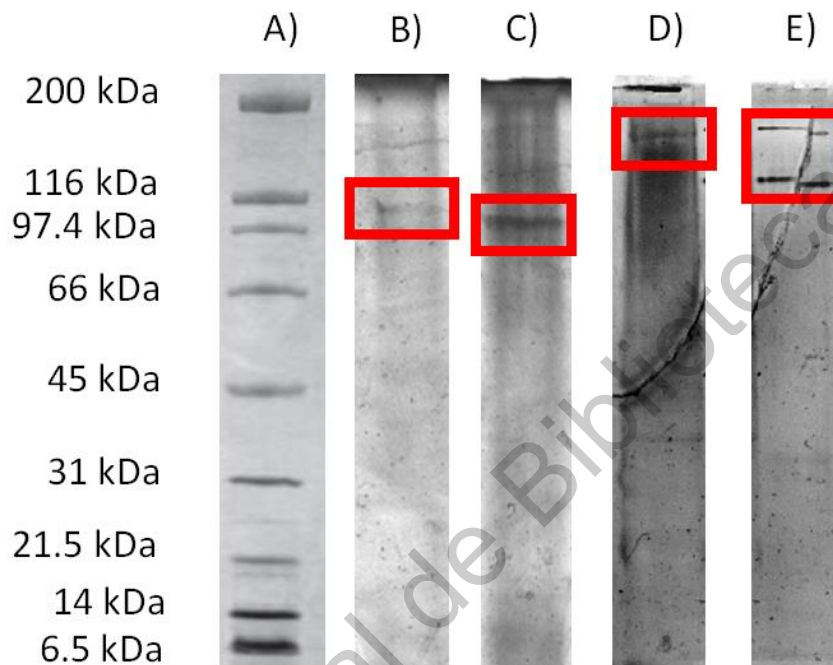


Figura 8. Comparación de perfiles de los extractos realizados con la metodología de molienda. Gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 18 % teñido con colorante azul de coomassie. A) Marcador de peso molecular con rango 6.5 a 200 kDa, B) Perfil de extracto con sulfato de amonio, C) Perfil de extracto con TCA-Acetona, D) Perfil de extracto con amortiguador fenol Tris, E) Perfil de extracto con amortiguador Tris-HCl.

8.3.3 Método por rayado.

Para el tercer método de disruptión de tejido se probaron las 10 metodologías de extracción de proteínas totales. Este método nos permite recuperar 1 mL de extracto a partir de un fragmento de aproximadamente 1 g. Cada metodología (precipitación con sulfato de amonio, precipitación con TCA-Acetona, amortiguador fenol Tris y amortiguador Tris-HCl, amortiguador de rehidratación, amortiguadores para fracción soluble y fracción insoluble, amortiguador con urea 8 M, amortiguador base fenol, amortiguador con ácido bórico y extracto de simbiontes separados) partió de 1 mL de extracto de proteínas totales. Los resultados de los perfiles de estos 10 extractos se muestran en la Figura 9.

En el primer carril se muestra el marcador de pesos moleculares que abarca un rango de 6.5 a 200 kDa con sus respectivas bandas (Figura 9A). En el segundo carril se muestra el perfil del extracto obtenido empleando la metodología de precipitación con sulfato de amonio donde se observó la presencia de una banda tenue alrededor de los 200 kDa (Figura 9B). En el tercer y quinto carril se muestran los perfiles de los extractos obtenidos con las metodologías de precipitación con TCA-acetona y amortiguador Tris-HCl, donde se puede observar la presencia de dos bandas alrededor de los 45 y los 200 kDa en ambos (Figura 9C y E). En el séptimo y octavo carril se observan los perfiles de los extractos obtenidos con la metodología de amortiguador para fracción soluble y fracción insoluble, respectivamente. En el caso del perfil para la fracción soluble no se logró observar la presencia de ninguna banda (derecha), mientras que en el perfil de la fracción insoluble se observó una banda alrededor de los 180 kDa (izquierda) (Figura 9G). En el onceavo carril se observa el perfil obtenido a partir de la metodología con amortiguador de ácido bórico, donde se observó la presencia de 2 bandas tenues alrededor de los 120 y los 200 kDa (Figura 9J). Por último, en los carriles 4, 6, 9, 10 y 12 se muestran los perfiles obtenidos con las metodologías de amortiguador fenol-Tris, amortiguador de rehidratación, amortiguador urea 8 M, amortiguador base fenol y extracto de simbiontes separados (tejido del anfitrión), respectivamente. En ninguno de estos perfiles se observó la presencia de bandas.

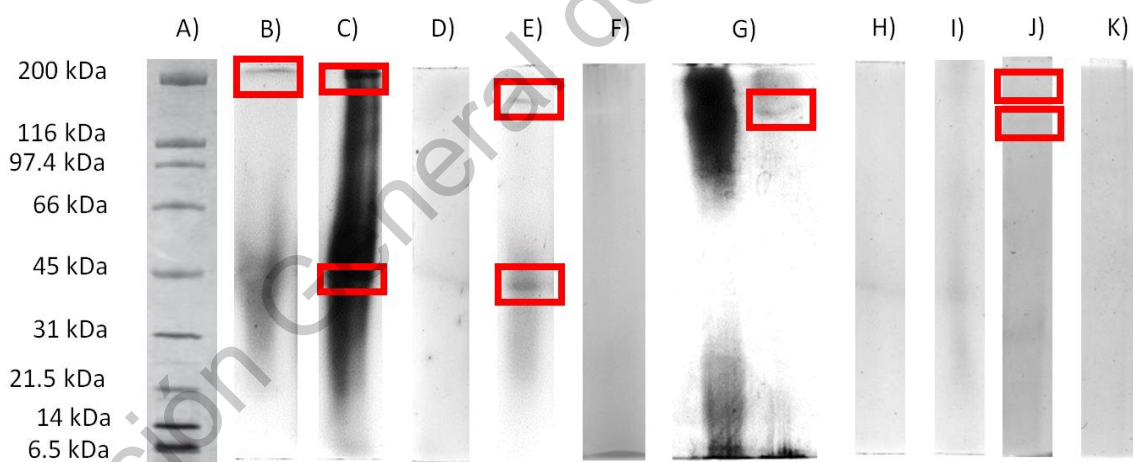


Figura 9. Comparación de perfiles de los extractos obtenidos con la metodología de rayado. Gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 18 % teñido con colorante azul de coomassie. A) Marcador de peso molecular con rango 6.5 a 200 kDa, B) Perfil de extracto con sulfato de amonio, C) Perfil de extracto con TCA-Acetona, D) Perfil de extracto con amortiguador fenol Tris, E) Perfil de extracto con amortiguador Tris-HCl, F) Perfil de extracto con amortiguador de rehidratación, G) Perfiles de extractos con amortiguador para fracción soluble (derecha) y para fracción insoluble (izquierda), H) Perfil de extracto con amortiguador urea 8 M, I) Perfil de extracto con amortiguador base fenol, J) Perfil de extracto con amortiguador de ácido bórico, K) Perfil de extracto de simbiontes separados (tejido del anfitrión).

8.3.4 Selección del método de extracción de proteínas totales de *M. complanata*.

Con los resultados obtenidos hasta este punto se construyó la tabla 4, para hacer un conteo total de las bandas obtenidas a lo largo de los diferentes métodos de disrupción de tejido y las metodologías de extracción de proteínas totales probadas. Por otra parte, con los resultados de la cuantificación de la concentración de proteína, se construyó la tabla 5 y la figura 10, para determinar que método nos proporcionaba un rendimiento mayor de recuperación de proteínas.

Tabla 4. Conteo de bandas totales a través de los métodos de disrupción de tejido y de las metodologías para extracción de proteínas totales

Método de disrupción de tejido	Sulfato de Amonio	TCA-Acetona	Fenol-Tris	Tris-HCl	Rehidratación	Urea 8 M	FS y FI	Base fenol	ácido bórico	Separación de simbioses
Limado	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
Molienda	1	1	1	2	-	-	-	-	-	-
Raspado	1	2	0	2	0	0	1	0	2	0
Total de bandas	2	3	1	4	0	0	1	0	2	0

Tabla 5. Concentración de proteínas y porcentaje de rendimiento de los métodos de obtención de proteoma probados.

	Sulfato de Amonio	TCA-Acetona	Fenol-Tris	Tris-HCl	Rehidratación	Urea 8 M	FS y FI	Base fenol	ácido bórico	Separación de simbioses
Proteína (µg/g)	2.67±0.12 ^a	3.42±0.09 ^b	1.1±0.01 ^{ch}	4.12±0.08 ^d	0.87±0.06 ^e	1.36±0.01 ^{fh}	2.25±0.82 ^{gh}	0.78±0.09 ⁱ	1.64±0.02 ^j	1.25±0.02 ^k
							2.18±0.06 ^{chfg}			

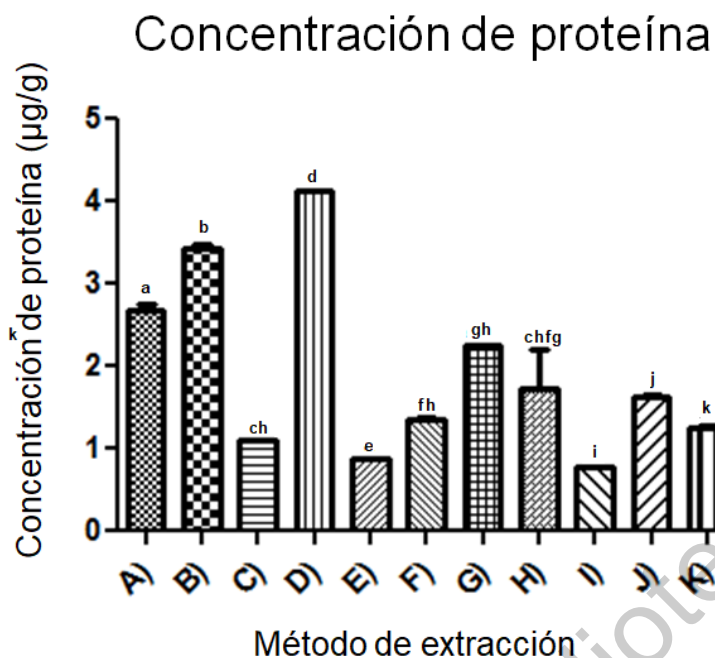


Figura 10. Comparación de la concentración ($\mu\text{g/g}$ de muestra) de los extractos obtenidos de *M. complanata*. A) Sulfato de amonio, B) TCA-Acetona, C) Amortiguador fenol Tris, D) Amortiguador Tris-HCl, E) Amortiguador de rehidratación, F) Amortiguador para fracción soluble, G) Amortiguador para fracción insoluble, H) Amortiguador urea 8 M, I) Amortiguador base fenol, J) Amortiguador de ácido bórico, K) Extracto de simbiontes separados (tejido del anfitrión). Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) por la prueba de Tukey.

Realizando un conteo de las bandas totales obtenidas, se observó que los métodos que habían demostrado un mayor número de bandas totales fueron los extractos realizados con las metodologías de precipitación con TCA-Acetona y amortiguador Tris-HCl, con un total de 3 y 4 bandas, respectivamente (Tabla 4). Por otra parte, en los resultados de la cuantificación de concentración de proteína también se observó una concentración más alta en los extractos de las metodologías mencionadas con anterioridad, $3.42 \mu\text{g/g}$ en el extracto realizado con la metodología de precipitación de TCA-Acetona y $4.12 \mu\text{g/g}$ en el extracto realizado con el amortiguador Tris-HCl. Con estos resultados se decidió realizar un segundo extracto con las metodologías de TCA-Acetona y Tris-HCl, empleando el método de disruptura de tejido por rayado. En este caso se obtuvieron 5 mL de extracto de cada método, partiendo de fragmentos de 20 g. Los perfiles de estos extractos se muestran en la Figura 11.

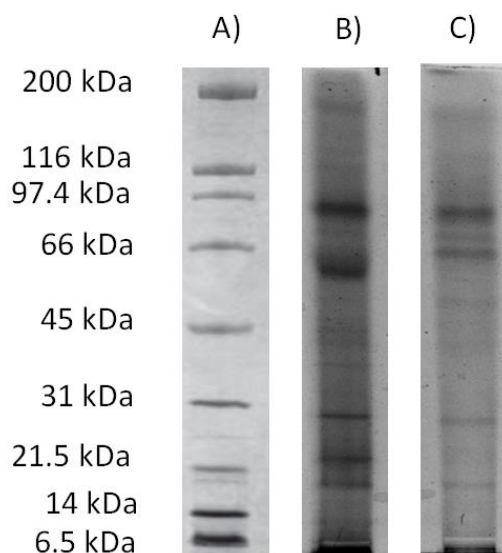


Figura 11. Comparación de perfiles de los extractos de proteínas totales Tris-HCl y TCA-Acetona. Gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 18 % teñido con colorante azul de coomassie. A) Marcador de peso molecular con rango 6.5 a 200 kDa, B) Perfil de extracto con amortiguador Tris-HCl, C) Perfil de extracto con TCA-Acetona.

En el primer carril se muestra el marcador de pesos moleculares que abarca un rango de 6.5 a 200 kDa con sus respectivas bandas (Figura 11A). En el segundo carril se muestra el perfil obtenido con la metodología del amortiguador Tris-HCl (Figura 11B), y en el tercer carril se muestra el perfil obtenido con la metodología de precipitación con TCA-acetona (Figura 11C). Es apreciable a simple vista que el perfil con la metodología del amortiguador Tris-HCl posee una abundancia mayor de bandas, además que éstas también tienen una mayor intensidad que la metodología de precipitación con TCA-acetona, por lo tanto, se escogió el amortiguador Tris-HCl como el más apropiado para la extracción de proteínas totales de *Millepora complanata*.

Una vez seleccionados los métodos de disrupción de tejido y de extracción de proteínas totales más apropiados, se procedió a hacer un extracto a partir de un fragmento blanqueado de *M. complanata*. Los resultados del perfil se muestran en la Figura 12.

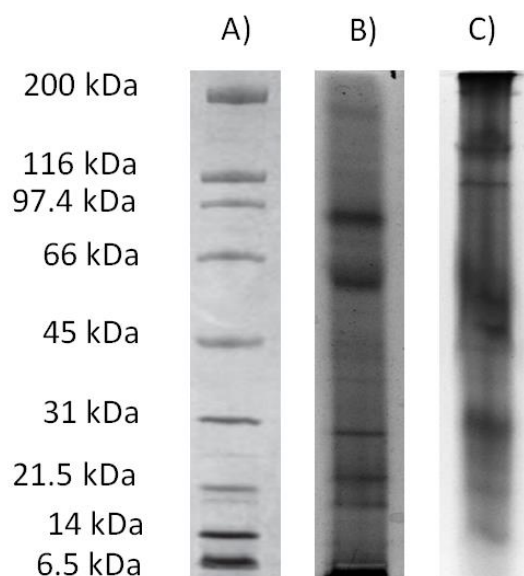


Figura 12. Comparación de perfiles de los extractos de proteínas totales de *M. complanata* normal y *M. complanata* blanqueado. Gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 18 % teñido con colorante azul de coomassie. A) Marcador de peso molecular con rango 6.5 a 200 kDa, B) Perfil de extracto con amortiguador Tris-HCl de *M. complanata* normal. C) Perfil de extracto con amortiguador Tris-HCl de *M. complanata* blanqueado.

8.4 Determinación de la concentración de proteína de los extractos.

Una vez que se contó con los perfiles de los extractos de ambos tratamientos, se procedió a cuantificar la concentración de proteínas totales por triplicado empleando el kit para cuantificación 2D Quant kit, y se realizó una prueba t de student. Los resultados se presentan en la Tabla 5 y Figura 12.

Tabla 5. Concentración de proteínas totales en extractos acuosos de Mc N y Mc B.

Muestra	Concentración (µg/mL)	Promedio (µg/mL)
Mc N1	19.52	
Mc N2	20.90	
Mc N3	24.039	21.49
Mc B1	18.35	
Mc B2	18.94	
Mc B3	16.98	18.09

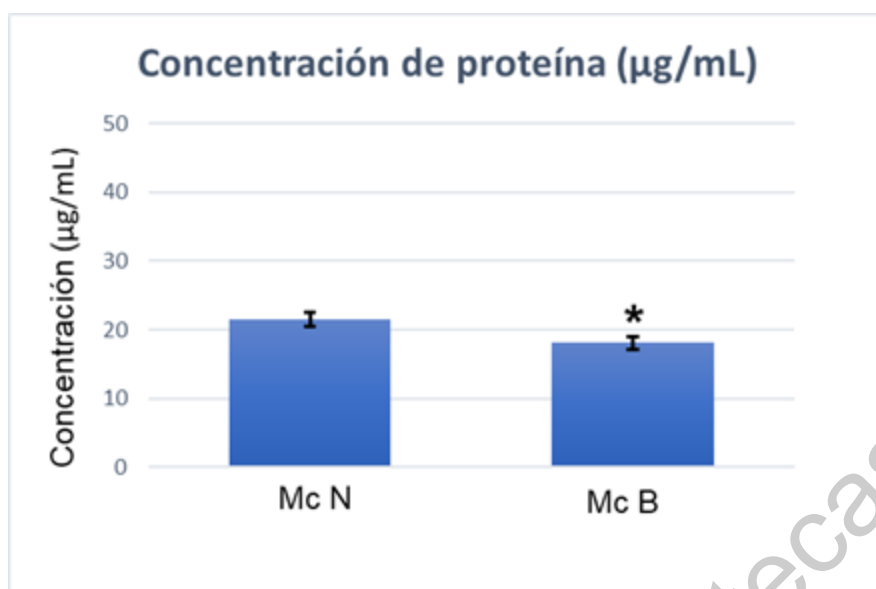


Figura 13. Concentración de proteína presente en los extractos de *M. complanata* normal (Mc N) y *M. complanata* blanqueado (Mc B). * indica diferencia significativa ($P \leq 0.05$) por la prueba de *t* de student.

La concentración de proteína en el extracto de *M. complanata* normal (Mc N) y *M. complanata* blanqueado (Mc B) fue de 21.49 y 18.09 µg/mL, respectivamente. Al realizar la prueba *t* de student se encontró diferencia significativa entre la concentración de ambos extractos. Sin embargo, la cantidad de proteína no era suficiente para cargar en tiras de pH para realizar el Isoelectroenfoque (IEE), por lo que se procedió a realizar una liofilización de los extractos acuosos para aumentar la concentración. Los resultados de la cuantificación de proteína de los extractos liofilizados de *M. complanata* normal y *M. complanata* blanqueado se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración de proteínas totales en extractos liofilizados de Mc N y Mc B.

Muestra	Concentración (µg/mL)	Promedio (µg/mL)
Mc N1	62.06	
Mc N2	61.81	
Mc N3	62.28	62.05
Mc B1	59.87	
Mc B2	59.43	
Mc B3	60.03	59.77

8.5 Electroforesis bidimensional en tiras de 7 cm con rango de pH 3 – 7.

Posteriormente se procedió a realizar la primera electroforesis bidimensional en tiras de 7 cm pH con rango de pH 3 – 7. Se pesaron 3 mg de extracto proteico liofilizado obtenido a partir de hidrocorales normales, los cuales equivalen a 120 μg de proteína aproximadamente, se re-suspendieron en amortiguador de rehidratación, se adicionaron a la tira y se llevaron al IEE. Una vez recuperada la tira tras 24 hrs, se procedió a hacer la separación en la segunda dimensión por peso molecular. En la Figura 13 se muestra el gel obtenido.

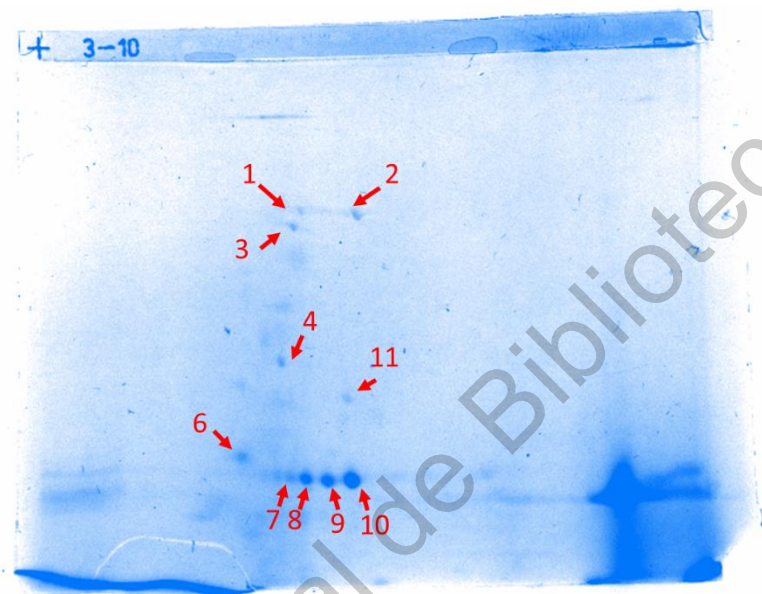


Figura 14. Perfil bidimensional de *M. complanata* normal en 7 cm. Gel bidimensional de poliacrilamida al 18 % y tira de 7 cm con rango de pH 3 – 7. Tinción con azul de coomassie, spots señalados con flechas rojas.

8.6 Electroforesis bidimensional en tiras de 11 cm con rango de pH 3 – 10.

En la primera electroforesis bidimensional con tiras de 11 cm se pesaron 4.1 mg de extracto liofilizado, los cuales equivalen a 254 μg de proteína, se resuspendieron en amortiguador de rehidratación, se adicionaron a la tira y se llevaron al IEE. Una vez recuperada la tira después de 48 hrs, se procedió a hacer la separación en la segunda dimensión por peso molecular. En la Figura 15 se muestra el gel obtenido.



Figura 15. Primer perfil bidimensional de *M. complanata* en 11 cm (M1). Gel bidimensional de poliacrilamida al 18 % y tira de 11 cm con rango de pH 3 – 10. Tinción con azul de Coomassie, spots señalados en el interior de los cuadros rojos.

El gel obtenido fue seleccionado como la primer repetición (M1). Se observaron un total de 40 spots bien definidos en la primer electroforesis bidimensional en 11 cm, estos spots se encontraban en un rango de peso molecular de 10 – 150 kDa y en un rango de pH de 4 – 9, ambos rangos fueron más amplios que los del primer gel bidimensional en tiras de 7 cm (interior de cuadros rojos). En la segunda electroforesis bidimensional con tiras de 11 cm se pesaron 8 mg de extracto liofilizado, los cuales equivalen a 480 μ g de proteína, se re-suspendieron en amortiguador de rehidratación, se adicionaron a la tira y se llevaron al IEE. Una vez recuperada la tira después de 48 hrs, se procedió a hacer la separación en la segunda dimensión por peso molecular. En la Figura 16 se muestra el gel obtenido.

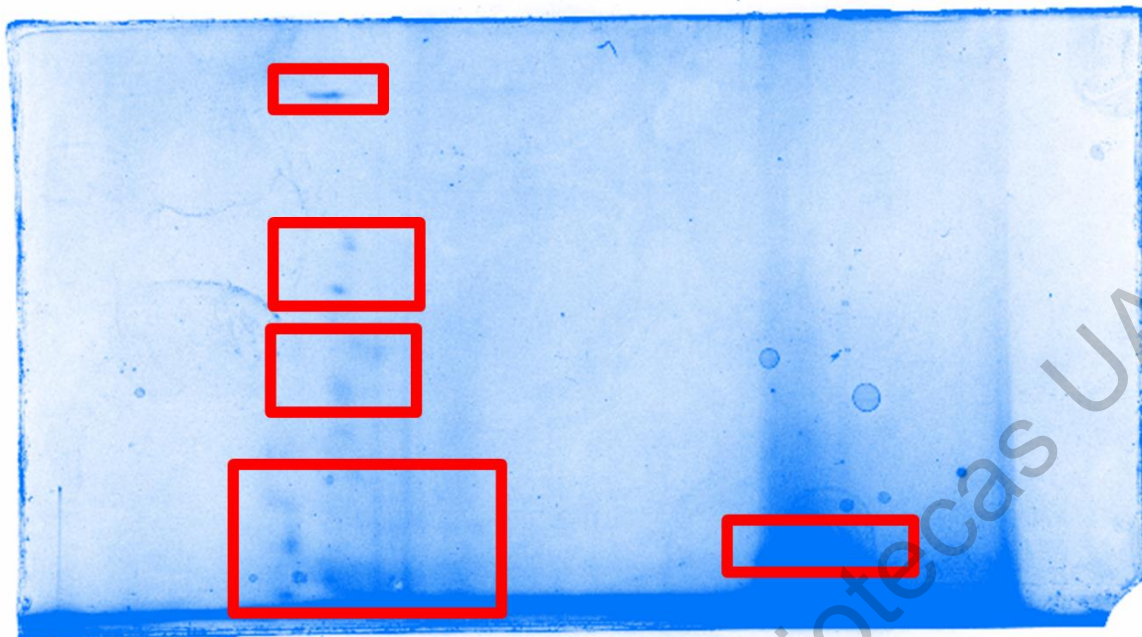


Figura 16. Segundo perfil bidimensional de *M. complanata* en 11 cm (M2). Gel bidimensional de poliacrilamida al 18 % y tira de 11 cm con rango de pH 3 – 10. Tinción con azul de Coomassie, spots señalados en el interior de los cuadros rojos.

El gel obtenido fue seleccionado como la segunda repetición (M2). Se observaron un total de 30 spots bien definidos en la segunda electroforesis bidimensional en 11 cm, estos spots se encontraban en un rango de peso molecular de 10 – 150 kDa y en un rango de pH de 4 – 9. En la tercera electroforesis bidimensional con tiras de 11 cm se pesaron 16 mg de extracto liofilizado, los cuales equivalen a 1000 μ g de proteína, se resuspendieron en amortiguador de rehidratación, se adicionaron a la tira y se llevaron al IEE. Una vez recuperada la tira después de 48 hrs, se procedió a hacer la separación en la segunda dimensión por peso molecular. En la Figura 17 se muestra el gel obtenido.

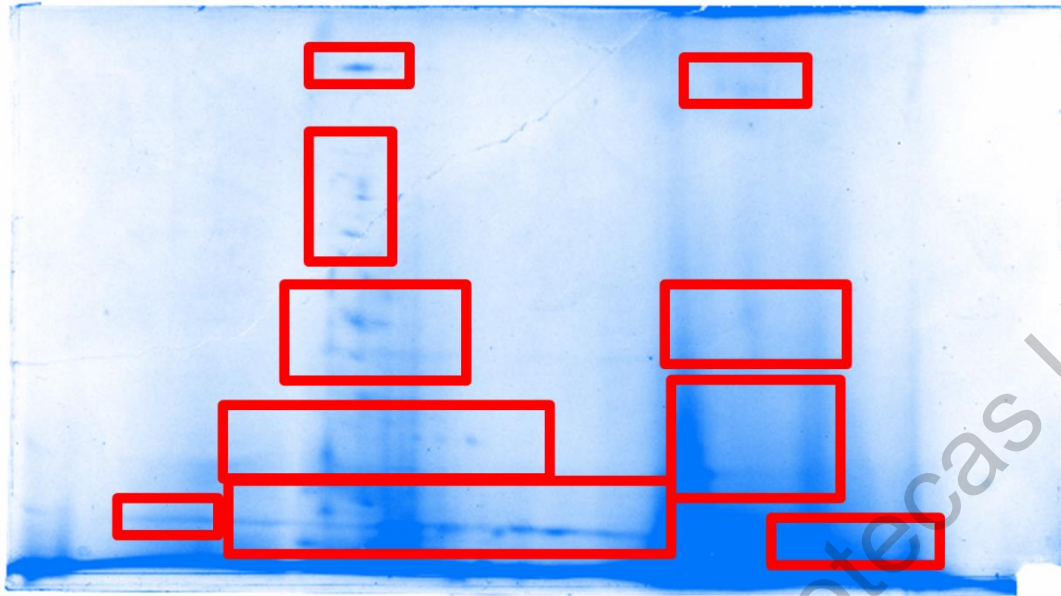


Figura 17. Tercer perfil bidimensional de *M. complanata* en 11 cm (M3). Gel bidimensional de poliacrilamida al 18 % y tira de 11 cm con rango de pH 3 – 10. Tinción con azul de Coomassie, spots señalados en el interior de los cuadros rojos.

El gel obtenido fue seleccionado como la tercera repetición (M3). Se observaron un total de 50 spots bien definidos en la segunda electroforesis bidimensional en 11 cm, estos spots se encontraban en un rango de peso molecular de 10 – 150 kDa y en un rango de pH de 4 – 9. Empleando el software PDQuest se procedió a construir el gel maestro utilizando los geles M1, M2 y M3, y se observaron un total de 100 spots, el gel maestro se presenta en la figura 18.

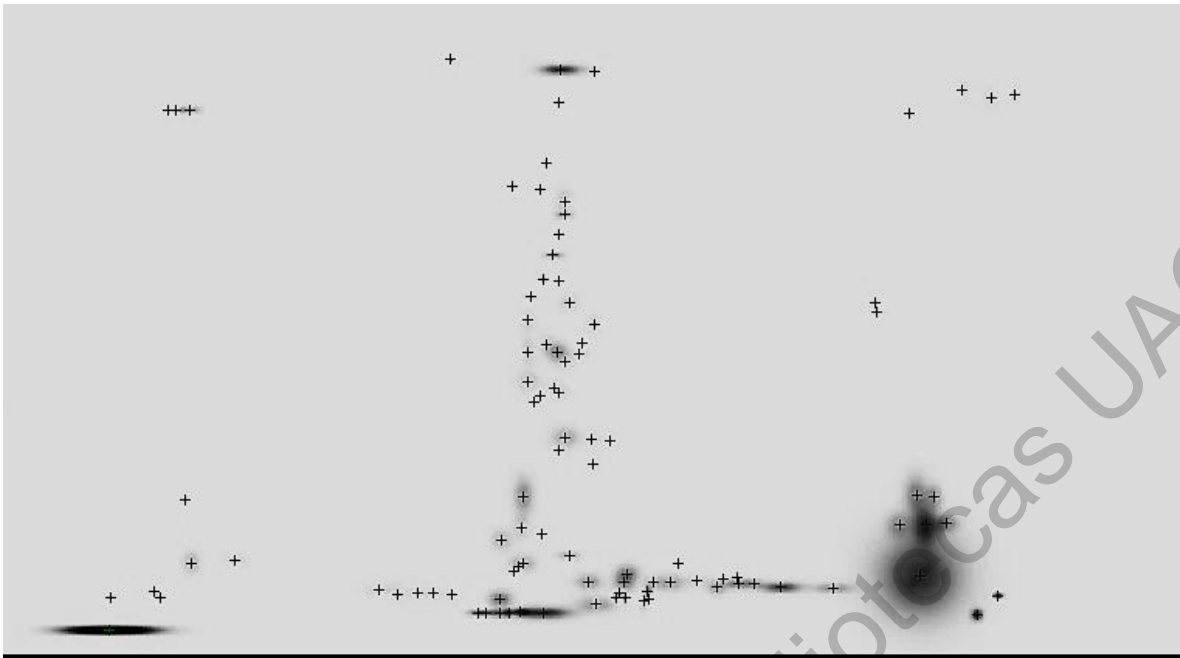


Figura 18. Gel maestro obtenido mediante el Software PDQuest.

En seguida, se escogieron los spots para su secuenciación por espectrometría de masas MALDI-TOF, empleando la intensidad de spot como criterio de selección. De los geles M1 y M3 se seleccionaron un total de 24 spots (48 spots en total), dichos spots se muestran en las figuras 19 y 20. En el gel M2 no fue posible seleccionar ningún spot debido a la baja intensidad que estos tenían.

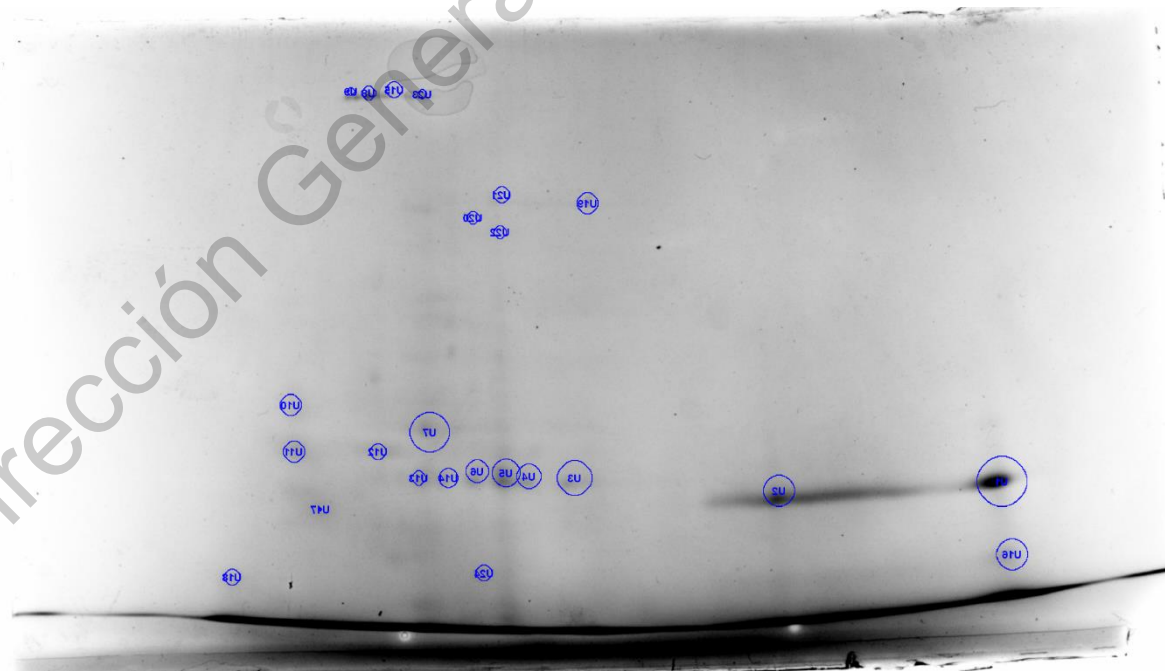


Figura 19. Spots seleccionados de M1. Spots seleccionados para su secuenciación encerrados en círculos azules.

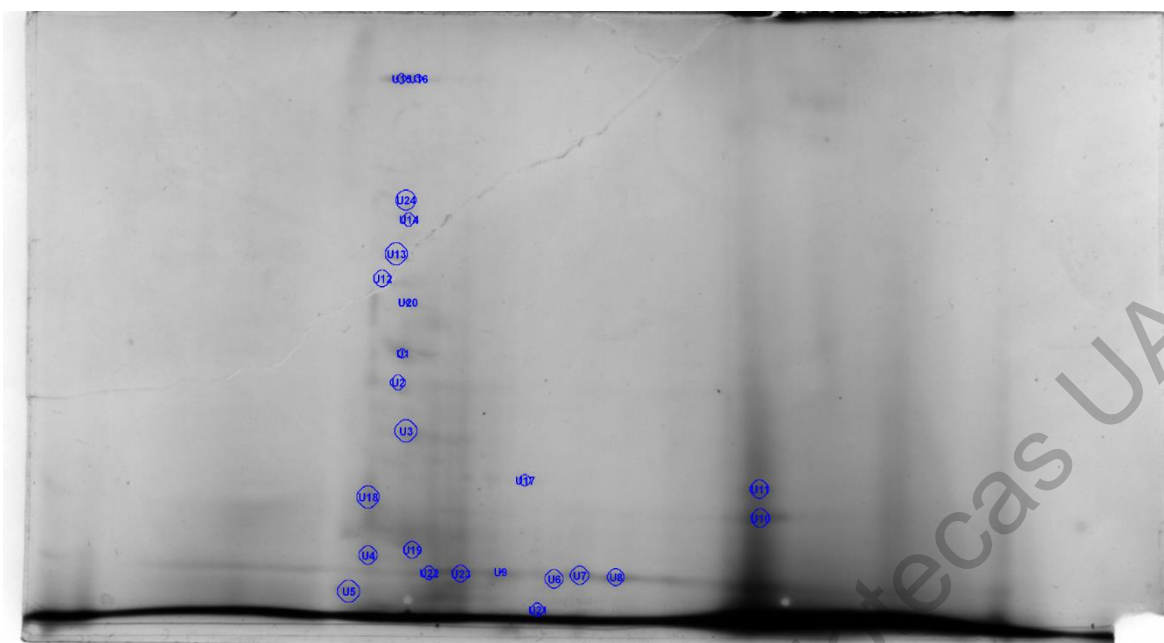


Figura 20. Spots seleccionados de M3. Spots seleccionados para su secuenciación encerrados en círculos azules.

8.7 Análisis de proteomas obtenidos a partir de especímenes blanqueados de *M. complanata* mediante cromatografía de líquidos acoplado a masas.

Los extractos de proteomas de especímenes blanqueados de *M. complanata* fueron analizados mediante cromatografía de líquidos acoplado a masas y posteriormente, las secuencia de aminoácidos fueron identificadas por homología. A continuación, se presentan las identidades obtenidas de las proteínas contenidas en el proteoma de los especímenes blanqueados de *M. complanata*.

8.7.1 Identidad de proteínas obtenidas mediante cromatografía de líquidos acoplado a masas de especímenes blanqueados de *M. complanata*.

A continuación, se presentan las identidades obtenidas de las proteínas contenidas en el proteoma de *M. complanata* blanqueado.

8.7.2 Identidad de proteínas obtenidas mediante cromatografía de líquidos acoplado a masas de especímenes blanqueados de *M. complanata*.

No.	Secuencia	Descripción	Organismo de origen
1	NDQLTEEQLAEFK	Proteína verde fluorescente-quimera de calmodulina	<i>Aequorea Victoria</i>
2	DALSVWETENLPNYS GK	Proteína predicha	<i>Nematostella vectensis</i>
3	L TTPQLSK	Serina/treonina-proteína quinasa 36 isoforma X1	<i>Orbicella faveolata</i>

4	NSLLWNDR	Predicha: ADN polimerasa dirigida por ARN del elemento móvil jockey	<i>Acropora digitifera</i>
5	AVTTPAGLSK	Proteína predicha	<i>Nematostella vectensis</i>
6	YLTSLHK	Proteína hipotética AWC38_SpisGene12298	<i>Stylophora pistillata</i>
7	WETENLPNYSKG	Proteína activadora de recombinación V(D)J 1	<i>Pocillopora damicornis</i>
8	GSELLWNNR	Serina/treonina proteína quinasa de repetición rica en leucina 1	<i>Orbicella faveolata</i>
9	FGLPALGR	Poliamina oxidasa 1	<i>Pocillopora damicornis</i>
10	NLVGFFK	subunidad 6 de la ATP sintasa F0 (mitocondria)	<i>Alatina alata</i>
11	DLNELLDLLK	Proteína sin caracterizar LOC105845055	<i>Hydra vulgaris</i>
12	GSELLWNDR	Proteína hipotética AWC38_SpisGene20676	<i>Stylophora pistillata</i>
13	TYQSKHR	Proteína 2 que contiene el dominio de fosfolipasa tipo patatina	<i>Acropora millepora</i>
14	DPLPSQHK	Proteína hipotética AC249_AIPGENE21860	<i>Exaiptasia pallida</i>
15	YVGAGSKHR	Proteína sin caracterizar C1683.06c	<i>Orbicella faveolata</i>
16	YVYSKQHR	Factor 6 asociado a DDB1-CUL4	<i>Stylophora pistillata</i>
17	LESGVQHR	Proteína predicha	<i>Nematostella vectensis</i>
18	TEENLPNYSKG	V(D)J proteína activadora de recombinación 1	<i>Pocillopora damicornis</i>
19	TDEVLYLLSDK	Proteína sin caracterizar LOC114523939	<i>Dendronephthya gigantea</i>
20	GLSELTSLHK	Alfa-aminoadípico semialdehído sintasa, mitocondrial	<i>Exaiptasia pallida</i>
21	DLEGQVQDLLDEIDKEK	Antígeno endosómico temprano 1	<i>Exaiptasia pallida</i>
22	RDQHKNPNYSKG	Proteína predicha	<i>Nematostella vectensis</i>
23	DLGLNLPVGEVPR	Proteína sin caracterizar LOC114977289, isoforma X1	<i>Dendronephthya gigantea</i>
24	TNVLASSDDQHK	Proteína sin caracterizar LOC111337897	<i>Stylophora pistillata</i>

25	GESDSSALVNPGMPR	Mediador de la subunidad 6 de la ARN polimerasa II	<i>Stylophora pistillata</i>
----	-----------------	---	----------------------------------

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8. DISCUSIÓN

El estudio de organismos marinos representa un reto para los investigadores, ya que los especímenes implican una mayor dificultad al momento de ser estudiados en comparación con los organismos terrestres. A pesar de que se han publicado numerosos estudios de cnidarios a la fecha, incluyendo estudios proteómicos, la obtención de proteínas totales es una metodología que difiere de una especie a otra, y con organismos constructores de arrecifes no hay excepción (Weston et al., 2015). Es por esto que es importante en primer término, estandarizar un método que permita obtener un extracto que nos proporcione la mayor cantidad y variedad de proteínas posible, tanto de la fracción insoluble en agua del proteoma, como la fracción soluble en agua (Anthony, 2016).

Para la obtención de proteínas totales se probaron tres métodos distintos para la disrupción del tejido, de los cuales el rayado con el rayador de vidrio DREMEL fue el más efectivo, permitiéndonos obtener una mayor abundancia de bandas en perfiles unidimensionales. A pesar de que los métodos probados en este proyecto no están reportados previamente en ninguna metodología, es posible especular lo siguiente:

El método de limado no resulta ser efectivo posiblemente debido a la dificultad para mantener una temperatura de 4 °C y para recuperar el extracto, dado que hay una alta pérdida del tejido extraído. Los perfiles electroforéticos de los extractos obtenidos mediante este método no mostraron la presencia de ninguna banda (Figura 7). A comparación del método de limado, los perfiles electroforéticos de los extractos obtenidos mediante el método de molienda presentaron algunas bandas, sin embargo, la abundancia de éstas era escasa (Figura 8), además de recuperarse una muestra altamente impura (contaminada con sales, lípidos y pigmentos entre otros compuestos), ya que los fragmentos fueron molidos en su totalidad, incluido su exoesqueleto calcáreo.

El método de raspado empleando el rayador de vidrio Dremel Engraver demostró ser una metodología más adecuada para la disrupción del tejido de los hidrocorales, al darnos un extracto con un alto número de bandas en comparación a los métodos anteriores (Figura 10). Esto pudiera deberse a que éste permite realizar una extracción y disrupción del tejido mucho más rápida y eficiente, lo que también facilita que la temperatura de 4 °C se mantenga a lo largo de toda la extracción para conservar la integridad de las proteínas, aunado a lo anterior, también permite recuperar una mayor cantidad de extracto.

Una vez seleccionado el mejor método para la disrupción de tejido, se procedió a probar las distintas metodologías propuestas para la obtención de proteínas totales.

Cabe mencionar que todas estas metodologías fueron reportadas en otros tipos de organismos, como plantas, animales terrestres y otros cnidarios. Sin embargo, como se menciona anteriormente, las metodologías varían de un organismo a otro, y los métodos que pueden resultar altamente efectivos en anemonas o medusas, pueden comportarse de distinta manera en hidrocorales. Los cnidarios como las medusas y las anemonas, además de presentar ausencia de exoesqueleto, poseen una abundancia de tejido mucho mayor y son organismos mucho más grandes a comparación de los corales e hidrocorales, por lo que se facilita en gran medida la disrupción de las capas dérmicas y la alta recuperación de tejido en este tipo de organismos. Los hidrocorales, al ser organismos de dimensiones apenas milimétricas, representan un enorme desafío para la recuperación de tejido, y aunado a lo anterior, la presencia de su exoesqueleto compuesto por carbonato de calcio genera altas interferencias en los métodos mecánicos para la disrupción del tejido (Cheng et al., 2018).

El método de obtención de proteínas totales mediante el amortiguador Tris-HCl demostró ser el más efectivo mostrando un total de 15 bandas en el perfil unidimensional (Figura 10). El método se reportó para la obtención de proteínas de la planta *Olea europaea*, la cual se caracteriza por contener un alto número de compuestos de interferencia (lípidos, polisacáridos y compuestos fenólicos), y demostró ser altamente efectivo. La composición del amortiguador es clave para el éxito de la extracción, la combinación Tris-HCl permite mantener un pH adecuado para la extracción de proteínas al mantenerse alrededor de la neutralidad (7.5). El β -mercaptoetanol es un agente reductor que permite la ruptura de los enlaces disulfuro y la posterior desnaturalización de las proteínas. El EDTA realiza la función de quelar metales pesados al formar complejos denominados quelatos, de modo que éstos no activen a proteasas que degraden las biomoléculas de interés, y por último el cloruro de sodio promueve un ambiente iónico, lo cual favorece la solubilidad de las proteínas (Wang et al., 2003).

Sin embargo, cada método particular de extracción de proteínas totales favorece la obtención de determinados tipos de proteínas. Aquellos amortiguadores que contienen concentraciones elevadas de urea o sulfato de amonio promueven la solubilización de proteínas lipofílicas al provocar una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que estos solutos compiten por el agua y rompen los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas, de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan (Weston et al., 2015, Domínguez-Pérez et al., 2018).

Otros métodos de extracción utilizan ácidos orgánicos como TCA o perclórico, que forman sales insolubles con las proteínas en medios ácidos. Sin embargo, las proteínas pueden precipitar de las soluciones mediante un agente precipitante de carga opuesta; esto requiere que el pH de la solución debe ser controlado de tal

modo que la proteína quede en el lado ácido o básico de su punto isoelectrico (Domínguez-Pérez et al., 2018, Cheng et al., 2018).

Hernández-Elizárraga et al. reportó en 2019 el perfil unidimensional del proteoma soluble de *M. complanata* en condiciones normales y de blanqueamiento, en los cuales se observaron bandas en un rango de pesos moleculares de 5.9 – 202.9 kDa. Los perfiles demostraron una abundancia de bandas similar a los perfiles obtenidos en este estudio. Sin embargo, es importante mencionar que los perfiles reportados por Hernández-Elizárraga fueron resueltos empleando una concentración de proteína de aproximadamente 80 µg, mientras que los que se obtuvieron en este estudio fueron resueltos con 60 µg. Esta pudiera la principal causa por la cual el perfil del proteoma obtenido en el presente estudio de *M. complanata* no demuestra una abundancia superior al perfil del proteoma soluble, por otra parte, ciertas bandas del proteoma total son muy tenues, por lo que resulta complicado apreciar varias de éstas a simple vista y en el fotodocumentador. Por lo tanto, se sugiere que en la posteridad se emplee una concentración de proteína mayor, ya que así sería posible observar con mayor claridad la presencia de las bandas más tenues (Cheng et al., 2018; Hernández-Elizárraga et al., 2019).

En cuanto a las proteínas identificadas empleando cromatografía de líquidos acoplado a masas a partir del extracto de especímenes blanqueados de *M. complanata*, un total de 10 proteínas de distintos tipos fueron reportadas anteriormente en estudios proteómicos y transcriptómicos diferenciales relacionados al blanqueamiento y estrés térmico: Cadena A-quinasa de cadena ligera de miosina-proteína fluorescente verde-quimera de calmodulina, serina/treonina-proteína quinasa de repetición rica en leucina, serina/treonina-proteína quinasa 36 isoforma X1, cuatro proteínas predichas de *Nematostella vectensis*, poliamina oxidasa 1, subunidad 6 de la ATP sintasa F₀ mitocondrial y Antígeno endosómico temprano 1.

La primer proteína enlistada y que ha sido reportada en estudios diferenciales de blanqueamiento pertenece al tipo de las verdes fluorescentes, las proteínas verdes fluorescentes (PVF) son un tipo de proteínas que fueron identificadas por primera vez en la medusa de la clase Hydrozoa *Aequorea victoria*, estas proteínas se caracterizan por emitir fluorescencia en la zona verde del espectro visible. Muchos cnidarios utilizan PVFs como receptores de transferencia de energía en bioluminiscencia; estas proteínas se distinguen de otras proteínas fluorescentes debido a la naturaleza química de su cromóforo, que se compone de residuos de aminoácidos modificados dentro del polipéptido. Las PVFs son altamente fluorescentes y se activan in vivo mediante un proceso de transferencia de energía a través de una luciferasa o una fotoproteína activada con Ca²⁺, que produce energía durante la oxidación de la coelenteracina (luciferina característica de cnidarios como *A. victoria*) (Prasher et al., 1992; Smith-Keune & Dove, 2008)

Ricaurte y colaboradores en 2016 reportaron una expresión diferencial aumentada de la proteína verde fluorescente FP512 en el coral *Acropora palmata*. Las PVFs se expresan durante la foto-aclimatación (Chalfie et al., 1994) y son potenciales marcadores para evaluar el estado fisiológico del cnidario durante el blanqueamiento debido al estrés térmico. Se cree que su respectiva regulación aumentada desencadena una respuesta inmune a través de la fotoinhibición en *A. palmata* (Fitt et al., 2009). Existe la hipótesis de que las proteínas verde fluorescentes cumplen también la función de atraer zooxantelas mediante la fluorescencia, y por otra parte, también se ha propuesto que las proteínas de fluorescencia cambian el entorno de luz en el tejido del cnidario, lo que resulta en una mejora en la luz para la fotosíntesis realizada por algas de la familia Symbiodiniaceae y la protección de la maquinaria fotosintética contra las longitudes de onda de luz perjudiciales (Kawaguti, 1969; Salih et al., 2000). Aihara y colaboradores en 2019 publicaron un estudio en el que demostraron que la atracción de zooxantelas por fragmentos de corales *Echinophyllia aspera* ocurre bajo condiciones de luz en las que los corales emiten fluorescencia verde, por lo que concluyeron que la fluorescencia verde que emiten los corales (provocada por las proteínas verdes fluorescentes) atrae zooxantelas; por esta razón, en los estados aposimbióticos de los corales, como cuando son sometidos a estrés térmico prolongado o cuando sufren blanqueamiento, la expresión de proteínas verdes fluorescentes aumenta significativamente, para de esta manera atraer nuevamente zooxantelas, y así poder repoblarse de endosimbiontes (Baker, 2001; Aihara et al., 2019).

La segunda proteína enlistada y que ha sido reportada en estudios diferenciales de blanqueamiento pertenece al tipo de las serina/treonina quinazas, las serina/treonina quinazas son componentes cruciales de diversas vías de señalización, entre las cuales se encuentran aquellas mediadas por receptores serina/tirosina quinasa, que activan la vía de señalización de las proteínas smad (segundos mensajeros denominados de esa manera debido a la similitud que presentan con las proteínas MAD de *Drosophila* y SMA de *Caenorhabditis elegans*) y median procesos de crecimiento, proliferación, especialización y muerte celular. Otro ejemplo muy conocido de proteínas serina/treonina quinasa son aquellas que forman parte de la vía de señalización Wnt, que en cnidarios median procesos similares a los mencionados anteriormente, además de jugar un papel fundamental en la embriogénesis de anemonas como *Nematostella vectensis* (Lee et al., 2006; Guder et al. 2006; Kumburegama et al., 2011). NF- κ B es otra vía de señalización importante en la cual está implicada la función de las serina/treonina quinazas, esta reportado que esta vía de señalización en cnidarios como *Exaiptasia pallida*, *Orbicella faveolata* y *Acropora palmanta* juega un papel importante en la respuesta inmunológica y en la disrupción de la simbiosis (Mansfield et al., 2017).

Lee y colaboradores en 2018 reportaron un aumento en la expresión de un transcrito de serina/treonina-proteína quinasa en *Acropora muricata* sometido a estrés térmico, mientras que Weston y colaboradores reportaron en 2015 la expresión diferencial de una proteína del mismo tipo en *Acropora microphthalma* sometido a estrés fótico y térmico. Las principales funciones descritas de dichas quinasas expresadas diferencialmente en estudios de cnidarios sometidos a distintas condiciones de estrés son: la regulación de la meiosis y la apoptosis. Vincular el deterioro fisiológico del cnidario y la regulación positiva de genes, transcritos y proteínas de este tipo sugiere que el huésped cnidario responde molecularmente al estrés térmico para minimizar el daño y restablecer la homeostasis celular (Kültz, 2005; Gierz et al., 2017). Sin embargo, dichas proteínas están implicadas en numerosos procesos fisiológicos y respuestas hormonales en los cnidarios, por lo que hace aún falta profundizar y demostrar de manera experimental en que procesos podrían estar implicadas de manera puntual.

La tercera proteína enlistada y que ha sido reportada en estudios diferenciales de blanqueamiento pertenece al tipo de las poliamina oxidadas. Las poliaminas son aminas alifáticas cargadas positivamente, esenciales para el crecimiento y la diferenciación celular normal, interactúan con restos cargados negativamente, como ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos. La L-arginina es un aminoácido precursor de muchas moléculas importantes en la fisiología celular, incluyendo las poliaminas; en microorganismos y plantas, las poliaminas se generan a través de la conversión de L-arginina a ornitina a través de la arginasa o arginina descarboxilasa (ADC) y posteriormente a agmatina y a putrescina. La mayoría de las células de mamíferos tienen la capacidad de producir las poliaminas que necesitan a partir de ornitina por acción de la ornitina descarboxilasa (ODC) que produce putrescina, la cual origina espermidina y espermina a través de la acción de la espermidina sintasa y espermina sintasa, respectivamente. La cadaverina se produce a partir de lisina; la ruta depende de la especie y del momento del desarrollo en que se produce (Bouchereau et al., 1999; Persson 2009; Minois et al., 2011; Greene et al., 2013).

Las poliaminas se catabolizan mayoritariamente por desaminación oxidativa por la diaminoxidasa (DAO). La putrescina se puede oxidar por la DAO, produciendo alfa-aminobutiraldehído en lugar de convertirse a espermidina. La poliamina oxidasa (PAO) participa en la degradación de estas moléculas y de sus derivados acetilados, ya que cataliza la desaminación oxidativa de espermina produciendo espermidina o putrescina, dependiendo de la naturaleza del sustrato. La agmatina se cataboliza por la agmatinasa y produce putrescina. La actividad catabólica de PAO y de la espermina oxidasa generan altas cantidades de H₂O₂ citotóxico y aminoaldehídos lo cual favorecen la apoptosis (Casero and Pegg, 2009). La homeostasis de las poliaminas está fuertemente regulada y depende del equilibrio entre la velocidad de su biosíntesis, catabolismo, excreción y absorción. El transporte a través de la

membrana está reconocido como un factor importante en la homeostasis de poliaminas (Chaturvedi et al., 2004; Aouida et al., 2005; Minois et al., 2011; Greene et al., 2013).

Moya y colaboradores en 2012 reportaron un transcrito de una poliamina oxidasa con una expresión diferencial aumentada en especímenes de *Anemonia viridis* sometidos a estrés térmico y radiación UV. En *A. viridis*, la poliamina oxidasa está regulada tanto por un aumento en el estado aposimbótico (Ganot et al., 2011) como por estrés térmico, deduciendo que el catabolismo de la poliamina aumenta. Además, los transportadores para precursores de poliaminas, como la arginina, están regulados negativamente en respuesta al estrés, lo que limita la síntesis de poliaminas (Morris, 2006). Por otra parte, se sugiere que la función de la poliamina podría estar vinculada con la cromatina y la estabilización del ARN, esto debido a que también se reportaron muchas otras proteínas sobreexpresadas relacionadas con el procesamiento de ADN y ARN, como la ADN polimerasa dirigida por ARN (Igarashi and Kashiwagi, 2010). La expresión aumentada de la poliamina oxidasa en *A. viridis* es una fuente adicional e inesperada de producción de ROS; el exceso de producción de ROS a partir de la degradación de poliaminas, aunado a otros factores como la limitación de CO₂ y la homeostasis deteriorada de Ca²⁺ apuntan hacia la apoptosis y la necrosis como la primera respuesta celular inducida por el estrés térmico y/o radiación UV. Esto es debido a que en este mismo estudio se reportó un transcrito de una proteína de muerte celular programada 4 con una expresión diferencial aumentada, junto con la sobreexpresión de otros transcritos como caspasa 8 y Bcl-X. Tanto la apoptosis como la necrosis se han observado como mecanismos para la pérdida de simbiontes en la respuesta al estrés térmico y el blanqueamiento en los cnidarios, por lo tanto, está claro que la respuesta genética inmediata al estrés térmico está activando estas vías de muerte celular (Moya et al., 2012).

La cuarta proteína enlistada y que ha sido reportada en estudios diferenciales de blanqueamiento corresponde a la subunidad 6 del dominio F₀ de una proteína del tipo ATP sintasas. La F₁F₀-ATP sintasa, F₁F₀-ATPasa o complejo V, produce la mayoría del ATP a partir de ADP, un grupo fosfato y la energía suministrada por un grupo de protones en los eucariontes y en las bacterias. Este complejo enzimático se encuentra en las membranas transductoras de energía, como la membrana interna mitocondrial, la membrana tilacoidal del cloroplasto, y la membrana plasmática bacteriana. En eucariontes, la ATP sintasa utiliza el potencial electroquímico generado por los complejos de la cadena respiratoria o fotosintética para sintetizar ATP (Domínguez-Ramírez et al., 2005).

Las F₁F₀-ATPasas, incluidas las mitocondriales, las cloroplásticas y las bacterianas, se organizan en dos regiones estructural y funcionalmente distintas:

1.- Un dominio membranal (F_0), que participa en la translocación de iones (protones o sodio) y está compuesto básicamente por dos subunidades (a y c)

2.- Un dominio extrínseco de membrana (F_1), que contiene los sitios catalíticos (subunidades α y β); estos dominios se encuentran unidos a través de un tallo central (subunidades γ y ϵ) y un brazo periférico (subunidad b en la ATPasa de *Escherichia coli*, subunidad b y b' en las bacterias fotosintéticas, así como en la del cloroplasto subunidad b , d , y F_6 en la enzima mitocondrial; subunidad δ en la ATP sintasa bacteriana y cloroplástica; subunidad OSCP en la ATPasa mitocondrial, mientras que el resto de las subunidades varía de acuerdo a la especie) (Domínguez-Ramírez et al., 2005).

Ricaurte y colaboradores en 2016 reportaron una expresión diferencial aumentada de la proteína ATP sintasa F_0 subunidad 6 en el coral *Acropora palmata* y una expresión diferencial disminuida de la proteína ATP sintasa F_0 subunidad 8. La regulación disminuida de este tipo de proteínas en especímenes blanqueados de *A. palmata* básicamente compromete el sistema inmune innato del cnidario bajo estrés térmico por calor; las proteínas como la subunidad ATP sintasa 8 aunada a otras proteínas como la apextrina, la ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1 y el receptor tipo toll, son proteínas clave en la cascada de inmunidad que ocurre en los cnidarios ancestrales (Miller et al., 2007). Sin embargo, se ha reportado anteriormente el rol que juegan estas proteínas en los cnidarios simbióticos, más específicamente a nivel de simbiosoma. Las ATP sintasas son proteínas que se reportaron en la membrana de simbiosomas de cnidarios como la anemona *Aiptasia pulchella*, la presencia de estas proteínas en la superficie del simbiosoma sugiere fuertemente que el mecanismo de la endosimbiosis es un proceso dependiente de ATP. El transporte molecular es un proceso fundamental durante la asociación mutualista, se ha demostrado que casi el 90% de los compuestos generados por el endosimbionte Symbiodiniaceae se transportan a las células del hospedero en forma de lípidos y azúcares, mientras que las células del hospedero proporcionan a los endosimbiontes recursos inorgánicos, como nutrientes a base de nitrógeno y carbono; como consecuencia, la regulación del transporte molecular entre la célula hospedera y sus endosimbiontes se convierte en la interacción principal (Whitehead and Douglas, 2003). Es importante mencionar que estos procesos de transporte de moléculas entre los simbiosomas son dependientes de ATP existe un grupo de proteínas conocidas como transportares ABC que son responsable del transporte transmembranal de moléculas tales como ácidos grasos de cadena larga, enzimas, péptidos, lípidos, metales, iones minerales y orgánicos, nitrato, entre otros; dichos procesos son dependiente de ATP (Rapoport, 2007; Peng et al., 2010). Al existir una disminución de la expresión de las subunidades de las ATP sintasas, automáticamente se verían entorpecidos todos aquellos procesos relacionados con

el transporte de nutrientes entre los simbioses, lo cual desfavorecería enormemente la homeostasis de la simbiosis.

La quinta proteína enlistada y que ha sido reportada en estudios diferenciales de blanqueamiento pertenece al tipo de las proteínas antígeno endosómico temprano. El antígeno endosómico temprano (EEA1, por sus siglas en inglés *Early Endosome Antigen 1*) es una proteína que se localiza exclusivamente en endosomas tempranos y tiene un papel importante en el tráfico endosómico (Lawe et al., 2000). La endocitosis es un mecanismo clave por el cual las células introducen moléculas grandes, partículas extracelulares e incluso pequeñas células, englobándolas en una invaginación de la membrana citoplasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse de la membrana para incorporarse al citosol. Existen dos tipos de endosomas, cuando se produce la endocitosis, el material "ingerido" es englobado en una depresión endocítica; este englobamiento es llamado vesícula endocítica y se fusionará luego con el "endosoma temprano" (Alberts et al., 2014).

El endosoma temprano se forma con las vesículas endocíticas, tiene un pH de 6.1-6.82, debido a que en su membrana poseen una bomba protónica ATPasa que transporta hidrogeniones (H⁺) desde el citosol hacia el interior del endosoma, y está ubicado en la periferia de la célula. Una vez en el endosoma temprano, el material endocitado puede seguir dos caminos:

- 1.- Ser reciclado por medio de vesículas de reciclaje (fragmentos del endosoma temprano), e ir de vuelta al mismo dominio de membrana o a otro, proceso llamado transcitosis.

- 2.- Seguir la ruta hacia el "endosoma tardío" para ser degradado o convertirse en vesícula extracelular. Este se forma con fragmentos de los "endosomas tempranos" cerca del aparato de Golgi, tiene una ubicación más central dentro de la célula y un pH un poco más ácido que el endosoma temprano. Esto último le permitirá facilitar la función de las enzimas hidrolíticas que recibe del aparato de Golgi, formando así finalmente los lisosomas, orgánulos especializados en degradación (Alberts et al., 2014).

La especificidad en el direccionamiento de las vesículas endocíticas está asegurada debido a que todas presentan marcadores de superficie que las identifican con su origen y con su tipo de carga y, además, las membranas diana presentan receptores complementarios que reconocen a los marcadores apropiados. Este crucial proceso de reconocimiento está controlado por dos tipos de proteínas: las proteínas Rab que dirigen la vesícula a puntos específicos sobre la membrana diana adecuada y las proteínas SNARE que participan en la fusión de las bicapas lipídicas (Alberts et al., 2014).

Las proteínas efectoras de Rab son proteínas de unión filamentosa localizadas en la membrana diana, éstas interactúan con las proteínas Rab activas (Rab-GTP) que se localizan en la membrana de la vesícula endocítica, estableciendo el primer contacto entre las dos membranas que se fusionarán. A continuación, las proteínas SNARE de las dos membranas (tanto de la vesícula como del endosoma temprano) se aparean anclando la vesícula a la membrana y catalizando la fusión entre las dos bicapas lipídicas próximas (Alberts et al., 2014).

Existen distintos tipos de proteínas Rab dependiendo de su localización, por ejemplo: Rab5A, Rab5c, Rab4 y Rab11 son características de las membranas de endosomas tempranos, mientras que Rab7 y Rab9 son características de las membranas de los endosomas tardíos. EEA1 es una proteína efectora Rab5A que se une directamente al fosfolípido fosfatidilinositol 3-fosfato a través de su dominio FYVE C-terminal y forma un homodímero a través de una bobina enrollada. EEA1 actúa como una molécula de anclaje que une el acoplamiento de vesículas con SNARE como la proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida, acercando físicamente los endosomas y, en última instancia, dando como resultado la fusión y la entrega de carga endosómica (Lowe et al., 2000; Merithew et al., 2003; Alberts et al., 2014).

Weston y colaboradores en 2015 reportaron una expresión diferencial aumentada de la proteína antígeno endosómico temprano 1-afector multivalente de la GTPasa de tráfico Rab5A en especímenes de *Acropora palmanta* inducidos a blanqueamiento por estrés térmico y fótico. Se ha reportado anteriormente que los simbiosomas de la anémona de mar *Aiptasia pulchella* que envuelven a Symbiodiniaceae en condiciones normales, contienen la proteína estabilizadora de membrana asociada a vesículas ApRab5, y carecen de niveles detectables de proteínas reguladoras de la biogénesis del lisosoma ApRab7 y ApRab11; mientras que en simbiosomas con zooxantelas estresados térmicamente, había una ausencia de ApRab5 y estaban presentes las proteínas ApRab7 y ApRab11 (Chen et al., 2004, 2003). Estos datos muestran que la disminución de la expresión ApRab5 es una característica de la comunicación huésped-simbionte para que los simbiontes sanos persistan dentro del simbiosoma de las células huésped. Por lo tanto, la ausencia de ApRab en la maduración del simbiosoma es crítica para prevenir la remodelación liposomal en la etapa inicial de la membrana fagosómica, de este modo, los simbiosomas portadores de zooxantelas pueden evadir el reconocimiento del sistema inmune innato del cnidario y así sostener endosimbiosis (Brumell and Scidmore, 2007).

Por otra parte, también se logró identificar una proteína de tipo fosfolipasa A2 (PLA2), las PLA2 son enzimas del tipo hidrolasa-lipasas, las cuales inducen cambios en la composición membranal, activan la cascada inflamatoria y generan vías de señalamiento celular. Su función es la degradación de los glicerofosfolípidos

de las membranas mediante la hidrólisis del enlace sn-2, liberando así ácidos grasos y lisofosfolípidos, también son responsables de la movilización de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico. Se clasifican en: PLA2 citosólicas de alto peso molecular (cPLA2) y las PLA2 secretorias de bajo peso molecular (sPLA2); aquellas PLA2 que se encuentran contenidas en los venenos de organismos (así como también en la saliva y en el jugo pancreático) se clasifican en sPLA2 (Nevalainen et al., 2004). Las fosfolipasas de tipo patatina (PNPLA) son fosfolipasas secretorias que poseen un dominio catalítico conservado que muestra homología con la patatina/fosfolipasa independiente de Ca^{+2} (encontradas inicialmente en el tubérculo de la patata). Las PNPLA han sido reportadas como fosfolipasas secretorias con la capacidad de inducir cambios en la composición de la membrana, activar la cascada inflamatoria y alterar las vías de señalización celular; su citotoxicidad ha sido asociada precisamente a la presencia del dominio tipo patatina (Pankhaniya et al., 2004; Sitkiewicz et al., 2007; Chen et al., 2010).

Por otro lado, Nevalainen reportó en 2004 la presencia de una PNPLA putativa en el genoma de *Nematostella vectensis*, sin embargo, otros tipos de sPLA2 han sido reportadas en estudios diferenciales de blanqueamiento (Nevalainen, 2008). En el filo Cnidaria se han encontrado altos niveles de actividad sPLA2 en los venenos de diversas especies de la clase Hydrozoa, muchas veces este tipo de toxinas actúa en conjunto con otras citolisinas para producir la lisis celular (Six and Dennis, 2000). En 2019, Olgúin-López et al. reportaron la expresión diferencial aumentada de una fosfolipasa A2 en el extracto del proteoma soluble de especímenes de *Millepora alcicornis* inducidos a blanqueamiento por estrés térmico, sin embargo, en el mismo estudio se evaluó la actividad citolítica y entre los extractos de especímenes normales y blanqueados no se encontró diferencia significativa, por lo que se sugiere que la citólisis provocada por extractos de especímenes blanqueados es producida por otro tipo de citolisinas como las toxinas formadoras de poro (Olgúin-López et al., 2019). Por otro lado, Hernández-Elizárraga et al. reportó en 2019 la disminución en la expresión de una fosfolipasa A2 ácida y de una fosfolipasa A2 ácida independiente de calcio en especímenes de *Millepora complanata* blanqueados. Sin embargo, en este estudio sí se observó diferencia significativa entre la actividad citolítica de los extractos de especímenes normales y blanqueados, siendo menor en este último, por lo que se sugiere que la principal actividad citolítica de los venenos de *M. complanata* es llevada a cabo por toxinas de este tipo (Hernández-Elizárraga et al., 2019).

El resto de las proteínas han sido reportadas anteriormente en cnidarios, sin embargo, se desconoce la implicación que éstas puedan tener en la respuesta a estrés térmico y durante el fenómeno del blanqueamiento. La ADN polimerasa dirigida por ARN del elemento móvil jockey es una proteína con función de transcriptasa inversa, es decir, se encarga de la síntesis de ADN a partir de ARN

mensajero (retrotransposición de ADN); la demostración de una actividad retrotranscriptasa se identificó inicialmente en el elemento móvil jockey de *Drosophila*. Los elementos móviles (también conocidos como transposones) son secuencias de ADN que pueden moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula, este proceso puede causar mutaciones y cambio en la cantidad de ADN del genoma. Los transposones se pueden clasificar en aquellos que se transponen directamente como ADN (transposones de ADN) y en los que se transponen a través de un intermediario de ARN (retrotransposones). Este último grupo se subdivide en virales y no virales: dentro de los retrotransposones no virales, los elementos más abundantes en mamíferos son los que carecen de repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés *Long Terminal Repetitions*) y se dividen en dos clases: elementos dispersos largos (LINE, por sus siglas en inglés *Long Interspersed Elements*) y elementos dispersos cortos (SINE, por sus siglas en inglés *Short Interspersed Elements*). El elemento móvil jockey es similar en organización estructural y en potencial de codificación a las LINE de varios organismos. Los retrotransposones son elementos genéticos que se pueden amplificar a sí mismos en un genoma y son ubicuos componentes del ADN de muchos organismos eucariotas (Ivanov et al., 1991; López et al., 1999; Pierce et al., 2016).

Otra de las proteínas identificadas que no han sido reportadas en estudios diferenciales de blanqueamiento es la proteína activadora de recombinación V(D)J. Las iniciales V(D)J provienen de las distintas combinaciones génicas de los segmentos V (variable), D (diversidad) y J (joining), que a su vez dan origen a las regiones variables de las cadenas de los receptores de antígeno. La recombinación V(D)J es un mecanismo de recombinación genética que se da principalmente en vertebrados; consiste básicamente en ensamblar al azar aminoácidos de genes que codifican proteínas específicas con papeles importantes en el sistema inmunitario. Esta recombinación específica de localización genera un repertorio diverso de receptores de linfocitos T (TCR) y moléculas de inmunoglobulina (Ig) que son necesarios para el reconocimiento de diversos antígenos bacterianos, víricos y de parásitos. Solo se ha reportado la presencia de una proteína activadora de recombinación V(D)J putativa en cnidarios, más específicamente en el genoma de la anemona *Pocillopora damicornis*, sin embargo, más allá de una posible evolución en el sistema inmune de esta anemona, se desconoce la implicación puntual de dicha proteína putativa en los cnidarios (García-Mariscal et al., 2013; Cunning et al., 2018).

La proteína factor 6 asociado a DDB1-CUL4 fue otra de las proteínas identificadas que no se han reportado en estudios de blanqueamiento. Las ligasas de dedo de anillo de culina (CRL, por sus siglas en inglés *Cullin-Ring finger Ligases*) constituyen la familia más grande de ubiquitina ligasas en células eucariotas y sirven como

reguladores vitales de una amplia gama de procesos celulares; se conocen 7 principales culinas (CUL1, CUL2, CUL3, CUL4A, CUL4B, CUL5 y CUL7). Cada culina actúa como un andamio para interactuar con un adaptador específico y diversos receptores de sustrato de manera combinatoria. Las CRLs se ensamblan de manera similar, de modo que el extremo N-terminal de culina se conecta a los receptores del sustrato a través de moléculas adaptadoras, mientras que el extremo C-terminal de culina interactúa con la proteína Rbx1 para reclutar la enzima conjugadora de ubiquitina E2 (Petroski & Deshaies, 2005; Chen et al., 2006).

La CUL4-DDB1 es una ubiquitina ligasa que regula la proliferación celular, la supervivencia, la reparación del ADN y la integridad genómica a través de la ubiquitinación dirigida de reguladores clave. CUL4 (CUL4A y 4B) se diferencia de otras culinas en que emplea la proteína DDB1 como su adaptador, la cual muestra diferentes propiedades estructurales y bioquímicas en comparación con los adaptadores BTB de otras culinas. Además, pueden ser necesarios factores para el plegamiento y el ensamblaje adecuados de un complejo de ubiquitina ligasa CUL4-DDB1 funcional. Entre las funciones más importantes se encuentra la degradación de las proteínas STAT, lo cual deshabilita las moléculas de señalización clave en la vía del interferón de la respuesta antiviral. El factor 6 (DCAF6) es una proteína que funge como coactivador del receptor de esteroides (Lee and Zhou, 2007).

Por otra parte, la α -aminoadípico semialdehído sintasa mitocondrial es otra proteína que también se identificó, sin embargo, dicha proteína no está reportada en estudios de blanqueamiento. Dicha proteína es una enzima bifuncional y tiene tanto actividad lisina-cetoglutarato reductasa (LCR) como sacaropina deshidrogenada (SDH), y cataliza los dos primeros pasos en la ruta de degradación de la lisina dentro de la mitocondria. Básicamente el extremo N-terminal contiene la porción con actividad lisina-cetoglutarato reductasa, en el primer paso se condensan lisina y 2-oxoglutarato a una molécula llamada sacaropina. A continuación, el extremo C-terminal esta enzima, posee la actividad sacaropina deshidrogenasa, y cataliza la oxidación de sacaropina para producir alfa-aminoadípico semialdehído y glutamato. Estas reacciones son el reverso de las etapas correspondientes en las vías de la biosíntesis de lisina presentes en organismos como levadura y hongos (Crowther et al., 2019).

Por último, se identificó un mediador de la subunidad 6 de la ARN polimerasa II que no ha sido reportada en estudios diferenciales de blanqueamiento. La ARN polimerasa II es una enzima de células eucariotas que cataliza la transcripción del ADN a precursores de ARN mensajero, microARNs y otros tipos de ácidos ribonucleicos. Se trata de complejo multienzimático de 12 subunidades, su unión a las secuencias promotoras de la expresión génica depende de la presencia de factores de transcripción. Como enzima funge como nucleotidil transferasa capaz de añadir, en ausencia de cebador, un nuevo residuo a un ribonucleótido en su

extremo 3'. Las ARN polimerasas requieren de un complejo proteico mediador que las porte y coloque en el lugar adecuado de unión en la caja TATA con su respectivo factor de transcripción, el mediador es un componente principal de la regulación en eucariotas. Es un complejo de 24 subunidades que actúa como intermediario entre las proteínas de regulación génica y la RNA polimerasa. Además, esta proteína proporciona una extensa área de contacto para las proteínas reguladoras de genes comparada con la que proporciona la RNA polimerasa por sí sola, como en el caso de las bacterias (Alberts et al., 2014).

Es importante mencionar que se lograron obtener proteínas que presentaron similitud con proteínas de membrana tales como la ATP sintasa F_0 subunidad 6 mitocondrial y el antígeno endosómico temprano 1. Esto nos permite inferir que se logró la obtención de proteínas de la fracción insoluble del proteoma, estas proteínas cuentan con dominios transmembranales compuestos por aminoácidos hidrofóbicos tales como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina; la obtención de este tipo de proteínas marca una diferencia importante en comparación con el proteoma soluble obtenido por Hernández-Elizárraga y col. en el 2019 (Cheng et al., 2018; Hernández-Elizárraga et al., 2019).

A pesar de que el presente estudio del proteoma total es preliminar, la información obtenida es altamente valiosa si en un futuro se realiza un estudio proteómico diferencial del proteoma total sobre los efectos del estrés térmico responsable del blanqueamiento en el holobionte de *M. complanata*. Dicho estudio supone un punto de partida metodológico para la obtención de proteínas pertenecientes a la fracción soluble e insoluble del proteoma, así como también garantiza la obtención de extractos capaces de ser separados por electroforesis bidimensional y analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF y cromatografía líquida acoplada a masas. Es importante continuar con el análisis del proteoma total empleando la información obtenida en el presente trabajo, para así profundizar en los mecanismos moleculares y procesos fisiológicos de supervivencia de estas especies amenazadas, con el objetivo de tener un mejor entendimiento del fenómeno del blanqueamiento en *M. complanata*.

10. CONCLUSIONES

1. La metodología de disrupción de tejido empleando el rayador de vidrio Dremel, en combinación con el amortiguador de extracción Tris-HCl demostró ser la metodología más efectiva para la obtención de proteínas totales de *Millepora complanata*. El proteoma total obtenido a partir de esta metodología mostró un perfil electroforético unidimensional con la mayor abundancia de bandas y la mayor concentración de proteína.
2. El blanqueamiento indujo una disminución significativa en la concentración de proteínas totales en los especímenes de *M. complanata*.
3. Las proteínas solubles e insolubles en agua identificadas por la metodología de cromatografía de líquidos acoplada a masas confirman que el método Tris-HCl es efectivo para la obtención de proteínas pertenecientes a la fracción soluble y a la fracción insoluble del proteoma de *Millepora complanata*.
4. La metodología de Tris-HCl demostró ser una metodología útil para la obtención de perfiles bidimensionales del proteoma total de *Millepora complanata* normal, debido a la presencia de numerosos spots bien definidos.
5. Las proteínas reportadas anteriormente en estudios diferenciales de blanqueamiento en anthozoos, y que también se encuentran presentes en los extractos de *Millepora complanata* blanqueado, nos permiten inferir que existe similitud en ciertos procesos fisiológicos y de supervivencia entre organismos de la clase Hydrozoa y Anthozoa. Sin embargo, es necesario identificar proteínas adicionales que pudieran formar parte de los mismos procesos fisiológicos o estar relacionadas con las proteínas identificadas, para de esta forma, confirmar si los procesos ocurren de manera similar.
6. Se lograron identificar proteínas contenidas en el proteoma total de *Millepora complanata* blanqueado. Sin embargo, es necesario identificar las proteínas presentes en el proteoma de *Millepora complanata* normal para realizar un estudio diferencial y determinar el efecto del blanqueamiento provocado por estrés térmico sobre el proteoma total del holobionte *Millepora complanata*.
7. El presente estudio es un aporte metodológico sumamente valioso para el estudio proteómico de organismos hidrozoo constructores de arrecifes, y un punto de partida para el estudio proteómico diferencial de los efectos del blanqueamiento provocado por estrés térmico en *Millepora complanata*.

9. REFERENCIAS

1. Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics [WWW Document]. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01511>
2. Aihara, Y., Maruyama, S., Baird, A.H., Iguchi, A., Takahashi, S., Minagawa, J., 2019. Green fluorescence from cnidarian hosts attracts symbiotic algae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 2118–2123. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812257116>
3. Alamo, M.A.F., Rivas, G., 2007. Niveles de organización en animales. UNAM.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular biology of the cell*, 6th edn New York. NY: WW Norton & Company.
5. Anderluh, G., Podlesek, Z., Maček, P., 2000. A common motif in propeptides of Cnidarian toxins and nematocyst collagens and its putative role11GenBank accession number AF130344. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1476, 372–376. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00237-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00237-X)
6. Anthony, K.R.N., 2016. Coral Reefs Under Climate Change and Ocean Acidification: Challenges and Opportunities for Management and Policy. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 41, 59–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-110615-085610>
7. Anthony, K.R.N., Kline, D.I., Diaz-Pulido, G., Dove, S., Hoegh-Guldberg, O., 2008. Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 17442–17446. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804478105>
8. Aouida, M., Leduc, A., Poulin, R., & Ramotar, D. (2005). AGP2 encodes the major permease for high affinity polyamine import in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 24267-24276.
9. Aracil, C.B., Rodríguez, M.P., Magraner, J.P., Pérez, R.S., 2011. *Fundamentos de bioquímica*. Universitat de València.
10. Baker, A.C., 2003. Flexibility and Specificity in Coral-Algal Symbiosis: Diversity, Ecology, and Biogeography of Symbiodinium. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34, 661–689. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132417>
11. Baker, A.C., 2001. Reef corals bleach to survive change. *Nature* 411, 765–766. <https://doi.org/10.1038/35081151>

12. Barott, K.L., Venn, A.A., Perez, S.O., Tambutté, S., Tresguerres, M., 2015. Coral host cells acidify symbiotic algal microenvironment to promote photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 607–612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413483112>
13. Barshis, D.J., Ladner, J.T., Oliver, T.A., Seneca, F.O., Traylor-Knowles, N., Palumbi, S.R., 2013. Genomic basis for coral resilience to climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 1387–1392. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210224110>
14. Bhagooli, R., 2013. Inhibition of Calvin–Benson cycle suppresses the repair of photosystem II in *Symbiodinium*: implications for coral bleaching. *Hydrobiologia* 714, 183–190. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1535-4>
15. Brinkman, D.L., Konstantakopoulos, N., McInerney, B.V., Mulvenna, J., Seymour, J.E., Isbister, G.K., Hodgson, W.C., 2014. Chironex fleckeri (Box Jellyfish) Venom Proteins EXPANSION OF A CNIDARIAN TOXIN FAMILY THAT ELICITS VARIABLE CYTOLYTIC AND CARDIOVASCULAR EFFECTS. *J. Biol. Chem.* 289, 4798–4812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.534149>
16. Brumell, J.H., Scidmore, M.A., 2007. Manipulation of Rab GTPase Function by Intracellular Bacterial Pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 636–652. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-07>
17. Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., & Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140(2), 103-125.
18. Bourne, D., Iida, Y., Uthicke, S., & Smith-Keune, C. (2008). Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *The ISME journal*, 2(4), 350.
19. Cao, L., Caldeira, K., Jain, A.K., 2007. Effects of carbon dioxide and climate change on ocean acidification and carbonate mineral saturation. *Geophys. Res. Lett.* 34, L05607. <https://doi.org/10.1029/2006GL028605>
20. Casero, R.A., Pegg, A.E., 2009. Polyamine catabolism and disease. *Biochem. J.* 421, 323–338. <https://doi.org/10.1042/BJ20090598>
21. Chaturvedi, R., Cheng, Y., Asim, M., Bussière, F. I., Xu, H., Gobert, A. P., ... & Wilson, K. T. (2004). Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and

mitochondrial membrane depolarization. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 40161-40173.

22. Chen, M.-C., Cheng, Y.-M., Hong, M.-C., Fang, L.-S., 2004. Molecular cloning of Rab5 (ApRab5) in *Aiptasia pulchella* and its retention in phagosomes harboring live zooxanthellae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1024–1033. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.151>
23. Chen, M.-C., Cheng, Y.-M., Sung, P.-J., Kuo, C.-E., Fang, L.-S., 2003. Molecular identification of Rab7 (ApRab7) in *Aiptasia pulchella* and its exclusion from phagosomes harboring zooxanthellae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 586–595. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01428-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01428-1)
24. Chen, W., Chang, B., Li, L., Chan, L., 2010. Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology* 52, 1134–1142. <https://doi.org/10.1002/hep.23812>
25. Chen, X., Zhang, J., Lee, J., Lin, P.S., Ford, J.M., Zheng, N., Zhou, P., 2006. A Kinase-Independent Function of c-Abl in Promoting Proteolytic Destruction of Damaged DNA Binding Proteins. *Mol. Cell* 22, 489–499. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.04.021>
26. Cheng, H., Zhao, H., Yang, T., Ruan, S., Wang, H., Xiang, N., Zhou, H., Li, Q.X., Diao, X., 2018. Comparative evaluation of five protocols for protein extraction from stony corals (Scleractinia) for proteomics. *ELECTROPHORESIS* 39, 1062–1070. <https://doi.org/10.1002/elps.201700436>
27. Cragg, G.M., Newman, D.J., 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1830, 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
28. Crowther, L. M., Mathis, D., Poms, M., & Plecko, B. (2019). New insights into human lysine degradation pathways with relevance to pyridoxine-dependent epilepsy due to antiquitin deficiency. *Journal of inherited metabolic disease.* 52, 620-628. <https://doi.org/10.1002/jimd.12076>
29. Cunning, R., Bay, R.A., Gillette, P., Baker, A.C., Traylor-Knowles, N., 2018. Comparative analysis of the *Pocillopora damicornis* genome highlights role of immune system in coral evolution. *Sci. Rep.* 8, 16134. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34459-8>
30. Curtis, H., Schnek, A., 2006. *Invitación a la biología*. Ed. Médica Panamericana.

31. Daly, M., Brugler, M.R., Cartwright, P., Collins, A.G., Dawson, M.N., Fautin, D.G., France, S.C., McFadden, C.S., Opresko, D.M., Rodriguez, E., Romano, S.L., Stake, J.L., 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus.
32. DeSalvo, M.K., Estrada, A., Sunagawa, S., Medina, M., 2012. Transcriptomic responses to darkness stress point to common coral bleaching mechanisms. *Coral Reefs* 31, 215–228. <https://doi.org/10.1007/s00338-011-0833-4>
33. DeSalvo, M.K., Sunagawa, S., Voolstra, C.R., Medina, M., 2010. Transcriptomic responses to heat stress and bleaching in the elkhorn coral *Acropora palmata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 402, 97–113. <https://doi.org/10.3354/meps08372>
34. Domínguez-Ramírez, L., Gómez-Puyou, M.T. de, Domínguez-Ramírez, L., Gómez-Puyou, M.T. de, 2005. La F 1 F 0 ATP sintasa: un complejo proteico con gran versatilidad estructural y funcional. *TIP Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas* 8, 18–27.
35. Fransolet, D., Roberty, S., Plumier, J.-C., 2012. Establishment of endosymbiosis: The case of cnidarians and Symbiodinium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 420–421, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.03.015>
36. Frazão, B., Campos, A., Osório, H., Thomas, B., Leandro, S., Teixeira, A., Vasconcelos, V., Antunes, A., 2017. Analysis of *Pelagia noctiluca* proteome Reveals a Red Fluorescent Protein, a Zinc Metalloproteinase and a Peroxiredoxin. *Protein J.* 36, 77–97. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9695-0>
37. Ganot, P., Moya, A., Magnone, V., Allemand, D., Furla, P., Sabourault, C., 2011. Adaptations to Endosymbiosis in a Cnidarian-Dinoflagellate Association: Differential Gene Expression and Specific Gene Duplications. *PLOS Genet.* 7, e1002187. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002187>
38. García-Mariscal, A., del Blanco, B., Hernández-Munain, C., 2013. Generación de diversidad de los receptores de antígeno en linfocitos: validación del «modelo de accesibilidad» en el control de la recombinación V(D)J. *Inmunología* 32, 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2012.07.003>
39. Gates, R.D., Baghdasarian, G., Muscatine, L., 1992. Temperature Stress Causes Host Cell Detachment in Symbiotic Cnidarians: Implications for Coral Bleaching. *Biol. Bull.* 182, 324–332. <https://doi.org/10.2307/1542252>
40. Gierz, S.L., Forêt, S., Leggat, W., 2017. Transcriptomic Analysis of Thermally Stressed Symbiodinium Reveals Differential Expression of Stress and

41. Glasl, B., Herndl, G. J., & Frade, P. R. (2016). The microbiome of coral surface mucus has a key role in mediating holobiont health and survival upon disturbance. *The ISME journal*, 10(9), 2280.
42. Glider, W.V., 1985. The Biology of the Association of Symbiodinium Microadriaticum with Aiptasia Pallida: An Anemone-Alga Symbiosis.
43. Greene, J. M., Feugang, J. M., Pfeiffer, K. E., Stokes, J. V., Bowers, S. D., & Ryan, P. L. (2013). L-arginine enhances cell proliferation and reduces apoptosis in human endometrial RL95-2 cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1), 15.
44. Guder, C., Philipp, I., Lengfeld, T., Watanabe, H., Hobmayer, B., & Holstein, T. W. (2006). The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene*, 25(57), 7450.
45. He, Q.-Y., Chiu, J.-F., 2003. Proteomics in biomarker discovery and drug development. *J. Cell. Biochem.* 89, 868–886.
<https://doi.org/10.1002/jcb.10576>
46. Hernández-Elizárraga, 2017. ESTUDIO PROTEÓMICO DEL EFECTO DEL BLANQUEAMIENTO DE ARRECIFES CORALINOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE TOXINAS DEL “CORAL DE FUEGO” *Millepora complanata*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO, Santiago de Querétaro, Qro.
47. Hernández-Elizárraga, V.H., Olgún-López, N., Hernández-Matehuala, R., Ocharán-Mercado, A., Cruz-Hernández, A., Guevara-González, R.G., Caballero-Pérez, J., Ibarra-Alvarado, C., Sánchez-Rodríguez, J., Rojas-Molina, A., 2019. Comparative Analysis of the Soluble Proteome and the Cytolytic Activity of Unbleached and Bleached *Millepora complanata* (“Fire Coral”) from the Mexican Caribbean. *Mar. Drugs* 17, 393.
<https://doi.org/10.3390/md17070393>
48. Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C.M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R.H., Dubi, A., Hatziolos, M.E., 2007. Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science* 318, 1737–1742.
<https://doi.org/10.1126/science.1152509>

49. Ibarra-Alvarado, C., Alejandro García, J., Aguilar, M.B., Rojas, A., Falcón, A., Heimer de la Cotería, E.P., 2007. Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 511–518. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.06.002>
50. Igarashi, K., Kashiwagi, K., 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.009>
51. Ivanov, V. a., Melnikov, A. a., Siunov, A. v., Fodor, I. i., Ilyin, Y. v., 1991. Authentic reverse transcriptase is coded by jockey, a mobile *Drosophila* element related to mammalian LINES. *EMBO J.* 10, 2489–2495. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07788.x>
52. Jain, R., Sonawane, S., Mandrekar, N., 2008. Marine organisms: Potential source for drug discovery. *Curr. Sci.* 94.
53. Kawaguti, S. (1969). Effect of the green fluorescent pigment on the productivity of the reef corals. *Micronesica*, 5(313), 121.
54. Krueger, T., Hawkins, T.D., Becker, S., Pontasch, S., Dove, S., Hoegh-Guldberg, O., Leggat, W., Fisher, P.L., Davy, S.K., 2015. Differential coral bleaching—Contrasting the activity and response of enzymatic antioxidants in symbiotic partners under thermal stress. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 190, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.08.012>
55. Kumburegama, S., Wijesena, N., Xu, R., & Wikramanayake, A. H. (2011). Strabismus-mediated primary archenteron invagination is uncoupled from Wnt/ β -catenin-dependent endoderm cell fate specification in *Nematostella vectensis* (Anthozoa, Cnidaria): Implications for the evolution of gastrulation. *EvoDevo*, 2(1), 2.
56. Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 225-257.
57. Lawe, D.C., Patki, V., Heller-Harrison, R., Lambright, D., Corvera, S., 2000. The FYVE Domain of Early Endosome Antigen 1 Is Required for Both Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Rab5 Binding CRITICAL ROLE OF THIS DUAL INTERACTION FOR ENDOSOMAL LOCALIZATION. *J. Biol. Chem.* 275, 3699–3705. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3699>
58. Lee, J., Jung, E., Kim, Y., Park, J., Park, J., Hong, S., ... & Park, D. (2006). Asiaticoside induces human collagen I synthesis through TGF β receptor I

kinase (T β RI kinase)-independent Smad signaling. *Planta medica*, 72(04), 324-328.

59. Lee, H., Jung, E., Kang, C., Yoon, W.D., Kim, J.-S., Kim, E., 2011. Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. *Toxicon* 58, 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.06.007>
60. Lee, J., Zhou, P., 2007. DCAFs, the Missing Link of the CUL4-DDB1 Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell* 26, 775–780. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.001>
61. Lee, S. T., Keshavmurthy, S., Fontana, S., Takuma, M., Chou, W. H., & Chen, C. A. (2018). Transcriptomic response in *Acropora muricata* under acute temperature stress follows preconditioned seasonal temperature fluctuations. *BMC research notes*, 11(1), 119.
62. López, M.C., Olivares, M., González, C.I., Martín, F., García Pérez, J.L., Thomas, M.C., 1999. Elementos móviles ¿Ventaja evolutiva o parasitismo molecular? Mobile elements: Positive evolution or molecular parasitisms?
63. López Quimbayo, L. D. Extracción de proteínas a partir de hojas y semillas de pentacalia nítida y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto proteico acuoso (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias).
64. Lozoya, A.V. de, 1994. Envenenamientos por animales: animales venenosos y urticantes del mundo. Ediciones Díaz de Santos.
65. Mansfield, K. M., Carter, N. M., Nguyen, L., Cleves, P. A., Alshanbayeva, A., Williams, L. M., ... & Siggers, T. W. (2017). Transcription factor NF- κ B is modulated by symbiotic status in a sea anemone model of cnidarian bleaching. *Scientific reports*, 7(1), 16025.
66. Mayfield, A.B., Chen, Y.-J., Lu, C.-Y., Chen, C.-S., 2018. The proteomic response of the reef coral *Pocillopora acuta* to experimentally elevated temperatures. *PLOS ONE* 13, e0192001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192001>
67. Merithew, E., Stone, C., Eathiraj, S., Lambright, D.G., 2003. Determinants of Rab5 Interaction with the N Terminus of Early Endosome Antigen 1. *J. Biol. Chem.* 278, 8494–8500. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211514200>
68. Miller, D.J., Hemmrich, G., Ball, E.E., Hayward, D.C., Khalturin, K., Funayama, N., Agata, K., Bosch, T.C., 2007. The innate immune repertoire in Cnidaria - ancestral complexity and stochastic gene loss. *Genome Biol.* 8, R59. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-4-r59>

69. Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2011). Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)*, 3(8), 716.
70. Morris, S.M., 2006. Arginine: beyond protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 508S-512S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.508S>
71. Moxon, J.V., Padula, M.P., Herbert, B.R., Golledge, J., 2009. Challenges, Current Status and Future Perspectives of Proteomics in Improving Understanding, Diagnosis and Treatment of Vascular Disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 38, 346–355. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2009.05.008>
72. Moya, A., Ganot, P., Furla, P., Sabourault, C., 2012. The transcriptomic response to thermal stress is immediate, transient and potentiated by ultraviolet radiation in the sea anemone *Anemonia viridis*. *Mol. Ecol.* 21, 1158–1174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05458.x>
73. Nevalainen, T.J., 2008. Phospholipases A2 in the genome of the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 3, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2008.04.003>
74. Nevalainen, T.J., Peuravuori, H.J., Quinn, R.J., Llewellyn, L.E., Benzie, J.A.H., Fenner, P.J., Winkel, K.D., 2004. Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 139, 731–735. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.006>
75. Oakley, C.A., Durand, E., Wilkinson, S.P., Peng, L., Weis, V.M., Grossman, A.R., Davy, S.K., 2017. Thermal Shock Induces Host Proteostasis Disruption and Endoplasmic Reticulum Stress in the Model Symbiotic Cnidarian *Aiptasia*. *J. Proteome Res.* 16, 2121–2134. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00797>
76. Obura, D.O., 2009. Reef corals bleach to resist stress. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.10.002>
77. Olguín-López, N., Hernández-Elizárraga, V.H., Hernández-Matehuala, R., Cruz-Hernández, A., Guevara-González, R., Caballero-Pérez, J., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., 2019. Impact of El Niño-Southern Oscillation 2015-2016 on the soluble proteomic profile and cytolytic activity of *Millepora alcicornis* (“fire coral”) from the Mexican Caribbean. *PeerJ* 7, e6593. <https://doi.org/10.7717/peerj.6593>
78. Özbek, S., 2011. The cnidarian nematocyst: a miniature extracellular matrix within a secretory vesicle. *Protoplasma* 248, 635–640. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0219-4>

79. Pankhaniya, R.R., Tamura, M., Allmond, L.R., Moriyama, K., Ajayi, T., Wiener-Kronish, J.P., Sawa, T., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* causes acute lung injury via the catalytic activity of the patatin-like phospholipase domain of ExoU*. *Crit. Care Med.* 32, 2293. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000145588.79063.07>
80. Peng, S.-E., Wang, Y.-B., Wang, L.-H., Chen, W.-N.U., Lu, C.-Y., Fang, L.-S., Chen, C.-S., 2010. Proteomic analysis of symbiosome membranes in Cnidaria–dinoflagellate endosymbiosis. *PROTEOMICS* 10, 1002–1016. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900595>
81. Persson, L. (2009). Polyamine homeostasis. *Essays in biochemistry*, 46, 11-24.
82. Petroski, M. D., & Deshaies, R. J. (2005). Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-RING ubiquitin-ligase complex SCF-Cdc34. *Cell*, 123(6), 1107-1120.
83. Pierce, S.K., Mahadevan, P., Massey, S.E., Middlebrooks, M.L., 2016. A Preliminary Molecular and Phylogenetic Analysis of the Genome of a Novel Endogenous Retrovirus in the Sea Slug *Elysia chlorotica*. *Biol. Bull.* 231, 236–244. <https://doi.org/10.1086/691071>
84. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229-233.
85. Rabilloud, T., Lelong, C., 2011. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *J. Proteomics* 74, 1829–1841. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.040>
86. Rapoport, T. A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450(7170), 663.
87. Riaño-Pachón, D.M., Kleessen, S., Neigenfind, J., Durek, P., Weber, E., Engelsberger, W.R., Walther, D., Selbig, J., Schulze, W.X., Kersten, B., 2010. Proteome-wide survey of phosphorylation patterns affected by nuclear DNA polymorphisms in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 11, 411. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-411>
88. Ricaurte, M., Schizas, N.V., Ciborowski, P., Boukli, N.M., 2016. Proteomic analysis of bleached and unbleached *Acropora palmata*, a threatened coral species of the Caribbean. *Mar. Pollut. Bull.* 107, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.068>

89. Richier, S., Rodriguez-Lanetty, M., Schnitzler, C.E., Weis, V.M., 2008. Response of the symbiotic cnidarian *Anthopleura elegantissima* transcriptome to temperature and UV increase. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 3, 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2008.08.001>
90. Righetti, P.G., Campostrini, N., Pascali, J., Hamdan, M., Astner, H., 2004. Quantitative Proteomics: A Review of Different Methodologies. *Eur. J. Mass Spectrom.* 10, 335–348. <https://doi.org/10.1255/ejms.600>
91. Rojas, A., Torres, M., Rojas, J.I., Feregrino, A., Heimer-de la Cotera, E.P., 2002. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* 40, 777–785. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00281-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00281-1)
92. Rosado, C.J., Kondos, S., Bull, T.E., Kuiper, M.J., Law, R.H.P., Buckle, A.M., Voskoboinik, I., Bird, P.I., Trapani, J.A., Whisstock, J.C., Dunstone, M.A., 2008. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell. Microbiol.* 10, 1765–1774. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01191.x>
93. Roth, M.S., 2014. The engine of the reef: photobiology of the coral–algal symbiosis. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00422>
94. Salih, A., Larkum, A., Cox, G., Kühl, M., Hoegh-Guldberg, O., 2000. Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature* 408, 850–853. <https://doi.org/10.1038/35048564>
95. Searle, J., Kerr, J.F., Bishop, C.J., 1982. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.* 17 Pt 2, 229–259.
96. Sitkiewicz, I., Stockbauer, K.E., Musser, J.M., 2007. Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol.* 15, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.12.003>
97. Six, D.A., Dennis, E.A., 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1488, 1–19. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00105-0)
98. Slattery, M., Ankisetty, S., Corrales, J., Marsh-Hunkin, K.E., Gochfeld, D.J., Willett, K.L., Rimoldi, J.M., 2012. Marine Proteomics: A Critical Assessment of an Emerging Technology. *J. Nat. Prod.* 75, 1833–1877. <https://doi.org/10.1021/np300366a>

99. Smith-Keune, C., & Dove, S. (2008). Gene expression of a green fluorescent protein homolog as a host-specific biomarker of heat stress within a reef-building coral. *Marine Biotechnology*, 10(2), 166-180.
100. Steen, R.G., Muscatine, L., 1987. Low temperature evokes rapid exocytosis of symbiotic algae by a sea anemone. *Biol. Bull.* 172, 246–263. <https://doi.org/10.2307/1541797>
101. Technau, U., Steele, R.E., 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Dev. Camb. Engl.* 138, 1447–1458. <https://doi.org/10.1242/dev.048959>
102. Tomanek, L., 2011. Environmental Proteomics: Changes in the Proteome of Marine Organisms in Response to Environmental Stress, Pollutants, Infection, Symbiosis, and Development. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 3, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142729>
103. Torreblanca, A., Barea, J.L.-, 2005. Proteómica: conceptos, desarrollo actual y aplicación en monitorización ambiental. *Rev. Toxicol.* 22, 72–73.
104. Veron, J.E.N., Hoegh-Guldberg, O., Lenton, T.M., Lough, J.M., Obura, D.O., Pearce-Kelly, P., Sheppard, C.R.C., Spalding, M., Stafford-Smith, M.G., Rogers, A.D., 2009. The coral reef crisis: The critical importance of <350ppm CO₂. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1428–1436. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.09.009>
105. Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., & Cresti, M. (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, 24(14), 2369-2375.
106. Wang, K., Huang, C., Nice, E., 2014. Recent advances in proteomics: towards the human proteome. *Biomed. Chromatogr.* 28, 848–857. <https://doi.org/10.1002/bmc.3157>
107. Weis, V.M., 2008. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J. Exp. Biol.* 211, 3059–3066. <https://doi.org/10.1242/jeb.009597>
108. Weston, A.J., Dunlap, W.C., Beltran, V.H., Starcevic, A., Hranueli, D., Ward, M., Long, P.F., 2015. Proteomics Links the Redox State to Calcium Signaling During Bleaching of the Scleractinian Coral *Acropora microphthalma* on Exposure to High Solar Irradiance and Thermal Stress.

109. Whitehead, L.F., Douglas, A.E., 2003. Metabolite comparisons and the identity of nutrients translocated from symbiotic algae to an animal host. *J. Exp. Biol.* 206, 3149–3157. <https://doi.org/10.1242/jeb.00539>
110. Williams, S.M., Sánchez-Godínez, C., Newman, S.P., Cortés, J., 2017. Ecological assessments of the coral reef communities in the Eastern Caribbean and the effects of herbivory in influencing coral juvenile density and algal cover. *Mar. Ecol.* 38, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/maec.12395>
111. Wooldridge, S.A., 2013. Breakdown of the coral-algae symbiosis: towards formalising a linkage between warm-water bleaching thresholds and the growth rate of the intracellular zooxanthellae. *Biogeosciences* 10, 1647–1658. <https://doi.org/10.5194/bg-10-1647-2013>

Dirección General de Bibliotecas

ANEXOS



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

DGOPA -PF-01

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN
COMISIÓN NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA

DIRECCIÓN GENERAL DE ORDENAMIENTO PESQUERO Y ACUÍCOLA

PERMISO DE PESCA DE FOMENTO

FOLIO No.139/15

Permiso de Pesca de Fomento No. PPF/DGOPA-139/15 Vigencia del 19 de octubre de 2015 Al 19 de octubre de 2016
Expedido en: Mazatlán, Sinaloa El día 19 de octubre de 2015

Titular del Permiso: Universidad Autónoma de Querétaro. Clave R.N.P. 2201001928
Domicilio: Cerro de las Campanas, S/N. Colonia: Las Campanas C.P. 76010
Localidad: Querétaro Municipio: Querétaro Entidad: Querétaro

Título del Proyecto: "Caracterización bioquímica y farmacológica de toxinas obtenidas a partir de especies del genero *Millepora* del Caribe Mexicano y determinación del efecto del blanqueamiento sobre la expresión de toxinas".

Zona de Operación: Aguas marinas de jurisdicción federal del Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos en las localidades: La Bocana Chica, La Ceiba y Jardines.

Nombre(s) de la(s) Embarcación(es) Autorizadas: Número de Matrícula(s): Marca y Potencia del Motor:
Las embarcaciones a utilizar serán proporcionadas por el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Puerto Morelos, UNAM.

Artes o Equipos de Pesca Autorizados:
Cinzel y martillo.
Taladro neumático para la extracción de núcleos.
Equipo de buceo autónomo.

Sitio de Desembarque Autorizado o Puerto Base:

Nombre del Investigador Responsable: Dr. José Alejandro García Arredondo y Dra. Alejandra Rojas Molina.
Institución que respalde Si No Nombre: Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

Con Base en la(s) Opinión(es) Técnica(s):
-Instituto Nacional de Pesca: Oficio No.- R/JL/INAPESCA/DGAIPA/868/2015 de fecha 4 de septiembre de 2015.

Este permiso se expide con fundamento en lo dispuesto en los artículos 1°, 4° fracción XXXII y 28 fracción II, III, V, 41 fracción V y 64 de la Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentables; 16 fracciones I y II, 20, 25, 29, 30 fracción I inciso b), 31 fracción II inciso c), 69, 71, 72, 74, 76 y 78 de su Reglamento; artículo 35 fracciones XXI y XXII de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; artículos 1°, 2° inciso d), fracción III y octavo transitorio del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, y 2 fracción II del Decreto por el cual se crea la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, el cual es:

- a) Intransferible.
- b) Se otorga sin perjuicio de los permisos o autorizaciones que requieran de otras autoridades competentes.
- c) Los documentos nacionales o extranjeros que se publiquen como resultado de las actividades realizadas, deberán hacer referencia al número del permiso correspondiente otorgado por esta Comisión.
- d) Sus efectos se extinguirán por cualquiera de las causas señaladas en los artículos 52, 53, 54, 55, 56 y 57 de la Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentables o por incumplimiento de las obligaciones que le impone el mismo.

VICTOR MANUEL ARRIAGA HARO
NOMBRE
AUTORIDAD EXPEDIDORA
DIRECTOR GENERAL
CARGO
FIRMA
HOJA 1 DE 3

NOTA: Este Documento no es válido si lleva tachaduras o enmendaduras

INTERESADO



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

DGOPA -PF -02

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN
COMISIÓN NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA
DIRECCIÓN GENERAL DE ORDENAMIENTO PESQUERO Y ACUÍCOLA
PERMISO DE PESCA DE FOMENTO

FOLIO No.139/15

TÉRMINOS Y CONDICIONES:

1.- Objetivo general:

- I. Caracterizar de manera estructural y farmacológica, las toxinas termolábiles y termoestables presentes en los extractos acuosos de los hidrocorales del caribe mexicano: *Millepora alcicornis*, y *Millepora complanata*; y determinar el efecto del blanqueamiento sobre la expresión de sus toxinas.

2. Participantes:

Dr. José Alejandro García Arredondo y Dra. Alejandra Rojas Molina, quienes fungen como responsables técnicos, conforme lo prevé el artículo 72 del Reglamento de la Ley de Pesca, el cual contara con la participación de: el Dr. Cesar Ibarra Alvarado, Dr. Mamadou Moustapha Bah, Dra. Judith Sánchez Rodríguez (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM), Dr. Roberto Iglesias Prieto (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM) y estudiantes de licenciatura y posgrado de la UAQ.

3.- Este permiso autoriza la realización de las siguientes actividades:

- I. La colecta de un máximo de 5 kilogramos de peso húmedo de fragmentos de coral de las especies: *Millepora alcicornis* y *Millepora complanata*.
- II. La colecta de fragmentos se llevará a cabo con cincel y martillo, o con un taladro neumático y buceo, en ambos casos se deberá limitar la extracción a máximo la mitad de cada colonia, para así favorecer su recuperación.
- III. Las piezas colectadas serán divididos en dos, una parte serán montados en base de PVC y colocados en estanques para un tratamiento térmico e inducción al blanqueamiento, y otra parte de muestras se congelaran inmediatamente después de la recolección para transportarlas al Departamento de Investigación Química y Farmacología de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, donde se prepararan los extractos.

4.- El Titular del presente permiso queda obligado a:

- I. Previo a las labores de muestreo deberá delimitar el área de muestreo mediante coordenadas geográficas para definir los polígonos de muestreo, así como indicar la superficie que se abarcará para su recolección.
- II. El área de estudio se encuentra dentro de diferentes áreas Naturales Protegidas, por lo que se deberá contactar a los Directores de las Áreas Naturales Protegidas correspondientes (<http://www.conanp.gob.mx/directorio.html>) debiendo tomar en consideración las indicaciones y recomendaciones que realicen los Directores correspondientes.
- III. Se recomienda efectuar la colecta sobre fragmentos desprendidos de hidrocorales a fin de no dañar las poblaciones silvestres, o en su caso, procurar no extraer mas del 50% de cada colonia hasta obtener la muestra requerida, esto con la finalidad de favorecer su recuperación por regeneración de tejido perdido.
- IV. Conservar el presente permiso durante las operaciones de campo y mostrarlo a las autoridades competentes que se lo soliciten.
- V. Permitir y facilitar las tareas de inspección que en su caso llegaran a realizar las autoridades competentes, lo anterior en términos de los artículos 128 y 129 de la ley general de Pesca y acuacultura Sustentables, apercibido de que de no hacerlo, se procederá a la revocación del permiso en términos del artículo 55 fracción II de la misma Ley.
- VI. Al término del proyecto y como resultado de los trabajos de investigación, se deberá entregar a esta Dirección General, el informe final respectivo en tiempo y forma donde se deberá incluir una memoria fotográfica de actividades, así como una copia simple de las publicaciones producto del permiso de pesca de fomento, a más tardar el **19 de noviembre de 2016**.
- VII. Los documentos nacionales o extranjeros que se publiquen como resultado de las actividades realizadas, deberán hacer referencia a la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca y al número de permiso que esta dependencia otorga.
- VIII. Durante la realización de las actividades del proyecto se deberá garantizar **no impactar** de manera negativa a las poblaciones silvestres.

AUTORIDAD EXPEDIDORA

VICTOR MANUEL ARRIAGA HARO
NOMBRE

DIRECTOR GENERAL
CARGO

FIRMA

HOJA 2 DE 3



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

DGOPA -PF -02

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

COMISIÓN NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA

DIRECCIÓN GENERAL DE ORDENAMIENTO PESQUERO Y ACUÍCOLA

PERMISO DE PESCA DE FOMENTO

FOLIO No.139/15

TÉRMINOS Y CONDICIONES (Continuación):

- IX. Los procedimientos de la colecta deberán cumplir con lo establecido en la **NOM-126-SEMARNAT-2000**, que establece las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres.

5.- Queda estrictamente prohibido:

- I. La comercialización de los organismos colectados.
- II. El empleo de cualquier tipo de explosivos o de sustancias tóxicas.
- III. Efectuar colecta, transporte y aprovechamiento alguno de las especies de flora y fauna silvestre, raras, amenazadas y en peligro de extinción, incluidas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) publicada en el Diario Oficial de la Federación el 30 de diciembre de 2010.
- IV. El uso de redes de arrastre en bahías y esteros y/o utilizar otra arte de pesca no autorizada.

AUTORIDAD EXPEDIDORA

VICTOR MANUEL ARRIAGA HARO

DIRECTOR GENERAL

NOMBRE

CARGO

FIRMA

HOJA 3 DE 3