



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PURIFICACIÓN DE UNA TOXINA
RECOMBINANTE DE TIPO HIDRALISINA (rPFT)
DEL “CORAL DE FUEGO” *M. alcicornis* Y
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD
HEMOLÍTICA”**

TESIS INDIVIDUAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

IVANA VALENTINA VIELMA GONZÁLEZ

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Purificación de una toxina recombinante de tipo hidralisina (rPFT) del "coral de fuego" *M. alcornis* y determinación de su actividad hemolítica

por

Ivana Valentina Vielma González

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQLIN-234893



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“PURIFICACIÓN DE UNA TOXINA
RECOMBINANTE DE TIPO HIDRALISINA
(rPFT) DEL “CORAL DE FUEGO” *M.
alcicornis* Y DETERMINACIÓN DE SU
ACTIVIDAD HEMOLÍTICA”**

TESIS INDIVIDUAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

IVANA VALENTINA VIELMA GONZÁLEZ

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SINODALES

Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA
Directora

Dr. ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO
Sinodal

Dra. NORMA BEATRIZ OLGUÍN LÓPEZ
Sinodal

M. en C. JESÚS EDUARDO VEGA TAMAYO
Sinodal

Alejandra Rojas M.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Índice general	i
Índice de cuadros	vi
Índice de figuras	vii
RESUMEN	
I ANTECEDENTES	1
I.1 Filo Cnidaria	1
I.1.1 Subfilo Anthozoa	4
I.1.2 Subfilo Endonidozoa	6
I.1.3 Subfilo Medusozoa	7
I.2 Género <i>Millepora</i>	12
I.2.1 <i>Millepora alcicornis</i>	14
I.3 Células en las que se generan las toxinas de los cnidarios	15
I.4 Toxinas Formadoras de Poro (TFP)	18
I.4.1 Actinoporinas	20
I.4.2 Toxinas formadoras de poro provenientes de medusas	20
I.4.3 Hidralisinas	21
I.5 Técnicas de purificación de proteínas	21

I.6	Técnicas cromatográficas	24
I.6.1	Cromatografía de exclusión o permeación en gel	25
I.6.2	Cromatografía de interacción hidrofóbica	25
I.6.3	Cromatografía de fase reversa	26
I.6.4	Cromatografía de intercambio iónico	26
II	HIPÓTESIS	27
III	OBJETIVOS	28
III.1	Objetivo general	28
III.2	Objetivos particulares	28
IV	METODOLOGÍA	29
IV.1	Materiales	29
IV.1.1	Reactivos	29
IV.1.2	Equipos	29
IV.2	Métodos	30
IV.2.1	Purificación de la TFP obtenida vía recombinante por FPLC	30
IV.2.2	Manejo de animales de experimentación	30
IV.2.3	Evaluación de la actividad hemolítica de la TFP recombinante	31
IV.3	Análisis estadístico	31
V	RESULTADOS	32
V.1	Purificación de la TFP obtenida vía recombinante por FPLC	32

V.2	Evaluación de la actividad hemolítica de la TFP recombinante	35
VI	DISCUSIÓN	38
VII	CONCLUSIONES	43
VIII	BIBLIOGRAFÍA	44
	ANEXOS	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Listado de las fracciones obtenidas por FPLC de intercambio iónico	33
2	Concentración de proteína total de cada fracción	33
3	Volumen requerido para obtener 50 µg de proteína de cada fracción	36
4	Curva de calibración para el ensayo de hemólisis	36
5	Resultados de la medición espectrofotométrica	37
6	Porcentaje de hemólisis de cada fracción	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática de la morfología de los cnidarios	2
2	Árbol filogenético simplificado del filo Cnidaria	4
3	Hexacoralarios	5
4	Coral rojo (<i>Corallium rubrum</i>)	6
5	<i>Polypodium hydriforme</i>	6
6	Esquema de <i>Obelia dichotoma</i>	8
7	Medusa <i>Pelagia noctiluca</i>	9
8	Pólipos de hidra con reproducción sexual y asexual	10
9	<i>Aglaophenia</i> sp. y <i>Eudendrium</i> sp., hidrozoos bentónicos	12
10	Organismos del género <i>Millepora</i>	14
11	Representación esquemática de un cnidocito	16
12	Representación del sistema de administración del veneno de los cnidarios	17
13	Purificación de proteínas por cromatografía	24
14	Cromatografía LB-rPFT obtenido por HPLC de intercambio iónico	32

15	Perfil electroforético unidimensional del lisado bacteriano proveniente de E. coli que produce una rPFT y sus fracciones aisladas por FPLC	34
16	Perfil electroforético unidimensional del lisado bacteriano proveniente de E. coli que produce una rPFT y sus fracciones aisladas por FPLC	35
17	Gráfico de los porcentajes de hemólisis de cada una de las fracciones aisladas de la muestra LB-rPFT	38

RESUMEN

El phylum Cnidaria comprende organismos marinos fundamentales en la formación de arrecifes, como los hidrocorales del género *Millepora*, conocidos como “corales de fuego” debido a sus toxinas que provocan lesiones similares a quemaduras. Estos componentes, principalmente las toxinas formadoras de poros (TFP), poseen un potencial aplicativo en diversos campos. No obstante, aún no hay suficiente información sobre su estructura química o su mecanismo de acción. Recientemente, nuestro grupo de trabajo logró obtener de forma recombinante una TFP del tipo hidralisina del coral defuego *M. alcicornis*, utilizando como sistema de expresión la cepa de *E. coli* C41 (DE3). Desafortunadamente, el proceso de purificación de dicha toxina no fue eficiente. Debido a esto, el presente trabajo de tesis tuvo por objetivo purificar la TFP recombinante mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), utilizando una columna de intercambio iónico; como resultado se obtuvieron 8 fracciones, las cuales fueron analizadas mediante electroforesis unidimensional SDS-PAGE. Se encontró que las fracciones 7 y 8 contenían un par de bandas que se encontraban en un rango de peso molecular entre 25 y 30 kDa, que corresponde al peso molecular de las TFPs de tipo hidralisina. El rango de peso molecular de las fracciones purificadas sugirió que la proteína recombinante contenía más de una etiqueta de afinidad de polihistidina, lo cual impide una unión específica con una resina de afinidad. Los resultados derivados del presente trabajo de tesis indicaron que el empleo de la cromatografía de intercambio iónico propuesta permitió aislar la rTFP de tipo hidralisina.

I. ANTECEDENTES

I.1 Phylum Cnidaria

Este Phylum comprende más de 13,000 especies vivas de animales, como corales, anémonas, abanicos de mar, plumas de mar, medusas e hidroides (Guirola-Fuentes y col., 2021). Los cnidarios se subdividen taxonómicamente en aproximadamente 7 clases y 25 órdenes que exhiben diversas adaptaciones con respecto a su morfología, reproducción y ecología; tienen formas corporales simples y poseen una característica evolutiva distintiva, la cual es, la presencia de células punzantes o cnidocitos. Estas células son las encargadas del almacenamiento y liberación del veneno de estos animales. (Park y col., 2012).

Entre los Metazoos, los cnidarios fueron los primeros que evolucionaron y presentaron un plano corporal bien definido, que incluye un eje corporal, sistema nervioso y diferenciación de capas de tejido, ectodermo y endodermo (Ver Figura 1). Estas capas de tejido se derivan de un linaje especial de células epiteliales del endodermo y del ectodermo; cuentan con un tercer linaje de células, el intersticial, el cual da lugar a la formación de las neuronas, el cnidoma, las células glandulares y los gametos. En el caso de las células intersticiales, estas son totipotentes y la función de sus derivados está dada por su posición relativa dentro del animal. Todos los cnidarios presentan dos capas celulares de tejido; ectodermo y endodermo, conectadas entre sí por una tercera capa de tejido conectivo desprovisto de células (mesoglea) (Santodomingo y col., 2010).

El ectodermo es una capa externa que contiene células epiteliales de distintos tipos (soporte y sensoriales), vacuolas mucosas y baterías de nematocistos. En esta capa se pueden diferenciar dos zonas: el margen y el calicoblasto. El margen es una capa de tejido blando que se encuentra en los pólipos solitarios y está directamente en contacto con el agua. En el caso de los pólipos coloniales, la zona del margen es continua entre pólipos y se denomina coenosarco. El calicoblasto es la capa inferior

que está directamente en contacto con el exoesqueleto (Santodomingo y col., 2010).

Por otro lado, el endodermo es una capa de epitelio que se encuentra en la columna, tentáculos, disco oral, estomodeo y en el ceonosarco de los corales azoxantelados. Esta capa recubre toda la cavidad gastrovascular (mucosas y granulares), nematocistos, amebocitos, zooxantelas (algas simbiotas de la familia Symbiodiniaceae), plexos nerviosos y paquetes musculares. En el caso de los corales sin zooxantelas, las células del epitelio presentan procesos filamentosos que se insertan en la mesoglea (capa fina y homogénea de fibras de colágeno); mientras que en los corales zooxantelados, existe un espacio libre entre el endodermo y la mesoglea, que es posteriormente ocupado por las zooxantelas (Santodomingo y col., 2010).

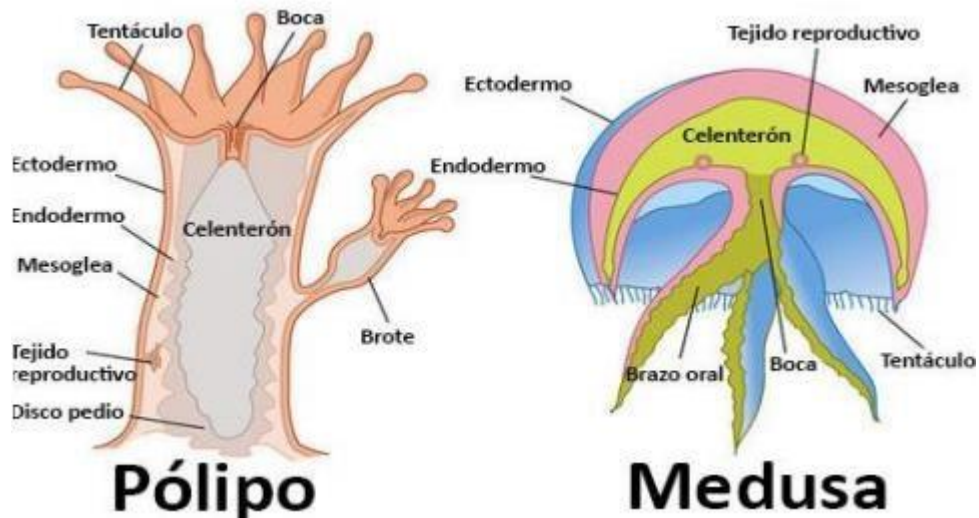


Figura 1. Representación esquemática de la morfología de los cnidarios (Modificado de Gili, y col., 2022).

Ciertas especies de cnidarios se alimentan de desechos (carroña) o también pueden obtener nutrientes por vía intracelular con algas fotosintéticas de la familia

Symbiodiniaceae (Fautin, 2002). Los corales y las zooxantelas constituyen el ecosistema marino más importante y productivo del mundo, ya que desempeñan un papel primordial en las redes alimentarias del ambiente oceánico (Ramos, 2022). Las algas unicelulares de la familia Symbiodiniaceae que establecen simbiosis con los cnidarios habitan en interior de la epidermis de sus hospedantes (Lazcano-Pérez y col., 2020).

Las algas, se alimentan por medio de la fotosíntesis, por este mismo mecanismo le brindan al cnidario cerca del 95 % de sus productos fotosintéticos. A cambio, los cnidarios le proporcionan un refugio contra los herbívoros y les permiten el acceso a productos metabólicos de desecho (nitrógeno inorgánico, fósforo y CO₂) empleados para realizar la fotosíntesis (Venn y col., 2006; Yellowlees y col., 2008).

Los arrecifes coralinos están siendo afectados por factores derivados del cambio climático, entre los que destacan el calentamiento global y la acidificación de los océanos (Lesser, 2011; Neal y col., 2017). Esto provoca un fenómeno conocido como blanqueamiento, el cual ocurre cuando la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae sufre un desequilibrio, causado por una baja en la población de simbiosiontes o por reducción en los pigmentos fotosintéticos (Ainsworth-Brown, 2021).

En cuanto a la clasificación de los Cnidarios, estos organismos son clasificados filogenéticamente en dos grandes Subphyla: Anthozoa (anémonas de mar, corales y plumas de mar) y Medusozoa (medusas, avispas marinas e hidras) (Daly y col., 2007; Stabili y col., 2018). Actualmente, se ha comprobado la existencia de una clase de animales parásitos microscópicos, denominados como mixozoos, que se han clasificado dentro del Phylum Cnidaria como otro Subphylum llamado Endocnidozoa (Chang y col., 2015). El Phylum Cnidaria ha sido objeto de innumerables estudios que han puesto en evidencia que la clasificación taxonómica tradicional (basada en morfología) no es la más adecuada y tiene varios inconvenientes. La nueva clasificación de estos organismos contempla la información molecular y morfológica para una mejor categorización (Budd y col., 2012). El Subphylum Anthozoa está

compuesto por todos los organismos de la clase Anthozoa, que, a su vez, está dividida en las subclases Hexacorallia y Octocorallia. Mientras que el Subphylum Medusozoa comprende las clases: Staurozoa, Cubozoa, Scyphozoa, Hydrozoa y Polipozoa (Ver Figura 2) (Kayal y col., 2013).

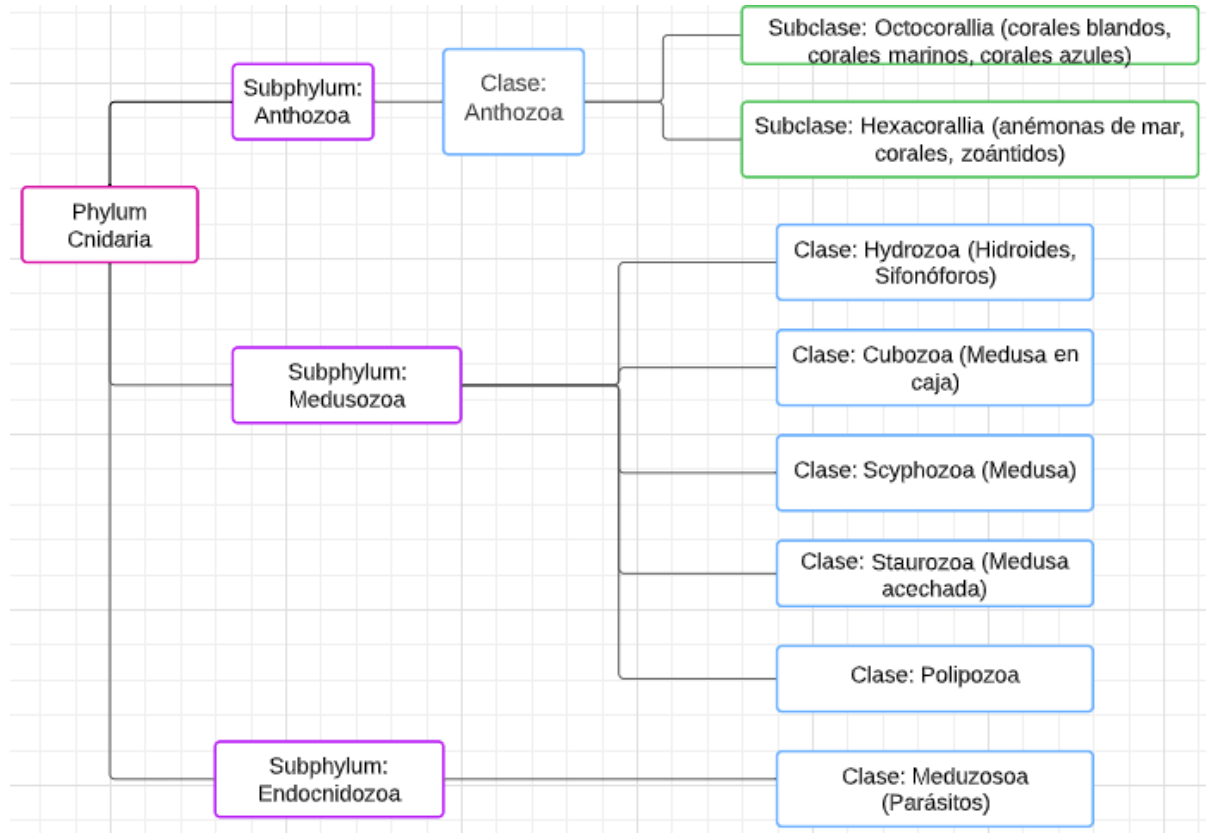


Figura 2. Árbol filogenético simplificado del phylum Cnidaria (Modificado de Chang; y col; 2015).

I.1.1 Subfilo Anthozoa

En el subfilo Anthozoa, se encuentran los organismos de la clase Anthozoa (Guirola-Fuentes y col., 2021). La subclase Octocorallia (Alcyonaria), incluye alrededor de 3000 especies, casi todas coloniales y algunas formadoras de exoesqueleto calcáreo. Las formas de pólipo contienen ocho tentáculos y ocho mesenterios. La presencia de pínulas (extensiones laterales) a nivel de los tentáculos, es otro rasgo que los distingue de otros taxones. Entre los representantes de esta subclase se encuentran

los corales blandos, el coral rojo y la pluma de mar, entre otros (Guirola-Fuentes y col., 2021).

La subclase Hexacorallia, se encuentra conformada por alrededor de 4300 especies, con exoesqueletos (corales) o sin ellos (anémonas) (Ver Figura 3 y 4). Estas presentan formas de vida, tanto coloniales, como solitarias y la mayoría de los representantes del grupo muestran simetría hexámera (de allí deriva su nombre). Sus pólipos suelen ser más variados que los de la subclase Octocorallia. Dentro de este grupo se encuentran las anémonas marinas y madréporas, las cuales se conocen por ser formadoras de barreras de coral y atolones. Todos los miembros de la subclase Hexacorallia poseen espirocistos, un tipo de cnidocisto, con una cápsula de pared muy fina y un gancho superenrollado, que le permite atrapar y sujetar a sus presas (Guirola-Fuentes y col., 2021).



Figura 3. Hexacorallarios: a) *Cerianthus* sp., b) *Balanophyllia* sp., c) *Parazoanthus axinellae*, d) *Leptosammia pruvoti* y e) *Cladocora caespitosa* (Modificado de Gili y col., 2022).

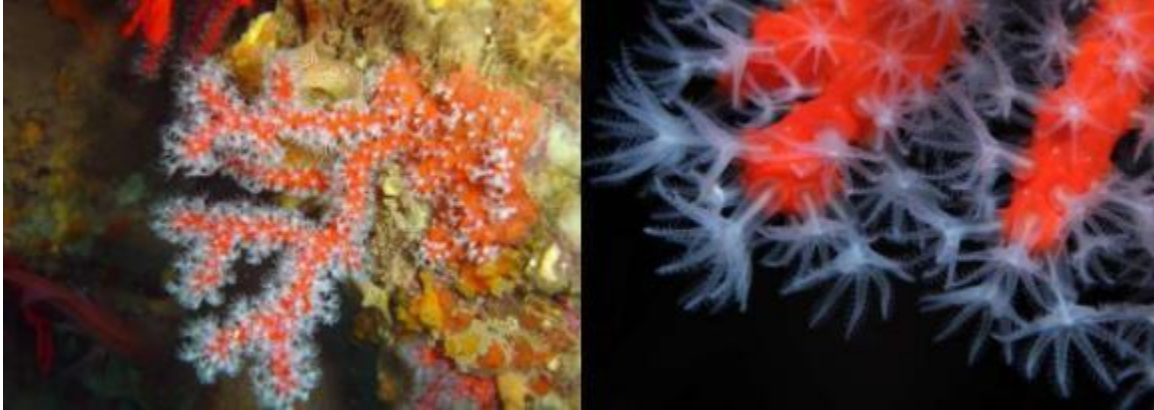


Figura 4. Coral rojo (*Corallium rubrum*) (Modificado de Gili y col., 2022).

I.1.2 Subfilo Endocnidozoa

Los endocnidozoos (Myxozoa) son endoparásitos microscópicamente pequeños (10–300 μm de largo) (Ver Figura 5), que a menudo parasitan a los peces, lo que los convierte en una carga económica grave para la acuicultura. Estos parásitos son muy reducidos, a menudo carecen de órganos y tejidos como la boca, el intestino, los músculos o el sistema nervioso. Sin embargo, en algunas etapas de la vida de los endocnidozoos, se pudo observar un sistema nervioso, como en *Polypodium hydriforme* (Koch y col., 2021).

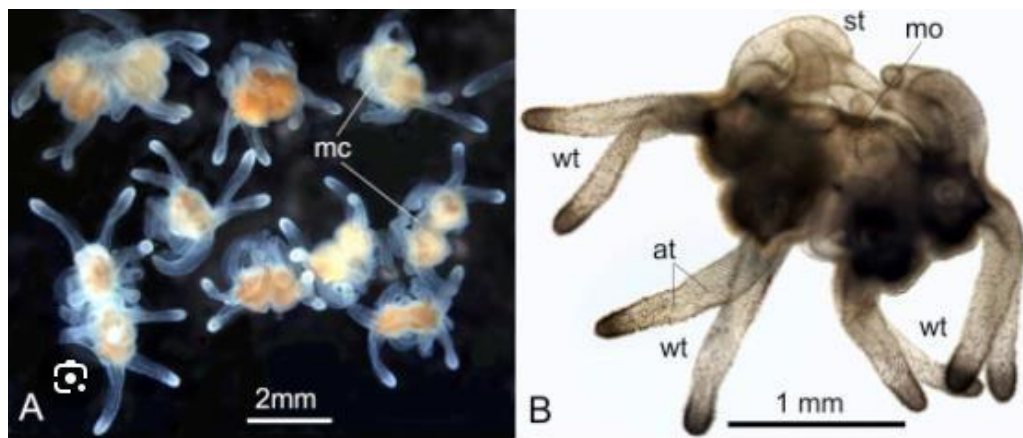


Figura 5. *Polypodium hydriforme* (Modificado de Raikova, y col., 2016).

La clase Myxozoa comprende más de 2000 especies de parásitos microscópicos obligados que se albergan en hospedantes, tanto invertebrados como vertebrados, como parte de su ciclo de vida. La gran mayoría de las especies de mixozoos alternan entre peces y hospedantes anélidos. *Myxobolus cerebralis*, es el agente causante de la enfermedad del torbellino en la trucha arcoíris. En este caso, el hospedante es un anélido del género *Tubifex*, el cual alberga al cnidario que produce actinoporas infecciosas que al liberarlas se anclan al pez, inyectando el esporoplasma en el tejido. Las mixosporas infecciosas se desarrollan dentro de los peces y finalmente son ingeridas por el anélido donde se convierten en una actinospora, completando así el ciclo de vida del parásito (Chang y col., 2015).

I.1.3 Subfilo Medusozoa

El subfilo Medusozoa, se compone de varias clases que son: Cubozoa, Scyphozoa, Hydrozoa, Staurozoa y Polipozoa. Específicamente, los Cubozoos, son un grupo distintivo, por su forma tan particular y por su picadura, la cual es un peligro para el ser humano. Entre estas, es notoria la avispa de mar australiana (*Chironex fleckeri*), debido a que es la causante de un número importante de muertes, es considerada la especie más peligrosa y letal del mundo; cuya toxina puede ser fatal, existen otras cubomedusas igualmente muy tóxicas, entre las que se encuentra la especie *Irukandji*, es una de las cuatro especies del género *Malo*, la *Malo kingi* tiene uno de los venenos más potentes del mundo, y su tamaño no es más grande que un pulgar; y otra medusa, perteneciente a este género es la *Carukia barnesi* también es altamente venenosa y habita en los mares de Australia (Gili J, M; y col; 2022).

Las especies de la superclase Cubozoa tienen la característica de estar divididas de forma tetrámerica, esto ocasiona la separación del celenterón en cuatro bolsas. Presentan cuatro ropalias sensoriales perradiales con ojos y ocelos, cuerpos vítreos, lentes y retinas, además de estatocistos (Ver Figura 6) (Gili y col., 2022).

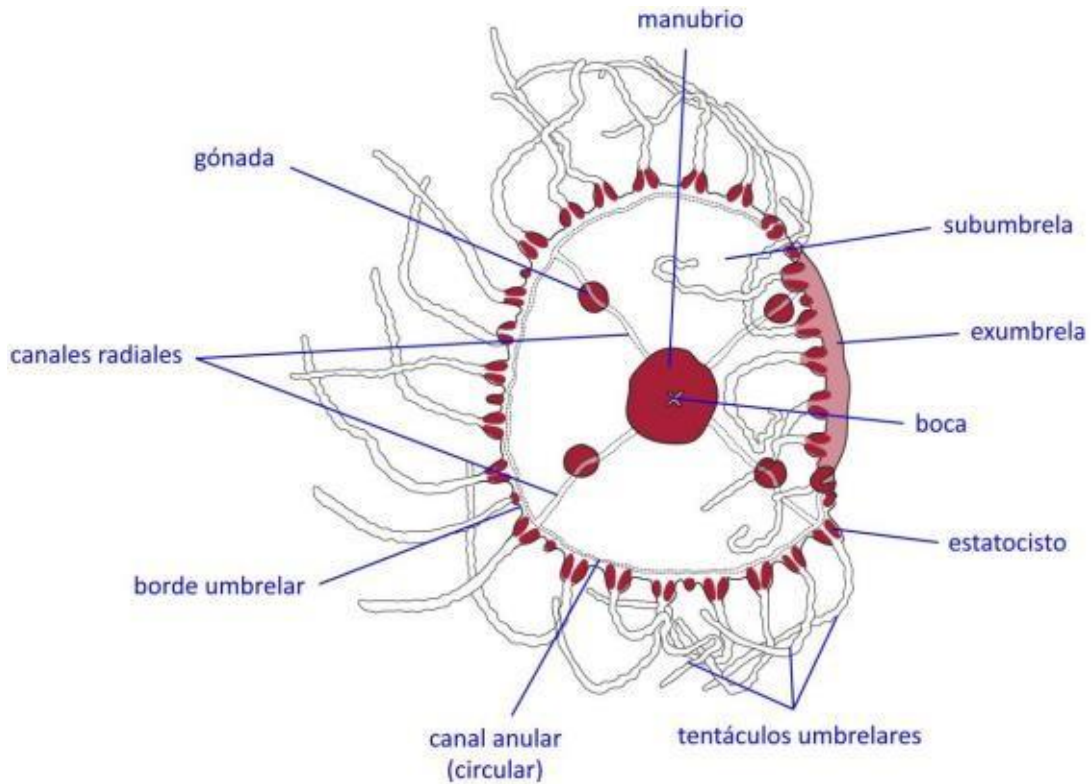


Figura 6. Esquema de *Obelia dichotoma* (Modificado de Moreno y col., 2011).

La umbrela aboral, que se encuentra en la superficie externa opuesta a la boca, es convexa y se denomina exumbrela. En tanto que la umbrela oral se encuentra en la superficie interna, es cóncava y se conoce como subumbrela (Moreno, A. G., y col; 2011). Los tentáculos se originan en cada una de las cuatro esquinas interradales y tienen unas bases musculares engrosadas llamadas pedalias (Ver Figura 7) (Gili y col., 2022).

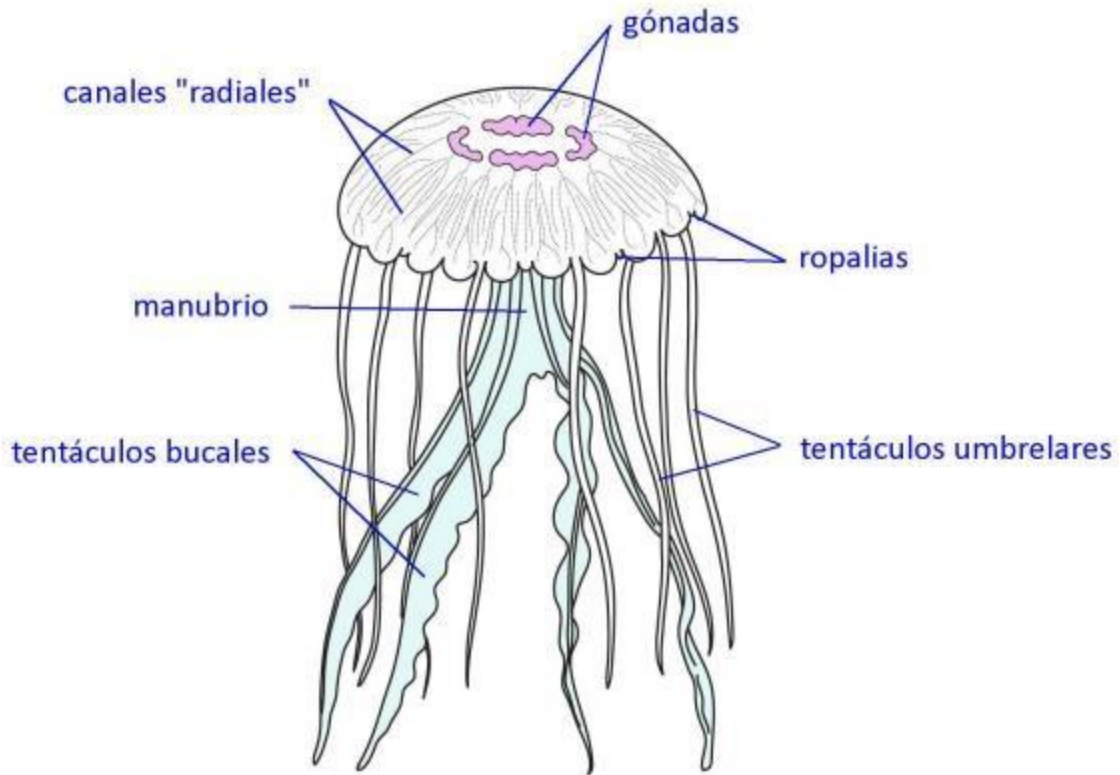


Figura 7. Medusa *Pelagia noctiluca* (Modificado de Moreno y col., 2011).

Las medusas de la superclase Scyphozoa, también pertenecientes al subfilo meduzoso, se tratan de medusas de talla grande, que incluyen a la mayoría de los más grandes invertebrados marinos. Las escifomedusas poseen una mesoglea, también conocida como capa intermedia, relativamente gruesa que les da un mayor soporte corporal. Además, cuentan con simetría radial, se les ha considerado como las medusas no bilaterales más perfectamente simétricas y de mayor tamaño del mundo (Guirola-Fuentes y col., 2021).

Los organismos de la superclase Hydrozoa están formados por un grupo heterogéneo que considera a los cnidarios que producen un estadio de vida libre pelágico y que se reproducen sexualmente conocidos como medusa (Ver Figura 8). Comparten también la presencia de velo y gónadas ectodérmicas. Este grupo se ha subdividido en 3 clases con base en la forma de los pólipos (Guirola-Fuentes y col., 2021).

En la clase Automedusa, las medusas se producen por la transformación directa de la plánula (nunca béntica) o a través de un “estado” actínula (Guirola-Fuentes y col., 2021). En la clase Hydroidomedusa, las medusas se producen a través de un nódulo medusario y en las especies de la clase Polypodiozoa, las medusas se generan mediante un complejo patrón de desarrollo parasitario (Guirola-Fuentes y col., 2021).

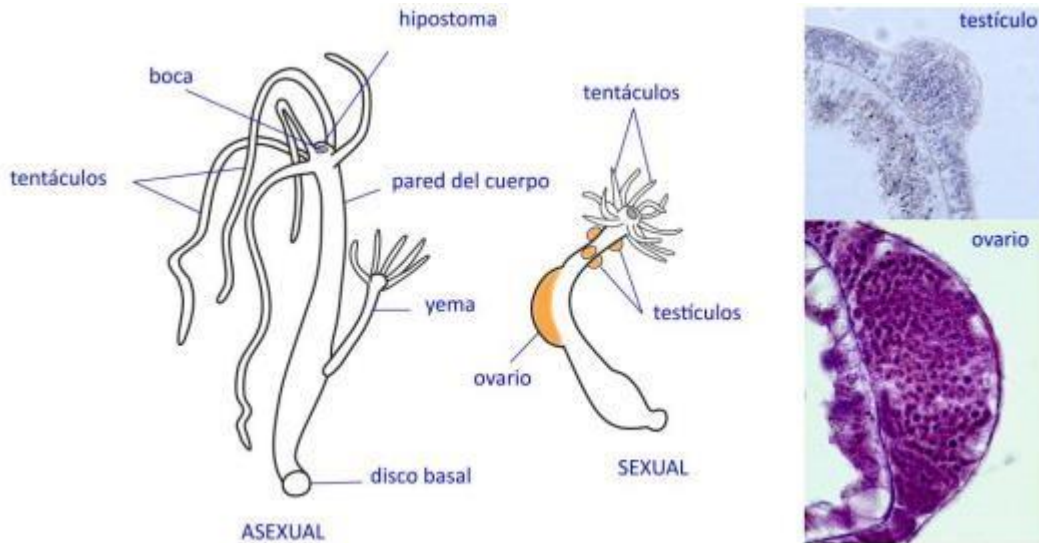


Figura 8. Pólipos de hidra con reproducción sexual y asexual (Modificado de Moreno y col., 2011).

Existe una extraordinaria variación en este ciclo de vida que se refleja en una amplia gama de diversidad de morfologías de pólipos, colonias y medusas, así como en la pérdida o reducción completa del estadio de pólipo o medusa en algunas especies (Cartwright y Nawrocki, 2010).

Los hidrozooos muestran una diversidad de formas coloniales que van desde colonias estoloniales e incrustantes, lo cual se refiere a colonias que se fijan por medio de estolones a la superficie, siendo generalmente a rocas o conchas, en forma de estera (Contreras, 2021).

De los estolones surgen los pedicelos, el pedicelo es un soporte; los pedicelos nacen de una delgada hidrorriza y poseen longitud variable, con zonas anilladas y una esfera chata debajo de las hidrotecas. Se ha observado que las colonias que crecen sobre sustratos duros poseen hidrotecas más grandes que las que crecen en sustratos inestables. Es importante aclarar que el perisarco (esqueleto quitinoso que rodea una colonia) se forma en una hidroteca, la cual es como una envoltura (Genzano, 2022).

Otra parte de la diversidad de formas coloniales son las colonias pinnadas erguidas, irregular o regularmente ramificadas; la colonia pinnada se refiere a que presenta varias ramificaciones, y que en sus ramificaciones posee pinnas (Segovia de González y col., 2021).

En las especies del subfilo Medusozoa, el estadio pólipo presenta una asociación de tipo colonial (relación intraespecífica, agrupaciones colaborativas formadas por individuos derivados de reproducción sexual), es decir, que tienen como origen un progenitor en común y permanecen unidos entre sí; mientras que el estadio medusa es normalmente solitario y pelágico. Los medusozoos bentónicos (*hidroides, hidrocorales, estauromedusas y escifopólipos*), son aquellos que se asocian a cualquier fondo acuático, son comunes en la mayoría de los ambientes marinos, donde actúan como sustrato, refugio y/o alimento para multitud de animales (Ver Figura 9). En cambio, los medusozoos planctónicos (medusas y sifonóforos) son depredadores que viven en la columna de agua, donde compiten con larvas de peces y determinan la estructura y funcionamiento de las comunidades pelágicas (Martell y Ángel, 2019).

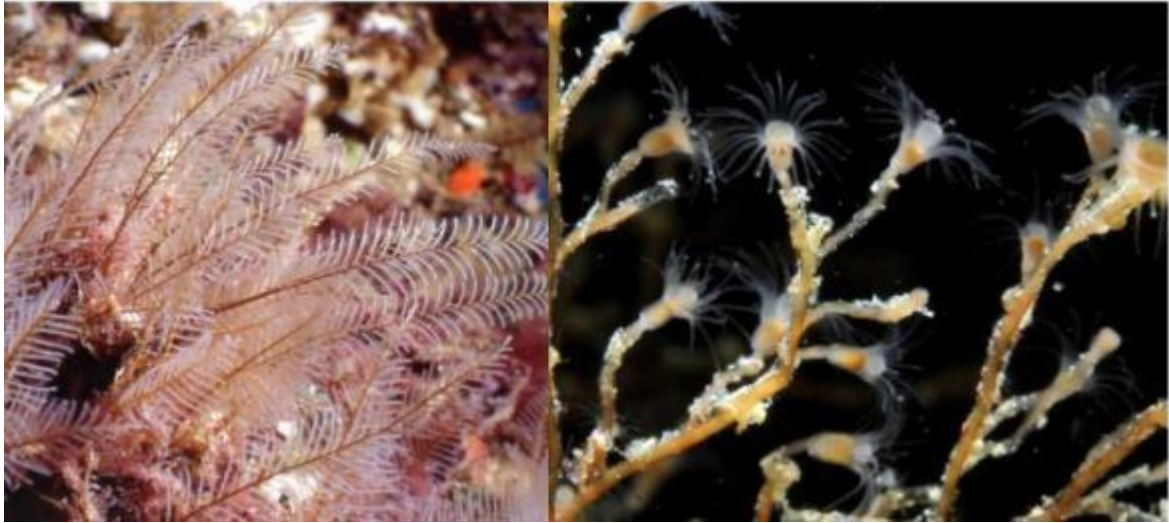


Figura 9. *Aglaophenia* sp. y *Eudendrium* sp., hidrozoos bentónicos (Modificado de Gili y col., 2022).

1.2 Género *Millepora*

El género *Millepora* (familia Milleporidae, Phylum Cnidaria, subfilo Meduzosoa, subclase Hydrozoa) está conformado por 19 especies distribuidas en aguas cálidas de todo el mundo. Alrededor de 12 de estas especies se encuentran en el Indo-Pacífico y 7 en el Atlántico-Caribe, sin especies comunes entre ambos océanos (Ruiz-Ramos y col., 2014). Sus colonias se extienden por varios metros y producen un denso bosque de ramas (Rojas-Molina y col., 2012).

Existen marcadas diferencias, tanto en la forma y como en la estructura de las colonias de los hidrocorales del género *Millepora* (Lewis, 2006). De hecho, excluyendo los corales escleractinios pétreos (clase Anthozoa), las especies de *Millepora* son los más abundantes cnidarios formadores de arrecifes, y por lo tanto juegan un papel importante en la ecología marina (Rojas-Molina y col., 2012).

Todas las colonias se originan a partir de un pólipo fundador, por lo que la estructura de la colonia es la del pólipo. Los pólipos defensivos que sobresalen del exoesqueleto son numerosos y altamente tóxicos y, por esta razón, los hidrocorales del género

Millepora son conocidos popularmente como “corales de fuego” (Lewis, 2006).

Los pocos estudios taxonómicos realizados sobre el género *Millepora* resaltan el alto grado de polimorfismo esquelético encontrado en el género. Esas investigaciones indicaron que las distinciones de especies eran inciertas debido a la alta variabilidad morfológica entre las colonias dentro de cada taxón y la superposición de características esqueléticas entre especies. Además, los experimentos de trasplante recíproco sugirieron que los factores ambientales podrían influir en la forma de la colonia (Ruiz-Ramos y col., 2014).

Las colonias están formadas por placas simples que crecen a partir de una base común o pueden crear estructuras complejas en forma de panel de placas interconectadas. Las placas crecen perpendiculares a la dirección de la corriente, pero en lugares con fuerte acción de las olas, las colonias pueden permanecer como una gran base incrustante. La superficie de las colonias varía de lisa a rugosa. En colonias más viejas, la forma de crecimiento puede volverse más parecida a una placa y los bordes de crecimiento más afilados, pero las placas permanecen conectadas en toda su longitud, lo que da como resultado una estructura de caja (Ruiz-Ramos y col., 2014).

Los cambios inducidos por el entorno ambiental en la morfología de los hidrocorales son notorios en dos especies que son componentes regulares de los arrecifes coralinos de la costa mexicana del Caribe: *M. alcicornis* y *M. complanata*, que exhiben diferentes formas de crecimiento. *M. alcicornis* presenta un patrón característico de crecimiento ramificado que se asemeja a un cuerno de alce, mientras que *M. complanata* crece en forma de placa (Ver Figura 10) (Rojas-Molina y col., 2012).



Figura 10. Organismos del género *Millepora*: A) *Millepora alcicornis*, B) *Millepora squarrosa*, C) *Millepora striata*
(Modificado de Ruiz-Ramos y col., 2014).

1.2.1 *Millepora alcicornis*

Los hidrocorales simbióticos como por ejemplo *Millepora alcicornis*, también conocidos como corales de fuego, tienen una distribución anfiatlántica, como lo demuestra su presencia en las islas de Cabo Verde, Isla Ascensión y Canarias. Estos cnidarios son capaces de colonizar sustratos, tanto naturales como artificiales, desde gorgonias muertas y rocas hasta cascos de barcos. Esta capacidad de habitar diferentes sustratos y sus rápidas tasas de colonización proporcionan una ventaja competitiva para posibles expansiones de su hábitat (Rodríguez y col., 2019).

Desafortunadamente, los arrecifes de coral son extremadamente vulnerables al estrés relacionado con las emisiones de gases de efecto invernadero, principalmente el calentamiento de los océanos (Lough, 2016). Luego de un evento de blanqueamiento el metabolismo central de ambos socios simbióticos se altera significativamente (Mayfield, y col., 2018). Teniendo en cuenta que las toxinas son fundamentales en la captura y digestión de las presas, es muy probable que el estrés térmico, que provoca la decoloración, altere su expresión en los cnidarios (Olguín-López y col., 2019).

Este fenómeno ha aumentado tanto en frecuencia como en gravedad en los últimos

años. Se han registrado eventos de blanqueamiento masivo en todas las regiones tropicales del mundo en 1987, 1998, 2003, 2005 y 2010. De hecho, entre 2014 y 2017 se observó el peor blanqueamiento documentado (Olguín-López y col., 2019).

Nuestro grupo de trabajo ha realizado algunos estudios para determinar los cambios en el perfil del proteoma soluble y la actividad citolítica de *M. alcicornis* que sufrió blanqueamiento. Uno de los estudios más recientes al respecto corresponde al artículo de investigación titulado “Impacto de El Niño-Oscilación del Sur 2015-2016 en el perfil proteómico soluble y actividad citolítica de *M. alcicornis* “coral de fuego” del Caribe Mexicano”, cuyo objetivo fue determinar el efecto del blanqueamiento sobre la expresión de proteínas hidrosolubles en este hidrocoral (Olguín-López y col., 2019).

I.3 Células en las que se generan las toxinas de los cnidarios

Los cnidocitos o cnidoblastos, comúnmente denominados como “células punzantes”, son sumamente importantes para estos organismos, debido a que cumplen con funciones especializadas que están relacionadas con atrapar y someter presas, así como para disuadir y repeler depredadores y competidores en los arrecifes coralinos (Jouiaei, y col., 2015). Los cnidos o cnidocistos son los organelos celulares especializados que se localizan en los cnidocitos para el almacenamiento y liberación del veneno. Estos organelos son secretados por el aparato de Golgi de los cnidoblastos y se clasifican en tres tipos principales: los nematocistos, presentes en todos los cnidarios; los espirocistos, presentes únicamente en los anthozoos; y los pticocistos, que pertenecen únicamente a los animales de la subclase Ceriantharia, nombrados también anémonas tubícolas (Fautin., 2009; Lazcano-Pérez y col., 2020). Los nematocistos presentan forma de cápsula con una especie de arpón que se dispara al tocar a una presa o depredador y penetra en él inyectando veneno (Lazcano-Pérez y col., 2020). Éstos se utilizan para capturar presas y constan de una pared colágena, un túbulo de liberación reversible en forma de flecha y veneno (Turk y col., 2009).

Los cnidocistos, son secreciones meramente inanimadas de células vivas, la complejidad de su diseño, del cual depende su funcionamiento, es sorprendente. Estos organelos son herramientas distintivas y morfológicamente variables compuestas por un material cartilaginoso duradero (Ver Figura 11). Este tipo de estructuras fueron de gran importancia para sobrevivir durante millones de años (Castaño, 2007; Kem, 2009). Los cnidos son la parte clave de estos organismos y su importancia se deriva de la relación entre la energía empleada en generarlos y su efectividad en la captura de las presas, esto permite a los cnidarios ser depredadores muy efectivos utilizando poca energía (Santodomingo y col., 2010).

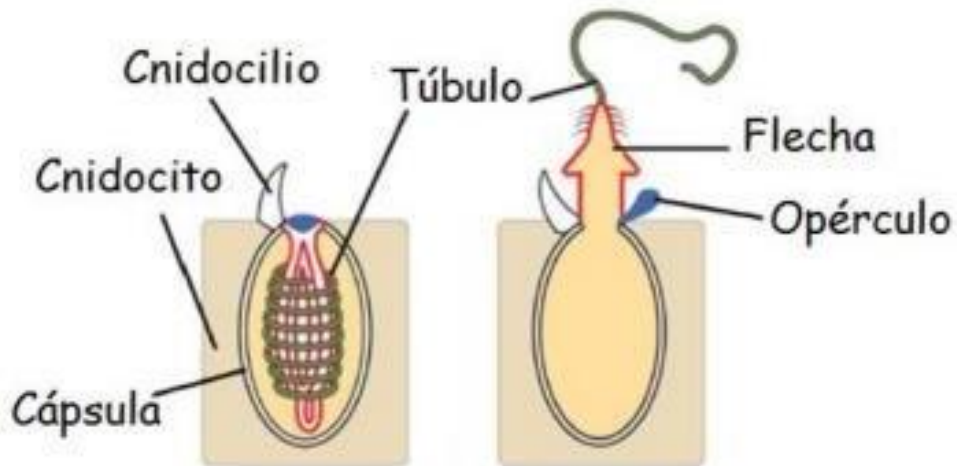


Figura 11. Representación esquemática de un cnidocito y un nematocisto (Modificado de Özbek, 2011).

Los nematocistos representan al grupo más diverso y estudiado de cnidocistos, pero aún no se comprende en su totalidad su mecanismo de descarga en respuesta a estímulos externos (mecánicos y químicos). Se cree que la presión osmótica del líquido intracapsular aumenta temporalmente como resultado de la exposición de los cnidos a la solución externa y la posterior exocitosis de cationes de la cápsula. Estas diferencias de presión osmótica a través de la pared de la cápsula se mantienen hasta el punto de que la presión intracapsular existente supera el valor umbral crítico y desencadena la descarga de los nematocistos. El veneno se encuentra en la superficie interna del túbulo invertido que, durante la descarga, se invierte de manera que el exterior queda expuesto y es inyectado en la presa. Esto hace que el interior del túbulo permanezca contiguo al interior de la cápsula y el contenido del nematocisto se expulse (Ver Figura 12) (Jouiaei, y col., 2015).

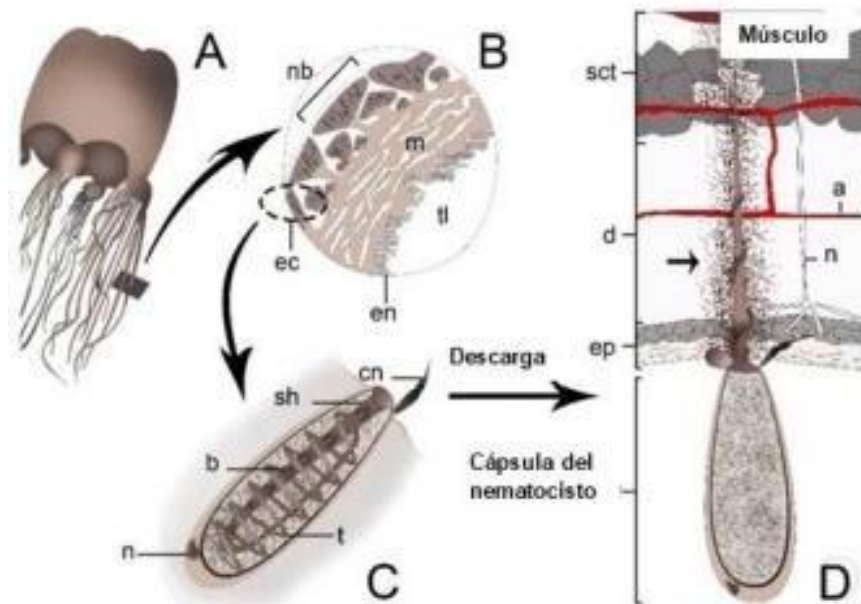


Figura 12. Representación del sistema de administración del veneno de los cnidarios (Modificado de Jouiaei, y col., 2015)

Dentro de los nematocistos se sintetiza y almacena el veneno, presentado en forma de un cóctel tóxico conformado por péptidos, proteínas, fosfolipasas, glicoproteínas, esteroides, carbohidratos y aminas bioactivas (Lazcano-Pérez y col., 2020).

Cuando un humano entra en contacto con los tentáculos de los cnidarios, lo primero que es afectado es la piel, la cual presenta edema, necrosis, dermatitis y urticaria. Posteriormente, el veneno viaja a través del sistema linfático y los vasos capilares, esto puede dañar el corazón o el sistema nervioso central. En casos muy severos, se genera un dolor muy intenso, neuropatías, parálisis, dificultad respiratoria, síntomas oftalmológicos, mononeuritis múltiple y, también, puede causar la muerte. Además, estas criaturas tienen la capacidad de almacenar sustancias tóxicas que no son producidas por ellos, sino por organismos con los que viven en simbiosis, una relación que les beneficia mutuamente (Lazcano-Pérez y col., 2020).

I.4 Toxinas Formadoras de Poro (TFP)

Las toxinas formadoras de poros (TFP) forman parte del mecanismo de defensa y ataque que utilizan los seres vivos. Las TFPs tienen una amplia distribución taxonómica y se han encontrado en diversos seres vivos, desde bacterias hasta mamíferos. Estas proteínas se secretan en forma soluble, pero sufren cambios conformacionales, creando un poro en la membrana del huésped (Soto y col., 2020). Estas toxinas interactúan con las membranas para alterar físicamente la estructura y la permeabilidad (Yap y Hwang, 2018), pueden ensamblarse en estructuras oligoméricas con la capacidad de insertarse en la membrana a través de receptores específicos que conducen a la formación de poros y, como consecuencia, se produce la permeabilización de la membrana (Soto y col., 2020). Estos poros en la membrana plasmática provocan un desequilibrio de los gradientes iónicos celulares (Yap y Hwang, 2018), lo que conduce a cambios en la concentración de iones en el citosol de la célula diana. Estos poros pueden ser líticos para la célula diana, por ejemplo, creando un desequilibrio osmótico, o pueden mediar en la translocación de proteínas, es decir, toxinas, al citoplasma.

Los múltiples resultados de la formación de poros por una TFP dependen de su concentración, el diámetro del poro, el número de poros/célula y la estabilidad del poro. El calcio y el potasio han sido identificados como los principales mediadores en la respuesta celular al daño de la membrana celular por estas proteínas (Soto y col., 2020), las cuales pueden causar finalmente la lisis celular (Yap y Hwang, 2018). Muchas bacterias patógenas producen TFP que son componentes importantes de su arsenal de virulencia. A pesar de la diversidad de secuencias y estructuras, todas las TFP bacterianas siguen el mismo modo de acción. Se secretan como proteínas monoméricas y solubles que pueden difundirse hacia las células diana a las que se unen a través de receptores específicos. Las dianas de las TFP incluyen receptores transmembranales o proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (proteínas ancladas a GPI), lípidos o grupos de lípidos. Sin embargo, existe información limitada sobre los mecanismos de muerte celular o las vías de señalización desencadenadas por las PFT eucariotas (Soto y col., 2020).

Las TFP se clasifican en dos grandes grupos, en función de los elementos de la estructura secundaria utilizados para atravesar la membrana celular. Las α -TFP utilizan hélices α anfipáticas para perforar la membrana, mientras que las β -TFP forman poros de barril β anfipáticos. Existen tres familias de α -TFP (colicinas, actinoporinas y citolisinas A) y tres de β -TFP (hemolisinas β , aerolisina β y citolisinas dependientes de colesterol) (Soto y col., 2020). Las actinoporinas (APs), producidas por las anémonas marinas, constituyen una familia particular. El creciente interés en las APs se debe a su elevada citotoxicidad, la cual puede usarse para diseñar inmunotoxinas contra células tumorales y sistemas de liberación de moléculas al citosol celular (Soto y col., 2020).

I.4.1 Actinoporinas

Estas son proteínas citolíticas producidas por anémonas marinas. La formación de poros de las APs transcurre por diferentes etapas: la unión de la proteína a la membrana, la oligomerización y el despliegue e inserción de la región amino terminal en la bicapa, lo cual conduce a la formación del poro (Mesa y col., 2016). Se han propuesto, hasta ahora, tres modelos de estructura del poro formado por las APs: el modelo del poro toroidal, el modelo del poro cónico y el modelo del poro híbrido. Los modelos difieren en cuanto a la estequiometría del poro y la relevancia de los lípidos en la arquitectura del canal (Mesa y col., 2016).

Existen algunos estudios que sugieren la existencia de estructuras preporo. Sin embargo, existen múltiples evidencias acerca de la relevancia estructural y funcional de estructuras diméricas en la evolución de estas toxinas de su forma soluble monomérica hacia el canal transmembrana. Éstas se insertan espontáneamente en las membranas lipídicas para formar poros oligoméricos y su actividad formadora de poros es inhibida por preincubación con la esfingomiélin (SM) (Mesa y col., 2016). Estas proteínas presentan la capacidad de desestabilizar las membranas diana y provocar la muerte celular, y por ello, han sido reconocidas por sus potenciales aplicaciones en el diseño de inmunotoxinas, dirigidas selectivamente para causar la muerte de células no deseadas (Mesa y col., 2016).

I.4.2 Toxinas formadoras de poros provenientes de medusas

La caracterización bioquímica y molecular de las toxinas sintetizadas por las medusas ha permitido identificar una gran diversidad de compuestos tóxicos, que van desde moléculas no proteínicas, hasta proteínas de alto peso molecular que han evolucionado a lo largo de cientos de años. Se han identificado enzimas como fosfolipasas, específicas e inespecíficas; toxinas formadoras de poros (TFPs), toxinas de medusas (JFTs o jellyfish toxin) e hidralisinas; también péptidos y neurotoxinas tales como toxinas que modulan canales de sodio o potasio, y péptidos

de tipo Kunitz, al igual que pequeños péptidos ricos en cisteína (SCRiPs), inhibidores ASIC; compuestos bioactivos no proteicos de bajo peso molecular como la serotonina (5-hidroxitriptamina), tetramina, acetilcolina, histamina y tiramina; hidratos de carbono tóxicos, entre otros (Genzano y col., 2020).

Debido a los muchos componentes que contienen estas toxinas, son capaces de alterar el transporte de los canales de sodio y calcio, provocan un fraccionamiento en las membranas celulares, liberan mediadores inflamatorios y actúan como toxinas directas en el miocardio, tejido nervioso, hepático e incluso renal (Genzano y col., 2020).

Está el caso de las metaloproteasas; las cuales inducen hemorragias y necrosis al degradar la matriz extracelular e impiden la formación de coágulos de la sangre. Las TFPs (presentes en todos los cnidarios venenosos) penetran la membrana celular de la víctima, dando lugar a la difusión de pequeñas moléculas y solutos que conducen a un desequilibrio osmótico y a la lisis celular (Genzano y col., 2020).

1.4.3 Hidralisinas

Estas toxinas pertenecen a una nueva familia de toxinas formadoras de poros (β -TFP) secretadas por células endodérmicas digestivas de *Hydra viridissima* (Sher y col., 2005) que se caracterizan por ser dependientes del colesterol. Las hidralisinas son secretadas durante el proceso de alimentación y desempeñan un papel importante en la lisis de tejidos de las presas de los cnidarios (Soto y col., 2020). No son activas en fosfolípidos o carbohidratos de tipo membranal, pero se unen a receptores específicos de membrana para la formación de poros (Sher y col., 2005).

1.5 Técnicas de purificación de proteínas

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de las células y tienen distintas funciones, entre las que se encuentran la actividad catalítica

(enzimas), motilidad corporal (actina, miosina), protección (anticuerpos), regulación de procesos celulares (hormonas), etc. Para llevar a cabo la purificación de una proteína existen diversos métodos según el tipo de proteína que se quiera purificar (Martínez y col., 2006).

La importancia de las proteínas y su purificación ha ido en aumento debido a los descubrimientos de las aplicaciones que pueden tener en la ciencia y esto ha propiciado el desarrollo técnicas de purificación y caracterización más eficientes. Cuando se tiene una proteína pura es posible caracterizar su estructura y su función y observar su interacción con otras biomoléculas, así como comprender los procesos moleculares y celulares en los cuales participa. Además, se puede explorar su aplicación en áreas como la biotecnología y la biomedicina, entre otras (Ramírez, 2021).

La carga, el peso molecular, la hidrofobicidad y la especificidad de una proteína por algún ligando son las características principales para determinar que técnica es la más adecuada para llevar a cabo su purificación. El primer paso es conocer las propiedades bioquímicas y fisicoquímicas, los parámetros fisicoquímicos que puedan llegar a modificar estas propiedades y el mecanismo por el cual llevan a cabo esta alteración de la molécula (Ramírez, 2021).

Una vez obtenida esta información, se puede determinar la técnica más apropiada para purificar una proteína. El siguiente paso es definir el método para lisar (romper) las células que contienen la proteína de interés. De manera general se consideran dos métodos para este paso, métodos mecánicos y químicos (Ramírez, 2021).

Entre los métodos mecánicos se encuentran la homogenización, sonicación, ciclos de congelado y descongelado y uso de presiones altas. En tanto que en los métodos químicos siempre se usa un compuesto químico para producir la lisis mediante un choque osmótico (Ramírez, 2021).

Cuando las membranas celulares se rompen, permiten la interacción de la proteína de interés con proteínas de la misma célula que tienen la capacidad de romper los enlaces peptídicos (enzimas proteasas). Por lo que es fundamental añadir en el amortiguador inhibidores de proteasas, para mantener la integridad de las proteínas (Ramírez, 2021).

El siguiente paso en la purificación de una proteína es la clarificación del extracto proteico, es decir, si nuestra proteína es soluble en el amortiguador, los restos celulares se separan mediante la centrifugación. Por último, la muestra se decanta para separar la parte soluble (donde se encuentra la proteína de interés) de los fragmentos celulares (Ramírez, 2021).

Es importante que en este proceso se considere la estandarización de un protocolo que abarque el menor tiempo posible, por eso se debe realizar el menor número de pasos que permitan obtener la mayor cantidad de proteína pura, y tener cuidado que la muestra se mantenga a 4 °C. Esto es con la finalidad de reducir la actividad de las proteasas y procesos químicos que desencadenen la ruptura del enlace peptídico, el cual puede ser resultado no sólo de la acción de las proteasas (Ramírez, 2021).

Para tener una idea de la complejidad de un extracto proteico, se utiliza la técnica de electroforesis en gel. Esta técnica se basa en el movimiento de las proteínas en respuesta a un campo eléctrico, dando como resultado la separación de las proteínas (Ramírez, 2021).

Como ya se mencionó anteriormente, en la purificación de las proteínas se emplean varios pasos que implican métodos que toman en consideración las diferentes propiedades físicas, químicas y biológicas de las enzimas, al igual que su forma, solubilidad en solventes específicos, peso molecular y carga eléctrica. El método que más se utiliza para purificar las proteínas es la cromatografía, técnica que separa las moléculas de acuerdo con las diferencias de interacción con una fase estacionaria (presente en una columna) y móvil (líquido o solvente) (Moncada, 2020).

I.6 Técnicas cromatográficas

La cromatografía de líquidos es la más utilizada en el caso de la purificación de las proteínas. La cromatografía líquida se basa en el principio de que, bajo un conjunto dado de condiciones, los solutos disueltos en una fase móvil interactúan en grado diferente con la fase estacionaria contenida en la columna (Mayolo-Deloisa y col., 2012). El tipo de interacción depende de las propiedades físicas y químicas de la fase estacionaria. Este tipo de cromatografía se encarga de aprovechar las diferencias inherentes entre las proteínas. Las técnicas de cromatografía de líquidos pueden estar clasificadas en cromatografía de: exclusión o filtración en gel, intercambio iónico, interacción hidrofóbica y fase reversa (Ver Figura 13) (Mayolo-Deloisa y col., 2012).

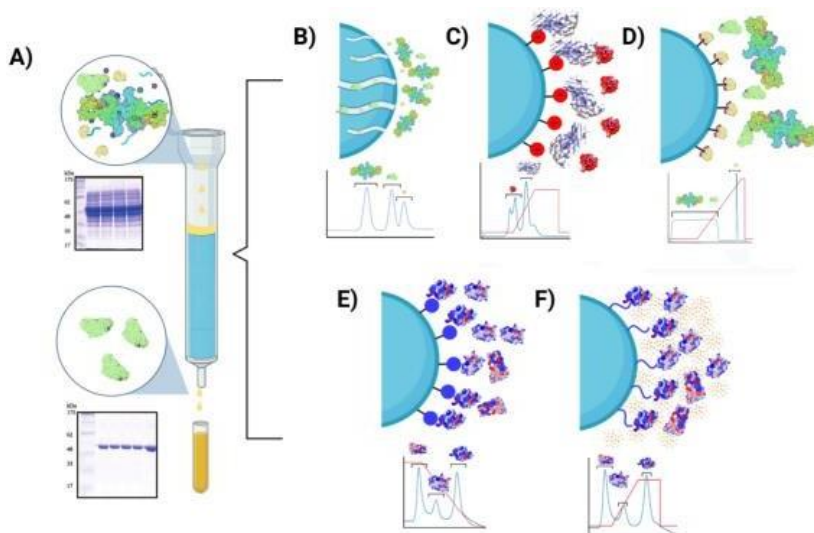


Figura 13. Purificación de proteínas por cromatografía. A) Esquema general de cromatografía. B) Cromatografía de exclusión molecular. C) Cromatografía de intercambio iónico. D) Cromatografía de afinidad. E) Cromatografía de interacción hidrofóbica. F) Cromatografía de fase reversa. (Modificado de Ramírez, 2021).

I.6.1 Cromatografía de exclusión o permeación en gel

El objetivo de la cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla, aprovechando la distribución de dichos componentes entre dos fases: la fase móvil y la fase estacionaria. Generalmente, mediante el empleo de una columna que contiene la fase estacionaria, los compuestos a separar son arrastrados por la fase móvil y son analizados a su paso por el detector. Si la fase móvil es un gas, se trata de una cromatografía de gases, mientras que, si es un líquido, se denomina cromatografía líquida (Gutiérrez, 2009).

La cromatografía de exclusión es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria es sólida y la fase móvil es líquida. Se le conoce como “cromatografía de exclusión por tamaño”. También se le puede llamar “cromatografía de permeabilidad sobre gel” (GPC) o de permeación en gel. La principal aplicación de este tipo de cromatografía es la separación de las moléculas en función de su tamaño con la finalidad de estudiar el peso molecular y distribución de los polímeros (Gutiérrez, 2009).

I.6.2 Cromatografía de interacción hidrofóbica

Es una de las técnicas más utilizadas para la separación y purificación de proteínas en procesos biotecnológicos. Lo que ocurre en esta cromatografía es que las proteínas se unen reversiblemente a ligandos hidrofóbicos que se encuentran inmovilizados en el soporte cromatográfico, debido a la presencia de una elevada concentración de sal. La elución se logra disminuyendo la fuerza iónica en la fase móvil, formando un gradiente decreciente (Mahn, 2009).

I.6.3 Cromatografía de fase reversa

Esta cromatografía está basada en la separación de los componentes de una mezcla por su polaridad. La elución de los componentes de una muestra se obtiene al hacer pasar como fase móvil un gradiente con disolventes orgánicos, que al lograr un equilibrio determinado desprenden los compuestos retenidos en la fase estacionaria (Gerstner y col., 2014).

I.6.4 Cromatografía de intercambio iónico

Esta cromatografía se basa en la diferencia de afinidades de los iones por la fase móvil y la fase estacionaria del sistema cromatográfico (Ruffner, 2022).

La conductividad de la solución es proporcional a la concentración iónica, esto permite saber de qué anión se trata en base a su tiempo de retención y cuantificar mediante la relación área del pico de la muestra: área del pico de un estándar. La temperatura es un factor que afecta directamente la conductividad de una solución, debido a esto, los cambios de temperatura ejercen una oscilación regular en la línea base, afectando la reproducibilidad y la linealidad de la determinación. Los efectos de las variaciones en la temperatura son reducidos por la supresión de la conductividad eléctrica (Ruffner, 2022).

II. HIPÓTESIS

La toxina formadora de poros de tipo hidralisina (rTFP) de *M. allicornis*, sintetizada de manera recombinante por *E. coli*, se purifica de forma eficiente mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) de intercambio iónico y provoca un efecto hemolítico en eritrocitos de rata.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Purificar la toxina formadora de poros del tipo hidralisina (rTFP) de *M. allicornis* sintetizada de manera recombinante por *E. coli*, mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) de intercambio iónico y evaluar su efecto hemolítico en eritrocitos de rata

III.2 Objetivos particulares

- Purificar la TFP obtenida vía recombinante, mediante cromatografía de intercambio aniónico
- Evaluar la actividad citolítica de la rTFP purificada, mediante el ensayo de hemólisis sobre eritrocitos de rata

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Materiales

- Columna HiPrep DEAE FF 16/10 (Cytiva)
- Material de vidrio (matraces erlenmeyer, vasos de precipitados y probetas)
- Balanza analítica
- Micropipetas
- Cámara de electroforesis para geles de poliacrilamida

IV.1.1 Reactivos

- Tris HCl 20 mM, pH 8.8
- Tris HCl 20 mM, pH 8.8 adicionado con NaCl
- Solución Alsever: Composición: 2.05 % dextrosa, 0.8 % citrato de sodio, 0.05 % ácido cítrico y 0.42 % cloruro de sodio adicionado con 10 mM de cloruro de calcio
- Control positivo 20 μ L de PLA2 (sPLA2 Assay Kit Kayman No. 7650001)
- Agua

IV.1.2 Equipo

- FPLC Amersham Pharmacia Biotech ÄKTApurifier 10 System (New Jersey, USA)
- Lector de microplacas (Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer)

IV.2 Métodos

IV.2.1 Purificación de la TFP obtenida vía recombinante

La separación se realizó en una columna HiPrep DEAE FF 16/10 (Cytiva), la cual se equilibró con Tris-HCl 20 mM, pH 8.8, y se eluyó con un gradiente de molaridad de NaCl (0.5 M) en el mismo tampón en un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas ÄKTApurifier 10 System. El flujo fue de 5 mL/min; con una presión

de columna de 0.15 MPa; comenzando con un flujo en B (Tris-HCl 20 mM-NaCl) de 60 mL, hasta llegar a una concentración de B (Tris-HCl 20 mM, con NaCl) del 100 %. El gradiente que se usó fue de 5. El volumen de la inyección fue de 10 mL, la concentración de la muestra fue de 7.37 mg/mL. La detección se realizó a 280 nm. Las fracciones obtenidas se liofilizaron y se re-suspendieron en 500 µL de agua desionizada para posteriormente evaluar la pureza.

La pureza fue evaluada mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 15 % y posteriormente se realizó la tinción con azul de Coomassie (Sher, D; Fishman y col;2005).

IV.2.2 Manejo de los animales de experimentación

Para la determinación del efecto hemolítico se emplearon 2 ejemplares de rata macho de la cepa Wistar (275 – 325 g de peso corporal) que se adquirieron y manejaron dentro de las instalaciones del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico de 43 x 53 x 20 cm (permitiendo un espacio mayor a 187 cm²/animal). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio de 24 – 26 °C, con humedad relativa de 70 – 75 % y ciclos de luz-oscuridad de 12 h con acceso libre de agua (agua purificada en bebederos de acrílico de 250 – 500 mL) y alimento (alimento ABENE BDL-7100 para animales de laboratorio en fase de mantenimiento) (NOM-062-ZOO-1999 apartado 5.1. Durante la fase experimental (1 día) los animales se sacrificaron por decapitación con guillotina sin anestesia (NOM-062-ZOO-1999 apartado 9.5.3.3) e inmediatamente se colectó la sangre en solución Alsever pH 7.4 adicionada con 10 mM de cloruro de calcio. Los Residuos Peligrosos Biológico – Infecciosos fueron debidamente etiquetados y almacenados siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SSA-2002, los cadáveres se almacenaron en bolsas amarillas a -20 °C y los punzocortantes en contenedores rojos especiales para este propósito. Esto por un periodo no mayor a 30 días, posteriormente se contrató un servicio especial dedicado al tratamiento y procesamiento de estos residuos.

IV.2.3 Evaluación de la actividad citolítica de la TFP recombinante

La obtención de la sangre de los sujetos experimentales se realizó al momento de la decapitación por guillotina, colectándola en la solución Alsever con pH 7.4 (0.5 mL). Para la detección de la actividad citolítica, se realizó una curva de calibración con la solución de 950 μ L Alsever pH 7.4 y 950 μ L agua y 50 μ L de una suspensión de eritrocitos de rata al 1 % en solución Alsever pH 7.4 adicionado con 10 mM de cloruro de calcio. Los eritrocitos se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en presencia de una concentración de 50 μ g de la toxina recombinante, la mezcla de reacción se centrifugó durante 4 minutos a 2400 rpm, y la actividad hemolítica se evaluó espectrofotométricamente a 415 nm (Olguín-López y col., 2019).

IV.3 Análisis estadístico

Los resultados derivados de los ensayos de hemólisis se analizaron mediante el programa de análisis de datos y gráficas Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media ($n = 2$).

V. RESULTADOS

V.1 Purificación de la TFP obtenida vía recombinante

En la Figura 14, se observa el cromatograma correspondiente a la separación por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, por sus siglas en inglés) de intercambio iónico del lisado bacteriano que contiene la rPFT (LB-rPFT). Por medio de esta estrategia de purificación se obtuvieron 8 fracciones (F1 a F8), las cuales se enlistan en el Cuadro 1.

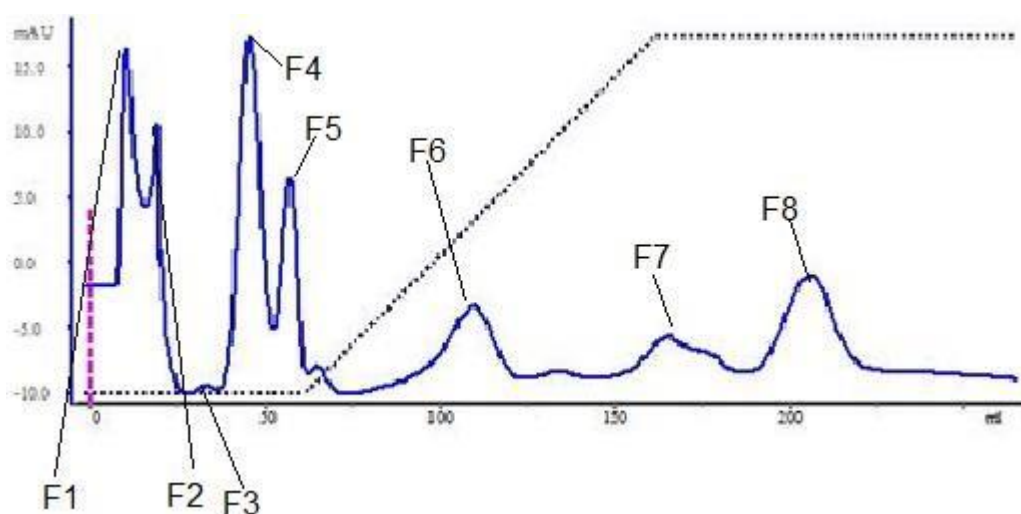


Figura 14. Cromatograma del LB-rPFT obtenido por FPLC de intercambio iónico. Columna: HiPrep DEAE FF 16/10. Fase de equilibrio: Tris-HCl 20 mM, pH 8.8 con un gradiente de NaCl 0.5 M en el mismo tampón (línea punteada). Flujo: 5 mL/min. Detección a 280 nm.

Cuadro 1. Listado de las fracciones obtenidas por FPLC de intercambio iónico.

No. de fracción	Volumen de retención (mL)
F1	8 – 12
F2	14 – 18
F3	20 – 26
F4	40 – 52
F5	52 – 62
F6	90 – 125
F7	150 – 180
F8	190 – 215

Posteriormente, estas 8 fracciones se sometieron a un proceso de liofilización para retirar toda la humedad de las muestras y así obtener un polvo; el cual se resuspendió en 500 μ L de agua desionizada. Una vez resuspendidas las fracciones, se les determinó la cantidad de proteína total mediante el método de Bradford; las concentraciones se enlistan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Concentración de proteína total en cada fracción.

No. de fracción	Concentración (μ g/mL)
1	327.14
2	541.18
3	302.14
4	280.71
5	344.12
6	348.57
7	359.29
8	459.29

Después de determinar la cantidad de proteína total presente en las fracciones, éstas se analizaron por medio de electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida al 15 % en condiciones desnaturizantes. Esto con el fin de obtener el perfil electroforético de cada una de ellas. Los resultados obtenidos se observan en las Figuras 15 y 16. Se observó que las 3 primeras fracciones (F1 a F3) sólo presentaban una banda nítida alrededor de los 10 kDa o por debajo de este valor de peso

molecular. En el caso de las 3 fracciones siguientes (F4 a F6) no se observan bandas definidas. Por último, en las fracciones 7 y 8 se pueden observar un par de bandas que se encuentran en un rango de peso molecular de entre 25 y 30 kDa, mismo que se ha reportado para las TFPs de tipo hidralisina.

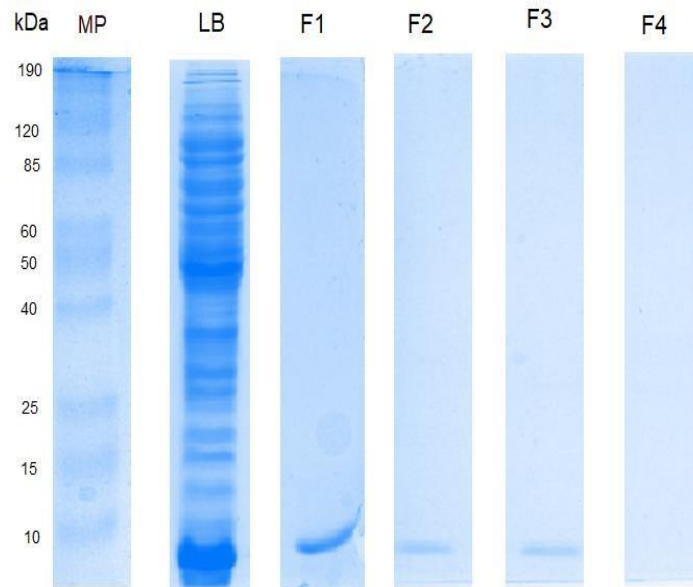


Figura 15. Perfil electroforético unidimensional del lisado bacteriano proveniente de *E. coli* que produce una rPFT y sus fracciones aisladas por FPLC. Carril MP (Marcador de peso molecular); Carril LB (Lisado bacteriano de referencia que contiene la rPFT); Carril F1, F2, F3 y F4 (Fracciones 1 – 4).

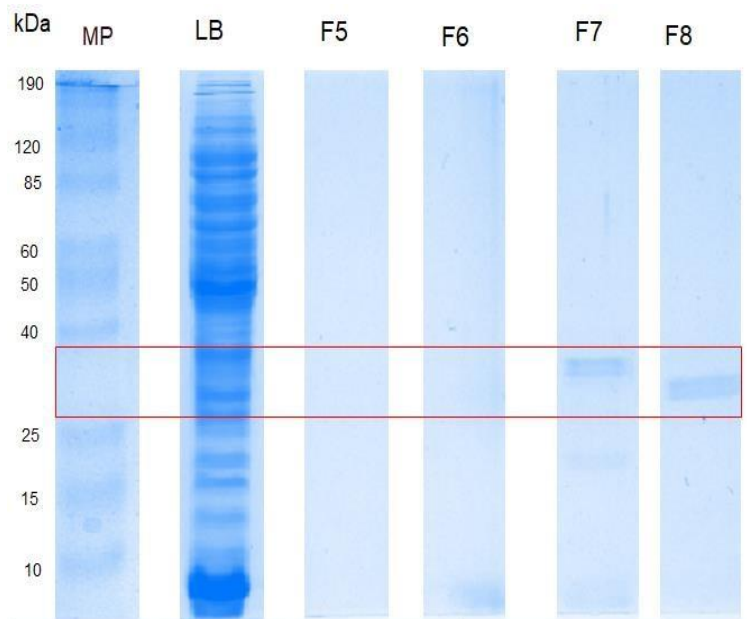


Figura 16. Perfil electroforético unidimensional del lisado bacteriano proveniente de *E. coli* que produce una rPFT y sus fracciones aisladas por FPLC. Carril MP (Marcador de peso molecular); Carril LB (Lisado bacteriano de referencia que contiene la rPFT); Carril F5 y F6 (Fracciones 5 – 6); Carril F7 y F8 (Fracciones con presencia de la hidralisina recombinante).

V.2 Evaluación de la actividad hemolítica de la TFP recombinante

Una vez se obtuvieron los perfiles electroforéticos de todas las fracciones, se evaluó su actividad hemolítica sobre eritrocitos de rata. Para este ensayo primeramente se calculó la cantidad de proteína en μg que contenía cada fracción (Ver Cuadro 3) para tomar 50 μg de proteína para realizar los ensayos.

Cuadro 3. Volumen requerido para obtener 50 µg de proteína en cada fracción.

No. de fracción	Proteína (µg)	Volumen requerido (µL)
1	163.57	61
2	270.588235	37
3	151.07	66
4	140.355	71
5	172.058824	58
6	174.285	57
7	179.645	56
8	229.645	44

Posteriormente, se utilizó solución Alsever para la evaluación de actividad hemolítica, se normalizaron los datos con valores de 0 y 100 % de hemólisis de los eritrocitos y así comenzar a evaluar las distintas fracciones. El 0 % de hemólisis se logró utilizando solución Alsever y para el 100 % de hemólisis se utilizó agua. Los valores de Abs para el proceso de normalización se observan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Curva de calibración para el ensayo de hemólisis.

Repetición	Hemólisis (%)	Absorbancia
1	0	0.252
	100	1
2	0	0.182
	100	1
3	0	0.259
	100	1

En el Cuadro 5 se enlistan los valores de absorbancia derivados del ensayo espectrofotométrico mientras que, en el Cuadro 6 se observan los porcentajes de hemólisis correspondientes a cada fracción evaluada mediante el ensayo de hemólisis en eritrocitos de rata.

Cuadro 5. Resultados de la medición espectrofotométrica de cada una de las fracciones (n = 2).

No. de fracción	1ª Repetición (Abs)	2ª Repetición (Abs)
1	0.256	0.127
2	0.22	0.131
3	0.276	0.147
4	0.536	0.352
5	0.414	0.165
6	0.325	0.267
7	0.943	1.048
8	0.873	0.448

Cuadro 6. Porcentaje de hemólisis de cada fracción (n = 2).

No. de fracción	Porcentaje de hemólisis promedio (%)
1	1.78
2	0
3	3.08
4	33.15
5	12.00
6	13.01
7	96.22
8	62.26

En la Figura 17, se observa el grafico correspondiente a la evaluación de la actividad hemolítica de las fracciones obtenidas por FPLC de intercambio iónico. Los resultados derivados de la evaluación del efecto hemolítico mostraron que las fracciones 7 y 8 el mayor porcentaje de hemólisis sobre los eritrocitos de rata, lo cual indico que el proceso de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico permitió la obtención de la PFT recombinante de forma más pura.

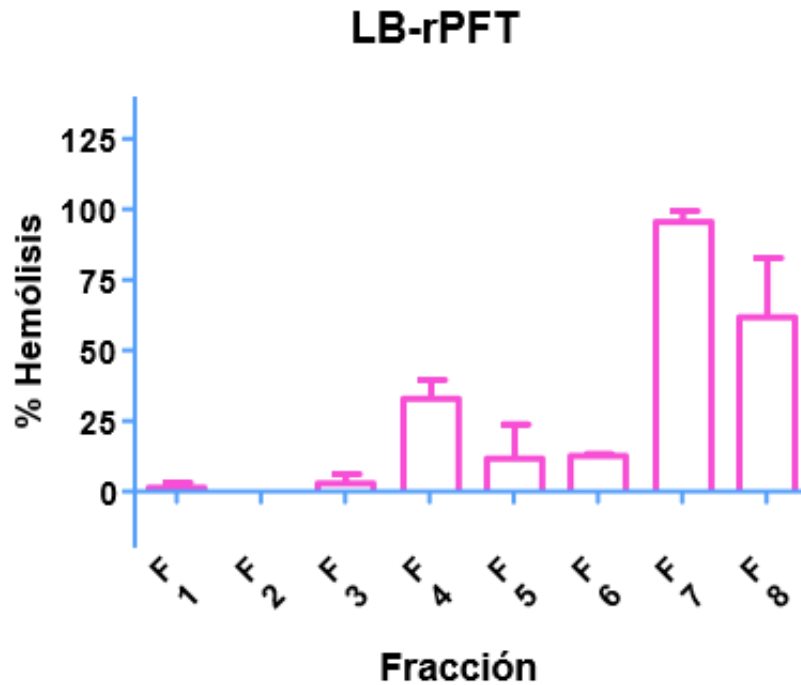


Figura 17. Gráfico de los porcentajes de hemólisis de cada una de las fracciones aisladas de la muestra LB-rPFT

VI. DISCUSIÓN

Las TFP son unas de las moléculas más interesantes que utilizan los seres vivos para ataque o defensa. Estas proteínas se secretan de forma soluble en agua, pero sufren cambios conformacionales, creando un poro en las membranas celulares de los tejidos de sus víctimas. Su unión a la membrana provoca inflamación celular, desequilibrio de los gradientes iónicos y muerte celular. Además, se clasifican en dos grandes grupos, dependiendo de los elementos de estructura secundaria utilizados para atravesar la membrana celular. Las α -TFP utilizan hélices α anfipáticas para perforar la membrana; mientras que las β -TFP forman poros anfipáticos de barril beta (Febles, 2020).

Las hidralisinas son un tipo de β -TFPs secretadas por las células endócrinas digestivas de las hidras. Estas toxinas, que se encontraron por primera vez en *Hydra viridissima* (hidra verde), se unen a las membranas de los eritrocitos y forman poros

discretos con un diámetro interno de aproximadamente 1,2 nm (Sher y col., 2005). El presente trabajo de tesis que tuvo como objetivo purificar la TFP de *M. alvicornis* sintetizada de manera recombinante y evaluar su efecto hemolítico, representa la continuación de una investigación previa en la que se expresó de manera heteróloga en la cepa de *E. coli* C41 (DE3) una PFT del tipo hidralisina, cuyo transcrito se identificó en el transcriptoma del hidrocoral *M. alvicornis*.

En un estudio previo realizado por Sher y col. (2005) se expresaron de forma recombinante Hln-1, 2 y 3 como representantes de las 3 subfamilias de hidralisinas que se encuentran en *C. viridissima*, las cuales fueron purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna de Q-Sepharose FF, encontrando diferencias significativas entre la forma en la que eluyeron cada una de las isoformas (Sher y col., 2005). Por ejemplo, las isoformas Hln-1 y Hln-2 presentaron un volumen de retención igual a 155 y 128 mL respectivamente. En el presente trabajo observamos un comportamiento similar en las fracciones F7 y F8 que mostraron valores de volumen de retención de 150 – 180 mL y 190 – 215 mL respectivamente. Realmente, estos valores se asemejan a la forma de elución presentada por la isoforma Hln-1, no obstante, se nota una diferencia importante entre el perfil de elución de la F7 con respecto a la F8.

Por otro lado, en los perfiles electroforéticos obtenidos por medio de electroforesis unidimensional se observó que tanto la F7 como la F8 presentan pesos moleculares que se encuentran dentro del rango de peso molecular reportado para las hidralisinas (27 a 31 kDa), sin embargo, se observa una diferencia en su desplazamiento en el gel de poliacrilamida, ya que la banda presente en F7 se observa ligeramente arriba con respecto a la que se puede observar en F8. En el caso de la evidencia reportada por el grupo de Sher, las isoformas Hln-1 y Hln-2 también presentaron diferencias en su desplazamiento en el gel de poliacrilamida, de hecho, la Hln-1 presentó un desplazamiento muy similar al que nosotros estamos reportando en F7 (Sher y col., 2005).

Hasta este punto los resultados de nuestro proceso de purificación para esta toxina recombinante han sido muy similares a los reportados en bibliografía, sin embargo, existe una duda significativa entre los resultados de la F7 con respecto a los obtenidos en la F8, debido primordialmente a que sólo se está llevando la expresión heteróloga de un solo transcrito. No obstante, es importante mencionar que a la PFT recombinante se le adicionó una etiqueta de afinidad (6xHisTag) para llevar a cabo su fraccionamiento por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés), desafortunadamente esto no fue posible debido a que una vez que se llevaba a cabo el proceso de aislamiento de la TFP recombinante esta perdía la actividad biológica. El principio de esta técnica se basa en el enlace coordinado de un ion metálico unido covalentemente a un agente quelante, con una proteína que contiene histidinas en el extremo C o N-terminal, debido principalmente a que la histidina es el aminoácido que exhibe la interacción más fuerte con las matrices de iones metálicos inmovilizados, ya que los grupos donantes de electrones en el anillo de histidina imidazol forman fácilmente enlaces de coordinación con el metal de transición inmovilizado (Bornhorst y col., 2000). De hecho, en muchas ocasiones se piensa que este tipo de etiquetas al ser significativamente más pequeñas que la mayoría de otras de afinidad (aproximadamente 2.5 kDa) no perturban de manera significativa la estructura o función de las proteínas.

Sin embargo, no siempre es así, ya que se pueden presentar muchos tipos de inconvenientes cómo, por ejemplo; la unión no específica de péptidos, proteínas, ácidos nucleicos u otros componentes presentes en la matriz de la muestra que se está sometiendo al proceso de purificación. Esto podría suceder debido a la formación de enlaces disulfuro con la proteína de interés o la presencia de interacciones hidrofóbicas no específicas pueden provocar inconvenientes en el momento de llevar a cabo el proceso de purificación de la proteína recombinante con etiquetas de afinidad (Bornhorst y col., 2000; Majorek y col., 2014). En este sentido, es probable que se estén presentando interacciones no específicas entre la etiqueta de polihistidina con alguno de los diferentes componentes que componen la matriz de la muestra y, por ende, se esté presentando una diferencia notoria entre los

volúmenes de retención y los desplazamientos en el gel de poliacrilamida de las fracciones 7 y 8.

En el caso de la evaluación de la actividad hemolítica de las fracciones obtenidas, se observó que únicamente las fracciones 7 y 8 presentaban un efecto hemolítico significativamente notorio sobre eritrocitos de rata en comparación con el resto de las fracciones. No obstante, se identifica que existe también una diferencia en el efecto hemolítico de ambas fracciones, ya que la F7 al parecer presenta un mayor efecto hemolítico, acercándose mucho al 100 %, aproximadamente al 96 % mientras que, la F8 presenta un porcentaje de hemólisis cercano al 65 % con la misma cantidad de proteína purificada (50 µg). Esto también podría estar directamente relacionado con la etiqueta de afinidad, debido a que en literatura se han encontrado reportes de cómo una etiqueta de His puede afectar la estructura, actividad o afinidad de unión de las proteínas. Por ejemplo, un estudio realizado sobre la versión recombinante del receptor tipo 2a del factor liberador de corticotropina de rata adopta dos patrones de enlaces disulfuro diferentes en el extremo N cuando la etiqueta His está en el extremo N o C que, si bien no afectaban la afinidad de unión a ligando, sí es una modificación estructural que no se encuentra en la proteína original. Otro ejemplo, es la proteína recombinante monocatenaria Fv asociada al tumor, en la cual se ha mostrado evidencia contundente de que la ubicación de la etiqueta de His afecta de manera significativa su capacidad de unión para unirse al epítipo. Adicionalmente, procesos como la especificidad al sustrato, las constantes cinéticas o la dinámica de las proteínas también pueden verse afectadas por la ubicación de la etiqueta de His en proteínas recombinantes (Goel y col., 2000; Klose y col., 2004; Majorek y col., 2014). Este tipo de evidencia sobre cómo las etiquetas de His afectan no sólo a la estructura sino en algunos casos la función de la proteína nos puede ayudar más a comprender el fenómeno que observamos en cuanto a la diferencia en la actividad hemolítica de las fracciones 7 y 8. Siendo de este modo un argumento factible que la etiqueta de histidina, así como las posibles interacciones que ésta pueda formar con otros componentes ligados a ella desde la matriz original puedan estar afectando de mayor manera el mecanismo de formación de poros y por este motivo, se está observando

una disminución de la actividad hemolítica de la F8 con respecto a la F7. No obstante, es importante llevar a cabo los ensayos para la determinación de la actividad hemolítica de ambas fracciones para tener un valor preciso de la potencia de su efecto hemolítico, además de llevar a cabo un análisis por espectrometría de masas para identificar la secuencia de aminoácidos de la proteína presente en cada fracción para así comprender de mejor manera de dónde vienen las diferencias reportadas en este estudio.

VII. CONCLUSIONES

- El análisis de un lisado bacteriano obtenido tras la expresión heteróloga en la cepa de *E. coli* C41 de la TFP de tipo hidralisina del coral de fuego *M. alcicornis* permitió la obtención de ocho fracciones cromatográficas, de las cuales las fracciones 7 y 8 mostraron un perfil electroforético que contenía proteínas con pesos moleculares en un rango de 25 a 31 kDa, el cual se ha reportado para las TFPs de tipo hidralisina.
- Las fracciones cromatográficas 7 y 8 mostraron el mayor efecto hemolítico sobre eritrocitos de rata, lo cual confirmó que dichas fracciones contenían la PFT de tipo hidralisina expresada por vía recombinante.
- Considerando las diferencias en los pesos moleculares de las proteínas contenidas en las fracciones 7 y 8 es posible hipotetizar que se están presentando interacciones no específicas entre la etiqueta de polihistidina con alguno de los diferentes componentes que componen la matriz de la muestra.
- La cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad, utilizando una columna de intercambio iónico HiPrep DEAE FF 16/10 permitió mejorar el proceso de purificación de la PFT de tipo hidralisina del coral de fuego *M. alcicornis* expresada de forma recombinantes en la cepa de *E. coli* C41 con respecto a la purificación mediante cromatografía de afinidad.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth**, T. D., Brown, B. E. Coral bleaching. *Current Biology*. **2021**. 31(1), R5-R6.
- Ausubel**, F. *Current Protocols in Molecular Biology*. Appendix 2. **2003**
- Ben-Ari**, H., Paz, M., Sher, D. The chemical armament of reef-building corals: Interand intraspecific variation and the identification of an unusual actinoporin in *Stylophora pistillata*. **2018**. *Sci Rep*; 8:251.
- Booth**, W. T., Schlachter, C. R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N. J., Klapper, V., Chruszcz, M. Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability. *ACS omega*, **2018**. 3(1), 760-768.
- Bornhorst**, J. A., Falke, J. J. Purification of proteins using polyhistidine affinitytags. In *Methods in enzymology*. Academic Press. **2000**. Vol. 326, 245-254.
- Budd**, A. F., Fukami, H., Smith, N. D., Knowlton, N. Taxonomic classification of the reef coral family Mussidae (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia): Classification of reef corals. *Zool J Linnean Soc*. **2012**. 166:465–529.
- Cartwright**, P., Nawrocki, A. M. Character Evolution in Hydrozoa (phylum Cnidaria). *Integrative and Comparative Biology*. **2010**. 50(3), 456–472.
- Castaña**, J. Revisión sobre la estructura y función de los cnidos en cnidaria. **2007**
- Chang**, E. S., Neuhofer, M., Rubinstein, N. D., Diamant, A., Philippe, H., Huchon, D., Cartwright, P. *Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2015**. 112(48), 14912–14917.
- Contreras**, A. Efectos adversos morfológicos en exposición hiperaguda a lodos de perforación en base agua en *Hydractinia symbiolongicarpus* (Familia: Hydractiniidae). *Acta Biológica Colombiana*. **2021**. 26 (3), 303-311.
- Daly**, M., Brugler, M. R., Cartwright, P., Collins, A. G., Dawson, M. N., Fautin, D. G.; Stake, J. L. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*. **2007**. 1668:127-182.

- Díaz, M.** *Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía iónica para la caracterización de aguas y su aplicación en muestras de aguas industriales* (Master's thesis, Universidad de Cartagena). **2018**.
- Fautin, D. G.** Reproduction of cnidaria. *Canadian Journal of Zoology*. **2002**. 80(10), 1735-1754.
- Fautin, D. G.** *Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae*. *Toxicon*. **2009**. 54(8), 1054–1064.
- Febles, C. S.,** de León Esperón, L., Alvarado-Mesén, J., Álvarez, F. L., Yglesias, A., Rodríguez, H., Álvarez, C. Mecanismos de muerte celular inducidos por toxinas formadoras de poros con especial enfoque en actinoporinas. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, **2020**. 8(2).
- Genzano, G. N.** Hidropólipos (Cnidaria) de Mar del Plata, Argentina. *Revista Nerítica*. **2022**. 5(1), 35-54.
- Genzano, G.,** Tapia, F., Dutto, S., Schiariti, A. Las medusas en los balnearios de la provincia de Buenos Aires. *Acta toxicológica argentina*. **2020**. 28(2), 53-59.
- Gerstner, C. D.,** Bernal, C. A., Marsili, N. R., Maccari, M., Williner, M. R. Identificación y cuantificación de azúcares por cromatografía electrocinética micelar en fase reversa en leche modificada. **2014**.
- Gili J, M.,** Vendrell-Simón B., Peral, L., Ambroso, S., Salazar, J., Zapata, R., Corbera, J., González, M. Los cnidarios – El mar a fondo. **2022**.
- Guirola-Fuentes, Jurek; Batista-Reyes, Yaisemys; Hernandez-Guitierrez, Alejandro.** *Intoxicación por toxinas marinas de animales de la familia de los celenterados*. I Jornada Científica de Farmacología y Salud. **2021**.
- Gutiérrez, M. C.,** Burdó Expósito, A., Cegarra Sánchez, J. La cromatografía de exclusión: análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por GPC. *Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*. **2009**. (135), 33-40.
- Hariprasad, G.,** Srinivasan, A., & Singh, R. *Structural and phylogenetic basis for the classification of group III phospholipase A2*. *Journal of Molecular Modeling*. **2013**. 19(9), 3779–3791.

- Hernández-Elizárraga**, V. H., Vega-Tamayo, J. E., Olgún-López, N., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A. Transcriptomic and proteomic analyses reveal the first occurrence of diverse toxin groups in *Millepora alcicornis*—*Journal of Proteomics*. **2023**. 288, 104984.
- Jankowski**, T., Anokhin, B. Phylum Cnidaria. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. **2019**. 93–111.
- Jouiaei**, M., Yanagihara, A., Madio, B., Nevalainen, T., Alewood, P., Fry, B. Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins*. **2015**. 7(6), 2251–2271.
- Kayal**, E., Roure, B., Philippe, H., Collins, A. G., Lavrov, D. V. Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. *BMC* **2013**. 13:5.
- Lazcano**, J. F., Salazar, Z., González, H. Anémonas, corales y medusas: los cnidarios y su importancia médica. *Revista Digital Universitaria (rdu)*. **2020**. 21, 2.
- Lesser**, M. P. Coral Bleaching: Causes and Mechanisms. En Z. Dubinsky & N. Stambler (Eds.), *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. Springer Netherlands. **2011**. 405-419.
- Lewis**, J. B. Biology and Ecology of the Hydrocoral *Millepora* on Coral Reefs. *Advances in Marine Biology*. **2006**. 1–55.
- Linares**, S. G. Análisis molecular del mecanismo de formación de poros por parte de las actinoporinas. (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid). **2017**.
- Lough**, J. M. *Coral reefs: Turning back time*. *Nature*. **2016**. 531(7594), 314–315.
- Mahn**, A. V. Modelación Fenomenológica de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica. *Información tecnológica*. **2009**. 20(3), 135-144.
- Majorek**, K. A., Kuhn, M. L., Chruszcz, M., Anderson, W. F., Minor, W. Double trouble—Buffer selection and His-tag presence may be responsible for non-reproducibility of biomedical experiments. *protein science*. **2014**. 23(10), 1359-1368.
- Martell**, L., Àngel, J. J. S. Diversidad de Medusozoa en México. **2019**.
- Martínez**, A. O., Martínez V. E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición hospitalaria*. **2006**. 21, 01-14.

- Mayfield, A. B.,** Chen, Y.J., Lu, C.Y., Chen, C.S. *The proteomic response of the reef coral *Pocillopora acuta* to experimentally elevated temperatures.* *PLOS ONE.* **2018.** 13(1).
- Mayolo-Deloisa, K.,** Martínez, L.M., Rito-Palomares, M. Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y repliegamiento de proteínas. *Revista mexicana de ingeniería química.* **2012.** 11(3), 415- 429.
- Melchor, J. J.,** Socarrás, A., Mantilla, L. E., Sepúlveda, J. C., Mancilla, L. I., Villalba, M. F., Cenobia, L. *Biotecnología y sus aplicaciones en el sector salud.* **2020.**
- Mesa, H.,** Pérez, A. Modelos de formación de poros de las actinoporinas, citolisinas producidas por anémonas marinas. *Cuban Journal of Biological Sciences/Revista Cubana de Ciencias Biológicas.* **2016.** 5(2).
- Moreno, A. G.,** Outerelo, R., Ruiz, E., Aguirre, J. I., Almodóvar, A., Alonso, J. A; Cano, J. *Prácticas de Zoología. Estudio y diversidad de los Cnidarios y Ctenóforos. REDUCA (Biología),* **2011.** 4(2).
- Neal, B. P.,** Khen, A., Treibitz, T., Beijbom, O., O'Connor, G., Coffroth, M. A., Knowlton, N., Kriegman, D., Mitchell, B. G., Kline, D. I. Caribbean massive corals not recovering from repeated thermal stress events during 2005-2013. *Ecology and Evolution.* **2017.** 7(5), 1339-1353.
- 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. 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. **2019.**
- Özbek, S.** The cnidarian nematocyst: A miniature extracellular matrix within a secretory vesicle. *Protoplasm.* **2011.** 248:635–640.
- Park, E.,** Hwang, D.-S., Lee, J.-S., Song, J.-I., Seo, T.-K., y Won, Y.-J. Estimation of divergence times in cnidarian evolution based on mitochondrial protein-coding genes and the fossil record. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* **2012.** 62(1), 329–345.

Raikova, E. V., Raikova, O. I. *Nervous system immunohistochemistry of the parasitic cnidarian *Polypodium hydriforme* at its free - living stage.* *Zoology.* **2016.** 119(2), 143–152.

Ramírez-Carretero, S., Miranda-Zaragoza, B., Rodríguez-Almazán, C. Purificación de proteínas. **2021.**

Ramos, G. M. E. ¿Una roca o un ser vivo? El maravilloso mundo de los arrecifes de coral. *Revista de Divulgación Científica AQUACIENCIA-ICMARES.* **2022.** 1(1), 10-12.

Rivera-Pacas, M. L. Validación del método de cromatografía iónica de los aniones fluoruro, cloruro, nitrato, nitrito, bromuro, fosfato, sulfato y bromatos en muestras de agua. **2007.**

Rodríguez, L., López, C., Casado-Amezua, P., Ruiz-Ramos, D. V., Martínez, B., Banaszak, A., Hernández, M. Genetic relationships of the hydrocoral *Millepora alcicornis* and its symbionts within and between locations across the Atlantic. *Coral Reefs.* **2019.**

Rojas-Molina, A., García-Arredondo, A., Ibarra-Alvarado, C., Bah, M. *Millepora*. (“fire corals”) species: Toxicological studies until 2011. *Adv Environ Res.* **2012.** 26:133-48.

Ruffner, B. (2022). Validación de dos nuevos ensayos para determinar especies inorgánicas de arsénico utilizando resina de intercambio y cromatografía iónicas. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.13084/6074>

Ruiz-Ramos, D. V., Weil, E., Schizas, N. V. Morphological and genetic evaluation of the hydrocoral *Millepora* species complex in the Caribbean. *Zoological Studies.* **2014.** 53(1), 4.

Santodomingo, N., Flórez, P., Reyes, J. Corales escleractinios de Colombia. *Invemar.* **2010.**

Segovia, J. V., Shadid, O. B., Núñez, J. C. Gorgonias (Octocorallia: Alcyonacea) de aguas someras de El Salvador. *Realidad y Reflexión.* **2021.** 54(54), 66-94.

- Stabili, L., Parisi, M., Parrinello, D., Cammarata, M.** Cnidarian Interaction with Microbial Communities: From Aid to Animal's Health to Rejection Responses. *Marine Drugs*. **2018**. 16(9), 296.
- Sher, D., Fishman, Y., Zhang, M., Lebendiker, M., Gaathon, A., Mancheño, J. M., Zlotkin, E.** Hydralysins, a New Category of β -Pore-forming Toxins in Cnidaria. *Journal of Biological Chemistry*. **2005**. 280(24), 22847–22855.
- Soto, C., de León, L., Alvarado-Mesén, J., Llorente, F., Yglesias, A., Rodríguez, H., Blanco, R., Lanio, M. E., Pazos, I. F., M. Hernández, A., Hernández, A. M., Álvarez, C.** Mecanismos de muerte celular inducidos por toxinas formadoras de poros con especial enfoque en actinoporinas. *Revista Cubana De Ciencias Biológicas*. **2023**. 8(2).
- Turk, T., Kem, W. R.** The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*. **2009**. 54(8), 1031–1037.
- Venn, A. A., Wilson, M. A., Trapido-Rosenthal, H. G., Keely, B. J., Douglas, A. E.** The impact of coral bleaching on the pigment profile of the symbiotic alga, *Symbiodinium*. *Planta, Cell & Environment*. **2006**. 29(12), 2133-2142.
- Voskoboinik, I., Dunstone, M, A., Baran, K; Whisstock, J, C., Trapani, J, A.** Perforin: Structure, function, and role in human immunopathology. *Immunological Reviews*. **2010**. 235(1), 35-54.
- Yap, W., Hwang, J.** *Response of Cellular Innate Immunity to Cnidarian Pore-Forming Toxins*. *Molecules*. **2018**. 23(10), 2537.
- Yellowlees, D., Reyes, T. A. V., Leggat, W.** Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Planta, Cell & Environment*. **2008**. 31(5), 679-694.

ANEXOS

Santiago de Querétaro a 18 de mayo de 2023

COMITÉ DE BIOÉTICA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Sirva la presente para informar que la C. Ivana Valentina Vielma González con exp 234893 estudiante de la Lic. de Químico Farmacéutico Biólogo, llevó a cabo su capacitación en el manejo de animales de laboratorio y vías de administración, en el semestre 2020-, como práctica del Laboratorio de Fisiopatología y Bioquímica perteneciente a su plan de estudios.

Sin otro particular agradezco de antemano su atención.

Atentamente



M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote
Coordinadora
Lic. Químico Farmacéutico Biólogo
Facultad de Química, UAQ.