



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EXPRESIÓN DE UNA TOXINA FORMADORA DE POROS  
DE TIPO HIDRALISINA (PFT) MEDIANTE UN SISTEMA  
HETERÓLOGO DE CÉLULAS HEK293”**

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**DIEGO DOMINGO HERRERA MEJÍA**

DIRIGIDA POR:

**Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA**

CODIRIGIDA POR

**Dr. ATAULFO MARTÍNEZ TORRES**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024.

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EXPRESIÓN DE UNA TOXINA FORMADORA DE POROS  
DE TIPO HIDRALISINA (PFT) MEDIANTE UN SISTEMA  
HETERÓLOGO DE CÉLULAS HEK293”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**DIEGO DOMINGO HERRERA MEJÍA**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA**

**SINODALES**

**Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA**

**DIRECTORA**

**Dr. ATAULFO MARTINEZ TORRES**

**CODIRECTOR**

**Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO**

**SINODAL**

**Dr. JOSÉ ALEJANDRO GARCIA ARREDONDO**

**SINODAL**

**M. en C. JESÚS EDUARDO VEGA TAMAYO**

**SINODAL**

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. ANTECEDENTES	1
I.1 Filo Cnidaria	1
I.2 Clase Hydrozoa	3
I.3 Género <i>Millepora</i>	5
I.4 Cnidarios como holobiontes	8
I.5 Cnidocitos	9
I.6 Toxinas presentes en los venenos de cnidarios	13
I.7 Aplicaciones de las PFTs	17
I.8 Vectores de clonación y expresión	23
1.8.1 pIRES2-EGFP	25
I.9 Proteínas recombinantes	26
I.10 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes	27
I.10.1 Bacterias	28
I.10.2 Células de mamífero	29
I.11 Células HEK293	30
I.11.1 HEK293 y la expresión de toxinas	30
II. HIPÓTESIS	32
III. OBJETIVOS	33
III.1 Objetivo general	33
III.2 Objetivos específicos	33
IV. METODOLOGÍA	34
IV.1 Materiales	34
IV.1.1 Material de vidrio	34

IV.1.2	Material desechable	34
IV.1.3	Material no desechable	34
IV.1.4	Alimento	35
IV.1.5	Material biológico	35
IV.1.6	Reactivos y medios de cultivo	35
IV.1.7	Kits comerciales	37
IV.2	Equipos	38
IV.3	Métodos	39
IV.3.1	Generación del vector de clonación	39
IV.3.2	Subclonación en el vector de expresión	41
IV.3.3	Transfección en células HEK293	43
IV.3.4	Evaluación de la viabilidad celular con azul tripano de las células transfectadas.	44
IV.3.5	Evaluación de la actividad citotóxica de la PFT recombinante.	44
IV.3.6	Evaluación de la viabilidad celular con azul tripano de las células expuestas a la PFT expresada.	45
IV.3.7	Cuantificación de la proteína presente en los medios obtenidos.	45
IV.3.8	Manejo de los animales de experimentación.	46
IV.3.9	Determinación de la actividad hemolítica.	46
IV.3.10	Análisis Estadístico	47
V.	RESULTADOS	49
VI.	DISCUSIÓN	69
VI.1	Generación de plásmidos	70
VI.2	Transfección en células HEK293	70
VI.3	Evaluación de la viabilidad celular con azul tripano de las células transfectadas.	72
VI.4	Evaluación de la actividad citotóxica	73

VI.5	Evaluación de la viabilidad celular con azul tripano de las células expuestas al medio condicionado	74
VI.6	Determinación de la actividad hemolítica.	76
VII.	CONCLUSIONES	78
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	79
IX.	ANEXOS	110

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Algunas toxinas presentes en los venenos de diferentes especies pertenecientes al filo Cnidaria.	14
2	Parámetros de pureza del amplicón purificado.	50
3	Parámetros que presentaron en el NanoDrop 1000 los vectores de expresión obtenidos a partir del kit QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit.	57
4	Análisis de varianza de una vía y análisis post-hoc de la viabilidad de las células transfectadas.	63
5	Análisis de varianza de una vía y análisis post-hoc Tukey de la viabilidad de las células expuestas al medio condicionado.	66
6	Concentraciones de los medios obtenidos.	67
7	Porcentaje de hemolisis provocado por PLA2 y los medios obtenidos.	68
8	Análisis de varianza de una vía y análisis post-hoc Tukey del porcentaje de hemolisis causado.	69
9	Unidad hemolítica media (UH <sub>50</sub> ) del control positivo (PLA2) y el medio condicionado.	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquematación de las fases que se presentan en el filo Cnidaria.	2
2	Árbol filogenético del filo Cnidaria y sus diferentes clases.	3
3	Ciclo de vida general de los organismos pertenecientes a la clase Hydrozoa.	4
4	Ciclo de vida de las especies pertenecientes al género <i>Millepora</i> .	5
5	Fotografías submarinas de diferentes especies pertenecientes al género <i>Millepora</i> .	6
6	Esquematación de la composición de los cnidarios como holobiontes por tres componentes principales.	9
7	Representación esquemática de un cnidocito sin accionar y un cnidocito accionado, mostrando el cambio en el cnidocisto.	11
8	Representación esquemática de la morfogénesis del nematocisto.	12
9	Representación esquemática del ensamblaje y mecanismo de acción de una actinoporina dentro de una inmunotoxina.	18
10	Representación de la aplicación de las PFTs como bioinsecticidas.	20
11	Ilustración de aplicación de las PFTs como biosensores.	21
12	Ilustración de las PFTs unidas a un fluoróforo como identificadores de esfingomielina.	22
13	Ilustración del funcionamiento de las PFTs como adyuvantes.	23
14	Diagrama que representa un vector de clonación y un vector de expresión con sus elementos mínimos.	26



15	Amplificación de la secuencia codificante de la PFT con los sitios EcoRI y Sall en un gel de agarosa al 0.7 %.	50
16	Selección de clonas presuntamente positivas del vector de clonación “pJET1.2_PFTMa-DH” mediante su desplazamiento en un gel de agarosa al 0.7 %.	51
17	Confirmación de la presencia de la secuencia de interés mediante digestión con EcoRI y Sall del vector “pJET1.2_PFTMa-DH”.	52
18	A) Secuenciación del fragmento que codifica para la PFT; B) Mapa del vector de clonación “pJET1.2_PFTMa-DH” modelado en SnapGene.	53
19	Ligación de pIRES2-EGFP digerido con EcoRI y Sall con los insertos digeridos y purificados que codifican para la PFT.	54
20	Selección de clonas presuntamente positivas del vector de expresión mediante su desplazamiento en un gel de agarosa al 0.7%.	54
21	Mapa del vector de expresión pIRES2-EGFP-HydMa-DH modelado en SnapGene.	55
22	Digestión con la enzima de restricción HindIII del vector de expresión pIRES2-EGFP y de pIRES2-EGFP-HydMa-DH.	56
23	Digestión de los vectores de expresión pIRES2-EGFP y pIRES2-EGFP-HydMa-DH con las enzimas de restricción EcoRI y Sall	57
24	Células HEK293 control negativo a las 24 horas posteriores a la transfección vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV.	58
25	Células HEK293 control positivo a las 24 horas posteriores a la transfección con el vector de expresión pIRES2-EGFP vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV.	58

26	Células HEK293 a las 24 horas posteriores a la transfección con el vector de expresión pIRES2-EGFP-HydMa-DH vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV.	59
27	Células HEK293 control negativo a las 48 horas posteriores a la transfección vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV.	59
28	Células HEK293 control positivo a las 48 horas posteriores a la transfección con el vector de expresión pIRES2-EGFP vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV.	60
29	Células HEK293 a las 48 horas posteriores a la transfección con el vector de expresión pIRES2-EGFP-HydMa-DH vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV.	60
30	Células HEK293 control negativo a las 72 horas posteriores a la transfección vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV.	61
31	Células HEK293 control positivo a las 72 horas posteriores a la transfección con el vector de expresión pIRES2-EGFP vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV.	61
32	Células HEK293 a las 72 horas posteriores a la transfección con el fragmento que codifica para la PFT vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV.	62
33	Porcentaje de viabilidad celular observado en la tinción con azul tripano en las células transfectadas.	62
34	Células HEK293 expuestas a un medio con una proporción 1:1 de medio presente en células control negativo en luz	63

	blanca a las A) 24 horas, B) 48 horas y C) 72 horas de la exposición.	
35	Células HEK293 expuestas a un medio con una proporción 1:1 de medio presente en células control positivo en luz blanca a las A) 24 horas, B) 48 horas y C) 72 horas de la exposición.	64
36	Células HEK293 expuestas a un medio con una proporción 1:1 de medio presente en células transfectadas con el vector pIRES2-EGFP-HydMa-DH en luz blanca a las A) 24 horas, B) 48 horas y C) 72 horas de la exposición.	64
37	Células HEK293 expuestas a un medio con una proporción 1:10 de medio presente en células transfectadas con el vector pIRES2-EGFP-HydMa-DH en luz blanca a las A) 24 horas, B) 48 horas y C) 72 horas de la exposición.	65
38	Porcentaje de viabilidad celular observado en la tinción con azul tripano en las células expuestas al medio condicionado (Barras mostrando SD).	65
39	Curva de calibración de BSA y su línea de tendencia con ecuación lineal.	67
40	Curva concentración-Respuesta del porcentaje de hemolisis ocasionado por el medio que contiene rPFT comparada con el control positivo (PLA2) y el control negativo.	69

## RESUMEN

El filo Cnidaria alberga alrededor de 10,000 especies diblásticas que en su vida presentan una fase de medusa y una de pólipo, esta última crucial en la formación de arrecifes coralinos vitales para la diversificación de la vida marina. Dentro de este filo se encuentran los “corales de fuego” pertenecientes al género *Millepora*, denominados así por las heridas similares a quemaduras que provocan al tener contacto con la piel humana. Las toxinas sintetizadas por estos organismos poseen un gran interés ya que es una fuente potencial de compuestos bioactivos naturales que podrían ser útiles para desarrollar nuevos medicamentos o materiales biomédicos; una familia de estos componentes son las toxinas formadoras de poros (PFTs), que son capaces de formar poros en las membranas celulares, resultando un desequilibrio osmótico debido a la difusión de moléculas y solutos, lo cual conduce a la lisis celular; esta característica puede tener diversas aplicaciones, desde el área terapéutica hasta el área agrícola, por lo que el primer paso para poder estudiarlas a profundidad es sobreexpresarlas en sistemas recombinantes para obtener material suficiente que permita realizar ensayos funcionales. En este trabajo utilizamos un sistema de expresión de células eucariotas HEK293 mediante la construcción de un plásmido derivado de pIRES2-EGFP que porta el DNAC de la PFT tipo hidralisina de *M. alcicornis*. Se probó la actividad del medio de las células transfectadas 24-72 horas post-transfección y se encontró que tiene actividad hemolítica, lo cual permite sugerir que HEK293 podría ser un buen modelo para la producción de PFTs.

## I. ANTECEDENTES

### I.1 Filo Cnidaria

Es uno de los grupos de animales más antiguos encontrando su origen en la era Neoproterozoica hace 1,000 millones de años (Van Iten y col., 2016) este se encuentra conformado por alrededor de 10,000 especies (Jouiaei y col., 2015) morfológica y ecológicamente diversas. No obstante, todos los miembros de este grupo están formados por dos capas celulares, 1) el ectodermo que forma la epidermis y responsable de las interacciones del coral con el entorno externo, como la producción de la capa de moco superficial, así como la captura y defensa de presas por parte de los nematocistos, y 2) el endodermo que forma la gastrodermis, donde se lleva a cabo la digestión, excreción y en la cual pueden residir algas simbióticas (Putnam y col., 2017). Por otro lado, la mesoglea, es una matriz extracelular rica en fibrillas la cual separa y protege ambas capas (Jayathilake y Gunathilake, 2020; Lommel y col., 2018). Los organismos de este filo (a excepción de los pertenecientes al subfilo Anthozoa) son diblásticos, es decir que atraviesan dos fases en su desarrollo: la fase de pólipo que miden de 2 a 15 mm, poseen de 5 a 7 tentáculos y están adheridos al sustrato a través de un disco glandular adhesivo y la fase de medusa en la que presentan una forma de campana o paraguas con tentáculos en el borde, ambas fases presentan un orificio en la zona apical, que hace de boca y ano, el cual está rodeado generalmente por tentáculos (Figura 1) (D'Ambra y Lauritano, 2020; Folino-Rorem, 2015). Dentro de este filo se encuentran las anemonas de mar, corales, hidroides y medusas los cuales habitan en ambientes acuáticos (Li y Hui, 2023). Además, tienen la capacidad de formar un exoesqueleto rígido compuesto principalmente por  $\text{CaCO}_3$ , el cual les facilita la creación de estructuras masivas que soportan ecosistemas completos basados en arrecifes tanto en aguas profundas como poco profundas (McFadden y col., 2021). Adicionalmente, estos organismos presentan un rasgo evolutivo característico, como lo es la presencia de células punzantes o también denominadas como cnidocitos (Hara y col., 2021). Estas células poseen un organelo especializado llamado nematocisto, el

cual se encarga de la síntesis, almacenamiento y administración del veneno de estos animales (Gold y col., 2019).

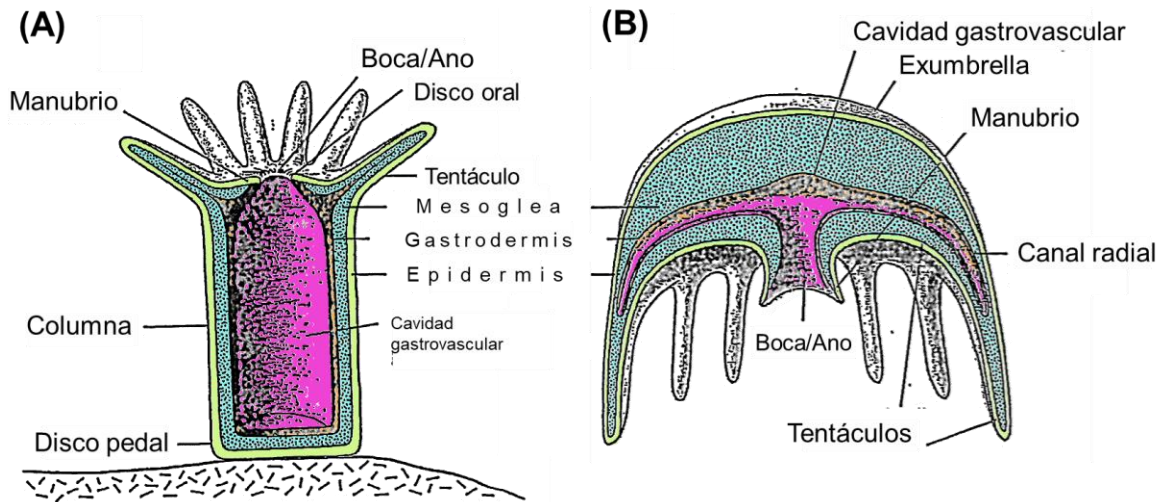


Figura 1. Esquematación de las fases que se presentan en el filo Cnidaria: A) La fase de pólipo sésil y B) la fase de medusa o de nado libre, en ambas se presenta la cavidad gastrovascular (morado), Epidermis o Ectodermo (verde) Mesoglea (azul) y Gastrodermis o Endodermo (naranja). Modificado de: Folino-Rorem, 2015.

El filo Cnidaria es considerado como un filo basal junto con Porifera (esponjas), Placozoa (*Trichoplax adhaerens*) y Ctenophora (medusas de peine) debido a que en estos se encuentra un ancestro común, en todos se tiene simetría radial y son diblásticos (Senatore y col., 2018); Cnidaria está conformado por 3 subfilos que son Anthozoa, Medusozoa y Endocnidozoa (Holland, 2011). El subfilo Anthozoa comprende animales sésiles, es decir, que no poseen formas propias de locomoción y, de hecho, son los principales constructores de estructuras arrecifales en el mundo (Cheng, 2021). Por otro lado, el subfilo Endocnidozoa está conformado por endoparásitos microscópicos de aproximadamente 10 - 300  $\mu\text{m}$  de largo que a menudo parasitan a los peces (Videira y col., 2016). Por último, el subfilo Medusozoa comprende alrededor de 4,055 especies distribuidos en cuatro clases, las cuales son: Hydrozoa (hidras), Cubozoa (medusas de caja), Scyphozoa (medusas verdaderas) y Staurozoa (medusas con tallo), que se encuentran localizadas en ambientes de agua

dulce y salada alrededor de todo el mundo (Figura 2) (Koch y col., 2021; Santander y col., 2022).

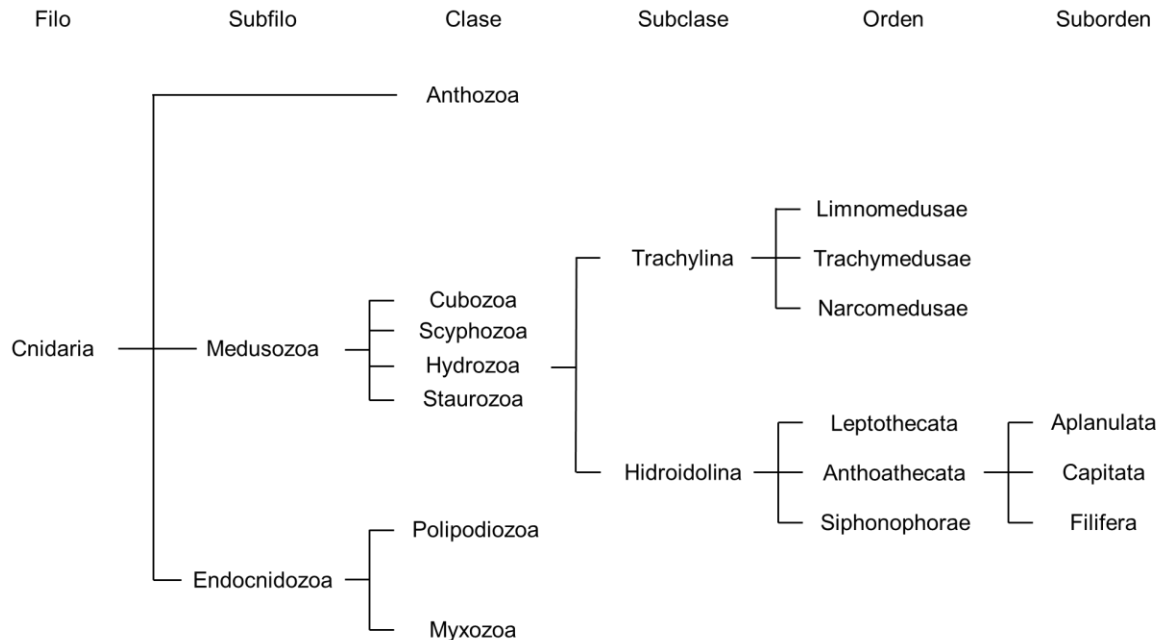


Figura 2. Árbol filogenético del filo Cnidaria y sus diferentes clases. Modificado de: Hauser y col., 2022; Van Iten y col., 2014; Cartwright y col., 2008.

## 1.2 Clase Hydrozoa

La clase Hydrozoa es uno de los grupos de metazoos más primitivos, estos pueden formar un perisarco de quitina estable que funciona como exoesqueleto (Song y col., 2021). El ciclo de vida diblástico de estos organismos comienza al liberarse gametos por medusas adultas, estos gametos producirán larvas de plánula planctotróficas, posteriormente esta plánula realizará metamorfosis para entrar en la etapa de pólipo colonial o hidroide que se propaga de manera asexual y genera medusas que tienen la capacidad de reproducirse sexualmente (Figura 3) (Matsumoto y col., 2019).

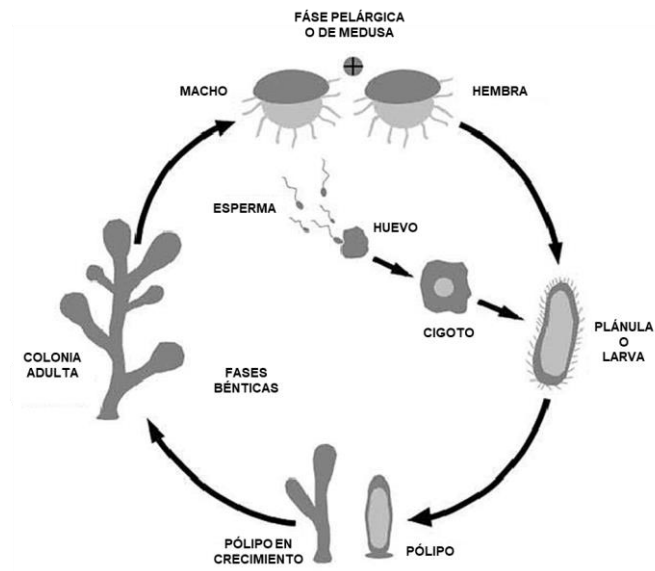


Figura 3. Ciclo de vida general de los organismos pertenecientes a la clase Hydrozoa. Modificado de: Tansui y Thammano; 2017.

Esta clase se caracteriza por mantener una simbiosis mutualista con algas protistas unicelulares, la mayoría de estas pertenecientes a la superclase Dinoflagellata (Hamada y col., 2020). Además, tienen la capacidad de formar una epibiosis mutualista altamente específica en la cual el hidrozoo vive sobre los corales y ambos miembros se ven beneficiados con corales en donde desarrollan pólipos especializados llamados dactilozoides que son específicos para la defensa de la colonia (Montano y col., 2017), dentro de estos se encuentran nematocistos que contienen toxinas tales como la fosfolipasa A<sub>2</sub>, Hemolisinas como Milleporin-1 y MCTx-1. Dentro de los extractos de los Hidrozooos se pueden encontrar compuestos de bajo peso molecular como la serotonina y toxinas formadoras de poros (PFTs, por sus siglas en inglés) tales como las actinoporinas, toxinas formadoras de poros de medusas (JFT), hidralisinas y perforinas, (Banagouro y col., 2022; Jouiaei y col., 2015). Adicionalmente, es importante mencionar que dentro de la clase Hydrozoa se encuentra el género *Millepora*, este contiene especies de hidrocorales importantes en la construcción de arrecifes coralinos y que son comúnmente llamados “corales de fuego” debido a que al entrar en contacto con la piel generan efectos locales y



sistémicos como dolor intenso y ampollas similares a una quemadura (Hernández-Elizárraga y col., 2022).

### 1.3 Género *Millepora*

El género *Millepora* se encuentra dentro de la clase Hydrozoa y la subclase Hidroidolina, en este grupo se encuentran cerca de 3,800 especies de hidrocorales, de las cuales alrededor de 16 especies pertenecen al género *Millepora* (Bentlage y Collins, 2021). Los organismos que pertenecen a este género son conocidos comúnmente como “corales de fuego”, debido a que producen lesiones cutáneas muy similares a quemaduras, ya que provocan una sensación de escozor en la piel (Ortíz-Gonzalez y col., 2021) y al igual que todas las especies del filo Cnidaria presentan dos fases, en su fase de pólipo coralino acumulan lípidos como ceras o triacilgliceroles que servirán como reservas para la etapa posterior al desove, posteriormente aparecerá la segunda fase o fase de medusa con la aparición de ampollas en los corales y la liberación de medusas planctónicas (Figura 4) (Imbs y col., 2021).

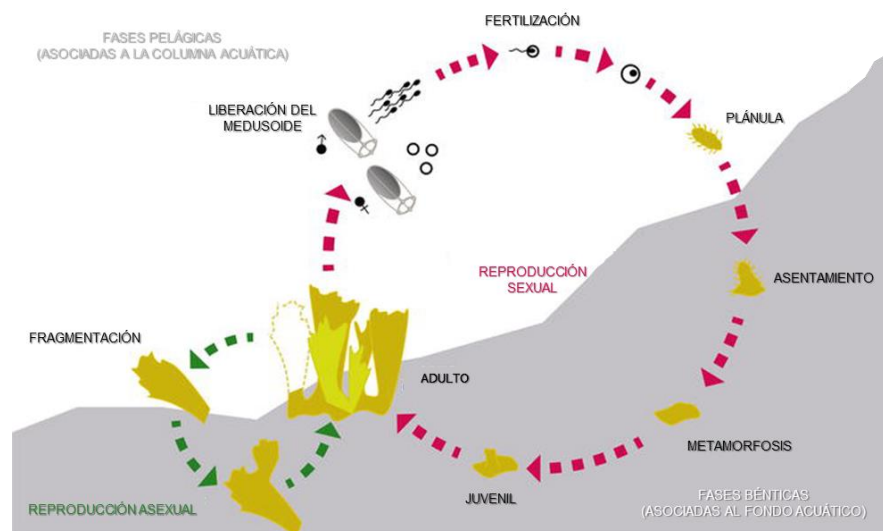


Figura 4. Ciclo de vida de las especies pertenecientes al género *Millepora*. Modificado de: E. Dubé y col., 2019.

Usualmente, estos animales se encuentran distribuidos en zonas tropicales o subtropicales como mares, costas rocosas, lechos de pastos marinos o raíces de manglares. Adicionalmente, los hidrocorales son considerados como los segundos organismos formadores de arrecifes más importantes, siendo superados únicamente por los corales escleractinios (Ruiz-Ramos y col., 2014). Además, son capaces de habitar o formar estructuras arrecifales a profundidades entre 0.5 m a 50 m, asimismo, las colonias de los hidrocorales crecen erguidas en ramas delgadas que se asemejan a dedos o en catrines en forma de hoja o cuchilla que pueden alcanzar los 60 cm de altura (Figura 5) (Ortíz-Gonzalez y col., 2021).

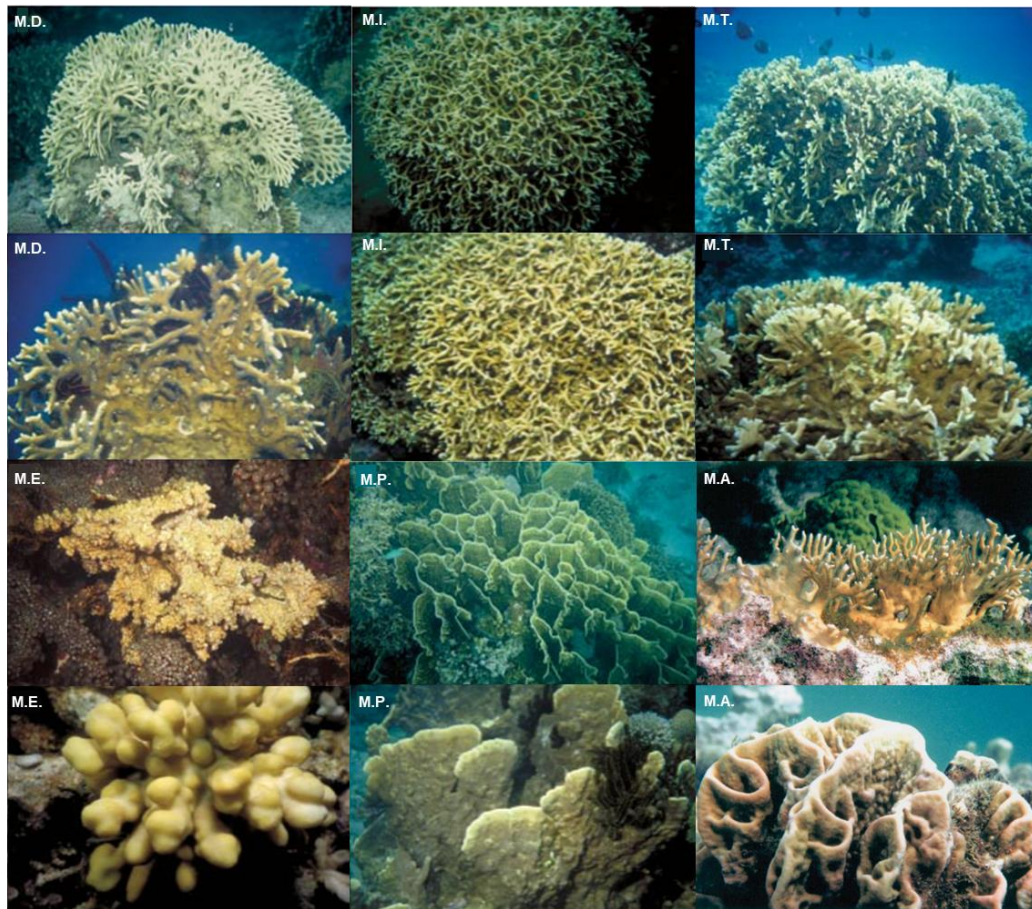


Figura 5. Fotografías submarinas de diferentes especies pertenecientes al género *Millepora*: *Millepora dichotoma* (M.D.), *Millepora intricata* (M.I.), *Millepora tenera* (M.T.), *Millepora exaesa* (M.E.), *Millepora platyphylla* (M.P.), *Millepora alcicornis* (M.A.). Modificado de: Razak y Hoeksema, 2003; Lewis, 2006.

Por otro lado, los hidrocorales poseen la capacidad de vivir en simbiosis con microalgas fotosintéticas de la familia Symbiodiniaceae, las cuales son la principal fuente de energía metabólica para los hidrocorales, debido a que les proporciona cerca del 95% de sus necesidades nutricionales lo cual les permite sobrevivir en aguas pobres en nutrientes. No obstante, este mutualismo adaptado a condiciones de temperatura estables puede ser perturbado con un aumento moderado de esta, provocando la pérdida de los simbiontes y dejando a la vista su esqueleto calcáreo en un fenómeno denominado como “blanqueamiento coralino” (Weis y col., 2008; Petrou y col., 2021). Sin embargo, estas criaturas son capaces de producir un veneno con una importante variedad de toxinas, en donde se pueden encontrar desde proteínas de alto peso molecular con actividad enzimática hasta pequeños péptidos con capacidad de paralizar a presas o con actividad microbiana. Adicionalmente, es importante mencionar que el veneno de estos organismos se produce dentro de células especializadas llamadas “cnidocitos”, específicamente en un organelo celular denominado “nematocisto” el cual se encarga de la síntesis, almacenamiento y liberación de este (Moran y col., 2013; Kass-Simon y Scappaticci, 2002); se han realizado estudios de los efectos que tiene el veneno de algunas especies del género *Millepora* y se ha reportado actividad hemolítica en donde se utilizó un extracto acuoso de *M. alcicornis* con una concentración de 0.0001 a 150 µg/mL en el que se observaron hemólisis en eritrocitos de diversas especies y se obtuvo una concentración del extracto capaz de lisar el 50% de los hematíes (HU<sub>50</sub>) de 0.042 ± 0.005 µg proteína/mL y al inyectarse este veneno por vía intravenosa a ratones se obtuvo una dosis letal media (LD<sub>50</sub>) de 17 µg de proteína/g de peso corporal y a dosis menores como 1.5 y 3.0 µg de proteína/g el extracto les provocó respiración forzada y a los pocos minutos se recuperaron y al aumentar las dosis a 6 y 12 µg de proteína/g se indujo hipoactividad y parálisis así como convulsiones e insuficiencia respiratoria que provocaron la muerte de los ratones (Hernández-Matehuala y col., 2015) y en otro estudio realizado por (Hernández-Elizárraga y col., 2022) un análisis zimográfico en el que se observó actividad hemolítica de extractos de *M. complanata* en el que se observaron zonas de hemólisis a ~25 y ~205 kDa y que concuerdan con este estudio en el que se indicó que estos contienen hemolisinas de una masa molecular

de 28 a 30 kDa con actividad PLA<sub>2</sub> y de alrededor de 200 kDa; además para caracterizar la actividad hemolítica de *M. complanata* evaluaron la influencia de inhibidores enzimáticos como el EDTA obteniéndose una reducción de la hemólisis en un 44.2 % que significa que casi la mitad de las hemolisinas presentes son dependientes de iones divalentes, de igual forma evaluaron el efecto que tiene un inhibidor de PLA<sub>2</sub> y obtuvieron una reducción del 19.66 % por lo que de igual forma el veneno contiene toxinas que pertenecen a las fosfolipasas A<sub>2</sub> (Hernández-Elizárraga y col., 2022) y dentro de la especie *M. alcicornis* se han realizado estudios en los que se han identificado toxinas tales como la desintegrina, actitoxina Ate1a DELTA, fosfolipasa A<sub>2</sub> y ATP-metaloproteasa dependiente de zinc (Olguín-López y col., 2019) así como Exotoxina-2, actitoxina Oor1b DELTA y fosfolipasa ácida A<sub>2</sub> independiente de calcio (Hernández-Elizárraga y col., 2019).

#### I.4 Cnidarios como holobiontes

Las algas protistas unicelulares pertenecientes a la superclase Dinoflagellata y específicamente de la familia Symbiodiniaceae son capaces de interactuar con cnidarios de la clase Hydrozoa de una forma extendida y de una forma ecológicamente exitosa (Hamada y col., 2020; Kirk y Weis, 2016) estos dinoflagelados viven dentro de las células de la gastrodermis en los corales (Rosenberg y Zilber-Rosenberg, 2018) y proporcionan al coral subproductos orgánicos esenciales al huésped a partir de la fotosíntesis (Bove y col., 2022) así como auxiliares en el ciclo del nitrógeno (Rådecker y col., 2015), del carbono (Kimes y col., 2010) y nutrientes esenciales (Robbins y col., 2019), estas asociaciones pueden darse con cepas de algas simbiotes que comparten un mismo nicho ecológico o también llamadas “algas homólogas”; o con cepas oportunistas que se alojaron después de que el coral sufrió alguna perturbación o también denominadas “algas heterólogas” (Davy y col., 1997; Weis y col., 2001). Y además de las algas, los corales dentro de su microbioma contienen bacterias, virus, hongos, arqueas, entre otros (Figura 6) (Pollock y col., 2018; van Oppen y Blackall, 2019) los cuales son importantes en el mantenimiento de su salud (Bove y col., 2022). Estas asociaciones

son variables del entorno y un mismo huésped puede asociarse con diversas cepas y así lograr una mayor flexibilidad (Reich y col., 2017) la cual es importante debido a que estas interacciones huésped-simbionte son resilientes bajo estrés (Hoadley y col., 2019). Un coral con un microbiota diverso logra mantenerse saludable en mayor medida a condiciones que provocan un estrés alto debido a los recursos que le son proporcionados por sus huéspedes (Bourne y col., 2016; Webster y Reusch, 2017) y tal es el grado de algunas simbiosis (en especial en corales de aguas poco profundas) que si esta relación se ve afectada los simbiosntes se pierden, se produce blanqueamiento coralino lo cual provoca la muerte del coral (Hoegh-Guldberg, 1999).

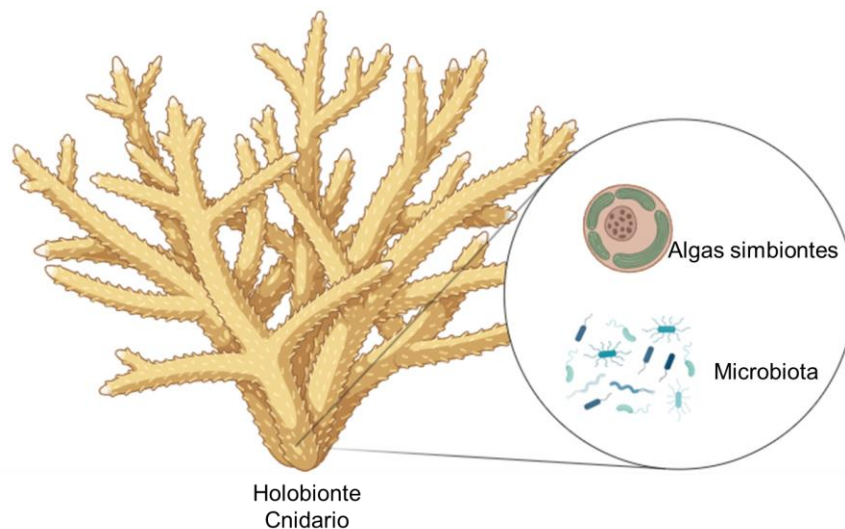


Figura 6. Esquematación de la composición de los cnidarios como holobiontes por tres componentes principales: El huésped animal, algas simbiotes de la familia Symbiodiniaceae y un amplio microbiota como bacterias, virus, hongos, protistas, entre otros. Modificado de: Herrera y col., 2020.

### 1.5 Cnidocitos

Las células punzantes o cnidocitos forman parte de una característica evolutiva bien conservada dentro de los cnidarios. Estas células cumplen diversas funciones especializadas relacionadas con atrapar y someter presas, así como disuadir y repeler depredadores (Jouiaei y col., 2015). Tanto en el estadio de pólipo como en el de medusa los cnidocitos se encuentran distribuidos por todo el ectodermo en una zona llamada cavidad gastrovascular (Ashwood y col., 2020). No obstante, estas

células se presentan en una concentración mayor en los tentáculos para poder cazar de una forma más eficaz, aunque también hay presencia de nematocistos en la actinofaringe, los filamentos mesentéricos, la columna y la fisa (Shenkar y col., 2014; Rachamim y col., 2014; Macrander y col., 2016). Específicamente dentro de la clase Hydrozoa el cnidoma, es decir, la forma en la que se encuentran presentes los cnidocitos en un cnidario: su tamaño, abundancia y distribución durante cada etapa de su desarrollo (Heins y col., 2015; Ballesteros y col., 2021). Los cnidocitos se clasifican en función de la forma de su eje, el tipo de espinas que poseen y su distribución dando origen a tres diferentes cnidocitos: 1) los nematocistos que poseen dos paredes que rodean la cápsula, 2) los espirocistos que únicamente tienen una pared que rodea la cápsula y 3) los pticocistos que son glutinosos. Los nematocistos se encuentran en las clases: Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa y Staurozoa (D'Ambra y Lauritano, 2020) y son los únicos cnidocitos con la capacidad de liberar veneno (Hara y col., 2021) y también son los únicos que poseen espinas ya que los espirocistos y pticocistos carecen de ellas debido a que poseen otras funciones que no son el inyectar veneno al objetivo, siendo el de los pticocistos el inmovilizar mecánicamente a sus presas mediante sustancias higroscópicas, cualidades que solo poseen los miembros de la subclase Hexacorallia y que además utilizan para construir su refugio (Doonan y col., 2019; Özbek y col., 2009). Además, los nematocistos al encontrarse cargados se consideran un sistema de micro armas capaz de perforar el tegumento de las presas o depredadores a una aceleración de 5 millones de gravedades, insertando un túbulo delgado que tiene forma de aguja por el cual se inyecta el veneno (Figura 7) (Rachamim y col., 2014).

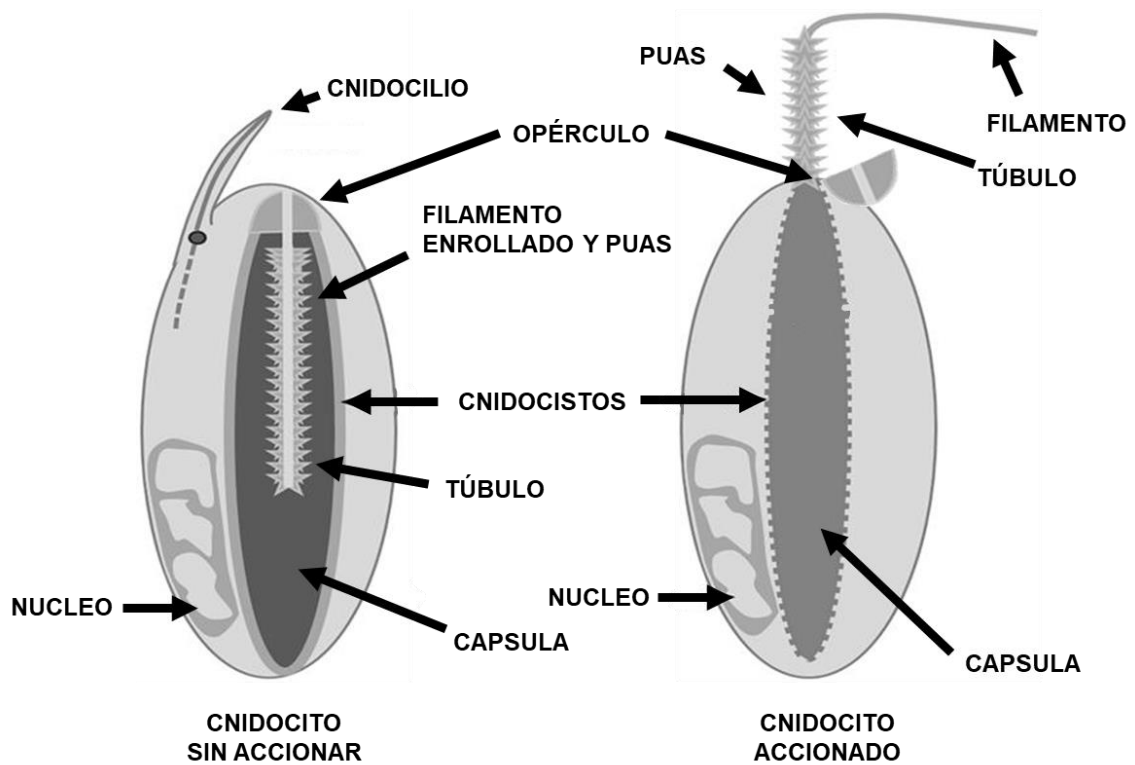


Figura 7. Representación esquemática de un cnidocito sin accionar y un cnidocito accionado, mostrando el cambio en el cnidocisto. Modificado de: Babonis y Martindale, 2014; Özbek y col., 2012.

Los nematocistos son producidos por el aparato de Golgi a partir de un nematoblasto (Beckmann y Özbek, 2012; Fautin, 2009), estos son formados a partir del crecimiento de la vesícula de nematocisto debido a la adición de vesículas llenas de proteínas del aparato de Golgi, los túbulos por su parte se forman por la tubulación de la membrana en el sitio apical de la vesícula del nematocisto y al completarse el proceso el túbulo se invagina en la matriz de la cápsula y la cápsula se cierra con una estructura similar a una tapa llamada opérculo y las espinas presentes en el túbulo se forman después de la invaginación. Finalmente, los nematocistos se maduran al compactarse la pared de la cápsula por polimerización de proteínas estructurales como los minicolágenos (Figura 8) (Kyslík y col., 2021; Beckmann y Özbek, 2012).

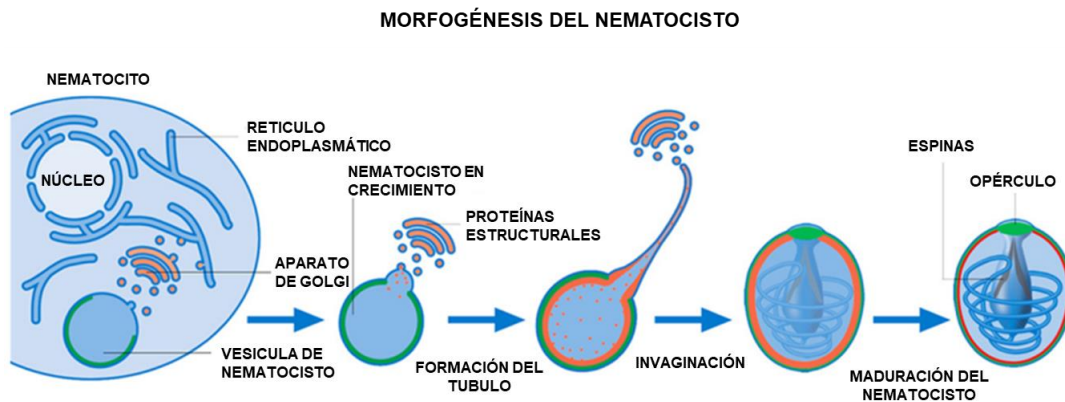


Figura 8. Representación esquemática de la morfogénesis del nematocisto.  
Modificado de: Beckmann y Özbek, 2012.

La cápsula del nematocisto está compuesta por una malla de proteínas entrecruzadas por puentes disulfuro intermoleculares, lo cual brinda resistencia y elasticidad, proteínas estructurales que forman el túbulo y las púas (Beckmann y Özbek, 2012) la matriz del nematocisto está empaquetada dentro de una cápsula de poli- $\gamma$ -glutamato asociada por cationes, al activarse el nematocisto mediante un estímulo físico hacia el cnidocilio sensible al tacto (Gold y col., 2019) la presión osmótica del líquido intracapsular aumenta temporalmente debido a que el agua puede fluir a través de la pared del nematocisto, esto provoca la disociación de la matriz agregada y la liberación de cationes presentes en la cápsula, la diferencia de presión osmótica entre el interior y el exterior de la cápsula del nematocisto aumenta hasta el punto de que la presión intracapsular supera el valor umbral crítico y conduce a la descarga del nematocisto y con ello la inyección del veneno que se encuentra en la superficie interna del túbulo que al realizarse la descarga se evierte de manera que ahora el veneno se encuentra en la parte exterior y pueda liberarse en el interior del organismo objetivo (Figura 7) (Jouiaei y col., 2015; Ayalon y col., 2011; Özbek y col., 2009; Szczepanek y col., 2002). Los venenos de los cnidarios tienen actividad citolítica, dermonecrótica, proteolítica y vasopermeática e induce a una parálisis rápida, lo que facilita la captura de presas además de causar dolor, lo que puede ahuyentar a los depredadores (Rachamim y col., 2014; Brodie, 2009; Sher y col., 2005a); de hecho, como lo demuestra el estudio realizado por Radwan y Aboul-



Dahab en 2004, el veneno producido por los nematocistos de *M. platyphylla* son capaces de provocar hemólisis en eritrocitos humanos.

#### 1.6 Toxinas presentes en los venenos de cnidarios

Los cnidarios se caracterizan por ser animales sumamente venenosos, razón por la cual ha incrementado el interés por evidenciar la diversidad toxicológica de los venenos que producen (Fry y col., 2009; Jouiaei y col., 2015). De hecho, en la actualidad ya se conocen algunos componentes tóxicos importantes en los venenos de estos organismos. Por ejemplo, se han identificado compuestos proteicos como péptidos, proteínas, enzimas e inhibidores de proteasas, así como compuestos no proteicos como purinas, compuestos de amonio cuaternarios, aminas biogénicas y betainas (D'Ambra y Lauritano, 2020). Entre los compuestos no proteicos se encuentra la serotonina que, debido a su efecto vasodilatador potencia el efecto de otros componentes del veneno (Sher y col., 2005b), histamina que aumenta la permeabilidad vascular (Burnett, 2009), bunodosina que tiene actividad analgésica mediante la activación de los receptores de serotonina (Zaharenko y col., 2011) y el caissarone que estimula la función intestinal mediante su actividad antagonista hacia los receptores de adenosina (Jouiaei y col., 2015; Cooper y col., 1995). En cambio, entre los compuestos proteicos presentes se encuentra la fosfolipasa A<sub>2</sub> que cataliza la escisión de los glicerofosfolípidos produciendo lisofosfolípidos y ácidos grasos, ayudando a la digestión de las presas (Nevalainen y col., 2004). Además, están las metaloproteinasas que son enzimas que necesitan un metal para llevar a cabo su función proteolítica y que en las presas inducen hemorragia y necrosis ya que degradan la matriz extracelular y evitan la formación de coágulos (Fry y col., 2009; Fox y Serrano, 2005). Asimismo, se han identificado toxinas que interaccionan con canales iónicos dependientes de voltaje que pueden modificar la transmisión de señales de las neuronas induciendo así parálisis mediante la alteración de la activación de los canales, por lo que los iones como el sodio y el potasio no pueden atravesar la membrana utilizando el gradiente electroquímico (Messerli y Greenberg, 2006). Por otro lado, se han encontrado inhibidores de proteasa tipo Kunitz,

inhibidores de canal TRPV1, moduladores de canal TRPA1 y ASIC, así como inhibidores de la beta-defensina tipo alfa-amilasa (D'Ambra y Lauritano, 2020).

Cuadro 1. Algunas toxinas presentes en los venenos de diferentes especies pertenecientes al filo Cnidaria, su masa molecular (kDa) y su actividad biológica. N/O: datos no obtenidos. Modificado de: D'Ambra y Lauritano, 2020; Sher y Zlotkin, 2009.

Toxina	Masa molecular (kDa)	Actividad biológica
Hidralisina	27	Neurotóxica, Citolítica, Paralítica.
Milleporina-1	30-34	Citolítica, Hemolítica.
Metaloproteinasas	N/O	Citolítica, Neurotóxica, Gelatinolítica, Caseinolítica, Fibrinolítica, evita la formación de coágulos.
Fosfolipasa A <sub>2</sub>	N/O	Citolítica, Citotóxica, Hemolítica, Dermonecrótica, Neurotóxica, Irritación local, Catalítica.
Colagenasa	25	Citotóxica, Hemolítica.
Fosfolipasa B	N/O	N/O
Elastasas	N/O	Musculotóxica, Citolítica, Hemolítica.
Bunodosina	N/O	Analgesia
Caissarona	N/O	Estimula la función intestinal
Proteinasa tipo Kunitz (SHPI-1)	~6	N/O
Hemolisina paralítica	> 100	Parálisis espástica inmediata, hemólisis, entrada de Ca <sup>2+</sup>
Neurotoxinas depresoras	< 100	Parálisis flácida de larga duración, Contracciones musculares locales.
Inhibidor de la succinoxidasa	< 50	En cangrejos violinistas es neurotóxica y los incapacita para enderezarse.

Por último, en estos organismos se han encontrado PFTs que poseen la capacidad de formar poros oligoméricos capaces de penetrar las membranas de las células diana, esto da como resultado la difusión de pequeñas moléculas y solutos que conducen al desequilibrio osmótico y una posterior lisis celular. Estas toxinas muestran una estructura monomérica soluble en agua y una estructura oligomérica unida a la membrana que es la que forma el poro (Parker y Feil, 2005). Las PFTs pueden clasificarse en dos grandes grupos, según el tipo de estructura secundaria que utilizan para penetrar la membrana tras la formación del poro, pueden ser  $\alpha$ -PFTs ricas en hélices alfa o  $\beta$ -PFT ricas en láminas beta. Dentro de las PFTs que se han identificado en cnidarios se encuentran 3 tipos principales: i) actinoporinas: son  $\alpha$ -PFTs que son sintetizadas como pre-pro-toxinas que se procesan enzimáticamente para generar una proteína madura de alrededor de 170 a 180 aminoácidos (Ramírez-Carreto y col., 2020) y estructuralmente son monómeros solubles que contienen un  $\beta$ -sandwich flanqueado por dos  $\alpha$ -hélices que al encontrar una membrana diana forman oligómeros formadores de poros mediante la inserción de la hélice anfipática N-terminal en la membrana (Sepehri y col., 2021) estas toxinas tienen un tamaño de alrededor de 20 kDa y han mostrado toxicidad en ratas como paro cardiovascular y respiratorio (Hu y col., 2011) e interactúan con membranas que contienen esfingomielina (Kristan y col., 2009; Bakrač y col., 2008) ya que estas proteínas contienen residuos aromáticos en el bucle  $\beta 7 - \beta 8$  los cuales están orientados hacia la membrana y hacen posible su interacción con esfingomielina (Mancheño y col., 2003), además de otros agentes que hagan posible la coexistencia de fases en la membrana (Sepehri y col., 2021); ii) toxinas de medusas (JFTs) que tienen un peso molecular de alrededor de 40 a 50 kDa, son encontradas principalmente en las especies pertenecientes a la clase Cubozoa y pueden crear poros bien definidos de 12 nm en el interior y 25 nm en el exterior de diámetro en los eritrocitos humanos (Yanagihara y Shoheit, 2012). A través de un análisis filogenético de las secuencias de estas toxinas se les puede subclasificar en dos grupos, el Tipo I y Tipo II de las cuales ya se realizaron estudios previamente por (Brinkman y col., 2014) en donde encontraron que CfTX-A/B del tipo II mostró al menos 30 veces más actividad hemolítica que CfTX-1/2 perteneciente al tipo I, sin embargo esta última es capaz de

inducir una falla cardiovascular rápida en ratas a comparación de la corta interrupción de la actividad cardiovascular a concentraciones similares de CfTX-A/B, por lo que el autor de estos estudios llegó a la conclusión de que las JFTs de tipo I poseen mayor reactividad hacia células cardíacas de vertebrados y en los ensayos funcionales realizados por (Nagai y col., 2000) se observó un valor de actividad hemolítica ( $EC_{50}$ ) para las toxinas CrTX-A, CaTX-A y CqTX-A fue de  $\sim 2, 70, 160$  ng/ml, respectivamente y valores de dosis letal media ( $LD_{50}$ ) para cangrejos de río fue de  $\sim 5, 5-25$  y  $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente; iii) hidralisinas, son  $\beta$ -PFTs paráliticas y citolíticas que son capaces de unirse a eritrocitos y formar poros discretos con un diámetro interno de 1.2 nm, no se producen en los nematocitos, sino que son sintetizadas en el tejido corporal y representan aproximadamente el 0.3% del peso seco total del espécimen de la especie *Hydra viridissima* (Sher y Zlotkin, 2009). Estas toxinas son capaces de lisar varios tipos de células cultivadas, su efecto citolítico es de tipo celular por lo que se sugiere la presencia de un receptor específico en las membranas diana, por lo que también se cree ayudan a los organismos que las sintetizan a desintegrar a la presa y poderla digerir con mayor facilidad (Sher y col., 2008). Adicionalmente, se detectó el sitio en el que se expresa el ARNm y en el que se encuentra la proteína madura. Esto se llevó a cabo mediante un experimento de hibridación *in situ*, en el que se observó expresión de hidralisinas en la base de las células digestivas endodérmicas que recubren la cavidad gastrovascular de la hidra y, por otra parte, cuando se realizaron pruebas inmunohistoquímicas se identificaron estas proteínas maduras tanto en la región basal como en la región apical de estas células (Sher y col., 2008). Asimismo, al alimentar a la hidra con nauplio de *Artemia* se logró visualizar la dinámica de las hidralisinas, en donde se observó que primero se secretan en la cavidad gastrovascular al ingerir a la presa para posteriormente unirse a las membranas de la presa y llevar a cabo el proceso de digestión. Adicionalmente, es importante mencionar que esta proteína es incapaz de unirse a las membranas de la hidra, ya que probablemente no posean el receptor específico necesario para llevar a cabo el proceso de reconocimiento de la membrana celular por parte de la toxina (Sher y Zlotkin, 2009).

## I.7 Aplicaciones de las PFTs

Las PFTs también pueden ser utilizadas como sondas moleculares para detectar esfingomielina o colesterol *in situ* como es el caso de la proteína ostreolisina A que es una actinoporina sintetizada por las anémonas de mar (Skočaj y col., 2014). Estas toxinas también poseen la capacidad de modular actividades metabólicas en algunas enfermedades y pueden emplearse para la producción de inmunotoxinas, modificando su especificidad sin afectar sus características, las cuales pueden tener un efecto citotóxico contra células aberrantes como células cancerosas y/o metastásicas o células madre cancerosas, mediante la construcción de un dominio de unión que es capaz de reconocer la célula dañina y un dominio tóxico que la mata (Janus y Robak, 2019; Zeng y col., 2006). Este tipo de estructuras son moléculas artificiales híbridas, en las que el dominio de unión puede ser un anticuerpo creado *ex vivo* o monoclonal o inclusive únicamente la fracción variable de su cadena única lo que permitiría mejorar su capacidad de penetración. Por otra parte, el dominio tóxico generalmente se compone de proteínas que actúan intracelularmente y conducen a la muerte celular como es el caso de las PFTs (Figura 9) (Rivera-de-torre y col., 2019) como es el caso de las actinoporinas como HALT-1, una toxina de 18.5 kDa sintetizada por *Hydra magnipapillata* utilizada en numerosas investigaciones, una de ellas utilizada como el dominio tóxico hacia los macrófagos proinflamatorios ya que posee una actividad importante dentro de los trastornos inflamatorios y autoinmunes. Además, esta misma toxina fue utilizada en otro estudio realizado por Jiemy y colaboradores en 2020 en el que se utilizó como dominio de unión el anticuerpo anti-CD64-scFv, construcción que obtuvo resultados significativos contra las líneas celulares de CD64 y CD64<sup>+</sup> al realizar un estudio de citotoxicidad *in vitro*. Por otro lado, Ng y colaboradores en 2019 realizaron un estudio en el que se utilizó esta misma toxina y una toxina mutada similar y se evaluaron sus efectos en varias líneas celulares de cáncer humano como MCF-7, HeLa, HepG2, HCT116 y SW-620, los resultados indicaron que dichas toxinas indujeron potentes efectos citotóxicos y una disminución considerable de la viabilidad celular. De tal forma que la toxina HALT-1 así como

toxinas mutadas similares a HALT-1 son potenciales candidatas para el desarrollo de inmunotoxinas útiles para combatir diversos tipos de cáncer.

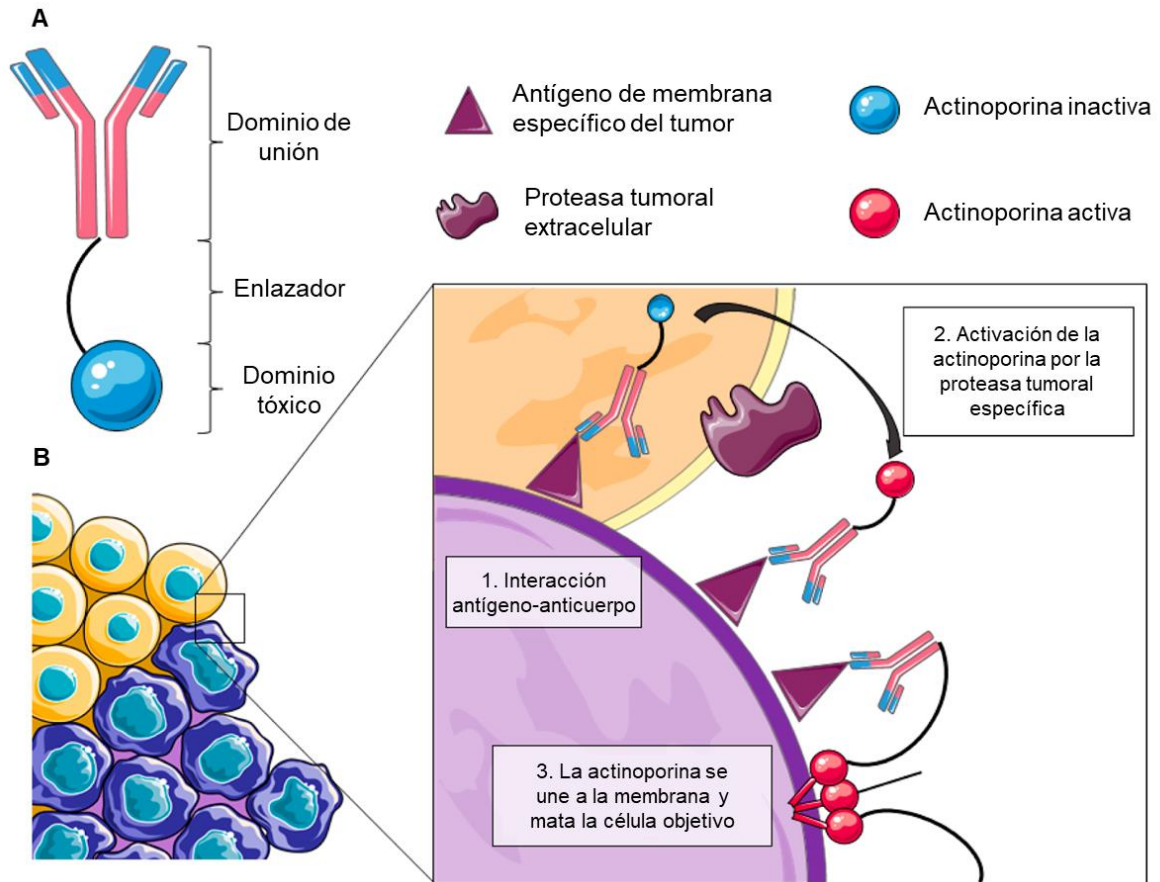


Figura 9. Representación esquemática del ensamblaje y mecanismo de acción de una actinoporina dentro de una inmunotoxina. Modificado de: Rivera-de-torre y col., 2019.

Otra posible aplicación de las PFTs es como bioinsecticidas, en particular las PFTs de las especies pertenecientes a la clase Arachnida debido a que las principales presas de estos animales venenosos son los insectos. Las PFTs de arácnidos podrían emplearse para la formulación de bioinsecticidas eficaces, que sean estables en condiciones de humedad y temperatura extremas, biodegradables, inocuos para las plantas, humanos y especies no plaga, que no se bioacumulen y que no produzcan efectos secundarios nocivos. También estas PFTs podrían emplearse para la construcción de variantes transgénicas que tengan efecto insecticida y que

posean las características deseables de un bioinsecticida amigable con el medio ambiente e inocuo para el humano y otras especies no nocivas (Figura 10) (Rivera-de-torre y col., 2019).

Se ha reportado que las toxinas Cry de 3 dominios sintetizadas por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, las cuales son  $\delta$ -endotoxinas que se forman durante la esporulación bacteriana junto con el grupo multigénico cyt, son PFTs que interactúan con proteínas del intestino medio de los insectos y forman una estructura oligomérica que se inserta en las membranas celulares y forman poros que provocan la lisis de las células intestinales. Este tipo de toxinas son inocuas para los vertebrados y plantas, además de ser biodegradables (de Maagd, 2001), son específicamente tóxicas para diferentes órdenes de insectos como Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera y Diptera y su mecanismo de acción tiene lugar en las larvas de estos animales que al ingerir la pro-toxina 3d-Cry se solubiliza y activa por las proteasas intestinales, las cuales generarán un fragmento tóxico de aproximadamente 60 kDa, este fragmento interactúa con diferentes proteínas en las células del intestino del insecto, se insertan en su membrana y se forman los poros en la membrana apical de las células del intestino medio de las larvas, provocando la muerte de las larvas debido a la lisis celular (Soberón y col., 2009). Considerando que los poros formados no son selectivos y pueden permear cationes, aniones, solutos neutros y agua, esto da como resultado una hinchazón celular y una posterior lisis osmótica coloidal (Pardo-López y col., 2013; Knowles y Ellar, 1987). El inconveniente de utilizar esta clase de toxinas radica en que estas son sensibles a la radiación UV lo que reduce su disponibilidad si se utiliza la pulverización como método de dispersión, así como la aparición de resistencia por parte de los insectos (Wei y col., 2019).

Otra estrategia para abordar el combate de las plagas en los cultivos es el diseño de plantas transgénicas que produzcan constitutivamente las PFTs. Por ejemplo, el maíz transgénico que produce la proteína Cry1Ab tiene la capacidad de resistir el ataque de Lepidópteros, la cual resulta inocua para los vertebrados, ya que sufre digestión hidrolítica y/o degradación (Delaney y col., 2008). Se ha demostrado mediante

ensayos *in vitro*, que Cry1Ab es degradada por pepsina, por lo que no constituye un problema de salud alimentaria (Koch y col., 2015), ni provoca daño a insectos benéficos como las abejas u otras especies polinizadoras debido a que estas no consumen el cultivo. Estas estrategias combinadas con otros componentes bioinsecticidas pueden ser altamente efectivas debido a que las PFTs aumentan la permeabilidad de las células ante otros componentes que desarrollan su actividad intracelularmente (Rivera-de-torre y col., 2019; Ramírez-Carreto y col., 2020).

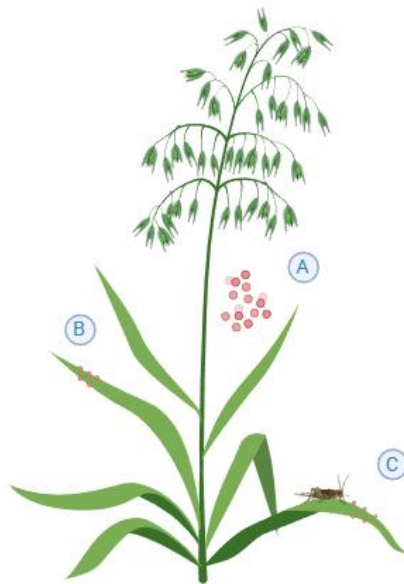


Figura 10. Representación de la aplicación de las PFTs como bioinsecticidas. A) Las PFTs se pueden esparcir sobre los cultivos en forma de aerosoles. B) Pueden permanecer durante largos periodos sin degradarse o afectar el cultivo. C) Al entrar en contacto con el insecto objetivo vía oral o mediante sus espiráculos comienzan a lisar sus células provocándole la muerte. Modificado de: Rivera-de-torre y col., 2019.

Otra aplicación de las PFTs es el de biosensores capaces de detectar diferentes analitos como ácidos nucleicos y polipéptidos (Oukhaled y col., 2012; Movileanu, 2009), mediante la alteración y el bloqueo parcial de la corriente eléctrica generada por las moléculas a medida que pasan a través del nanoporo los cuales están incrustados en membranas con dos compartimentos (cis y trans) que contienen una solución de electrolitos y electrodos y al aplicar un voltaje de polarización a través de la membrana, el paso libre de iones a través de los nanoporos genera una corriente



constante que indica que el poro se encuentra abierto, al difundir una molécula a través del poro el flujo de iones se interrumpe parcialmente y genera un cambio en la corriente iónica, detectándola como una señal eléctrica (Figura 11) (Kececi y col., 2008; Harrell y col., 2006) a esta técnica se le conoce como pulso resistivo y permite detectar e identificar una molécula individual a partir de su volumen, concentración e interacción con poros (Noakes y col., 2019; Cao y col., 2018). Al utilizar nanoporos para reconocer péptidos y proteínas se deben tomar en cuenta algunos factores como la forma, el tamaño, la superficie y la carga interna del poro (Watanabe y col., 2017; Ramírez-Carreto y col., 2020).

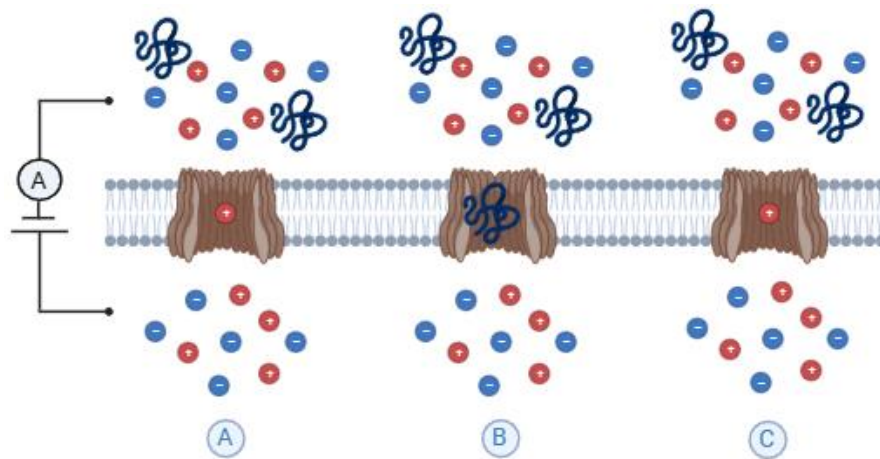


Figura 11. Ilustración de aplicación de las PFTs como biosensores, al formarse el poro en la membrana celular en una corriente iónica se puede diferenciar cuando A) no está pasando algún polipéptido por el poro. B) Cuando la corriente se ve interrumpida por el paso del polipéptido a través del poro y con ello C) Cuantificar el tiempo que tarda en retomarse la corriente eléctrica, el cual es característico y puede compararse en una base de datos y así conocer de que polipéptido se trata. Modificado de: Ramírez-Carreto y col., 2020.

La identificación de esfingomielina en las membranas de diversas células puede realizarse con la ayuda de actinoporinas y conocer la distribución de este lípido en células eucariotas, debido a que la esfingomielina es un precursor de lípidos bioactivos como la ceramida, la ceramida-1-fosfato, la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato que son reguladores de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Ogretmen y Hannun, 2004). La actinoporina que se ha insertado en sondas es una

proteína quimérica compuesta por la proteína verde fluorescente y la equinatoxina II que ha perdido su actividad hemolítica, pero conserva la afinidad por la esfingomielina y ha sido utilizada para poder explorar la distribución de esfingomielina en la línea celular canina MDCK-II (Figura 12) (Bakrač y col., 2010), Este lípido es importante debido a que es un componente clave junto con el colesterol de los micro dominios denominados balsas lipídicas, las cuales interactúan con proteínas implicadas en el transporte vesicular y en los mecanismos de señalización (Hannun y Obeid, 2008; Ramírez-Carreto y col., 2020).

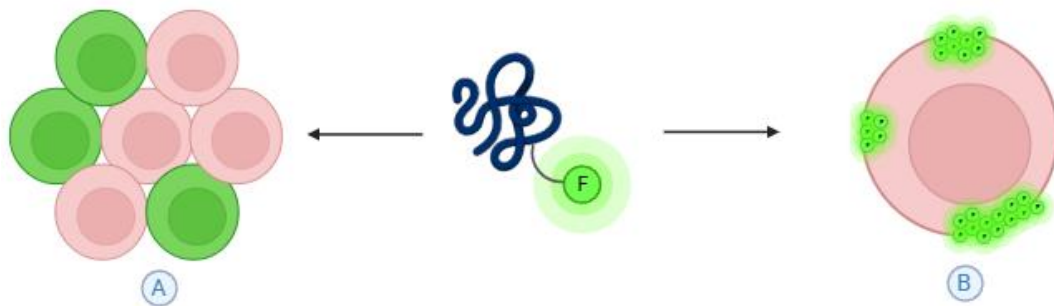


Figura 12. Ilustración de las PFTs unidas a un fluoróforo como identificadores de esfingomielina. A) Se pueden discriminar células que sobre expresan esfingomielina o B) Conocer en que zonas de la membrana se encuentra presente. Modificado de: Ramírez-Carreto y col., 2020.

Otra aplicación importante de las PFTs es como adyuvantes de vacunas, debido a que uno de los grandes desafíos al diseñar vacunas es el mejorar la respuesta inmune mediada por los linfocitos T citotóxicos CD8 debido a que los antígenos exógenos deben superar la barrera de la membrana plasmática y entrar en el citosol de las células presentadoras de antígeno que son capaces de procesar estas moléculas para inhibir el reconocimiento de antígenos por los linfocitos (Figura 13) (Platzer y col., 2014; Christensen y col., 2007). Se ha demostrado que el encapsulamiento de la toxina esticolisina II mediante liposomas junto con el antígeno posee una mayor eficacia. Esto debido a que estos tienen una gran capacidad de transferencia de antígenos y ataque a las células presentadoras de antígenos y con ello estimulan la respuesta inmune, mediante la mayor producción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del antígeno en comparación con la lograda al encapsular

únicamente el antígeno. También se ha demostrado que la encapsulación de la esticolisina II en un liposoma de lípidos libres de esfingomielina y ovoalbúmina induce lisis en células diana en ausencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, promoviendo la respuesta antígeno específica por los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (Laborde y col., 2017; Ramírez-Carreto y col., 2020).

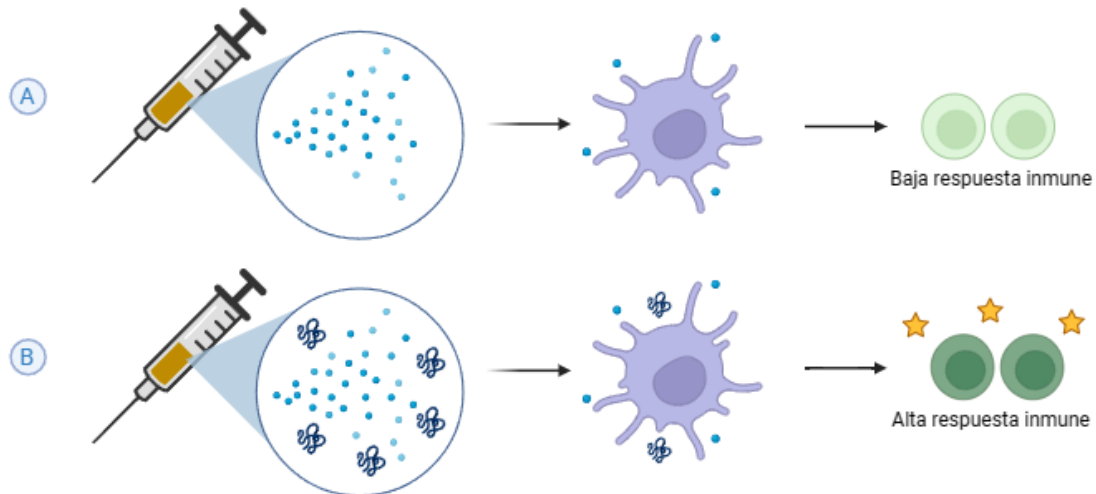


Figura 13. Ilustración del funcionamiento de las PFTs como adyuvantes. Algunas terapias inmunizantes requieren coadyuvantes debido a que estos componentes estimulan la respuesta inmune, aumentando la cantidad y eficiencia de los linfocitos T y con ello se reconoce de mejor forma el antígeno a presentar. Modificado de: Ramírez-Carreto y col., 2020.

### 1.8 Vectores de clonación y expresión

Los plásmidos, descubiertos por Lederberg y Zinder en su trabajo publicado en 1952 habla sobre como *Salmonella typhimurium* es capaz de transferir rasgos hereditarios de una cepa a otra por medio de algo que denominó agente filtrable y descubrió que los filtrados individuales pueden transducir muchos rasgos diferentes, pero no más que uno en una sola bacteria. Las bacterias en su citoplasma presentan diversos plásmidos de ADN circular de doble cadena denominadas que son capaces de replicarse de forma autónoma, no contienen genes esenciales para el crecimiento de las células huésped (Carattoli, 2009; Thomas y Nielsen, 2005) y son utilizados para transferir información genética de forma horizontal hacia bacterias de diferentes

géneros a través de la conjugación. Los plásmidos tienen sistemas que garantizan su replicación autónoma, su número de copias y una herencia estable durante la división celular (Carattoli, 2009). Estas características pueden ser aprovechadas para insertar plásmidos en bacterias para desempeñar diferentes funciones. Cohen y colaboradores en 1973 lograron reproducir plásmidos construidos *in vitro* mediante la reasociación de fragmentos de replicones más grandes generados por endonucleasas en *E. coli*, proceso que se denomina “clonación”. La clonación se realiza mediante la inserción del gen utilizando enzimas de restricción de tal forma que el plásmido funcione como un medio de transporte con el fin de hacer numerosas copias del gen de interés y mantenerlas estables dentro del hospedero bacteriano; este conjunto plásmido/gen de interés se le denomina como vector de clonación (Marillonnet y Grütznér, 2020; Nora y col., 2018; Shizuya y col., 1992). Adicionalmente, estos vectores de clonación deben tener un conjunto de características que los hagan aptos para la transformación bacteriana, la cual es la incorporación del material genético circular dentro de la bacteria y ser replicado (Chen y Dubnau, 2004). El vector que es el ADN exógeno se encuentra en el medio y la bacteria debe encontrarse en un estado competente (Wang y col., 2020) en el que su membrana celular se encuentre en un estado semipermeable y el vector pueda introducirse en el citoplasma y lograr de esta forma la transformación, para que posteriormente la bacteria sea capaz de traducir y transcribir el gen de interés (Blokesch, 2016). Entre las características que deben tener este tipo de vectores se encuentran: i) origen de replicación (*ori*) que debe ser reconocido por la maquinaria de replicación celular y definirá el número de copias del plásmido en la célula, ii) marcador de selección, el cual es un gen que otorga una ventaja a las bacterias transformadas para llevar a cabo una selección de aquellas bacterias que sí llevaron a cabo la incorporación del material genético y por último, iii) sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés) que contiene varios sitios de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción. No obstante, los plásmidos también son utilizados para expresar genes de interés con el fin de producir grandes cantidades de un producto final, es decir, la producción de proteínas recombinantes, tomando el nombre de vectores de expresión (Nora y col., 2018; Terpe, 2006; Stanley y Luzio,

1984). Los vectores de expresión además de contener los componentes fundamentales de un vector de clonación deben contener dos elementos más: un promotor el cual debe ser constitutivo o específico de la célula en la que se insertó el vector, éstos pueden ser naturales o sintéticos y/o inducibles y sirven para iniciar la transcripción por parte de la célula. Los promotores deben encontrarse corriente arriba del gen de interés. Por otra parte, los vectores de expresión también deben tener sitios en donde puedan unirse factores de transcripción para que se mejore la eficiencia y/o especificidad de la expresión transgénica como lo son los potenciadores o enhancers (Figura 14) (Domenger y Grimm, 2019; Xiong y col., 2019).

### 1.8.1 pIRES2-EGFP

pIRES2-EGFP es un vector bicistrónico que contiene IRES para expresar un gen de interés junto con la proteína mejorada verde fluorescente (EGFP, por sus siglas en inglés) que está controlada por el promotor CMV y el casete de resistencia a neomicina/kanamicina está controlado por el promotor temprano SV40 (Rubessa y col., 2019). Este plásmido es ampliamente utilizado en células eucariotas, específicamente en células de mamífero y que tiene la cualidad de producir un ADN bicistrónico de la proteína que se desea expresar y la proteína mejorada verde fluorescente, lo cual nos proporciona una referencia de la cantidad de proteína que se está expresando. Este vector tiene muchas ventajas, entre las cuales se encuentran que su sitio de clonación múltiple tiene sitios de corte para una gran variedad de enzimas de restricción y posee un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), lo cual facilita la iniciación de la síntesis proteica mediante la traducción del marco abierto de lectura de un ARN mensajero. Por lo que este plásmido ha sido ampliamente utilizado para construir vectores de expresión basados en él, para expresar: apoptina y la proteína de fusión TAT-apoptina (Zhu y col., 2024), beclina-1 (Prizad y col., 2021), una proteína de membrana latente fusionada con el factor estimulante de colonias de granulocitos denominada CSF2A (Sun y col., 2018), entre otros.

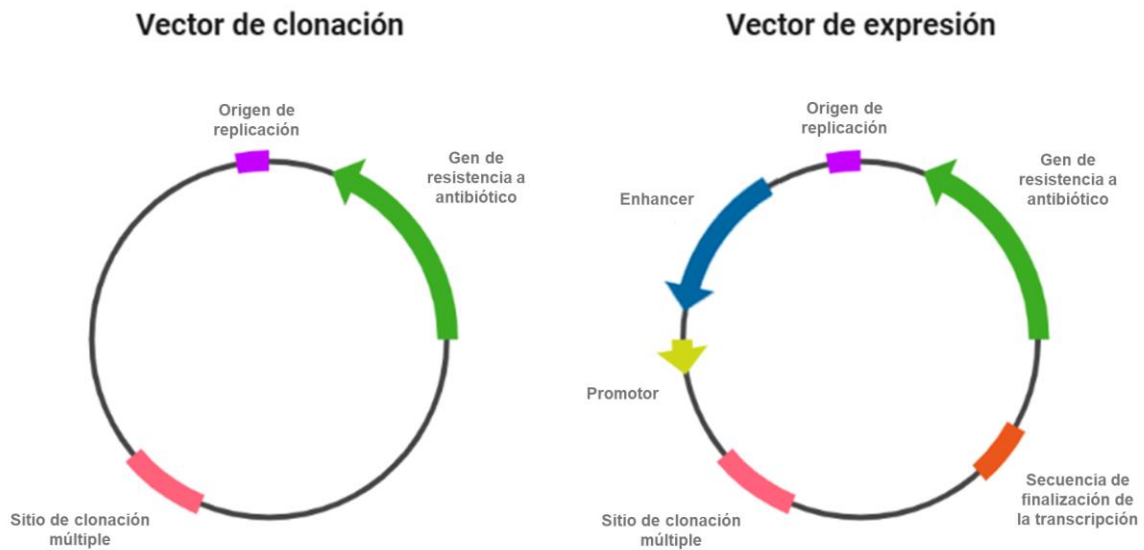


Figura 14. Diagrama que representa un vector de clonación y un vector de expresión con sus elementos mínimos. Modificado de: Nora y col., 2018.

### I.9 Proteínas recombinantes

Desde sus inicios en la década de los 80s, así como la producción y comercialización de la primera proteína recombinante (insulina), este tipo de estrategias de producción de proteínas han demostrado ser una herramienta vital en el área médica debido a que ayudan tecnológicamente en un panorama donde las enfermedades infecciosas y el cáncer son una de las principales causas de muerte entre los seres humanos. Las proteínas recombinantes se emplean como terapias, en la producción de vacunas y para la elaboración de reactivos de diagnóstico (Tripathi y Shrivastava, 2019). Entre las proteínas recombinantes que se han aprobado en el mercado de 2014 al 2018 se encuentran 68 anticuerpos monoclonales, 23 hormonas, 16 factores de coagulación, 9 enzimas y 7 vacunas (Walsh, 2018). La producción de proteínas recombinantes como terapia contra las enfermedades aumenta el rendimiento de los tratamientos y disminuye sus costos, por lo que estas proteínas pueden producirse a escala industrial mediante su expresión utilizando bacterias, células de mamíferos, levaduras, células de insectos, plantas y animales transgénicos (Gupta y col., 2019; Owczarek y col., 2019; Merlin y col., 2014). Las células de mamíferos han sido los

sistemas mayormente utilizados en los últimos años, debido a que 62 de los últimos 71 nuevos ingredientes biofarmacéuticos son proteínas recombinantes y de ellos 52 provienen de células de mamíferos, 5 provienen de *E. coli*, 4 de *S. cerevisiae* y 1 de un sistema transgénico (Tripathi y Shrivastava, 2019; Walsh, 2018). Los anticuerpos monoclonales son las proteínas recombinantes más estudiadas. Éstas originalmente fueron creadas a partir de la inmunoglobulina humana G1 con la finalidad de atacar con un alto grado de especificidad epítomos. En la actualidad los anticuerpos monoclonales son empleados para: estimular el sistema inmune del huésped contra una célula cancerosa objetivo, inhibir enzimas o proteínas, imitar un ligando de señalización o presentar un antígeno (Dijk y Winkel, 2001; Burnett y Burnett, 2019). Los tratamientos basados en inmunotoxinas son los más novedosos en el tratamiento contra el cáncer, especialmente el cáncer de mama que es el tipo de cáncer más prevalente entre la población femenina y presenta un alto grado de mortalidad (Jafari y col., 2017), debido a que los tratamientos como la cirugía, la radiación y la quimioterapia no han sido efectivos para disminuir las tasas de mortalidad (Vafadar y col., 2020).

#### I.10 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes

Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes pueden basarse tanto en organismos unicelulares como células bacterianas, de mamíferos, de levaduras, de insectos, de animales transgénicos y de plantas transgénicas, así como en organismos multicelulares como hongos (Puetz y Wurm, 2019) y su elección depende de la proteína de interés. Los sistemas unicelulares bacterianos tienen una gran ventaja en la expresión de péptidos y proteínas pequeñas que no requieren un plegamiento complejo o modificación postraduccional. En tanto que las levaduras pueden producir proteínas más grandes y complejas y los sistemas que utilizan células de mamífero se utilizan para proteínas grandes con plegamiento complejo y que requieran modificaciones postraduccionales (Demain y Vaishnav, 2009).

Los primeros sistemas de expresión eran basados en células bacterianas de la especie *E. coli*, ahora con la opción de utilizar células de mamíferos como las células de ovario de hámster chino (CHO) se pueden lograr concentraciones altas de proteína expresada en el medio, en un estudio realizado por Poulain y colaboradores en 2017 demuestra que CHO es capaz de lograr concentraciones de hasta 350 mg/L de un anticuerpo recombinante y 940 mg/L de un receptor Fc recombinante, concentraciones que no se pueden lograr en bacterias o levaduras debido a la alta tasa de secreción de proteínas que presentan, además tienen el defecto de que no secretan las proteínas, promoviendo así la formación de partículas insolubles llamadas cuerpos de inclusión en los que la proteína se encuentra inactiva. Adicionalmente, *E. coli* no es capaz de realizar modificaciones postraduccionales como la glicosilación (Ferreira y col., 2018) que es una característica importante de las proteínas y desempeña un papel crucial en la eficacia, la vida media sérica y la antigenicidad de un biofármaco recombinante. Por lo que se utilizan sistemas de expresión de células de mamíferos, levaduras e insectos que son capaces de producir un patrón de glicosilación similar al humano y así evitar efectos secundarios (Tripathi y Shrivastava). Se deben considerar diferentes parámetros antes de escoger el tipo de sistema de expresión. Por ejemplo, el tamaño de la proteína, debido a que células procariotas bacterianas como *E. coli* se limitan a producir proteínas pequeñas de menos de 30 kDa (Demain y Vaishnav, 2009), el plegamiento correcto de la proteína y la necesidad de la intervención de proteínas chaperonas específicas que no se encuentran en células procariotas (Margolin y col., 2018) las modificaciones postraduccionales como la formación de enlaces disulfuro o glicosilación que puede diferir entre especies (Lim y col., 2010; Burnett y Burnett, 2019).

#### I.10.1 Bacterias

Los sistemas bacterianos son simples, de bajo costo y generalmente se utiliza la bacteria *E. Coli* debido a su bioquímica y genética bien conocidas, rápido crecimiento y buena productividad (Gupta y Shukla, 2016). Entre sus desventajas se encuentra la falta de modificaciones postraduccionales adecuadas, la formación de cuerpos de



inclusión, la posibilidad de errores de traducción debido a la presencia de un gran número de codones raros para *E. coli* en los genes heterólogos (Baeshen y col., 2015) y los problemas de endotoxinas. Para solucionar estos problemas como la formación de cuerpos de inclusión se pueden adicionar etiquetas de fusión a la secuencia génica (Liu y col., 2019) la suplementación con cofactores y la coexpresión de la proteína con chaperonas moleculares o químicas (Gupta y col., 2019), también el uso de etiquetas como Fh8 (antígeno de *Fasciola hepatica*), SUMO (pequeño modificador relacionado con la ubiquitina), 6xHis (Hexahistidina), TRX (tioredoxina), MBP (proteína de unión a maltosa), entre otras en el extremo amino terminal o carboxilo terminal mejoran la solubilidad de las proteínas y ayudan en la purificación por cromatografía de afinidad (Paraskevopoulou y Falcone, 2018). La presencia de codones raros para *E. coli* puede solucionarse mediante la optimización de codones o la modificación de la bacteria (Gupta y col., 2019; Rosano y Ceccarelli, 2014), se pueden formar enlaces disulfuro en un ambiente redox y presencia de foldasas como las isomerasas disulfuro y peptidil-prolil isomerasas en el periplasma (Gupta y Shukla, 2017) y las endotoxinas pueden eliminarse con un proceso de purificación adecuado (Mamat y col., 2015).

#### I.10.2 Células de mamífero

Los sistemas basados en células de mamíferos son los mayores productores de proteínas recombinantes aprobadas como biofármacos (Owczarek y col., 2019) debido a que tienen la capacidad de expresar proteínas recombinantes grandes y complejas y generalmente son utilizadas las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), NS0 y Sp2/0. Aproximadamente el 84% de los anticuerpos monoclonales aprobados fueron expresados en células de ovario de hámster chino, alrededor del 13% en células NS0 y el resto en células Sp2/0 (Walsh, 2018). Estos sistemas si realizan modificaciones postraduccionales, aunque su patrón de glicosilación es diferente al humano, por lo que también se han estudiado las líneas celulares humanas HEK293, HKB11, PER.C6, HeLa y CAP (Hunter y col., 2019; Dumont y col., 2015) para lograr modificaciones postraduccionales similares a las

producidas en los humanos. Entre las desventajas de utilizar un sistema de este tipo se encuentra la contaminación con virus animales, la difícil formulación de medios de cultivo para una línea celular debido a que requieren diversos componentes como factores de crecimiento, aminoácidos, agentes reductores y vitaminas (Tripathi y Shrivastava, 2019).

### I.11 Células HEK293

La línea celular HEK293 es la línea celular humana más utilizada en la expresión de proteínas recombinantes; tuvo su origen en 1973 (Malm y col., 2020; Pullix y col., 2021) en un riñón de un embrión femenino humano abortado y fueron immortalizadas mediante la integración de un fragmento del genoma adenoviral 5 de 4 kbp el cual contiene los genes E1A y E1B en el cromosoma 19 (Graham y col., 1977; Louis y col., 1997), los cuales inhiben la apoptosis e interfieren con las vías de transcripción y control del ciclo celular (Berk, 2005). Las células HEK293 se utilizan ampliamente para producir proteínas recombinantes debido a la relativa facilidad de transfección, la fácil recolección de proteínas producidas intracelularmente o secretadas al medio exterior (Hussain y col., 2017) y la obtención de productos biológicos con modificaciones postraduccionales complejas, las cuales se requieren en anticuerpos, factores de crecimiento y de coagulación debido a que les confieren estabilidad y potencia (Tan y col., 2021). Estos sistemas de expresión tienen varias áreas de oportunidad tales como los pobres rendimientos y la contaminación de productos con el antígeno T SV40 large. Estas células ya se han utilizado para producir antígenos virales para vacunas enfocadas a prevenir el VIH y el zika (Lavado-García y col., 2020; Hu y col., 2018) y desde 2015 la FDA ha aprobado siete productos derivados de HEK293 de los cuales seis son terapias celulares y génicas en donde se utilizó esta línea celular en la producción de vectores virales (Tan y col., 2021).

#### I.11.1 HEK293 y la expresión de toxinas

La expresión heteróloga de toxinas es una opción prometedora debido a lo complicado que es obtener estas toxinas a partir de los organismos que las sintetizan,

ya que las toxinas representan solo un pequeño porcentaje de todo el veneno, por lo que se debe recurrir a procesos clásicos de purificación como el fraccionamiento que tiene rendimientos bajos y en muchas ocasiones no se logra la purificación completa de las toxinas de interés (Rohou y col., 2007). Adicionalmente algunas toxinas no se encuentran presentes en el veneno, ya que se encuentran codificadas por genes inactivos (Rivera-de-Torre y col., 2022). Por lo que expresar toxinas *in vitro* permite su producción con un alto rendimiento, homogeneidad de muestras y evita la contaminación cruzada con otros compuestos (Valle y col., 2015; Calvete, 2017). Expresar toxinas en células de mamífero ofrece ventajas como la generación de enlaces disulfuro, además de que las toxinas obtenidas guardan una estrecha similitud con las nativas (Rivera-de-Torre y col., 2022). La línea celular HEK293 se ha utilizado para producir varios cientos de péptidos ricos en cisteína, los cuales contienen hasta 10 cisteínas, de las cuales algunas son toxinas contenidas en los venenos de animales. Un ejemplo de esto es la expresión de una toxina con ayuda de un sistema de transducción de lentivirus en donde se observó la expresión de la proteína en la superficie celular o secretadas por las células (Correnti y col., 2018; Crook y col., 2020). Otro ejemplo es la expresión de tanatina, un péptido catiónico de horquilla beta, el cual tiene actividad contra diversos patógenos (Tanhaeian y col., 2020). Además de la expresión de la bungarotoxina- $\kappa$  que es una toxina producida por la serpiente de krait (*Bungarus multicinctus*) (Clarke, 1992) la cual es capaz de bloquear la activación del receptor nicotínico de acetilcolina de tipo muscular debido a su alta afinidad, impidiendo que la acetilcolina se una y logrando así inducir parálisis muscular (Gorman y col., 1997).

## II. HIPÓTESIS

Las células eucariotas HEK293 permiten la expresión recombinante de la PFT de tipo hidralisina de *M. alcornis*.

### **III. OBJETIVOS**

#### IV.1 Objetivo General

Expresar de forma heteróloga la PFT de tipo hidralisina utilizando células eucariotas HEK293 mediante el vector de expresión PIRES2-EGFP.

#### IV.2 Objetivos específicos

- Generar un vector de expresión que porte el DNAC de la hidralisina a partir del plásmido pIRES2-EGFP.
- Expresar la hidralisina de manera transitoria en células HEK293 y coleccionar los medios de cultivo.
- Evaluar el efecto citotóxico del medio de cultivo de las células HEK293 transfectadas con el plásmido de expresión de la hidralisina.
- Determinar el efecto hemolítico del medio de las células HEK293 mediante un ensayo de hemólisis en eritrocitos de rata.

## **IV. METODOLOGÍA**

### IV.1 Materiales

#### IV.1.1 Material de vidrio

- Cámara de Neubauer
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL
- Vasos de precipitados de 100 mL

#### IV.1.2 Material desechable

- Microplaca estándar de polipropileno con 96 pocillos
- Microtubos de 1.5 mL
- Microtubos de PCR
- Microtubos de 600  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta de 10  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta de 1000  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta de 200  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta de 5 mL
- Tubos cónicos de 15 mL
- Tubos cónicos de 50 mL

#### IV.1.3 Material no desechable

- Jaulas de acrílico de 43 x 53 x 20 cm
- Guillotina
- Bebedero para ratas

#### IV.1.4 Alimento

- Alimento ABENE BDL-7100.

#### IV.1.5 Material biológico

Nombre	Producto	Genotipos	Origen
Células competentes <i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue Competent Cells. Electroporation- Competent Cells.	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Instituto de Neurobiología UNAM (INB)
Células HEK293	Homo sapiens, human kidney; Embryo 293 cells.	HEK 293 Cell Line human  CRL-1573	ATCC  293 [HEK-293] CRL-1573™
Ratas Wistar	N/A	<i>Rattus norvegicus</i>  <i>domestica</i>	Bioterio del INB  UNAM

N/A: No Aplica.

#### IV.1.6 Reactivos y medios de cultivo

- Ácido acético glacial 100% (Sigma-Aldrich, 2020).
- Acrilamida 99% (Sigma-Aldrich, 2019).
- Azul tripano al 0.4% (Thermo Fisher Scientific, 2024).
- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate Bradford (Bio-Rad, 2022).

- Bovine Serum Albumin BSA standard 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Thermo Fisher Scientific, 2024).
- Buffer Anza 10x (Invitrogen, 2023).
- Buffer CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, 2020).
- Buffer de carga 6x (Composición: 0.05 % azul de bromofenol, 40 % sucrosa, 0.1 M EDTA (pH 8.0) y 0.5% SDS) (Sigma-Aldrich, 2024).
- Buffer de elución (Composición: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8.0) (Qiagen, 2008).
- Buffer de lavado (Composición: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8.0) (Qiagen, 2008).
- Buffer de lisis (Composición: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.0) (Qiagen, 2008).
- Buffer EB (Composición: 10 mM Tris-Cl, pH 8.5) (Qiagen, 2023).
- Buffer ETR (Qiagen, 2023).
- Buffer HF 5x (Composición: 7.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) (New England Biolabs, 2020).
- Buffer P1 (Composición: 50 mM Tris·Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNasa A) (Qiagen, 2023).
- Buffer P1 (Composición: 50 mM Tris·Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNasa A) (Qiagen, 2023).
- Buffer P2 (Composición: 200 mM NaOH, 1% SDS) (Qiagen, 2023).
- Buffer PBS (Composición: 50 mM fosfato de potasio; 150 mM NaCl, pH 7.2) (Qiagen, 2008).
- Buffer PE (Qiagen, 2023).



- Buffer QG (Composición: 1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol) (Qiagen, 2023).
- Buffer S3 (Qiagen, 2023).
- Buffer T4 ligasa (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithiothreitol 1 mM ATP, pH 7.5) (New England Biolabs, 2024).
- Enzima ADN T4 ligasa (New England Biolabs, 2024).
- Enzima EcoRI (Invitrogen, 2023).
- Enzima Sall (Invitrogen, 2023).
- Medio DMEM (Composición: 4 mM L-glutamina, 4.5 g/L D-glucosa, 110 mg/L piruvato de sodio, 1500 mg/L bicarbonato de sodio) (Gibco, 2011).
- Metanol 99% (Thermo Fisher Scientific, 2020).
- Polimerasa Phusion (Thermo Fisher Scientific, 2021).
- SDS Sodium Dodecyl Sulfate (Lauryl) (Thermo Fisher Scientific, 2023).
- Solución Alsever (Composición: 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4, ácido cítrico·3Na·2H<sub>2</sub>O 8.0 g/L, ácido cítrico·H<sub>2</sub>O 0.55 g/L, D-glucosa 20.5 g/L). (Sigma-Aldrich, 2002).
- Solución de dNTPs 10 mM (Invitrogen, 2011).
- Vector de clonación pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific, 2020).
- Vector molde (Vega-Tamayo, 2022).

#### IV.1.7 Kits comerciales

- CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, 2024).
- QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen, 2016).
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, 2015).

## IV.2 Equipos

- Cámara del microscopio (Marca: Olympus, Modelo: DP-70, Número de serie: 02186335).
- Centrifuga (Marca: Beckman, Modelo: J2-HS Centrifuge, Número de serie: EC002057).
- Equipo de electroforesis (Marca: Amersham pharmacia biotech, Modelo: electrophoresis power supply EPS 301, Número de serie: 01885756).
- Fotodocumentador UV (Marca: DNR bioimaging systems, Modelo: MiniBIS pro, Número de serie: 02208726).
- Incubadora (Marca: Quincy Lab, Modelo: 12-140 incubator, Número de serie: 2167233).
- Incubadora de agitación (Marca: Hybaid, Modelo: Midi Dual 14 Hybridization Oven Ambient, Número de serie: EC001215).
- Incubadora de CO<sub>2</sub> (Marca: Nuaire, Modelo: autoflow co2 water-jacketed incubator, Número de serie: 02338685).
- Lector de microplacas de 96 pocillos (Marca: Biorad, Modelo: Benchmark Plus microplate reader, Número de serie: 4274D).
- Mezclador térmico (Marca: Eppendorf, Modelo: Thermomixer compact, Número de serie: 2186313).
- Microcentrifuga (Marca: Thermo Fisher Scientific, Modelo: Fresco<sup>TM</sup> 21 Microcentrifuge), Número de serie: 42063156).
- Microscopio invertido de fluorescencia (Marca: Olympus, Modelo: CKX41, Número de serie: 0J41294).

- NanoDrop (Marca: Thermo Fisher Scientific, Modelo: NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Número de serie: 02253254).
- Termociclador (Modelo SelectCycler, Modelo: SBT9600-G, Número de serie: 1104051).
- Vórtex (Marca: Daigger, Modelo: Vortex Genie 2, Número de serie: EM000466).

### IV.3 Métodos

#### IV.3.1 Generación del vector de clonación.

Se obtuvieron los siguientes cebadores para obtener la secuencia codificada flanqueada con sitios de restricción específicos para las enzimas EcoRI (GAATTC) y Sall (GTCGAC), siendo el cebador sentido: 5'GCTGAATTCAGGATGTCAATTCAAGAA3', y el cebador antisentido: 5'GTCGACCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC AAAGGTTCTG3' y tomando como molde el vector pJET1.2/EVT\_HydMa (Vega-Tamayo, 2022), se colocó en un tubo para PCR: 4  $\mu$ L de Buffer HF 5x, 0.4  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 10  $\mu$ L de cebador sentido 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ L de cebador antisentido a 100  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ L de enzima polimerasa de alta fidelidad Phusion a 2,000 unidades/mL (Thermo Fisher Scientific), 3 ng de vector molde y se aforó a un volumen de 20  $\mu$ L con agua libre de nucleasas. Se colocó en un termociclador en donde se colocaron las siguientes condiciones: 98 °C temperatura de desnaturalización inicial durante 30 segundos y posteriormente 10 segundos de desnaturalización, 61.5 °C de temperatura de alineación durante 30 segundos, 72 °C de temperatura de extensión durante 30 segundos y una temperatura de conservación final de 4 °C por 30 ciclos. Finalizada la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa con la finalidad de aislar la banda, mediante un fotodocumentador UV se observó la banda a purificar (792 pb), se recortó con un bisturí y se utilizó el kit PCR QIAquick agregando tres volúmenes de Buffer QG, posteriormente se incubó a 50 °C en un mezclador térmico hasta completa disolución

de la banda mezclando cada 2 minutos en un vórtex, después se agregó 1 volumen de isopropanol y se mezcló en un vórtex, se llevó esta mezcla a una columna QIAquick con un tubo colector incluido y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto a 4°C, se desechó el sobrenadante y se agregaron 750 µL de buffer PE, se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto a 4 °C y se desechó el sobrenadante, se colocó un tubo de 1.5 mL debajo de la columna y se colocaron 30 µL de buffer EB y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto a 4 °C. Posteriormente se colocaron en un microtubo de 600 µL: 10 µL de buffer CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific), 2 µL del vector de clonación pJET1.2/blunt a 50 ng/µL, 1 µL de enzima ADN T4 ligasa a 5 U/µL, 80 ng de producto de PCR y se aforó a un volumen de 20 µL con agua libre de nucleasas, la mezcla de ligación se incubó a temperatura ambiente 10 horas. Posteriormente en un tubo de 1.5 mL se colocaron 10 µL de la mezcla de ligación o 500 ng de vector de expresión pIRES2-EGFP y 100 µL de bacterias competentes *E. coli* XL1-blue, se homogeneizó la mezcla rápidamente y se dejó incubando 30 minutos en hielo, posteriormente se realizó un choque térmico a 42 °C durante 90 segundos en un mezclador térmico, seguido de esto se incubó por 30 minutos en hielo para posteriormente añadirles 1 mL de medio LB e incubarlas a 37 °C con agitación a 450 rpm, finalmente se sembraron en placas Petri con medio LB sólido con antibiótico ampicilina 100 µL/mL y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Al transcurrir este tiempo se aislaron 8 colonias en tubos de ensayo de 5 mL con medio LB y ampicilina 1 µL/mL. Los tubos de ensayo se dejaron incubando durante 16 horas a 37 °C con una agitación de 250 rpm. Finalmente, para extraer el vector de clonación previamente ligado que se denominó “pJET1.2\_PFTMa-DH” o el vector de expresión “pIRES2-EGFP” se colocaron 1.5 mL de medio LB con bacterias en suspensión en microtubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 1 minuto a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se repitió el paso anterior con otros 1.5 mL de suspensión bacteriana, posteriormente al obtener el sedimento bacteriano compacto se resuspendió en 250 µL de buffer P1 y se agitó en un vórtex hasta completa disolución, después se agregaron 250 µL de Buffer P2 y se mezcló por inversión 6 veces, a continuación se agregaron 350 µL de buffer S3 y se mezcló inmediatamente por inversión, se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos a 4 °C y se tomó el

sobrenadante, el cual se pasó a otro tubo de 1.5 mL, se agregó 1 volumen de una mezcla 1:1 de fenol-cloroformo a cada tubo y se mezcló vigorosamente en el vórtex, luego se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 minutos a 4 °C y se tomó la fase acuosa superior, evitando tomar parte de la fase orgánica y se colocó en un nuevo tubo de 1.5 mL, a continuación se agregó 1 volumen de isopropanol y se mezcló vigorosamente en el vórtex y se centrifugó a 14,000 rpm durante 6 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante, se agregaron 200 µL de etanol al 70 %, se mezcló vigorosamente en el vórtex, se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos a 4 °C y finalmente se desechó el sobrenadante, se incubó a 37 °C durante 5 minutos para favorecer la evaporación del etanol y se disolvieron tanto el vector “pJET1.2\_PFTMa-DH” como “pIRES2-EGFP” obtenidos en 30 µL de agua libre de nucleasas y se realizaron geles de agarosa al 0.7 % para su caracterización los cuales se visualizaron en un fotodocumentador con una lámpara de luz UV incorporada.

#### IV.3.2 Subclonación en el vector de expresión.

Para extraer el fragmento que codifica para la PFT se colocaron en un microtubo de 600 µL: 10 µL del vector “pJET1.2\_PFTMa-DH” a una concentración de 358.1 ng/µL, 2 µL de enzima EcoRI 10 U/µL, 2 µL de enzima Sall 10 U/µL, 2 µL de buffer Anza 10x (Invitrogen) y se aforó la mezcla a un volumen de 20 µL con agua libre de nucleasas, este procedimiento se llevó a cabo de la misma forma para linealizar el vector de expresión “pIRES2-EGFP” de concentración 2071.5 ng/µL La mezcla de digestión se agitó delicadamente y se llevó la totalidad del contenido al fondo del tubo; la mezcla se incubó durante 3 horas a 37 °C. Posterior a la digestión se mezcló con 4 µL de buffer de carga 6x y se colocó en un carril en un gel de agarosa al 0.7 % con bromuro de etidio 0.5 µg/mL y se corrió el gel en un equipo de electroforesis a 80 V durante 90 minutos. Para purificar la banda obtenida se llevó el gel a un fotodocumentador UV en el cual se observó la banda a purificar y con un bisturí se recortó. Luego la banda se extrajo y limpió utilizando el kit PCR QIAquick agregando tres volúmenes de Buffer QG, posteriormente se incubó a 50 °C en un mezclador térmico hasta completa disolución de la banda mezclando cada 2 minutos en un vórtex, después

se agregó 1 volumen de isopropanol y se mezcló en un vórtex, se llevó esta mezcla a una columna QIAquick con un tubo colector incluido y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto a 4°C, se desechó el sobrenadante y se agregaron 750 µL de buffer PE, se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto a 4 °C y se desechó el sobrenadante, se colocó un tubo de 1.5 mL debajo de la columna y se colocaron 30 µL de buffer EB y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto a 4 °C, obteniéndose el fragmento de la PFT y el vector de expresión linealizado. Posteriormente para ligar el vector de expresión linealizado y la secuencia codificante para la PFT se colocaron en un microtubo de 600 µL: 3 µL del fragmento de PFT, 1 µL de vector de expresión pIRES2-EGFP linealizado con sus extremos digeridos por EcoRI y Sall, 0.5 µL de ADN T4 ligasa 5 U/µL, 1 µL de buffer 10x y se aforó a un volumen de 10 µL con agua libre de nucleasas, se dejó incubando la mezcla de ligación a temperatura ambiente 10 horas. Al finalizar el periodo de incubación se colocaron 10 µL de la mezcla de ligación en un microtubo de 1.5 mL y se transformaron bacterias competentes *E. coli* XL1-blue como se indicó en la sección anterior, se seleccionaron 8 colonias y se aislaron los plásmidos siguiendo el protocolo descrito en la sección previa. Los plásmidos se analizaron en geles de agarosa al 0.7 %, se seleccionaron los que cumplieron con el peso molecular predicho y se inocularon las bacterias correspondientes en 50 mL de medio LB con kanamicina 5 µL/mL, se incubaron durante 16 horas a 37 °C con una agitación de 600 rpm. Posteriormente se utilizó el kit “QIAGEN Plasmid Plus Midi Sample Kit”, en donde el primer paso es centrifugar en tubos cónicos de 50 mL el medio LB con bacterias en suspensión en una centrifuga a 6,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, terminada la centrifugación se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento bacteriano en 2 mL de buffer P1 con ayuda de un vórtex, al resuspender completamente se añadieron 2 mL de buffer P2 y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo hasta que el lisado tomó una apariencia viscosa, se incubó el tubo a temperatura ambiente por 3 minutos, transcurrido ese tiempo se colocaron 2 mL de buffer S3 y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces, posteriormente se llevó el lisado al cartucho QIAfilter y se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 minutos, al terminar el tiempo de incubación se insertó el emboló y se filtró el lisado hacia la columna QIAGEN Plasmid Plus con un extensor

de tubo y se añadieron 2 mL de buffer BB al lisado aclarado y se mezcló por inversión 5 veces, posteriormente se aplicaron alrededor de 300 mbar de vacío hasta que todo el líquido pasó a través de la columna, posteriormente para realizar los lavados se agregaron 700  $\mu$ L de buffer ETR y se aplicó vacío hasta que todo el líquido pasó a través de la columna, después se agregaron 700  $\mu$ L de buffer PE y se aplicó vacío hasta que pasó todo el líquido a través de la columna, al terminar los lavados se centrifugó la columna a 9,700 rpm a 4 °C durante 1 minuto y se colocó la columna en un microtubo nuevo de 1.5 mL, posteriormente se agregaron al centro de la columna 200  $\mu$ L de buffer EB, se dejaron reposar durante 1 minuto y se centrifugó a 9,700 rpm a 4 °C durante 1 minuto, y finalmente se realizaron geles de agarosa al 0.7 % para su caracterización y al terminar, el vector de expresión pIRES2-EGFP-HydMa-DH con concentración de 1331.3 ng/ $\mu$ L de forma apta para poder transfectar células HEK293 se cuantificó y midió su pureza en un NanoDrop 1000. (Thermo Fisher Scientific, 2012).

#### IV.3.3 Transfección en células HEK293.

En un microtubo estéril de 1.5 mL se colocaron 10  $\mu$ L de lipofectamina 2000 (Invitrogen), en otro se colocaron 400 ng del vector pIRES2-EGFP-HydMa-DH y a ambos se les agregaron 250  $\mu$ L de medio DMEM sin suero a 37 °C, transcurridos 5 minutos se mezcló el contenido de ambos microtubos y se dejó reposando durante 20 minutos, posteriormente el contenido se distribuyó uniformemente en placas de 35 mm con una confluencia celular del 40 % y se dejaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C y una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 % durante 72 horas, durante este tiempo se tomaron fotografías para observar la morfología celular y la producción de la proteína reportera verde fluorescente (EGFP) en un microscopio invertido de fluorescencia con cámara a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la transfección en un aumento de 40x. Transcurridas las 72 horas posteriores a la transfección, se colocó el medio celular en microtubos estériles de 1.5 mL, se centrifugaron a 6,000 rpm por tres minutos, se colectó el sobrenadante; por otro lado, en la placa de cultivo celular de 35 mm se colocaron 1 mL de buffer PBS para lavar las células y posteriormente

se añadieron 0.5 mL de tripsina, se incubó durante 3 minutos en la incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> y al terminar la incubación se colocó la tripsina con las células en suspensión en el tubo de 1.5 mL donde quedó el sedimento del paso anterior y se centrifugó a 6,000 rpm durante 3 minutos, al finalizar la centrifugación se desechó el sobrenadante y se añadieron 600 µL de medio celular y se resuspendieron completamente las células, se repitió el mismo procedimiento con el vector de expresión pIRES2-EGFP como control positivo y se omitió el paso de colocar plásmido en otro ensayo como control negativo, en cada caso se realizó por triplicado.

#### IV.3.4 Evaluación de la viabilidad celular con azul tripano de las células transfectadas.

En un trozo de papel Parafilm se colocaron 50 µL de la suspensión celular y 50 µL de colorante azul tripano al 0.4 % (Thermo Fisher Scientific), se mezclaron hasta obtener homogeneidad y se colocaron 20 µL en una cámara de Neubauer, 10 µL en cada lado y se realizó el recuento celular en los ocho cuadrantes secundarios de los bordes superior e inferior, obteniendo el porcentaje de células no viables en cada caso.

#### IV.3.5 Evaluación de la actividad citotóxica de la PFT recombinante.

Se realizaron diluciones con el medio previamente reservado a una proporción de 1:1 y 1:10 para el caso del medio de las células transfectadas con el vector que contiene el fragmento que codifica para la PFT y una dilución a una proporción 1:1 para los medios del control positivo y el control negativo, el medio restante se reservó; previamente se sembraron placas de cultivo celular de 35 mm para que tuvieran una confluencia de alrededor del 40 % a las cuales se les retiró su medio cuidadosamente, posteriormente se lavaron con 1 mL de buffer PBS y se añadieron 2 mL de las diluciones previamente realizadas, se dejaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C y una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 % durante 72 horas, durante este tiempo se tomaron fotografías para observar la morfología celular en un microscopio



invertido de fluorescencia con cámara a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la exposición al medio condicionado en un aumento de 40x.

IV.3.6 Evaluación de la viabilidad celular con azul tripano de las células expuestas a la PFT expresada.

Transcurridas las 72 horas posteriores a la exposición al medio condicionado, se colocó el medio celular en microtubos estériles de 1.5 mL, se centrifugó a 6,000 rpm por tres minutos y se desechó el sobrenadante; por otro lado, en la placa de cultivo celular de 35 mm se colocó 1 mL de buffer PBS para lavar las células y posteriormente se añadieron 0.5 mL de tripsina, se colocó durante 3 minutos en la incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> y al terminar la incubación se colocó la tripsina con las células en suspensión en el tubo de 1.5 mL donde quedó el sedimento del paso anterior y se centrifugaron a 6,000 rpm durante 3 minutos, al finalizar la centrifugación se desechó el sobrenadante y se añadieron 600 µL de medio celular y se resuspendieron completamente las células, de las suspensiones obtenidas se colocaron 50 µL en un trozo de papel Parafilm y 50 µL de colorante azul tripano al 0.4 % (Thermo Fisher Scientific), se mezclaron hasta obtener homogeneidad y se colocaron 20 µL en una cámara de Neubauer, 10 µL en cada lado y se realizó un recuento celular en los ocho cuadrantes secundarios de los bordes superior e inferior, obteniendo el porcentaje de células no viables en cada caso.

IV.3.7 Cuantificación de la proteína presente en los medios obtenidos.

En una microplaca estándar de polipropileno con 96 pocillos se realizó por triplicado una curva con BSA estándar 0.5 µg/µL (Thermo Fisher Scientific, 2024) con 5 puntos a una concentración de 0, 25, 50, 75 y 100 µg/mL y se aforó a 100 µL con agua destilada y posteriormente se añadieron 200 µL de tinte de proteínas Bradford (Bio-Rad, 2022), se mezcló hasta que se incorporó totalmente y se introdujo en un lector de microplacas de 96 pocillos a una absorbancia de 595 nm, se graficaron los puntos y se obtuvo una ecuación lineal que describe la correlación entre la concentración de proteínas y la absorbancia, la cual se utilizó para determinar la concentración de cada

uno de los medios previamente reservados; en la misma microplaca se colocaron 100  $\mu$ L de diluciones 1:10 de los medios reservados y 200  $\mu$ L de tinte de proteínas Bradford y se leyó su absorbancia a 595 nm.

#### IV.3.8 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 cm<sup>2</sup>/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 horas 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, debido a que algunos anestésicos podrían alterar las membranas de los eritrocitos lo que podría alterar los resultados del estudio. Por último, los Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos fueron debidamente etiquetados y almacenados siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, los cadáveres se almacenaron en bolsas amarillas a -20 °C y los punzocortantes en contenedores rojos especiales para este propósito por un periodo no mayor a 30 días, posteriormente se contrató un servicio especial dedicado al tratamiento y procesamiento de estos residuos.

#### IV.3.9 Determinación de la actividad hemolítica.

En microtubos de 600  $\mu$ L se colocaron 500  $\mu$ L de una solución de eritrocitos al 1 % en solución Alsever pH 7.4 adicionada con 10 mM de cloruro de calcio y se realizó

una curva dosis respuesta del control negativo (medio de células transfectadas con pIRES2-EGFP) y de PFT (medio de células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH) con una concentración de proteína total de los medios reservados de: 0, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3000, 6000, 10000 y 40000  $\mu\text{g/mL}$  y como control positivo fosfolipasa A2 con concentraciones de: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5  $\mu\text{g/mL}$  y para obtener la absorbancia de hemólisis total se colocaron partes iguales de solución de eritrocitos al 1 % y agua destilada, se homogeneizaron y se incubaron a 37 °C durante 16 horas, al transcurrir este tiempo se llevaron a una microcentrífuga y se centrifugaron a 2,400 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se colocó en una microplaca de 96 pocillos y se obtuvo su absorbancia a 415 nm y posteriormente, tomando en cuenta la absorbancia de hemólisis total como 100 % se obtuvieron los porcentajes de hemólisis de cada concentración.

#### IV.3.10 Análisis Estadístico.

Para analizar los datos del porcentaje de viabilidad celular de las células transfectadas, se calcularon la media y la desviación estándar (SD) para cada prueba (control negativo, control positivo y rPFT) y utilizando un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc de Tukey para determinar si las medias diferían significativamente entre sí, junto con los valores P, F y  $R^2$ . Este procedimiento también se aplicó a la prueba de exposición con el medio condicionado (Control Negativo, Control Positivo, rPFT 1:1 y rPFT 1:10), obteniendo los gráficos correspondientes. Para las pruebas hemolíticas se calcularon las absorbancias medias y sus desviaciones estándar (SD) y de manera similar, se generó una curva concentración-respuesta y se realizó un ANOVA unidireccional con una prueba post-hoc de Tukey para evaluar si las medias entre el control negativo, el control positivo (PLA2) y rPFT diferían significativamente entre sí, en todas las evaluaciones de Tukey la significancia está marcada por  $P < 0.05$  y utilizando este mismo gráfico se obtuvo la unidad hemolítica media ( $HU_{50}$ ) de los medios y se utilizó la misma metodología para realizar la comparación que con los ensayos de

viabilidad, todo esto con un intervalo de confianza del 95 % utilizando el programa de análisis estadístico GraphPad Prism versión 5.0.

## V. RESULTADOS

Se utilizó el plásmido pJET1.2/EVT\_HydMa (Vega-Tamayo, 2022) para obtener por PCR un amplicón de 771 pb, el cual incluye la secuencia codificante para la PFT, los sitios de restricción para las enzimas de restricción EcoRI (G<sup>A</sup>AATTC) y Sall (G<sup>A</sup>TCGAC) y una secuencia que codifica al final de la proteína una cola de 6xHis. En la Figura 15 se observa el producto de PCR obtenido (Carril 1) junto con el marcador de peso (Carril 2) y en el Cuadro 2 sus parámetros de pureza, los ácidos nucleicos tienen una absorbancia máxima a 260 nm y la relación 260/280 con un valor cercano a 1.8 es indicativo de que se tiene ADN de alta pureza.

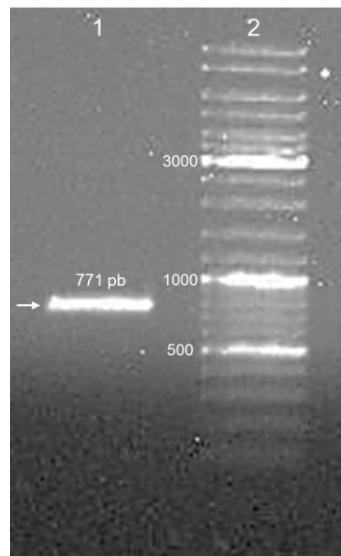


Figura 15. Amplificación de la secuencia codificante de la PFT con los sitios EcoRI y Sall en un gel de agarosa al 0.7 %.

Cuadro 2. Parámetros de pureza del amplicón purificado.

Concentración (ng/ $\mu$ L)	260/280
15.5	2.24

Después de la transformación de las bacterias con el producto de ligación entre pJET1.2/blunt y el fragmento que codifica para la PFT, se utilizaron placas de agar LB sólido con ampicilina con el fin de aislar colonias, se colectaron 8 colonias a las cuales les fue extraído sus plásmidos (Figura 16). Se seleccionaron aquellas clonas

que se adecuaran mejor al peso esperado y no presentaran comportamientos atípicos en la forma en la que se desplaza en el gel de agarosa, estas clonas se denominaron como “presuntivamente positivas”.

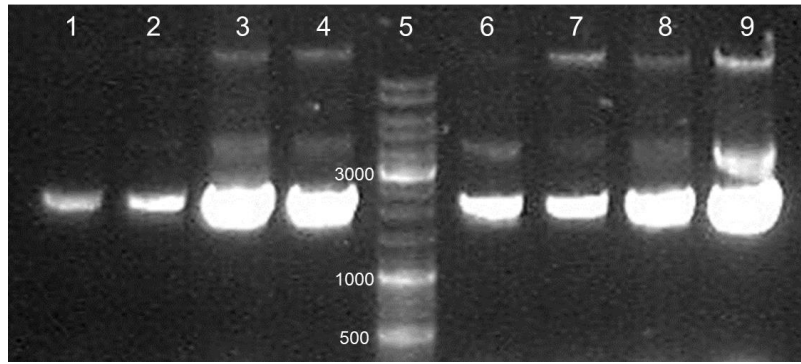


Figura 16. Selección de clonas presuntamente positivas del vector de clonación “pJET1.2\_PFTMa-DH” mediante su desplazamiento en un gel de agarosa al 0.7 %. Carriles 1-4 y 6-9 son los plásmidos aislados, carril 5 marcador de peso molecular.

Con el propósito de confirmar si las clonas presentaban el fragmento de interés, se realizó una digestión de los plásmidos utilizando las enzimas de restricción EcoRI y Sall, la reacción de digestión se resolvió en un gel de agarosa al 0.7 % (Figura 17). En el gel se observa que el vector de clonación denominado “pJET1.2\_PFTMa-DH” contiene el fragmento que codifica para la PFT, debido a que se libera el fragmento de 771 pb.

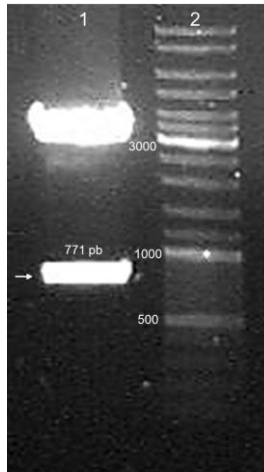


Figura 17. Confirmación de la presencia del fragmento de interés mediante digestión con EcoRI y Sall del vector “pJET1.2\_PFTMa-DH”. La flecha indica el fragmento liberado por el corte con las enzimas de restricción correspondiente a la PFT.

Una vez que se confirmó la identidad del plásmido, se llevó a cabo la secuenciación del fragmento de interés (Figura 18, A y Anexo 1). En el Anexo 1 indica los codones de inicio y paro. Los resultados obtenidos mostraron que los sitios de restricción se encuentran en el sitio adecuado, sin interferir con el marco abierto de lectura que codifica para la PFT y que este mismo no presenta modificaciones en su estructura que puedan ser perjudiciales estructuralmente para la proteína al momento de ser expresada, el vector de clonación obtenido muestra el sitio de clonación múltiple ocupado por la secuencia que codifica para la PFT (en rojo), delimitada con los sitios de corte de las enzimas EcoRI y Sall (Figura 18, B).

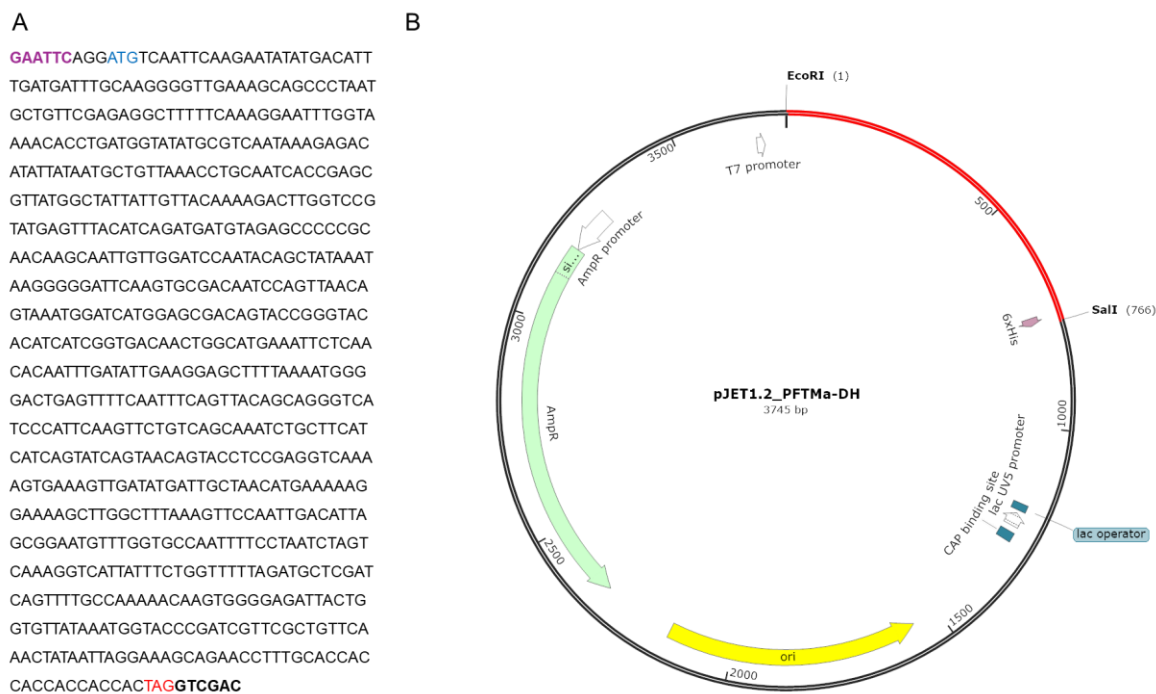


Figura 18. A) Secuencia del fragmento que codifica para la PFT; B) Mapa del vector de clonación “pJET1.2\_PFTMa-DH” modelado en SnapGene. Morado: Sitio de restricción de EcoRI, Negritas: Sitio de restricción Sall, Azul: Codón de inicio de la traducción, Rojo: Codón de término de la traducción, ori: Origen de replicación, AmpR: Sitio de resistencia a ampicilina, AmpR promoter: Promotor de gen de resistencia a ampicilina, lac operator: Operador lac, lac UV5 promoter: Promotor lac UV5.

Posteriormente, se transfirió el fragmento que codifica para la hidralisina al vector de expresión “pIRES2-EGFP”. En la Figura 19 se observa en el primer carril una banda de 765 pb, la cual se obtuvo como resultado de digerir el vector de clonación “pJET1.2\_PFTMa-DH” con las enzimas de restricción EcoRI y Sall, banda que corresponde al fragmento de PFT, en el segundo carril se encuentra el vector de expresión “pIRES2-EGFP” de 5298 pb digerido con EcoRI y Sall y en el cuarto carril se observa el producto de la ligación de ambos, en donde se presentan bandas características de la formación de una ligación, las cuales poseen un peso mayor al del vector de expresión, debido a la ligación de múltiples fragmentos y vectores. La presencia de estas bandas indica que se llevó a cabo una ligación exitosa.



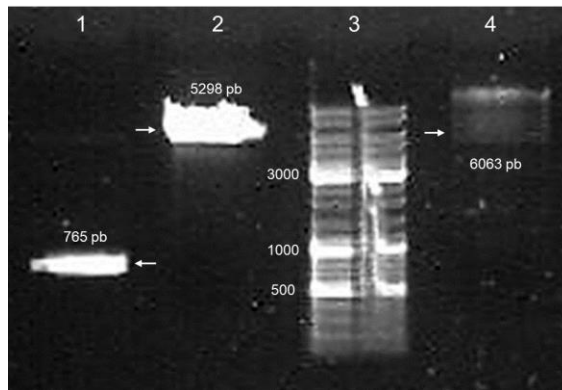


Figura 19. Ligación de pIRES2-EGFP digerido con EcoRI y Sall con los insertos digeridos y purificados que codifican para la PFT.

Se aislaron 8 plásmidos independientes y se resolvieron en geles de agarosa al 0.7 % (Figura 20, carriles 1-3 y 7-9), que fueron comparados con el vector de expresión “pIRES2-EGFP” (Figura 20, carriles 4 y 6). Se seleccionaron aquellas clonas que se adecuarán mejor al peso esperado y no presentaran comportamientos atípicos en la forma en la que se desplaza su material genético en el gel de agarosa y que, además, mostraran una diferencia en peso con el vector de expresión “pIRES2-EGFP”. Estas clonas se denominaron como “presuntamente positivas”.

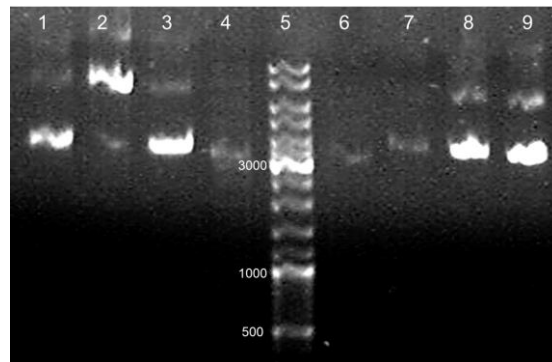


Figura 20. Selección de clonas presuntamente positivas del vector de expresión mediante su desplazamiento en un gel de agarosa al 0.7%. Carriles 4 y 6 pIRES2-EGFP.

A partir de estos resultados se seleccionaron dos clonas, las cuales presentaron un peso mayor al del vector “pIRES2-EGFP” pero que concordara con el esperado de

6063 pb para el vector de expresión ligado a la PFT, dando lugar al vector denominado “pIRES2-EGFP-HydMa-DH” (Figura 21).

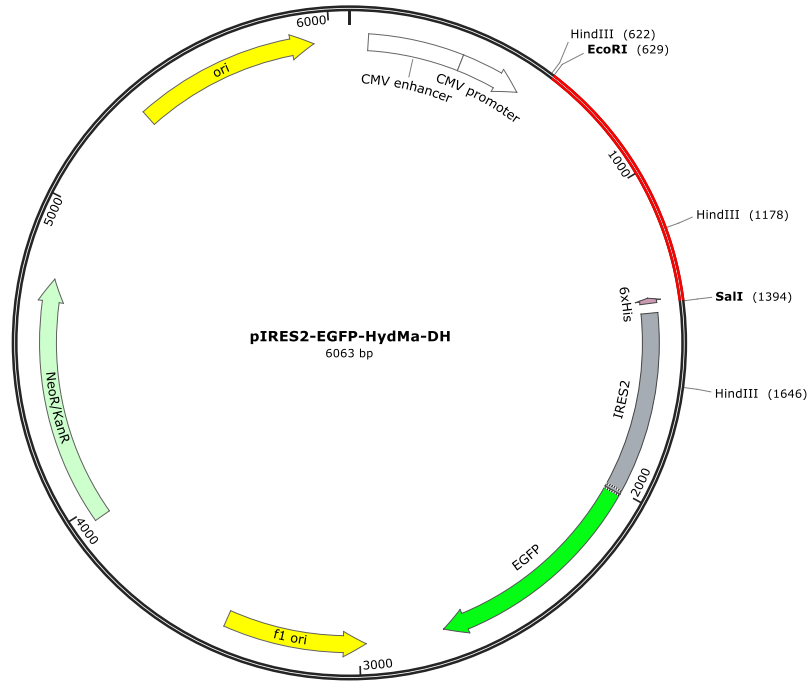


Figura 21. Mapa del vector de expresión pIRES2-EGFP-HydMa-DH modelado en SnapGene. NeoR/KanR: Gen de resistencia a Neomicina/Kanamicina, Ori: Origen de replicación, CMV promoter: promotor del citomegalovirus, CMV enhancer: potenciador del citomegalovirus, f1 ori: origen de replicación relacionado a partículas de fago, EGFP: Gen de la proteína mejorada verde fluorescente, IRES2: Sitio interno de entrada al ribosoma.

Con el fin de comprobar la obtención del vector de expresión “pIRES2-EGFP-HydMa-DH” se realizaron dos digestiones, una digestión que involucrase la zona insertada y al vector de expresión, debido a que, si se realiza esta digestión en el vector de expresión sin el inserto, los resultados serán diferentes. Por lo que, como se observa en la Figura 22, se realizó una digestión con la enzima de restricción HindIII, obteniéndose dos bandas, la primera con un peso de 269 pb y la segunda con un peso de 5039 pb, respecto a lo observado en el segundo carril correspondiente a la digestión de pIRES2-EGFP-HydMa-DH con HindIII, se obtuvieron tres bandas la primera con un peso de 468 pb, la segunda de 556 pb y la tercera de 5039 pb.

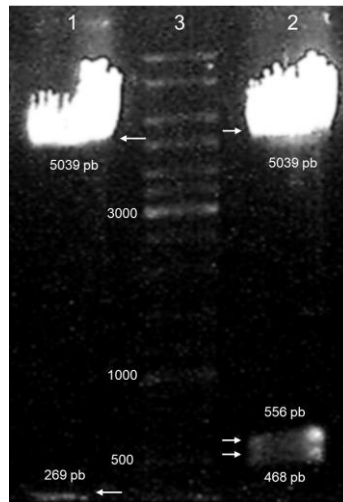


Figura 22. Digestión con la enzima de restricción HindIII del vector de expresión 1) pIRES2-EGFP y de 3) pIRES2-EGFP-HydMa-DH. 2) Marcador de peso molecular.

Debido a que los resultados concordaron con lo esperado, se realizó una segunda digestión, ahora con las enzimas de restricción EcoRI y Sall, observándose en el primer carril de la Figura 23 la digestión del vector pIRES2-EGFP y obteniéndose una banda de 5298 pb, en el segundo carril se observan dos bandas, una de 5298 pb y la segunda de 765 pb correspondiente al fragmento que codifica para la PFT.

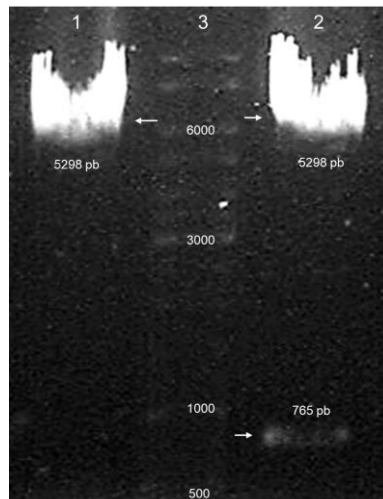


Figura 23. Digestión de los vectores de expresión 1) pIRES2-EGFP y 3) pIRES2-EGFP-HydMa-DH con las enzimas de restricción EcoRI y Sall. 2) Marcador de peso molecular.

Finalmente, al realizar la extracción de los vectores de expresión “pIRES2-EGFP-HydMa-DH” y “pIRES2-EGFP” mediante el kit QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen, 2016) se obtuvo un plásmido de alta pureza apto para ser transfectado en la línea celular HEK293, se cuantificó el material genético obtenido en el NanoDrop 1000, obteniendo los resultados del Cuadro 3, los cuales mostraron alta pureza y concentración, tomando en cuenta que, como se mencionó anteriormente, para la relación 260/280 se espera para ADN un valor de 1.8.

Cuadro 3. Parámetros que presentaron en el NanoDrop 1000 los vectores de expresión obtenidos a partir del kit QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit.

	<b>Concentración (ng/μL)</b>	<b>260/280</b>
pIRES2-EGFP-HydMa-DH	1944.8	1.85
pIRES2-EGFP	2071.5	1.86

Al obtener la información del Cuadro 5 se procedió con la transfección de 4.0 μg de DNA por placa de 35 mm a una confluencia del 40%, obteniéndose los siguientes resultados (Figuras 24, 25 y 26). A las 24 horas se observó una diferencia notoria en la formación de vacuolas y la integridad de la membrana plasmática, mientras que en el control negativo no se observan, en el control positivo se observan unas pocas y en el ensayo de las células que expresan la PFT recombinante (rPFT) se observa una mayor cantidad y un cambio notorio en la integridad membranal.

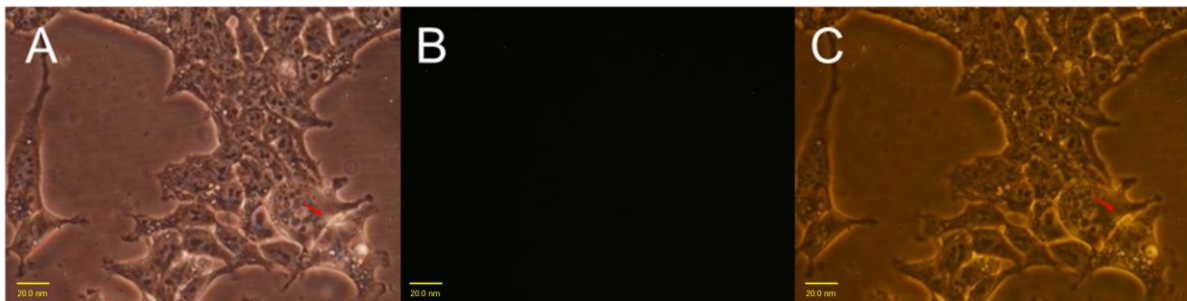


Figura 24. Células HEK293 control negativo a las 24 horas posteriores a la transfección vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV. Flechas en rojo: Daño celular.

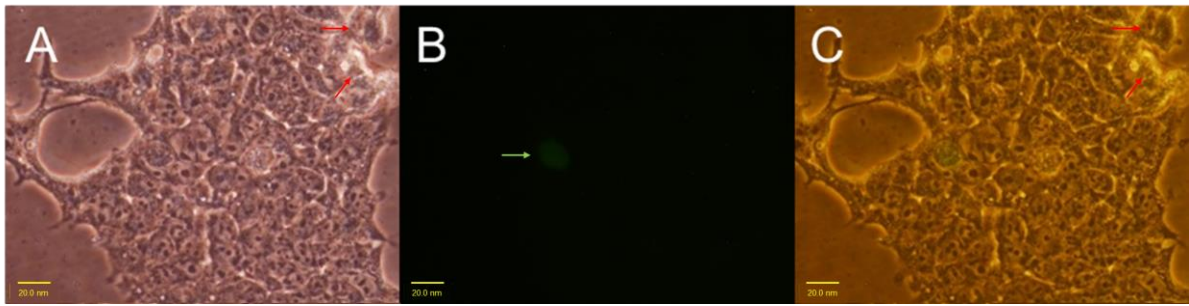


Figura 25. Células HEK293 control positivo a las 24 horas posteriores a la transfección con el vector de expresión pIRES2-EGFP vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV. Flechas en rojo: Daño celular. Flechas en verde: Fluorescencia.

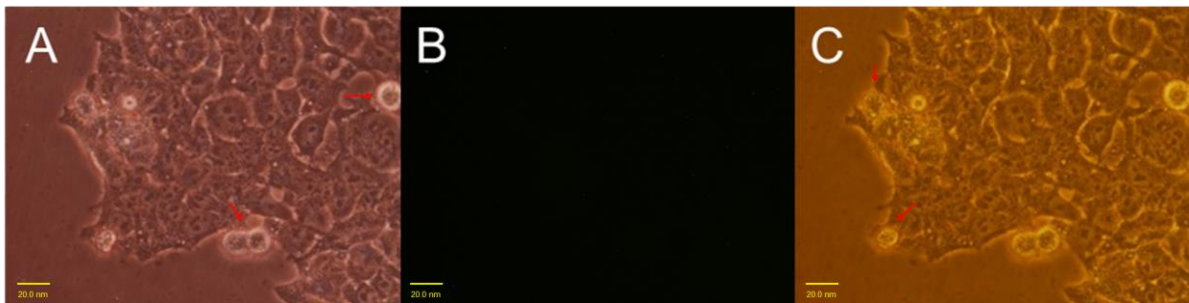


Figura 26. Células HEK293 a las 24 horas posteriores a la transfección con el vector de expresión pIRES2-EGFP-HydMa-DH vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV. Flechas en rojo: Daño celular. Flechas en verde: Fluorescencia.

Posteriormente, en los ensayos a las 48 horas (Figuras 27, 28 y 29) se mantuvo la tendencia observada previamente (Figuras 24, 25 y 26), ya que en el control negativo apenas se observa afectación en la membrana de las células, en el control positivo la afectación es mayor y en el ensayo de las células que expresan la rPFT la afectación es aún mayor que en el control positivo, además que, en el control positivo se observa una mayor fluorescencia de EGFP respecto a las células que fueron transfectadas con el vector de expresión que contenía tanto la secuencia que codifica para EGFP como para la rPFT.

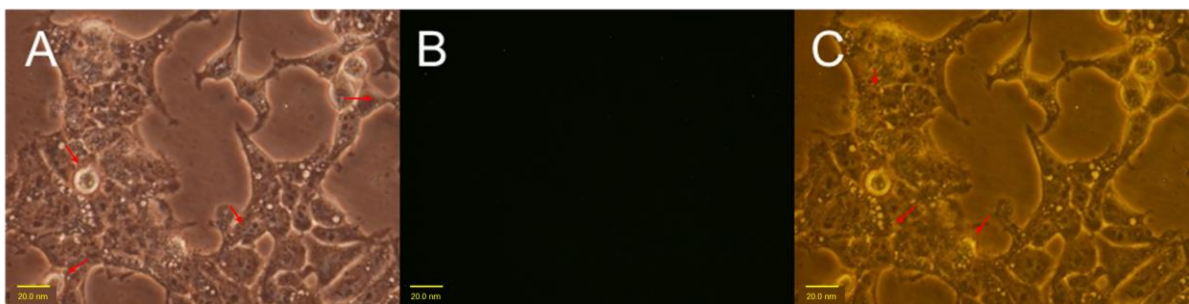


Figura 27. Células HEK293 control negativo a las 48 horas posteriores a la transfección vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV. Flechas en rojo: Daño celular.

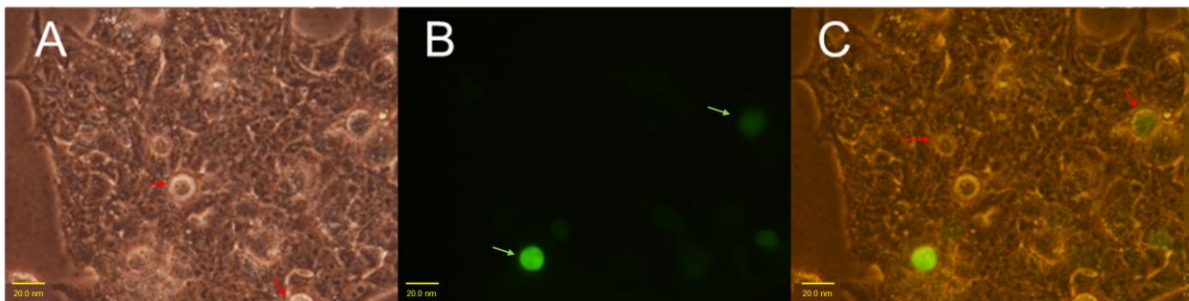


Figura 28. Células HEK293 control positivo a las 48 horas posteriores a la transfección con el vector de expresión pIRES2-EGFP vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV. Flechas en rojo: Daño celular. Flechas en verde: Fluorescencia.

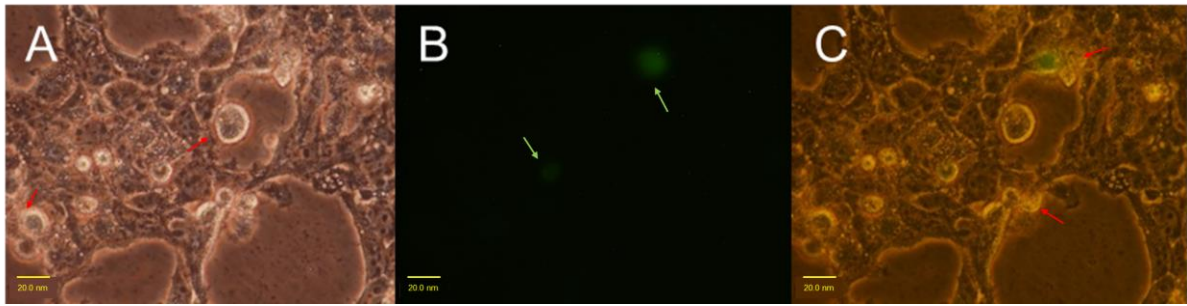


Figura 29. Células HEK293 a las 48 horas posteriores a la transfección con el vector de expresión pIRES2-EGFP-HydMa-DH vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV. Flechas en rojo: Daño celular. Flechas en verde: Fluorescencia.

Finalmente, en los ensayos a las 72 horas (Figuras 30, 31 y 32) la diferencia en la formación de vacuolas se hizo mayor, así como la integridad de la membrana plasmática de las células, la cual disminuyó, y respecto a la expresión de EGFP, se observó una menor expresión en el ensayo de las células que expresan la rPFT comparándolo con el control positivo.

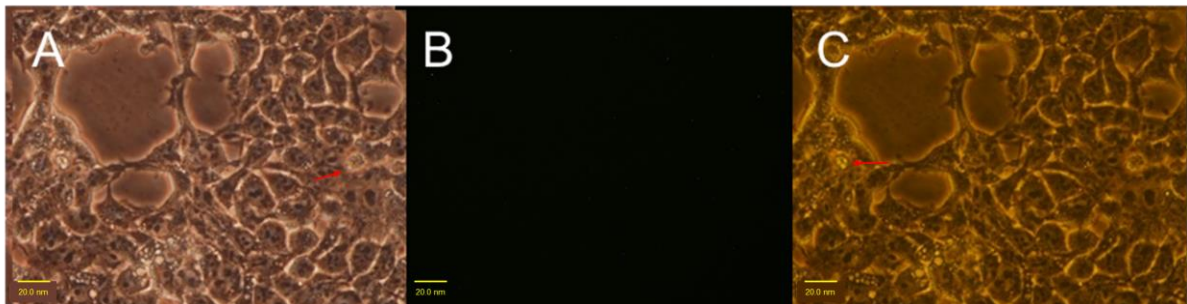


Figura 30. Células HEK293 control negativo a las 72 horas posteriores a la transfección vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV. Flechas en rojo: Daño celular.

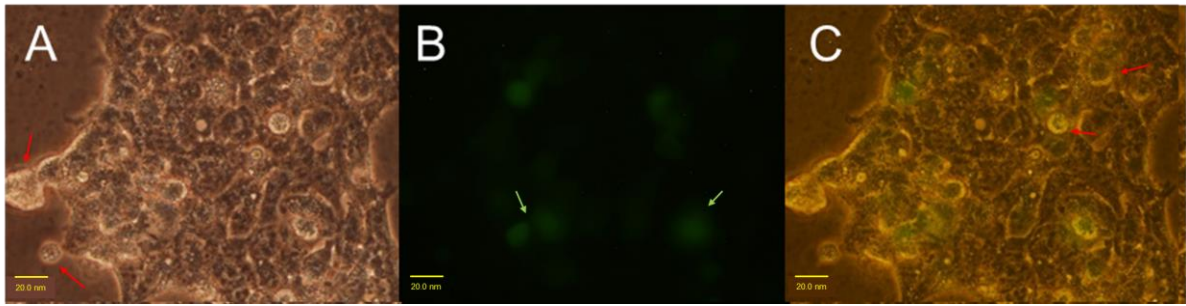


Figura 31. Células HEK293 control positivo a las 72 horas posteriores a la transfección con el vector de expresión pIRES2-EGFP vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV. Flechas en rojo: Daño celular. Flechas en verde: Fluorescencia.



Figura 32. Células HEK293 a las 72 horas posteriores a la transfección con el vector de expresión pIRES2-EGFP-HydMa-DH vistas a un aumento de 40x en A) Luz blanca B) Luz UV C) Luz blanca y UV. Flechas en rojo: Daño celular. Flechas en verde: Fluorescencia.

La viabilidad celular fue otro parámetro que se evaluó entre los ensayos, siendo de 93.06 % en el control negativo,  $86.99 \pm 0.3536$  % en el control positivo y de  $72.30 \pm 4.452$  % en el ensayo de las células que expresan rPFT, como se observa en la Figura 33.



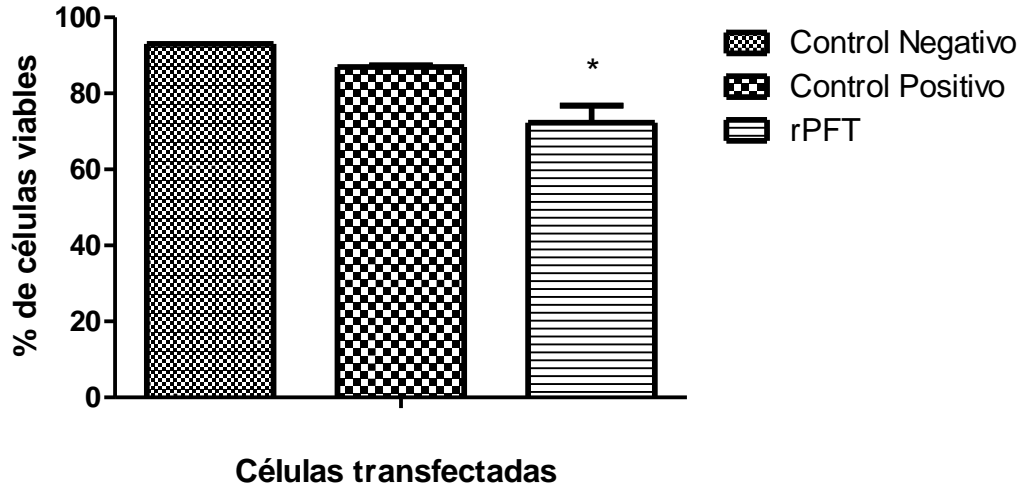


Figura 33. Porcentaje de viabilidad celular observado en la tinción con azul tripano en las células transfectadas.

Al comparar los grupos control se obtiene un valor de P mayor a 0.05, que significa que estos grupos son estadísticamente similares, mientras que al comparar el ensayo de las células que expresan rPFT con los controles se obtienen valores de P menores a 0.05 que significa que es estadísticamente diferente a ellos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza de una vía y análisis post-hoc de la viabilidad de las células transfectadas (C.N. Control Negativo, C.P. Control positivo).

ANOVA		Tukey	
Valor P	0.0086	Comparación	P < 0.05
Numero de grupos	3	C.N. vs C.P.	No
F	34.14	C.N. vs rPFT	Si
R <sup>2</sup>	0.9579	C.P. vs rPFT	Si

Del mismo modo que con las células transfectadas, se monitoreó la formación de vacuolas y la integridad de la membrana plasmática, la cual mantuvo un comportamiento similar en los controles (Figura 34 y 35), y en los ensayos donde se expusieron las células al medio presente en células transfectadas con el vector de expresión “pIRES2-EGFP-HydMa-DH” que expresan rPFT se observa una diferencia en la formación de vacuolas y la integridad de la membrana plasmática, siendo el ensayo que tiene la proporción 1:1 el que mayor diferencia presenta (Figura 36), y el

ensayo 1:10 aunque presenta el cambio más leve (Figura 37), se sigue observando el mismo comportamiento.

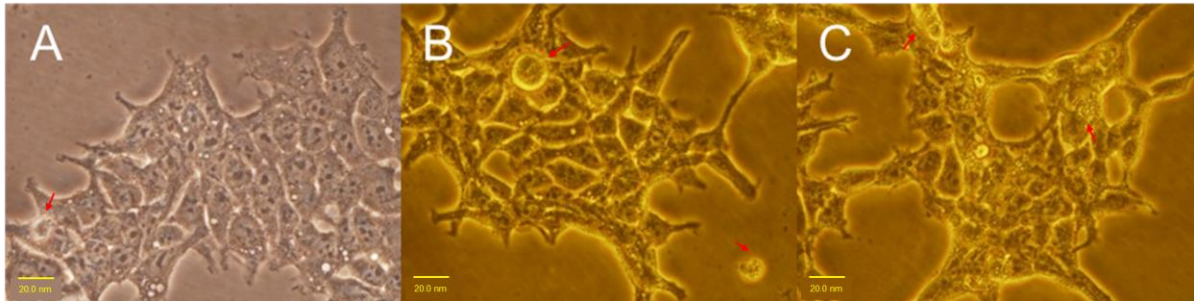


Figura 34. Células HEK293 expuestas a medio DMEM con una proporción 1:1 de medio presente en células control negativo en luz blanca a las A) 24 horas, B) 48 horas y C) 72 horas de la exposición. Flechas en rojo: Daño celular.

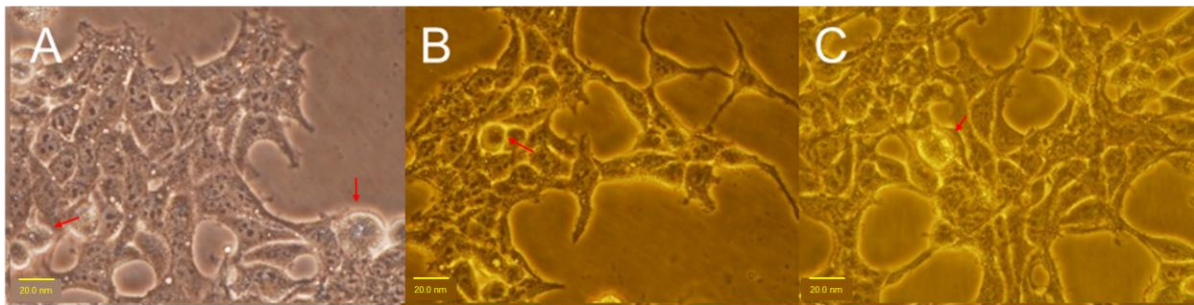


Figura 35. Células HEK293 expuestas a medio DMEM con una proporción 1:1 de medio presente en células control positivo en luz blanca a las A) 24 horas, B) 48 horas y C) 72 horas de la exposición. Flechas en rojo: Daño celular.

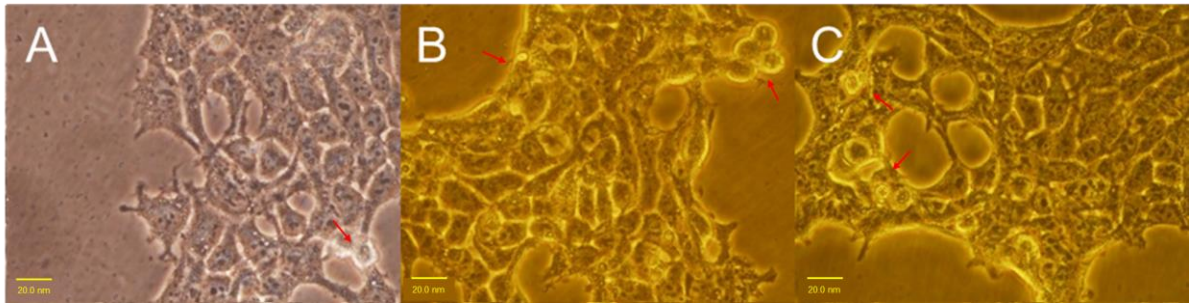


Figura 36. Células HEK293 expuestas a medio DMEM con una proporción 1:1 de medio presente en células transfectadas con el vector pIRES2-EGFP-HydMa-DH en luz blanca a las A) 24 horas, B) 48 horas y C) 72 horas de la exposición. Flechas en rojo: Daño celular.

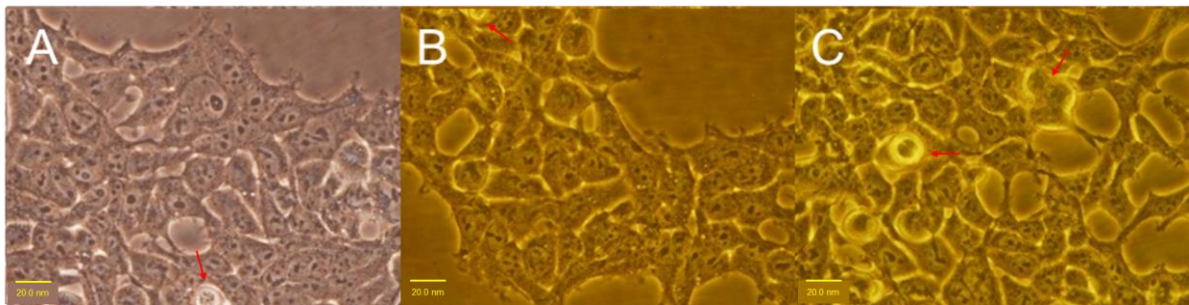


Figura 37. Células HEK293 expuestas a medio DMEM con una proporción 1:10 de medio presente en células transfectadas con el vector pIRES2-EGFP-HydMa-DH en luz blanca a las A) 24 horas, B) 48 horas y C) 72 horas de la exposición. Flechas en rojo: Daño celular.

Del mismo modo que con las células transfectadas, la viabilidad celular fue afectada en gran medida y de forma proporcional a lo observado en las imágenes al microscopio, siendo la viabilidad de 93.43 % en el ensayo con el medio control negativo, de  $91.07 \pm 0.3677$  % con el medio control positivo, de  $82.55 \pm 0.9970$  % del medio con la rPFT en una proporción 1:1 y de  $87.99 \pm 1.704$  % en una proporción 1:10, como se puede observar en la Figura 38.

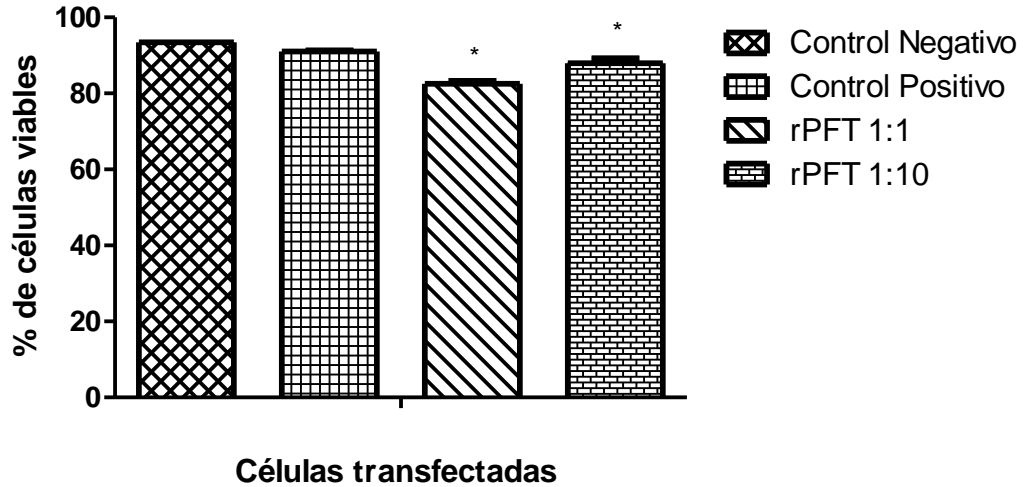


Figura 38. Porcentaje de viabilidad celular observado en la tinción con azul tripano en las células expuestas al medio condicionado (Barras mostrando SD).

El valor P del análisis Tukey entre el control negativo y el control positivo fue mayor que 0.05, es decir que los controles actuaron significativamente similares, por su parte la comparación entre el control positivo y rPFT 1:10 mostró un valor P mayor a 0.05, lo que significa que no hay diferencias estadísticas entre lo mostrado por un ensayo y otro y, finalmente, la comparación del resto de grupos obtuvo un valor de P menor a 0.05, que significa que existe diferencia estadística entre grupos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza de una vía y análisis post-hoc Tukey de la viabilidad de las células expuestas al medio condicionado (C.N. Control Negativo, C.P. Control positivo).

ANOVA	
Valor P	0.0016
Numero de grupos	4
F	43.88
R <sup>2</sup>	0.9705

Tukey	
Comparación	P < 0.05
C.N. vs C.P.	No
C.N. vs rPFT 1:1	Si
C.N. vs rPFT 1:10	Si
C.P. vs rPFT 1:1	Si
C.P. vs rPFT 1:10	No
rPFT 1:1 vs 1:10	Si

En la figura 39 se obtuvo el promedio de la curva de calibración obteniéndose una absorbancia para el punto de 0 µg/mL de 0.2810, para 25 µg/mL de 0.3193, para 50

µg/mL de 0.3546, para 75 µg/mL de 0.3813 y para 100 µg/mL de 0.4213, obteniendo una ecuación lineal  $y = 0.0014x + 0.283$  y un coeficiente de correlación de 0.9983.

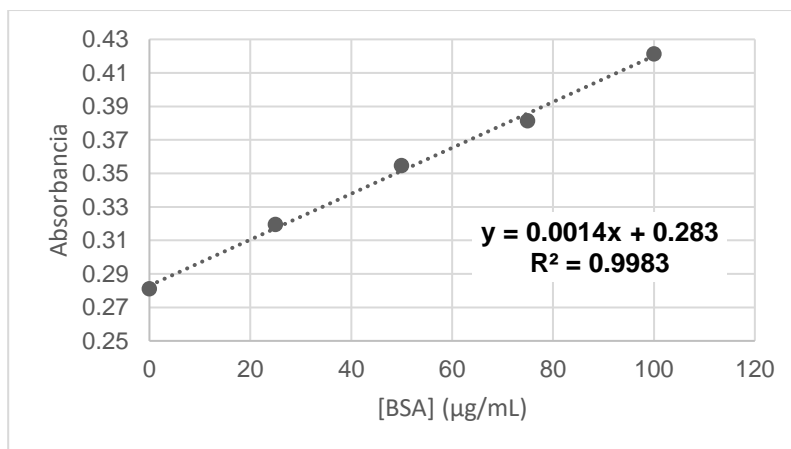


Figura 39. Curva de calibración de BSA y su línea de tendencia con ecuación lineal.

A partir de la absorbancia de los medios y utilizando la ecuación obtenida de la curva de calibración se obtuvieron las concentraciones de los medios a utilizar en el ensayo hemolítico (Cuadro 6), en el cual se utilizaron concentraciones de 0, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3000, 6000 y 10000 µg/mL para medir el efecto del medio condicionado sobre eritrocitos de rata y poder realizar una curva concentración-respuesta, se utilizaron estas concentraciones debido a que la mayor parte de la proteína cuantificada es albumina, la proteína predominante en el suero bovino fetal presente en el medio DMEM.

Cuadro 6. Concentraciones de los medios obtenidos.

<b>Medio</b>	<b>Control Negativo</b>	<b>rPFT Muestra 1</b>	<b>rPFT Muestra 2</b>
Absorbancia	0.413	0.387	0.388
Concentración (µg/µL)	928.57	742.86	750.00

Al obtener los porcentajes de hemólisis del control positivo y de los medios obtenidos (Cuadro 7) se observa una diferencia notoria en el porcentaje de hemólisis del medio que puede contener la rPFT del que no la contiene, por lo que este efecto podría ser atribuido a la producción de esta proteína por parte de las células HEK293.

Cuadro 7. Porcentaje de hemólisis provocado por PLA2 y los medios obtenidos.

<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>PLA2 (%)</b>
0	15.11
0.5	19.28
0.10	26.16
0.15	38.40
0.20	44.42
0.25	57.29
0.30	62.65
0.35	64.65
0.40	70.23
0.45	77.66
0.50	90.01
0.55	96.58

<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Control negativo (%)</b>	<b>M.C. (%)</b>
0	10.34	28.46
50	11.09	30.47
100	11.39	32.76
200	11.49	37.85
600	12.20	40.94
800	13.15	43.67
1600	13.30	50.38
3000	14.01	59.46
6000	15.11	68.55
10000	16.46	82.08
40000	21.08	88.40

En la Figura 40 se obtuvo la curva concentración-respuesta de la Fosfolipasa A2 (PLA2) utilizada como control positivo hemolítico, del medio presente en las células transfectadas con pIRES2-EGFP y del medio que presumiblemente contiene la rPFT.

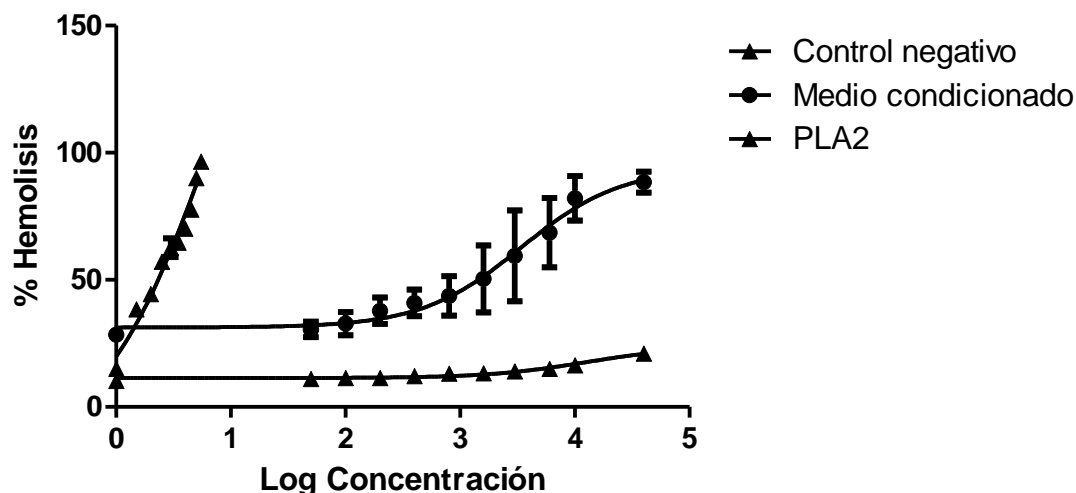


Figura 40. Curva concentración-respuesta del porcentaje de hemólisis ocasionado por el medio condicionado comparada con el control positivo (PLA2) y el control negativo.

Los resultados del análisis de varianza del Cuadro 8 arrojan que la hemólisis causada por el medio condicionado es significativamente diferente que la causada por el control negativo, pero no lo es si se compara contra el control positivo, lo que quiere decir que el medio condicionado tiene propiedades hemolíticas que, al observar que el control negativo no las posee, esto sugiere la posible presencia de la rPFT.

Cuadro 8. Análisis de varianza de una vía y análisis post-hoc Tukey del porcentaje de hemólisis causado. (C.N. Control Negativo, C.P. Control positivo, M.C. Medio condicionado).

ANOVA		Tukey	
Valor P	P<0.0001	Comparación	P < 0.05
Numero de grupos	3	C.N. vs C.P.	Si
F	20.19	C.N. vs M.C.	Si
R <sup>2</sup>	0.5820	C.P. vs M.C.	No

La unidad hemolítica media (UH<sub>50</sub>) mostrada en el Cuadro 9 indica que para la rPFT es necesaria una concentración de 3406 ± 1.3228 µg/mL de proteína total presente en el medio condicionado para hemolizar el 50 % de eritrocitos presentes en la suspensión, mientras que para la PLA2 es necesaria una concentración de 5.324 ± 1.3740 µg/mL para lograr el mismo efecto.

Cuadro 9. Unidad hemolítica media (UH<sub>50</sub>) del control positivo (PLA2) y el medio condicionado.

<b>Muestra</b>	<b>UH<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
PLA2	5.324 ± 1.3740
M.C.	3406 ± 1.3228



## VI. DISCUSIÓN

Las PFTs se encuentran presentes en la gran mayoría de las especies del planeta, incluyendo organismos procariotas y eucariotas, estas proteínas son expresadas por organismos pertenecientes a todos los reinos (Kulma y Anderluh, 2021). Las toxinas son importantes para los seres vivos que las sintetizan, ya que desempeñan diversas funciones esenciales para la supervivencia. Algunas toxinas son empleadas como mecanismo de virulencia, por ejemplo, en algunas bacterias patógenas como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis* (Los y col., 2013) otras son componentes del sistema inmune de las plantas, animales invertebrados (Bischofberger y col., 2009) y mamíferos (Iacovache y col., 2010), incluyendo seres humanos (Mukherjee y col., 2014; Szczesny y col., 2011). Existen toxinas que son empleadas para la caza y digestión de las presas o para la defensa contra depredadores. En tanto que algunas toxinas son sintetizadas como respuesta ante organismos patógenos (Podobnik y Anderluh, 2017). En la actualidad existe un interés creciente en las PFTs, cuyas características les confieren versatilidad estructural, ya que en su forma monomérica son hidrosolubles y cuando reconocen una molécula receptora específica en la membrana celular se insertan en la membrana formando un poro (Ostolaza y col., 2019; Yamaji-Hasegawa y col., 2016). Además, las PFTs presentan una alta especificidad de unión a proteínas ancladas a glicosilfosfatidil-inositol (Diep y col., 1998) y gangliósidos (Shewell y col., 2020) o a zonas de la membrana plasmática que poseen propiedades fisicoquímicas específicas, como por ejemplo los fosfolípidos cargados negativamente (Rojko y Anderluh, 2015). De tal forma que sus aplicaciones se extienden desde el ámbito analítico (Kasianowicz y col., 2016), biotecnológico (Kasianowicz y col., 1996) hasta el terapéutico (Mendoza-Almanza y col., 2020).

Las hidralisinas son una familia de proteínas que se encuentra dentro del grupo de las PFTs debido a la similitud en su estructura primaria. Fueron purificadas, clonadas y expresadas por Zhang y su equipo de investigación en 2003 a partir de la hidra

verde *Chlorohydra viridissima*. Dichos investigadores al realizar el modelado estructural *in silico* encontraron que este tipo de proteínas son globulares y se componen mayoritariamente (por encima del 50%) de láminas  $\beta$ . Adicionalmente, se ha encontrado evidencia de que no se encuentran en los nematocistos, Sher y colaboradores en 2005 proponen que las hidralisinas poseen una función defensiva o auxiliar en la parálisis de las presas dentro de la cavidad gastrovascular. Estas toxinas no reconocen la esfingomielina, y en cambio, se cree que reconocen un receptor proteico, lo cual aumenta el interés en los organismos pertenecientes a la clase Hydrozoa que son capaces de expresar este tipo de proteínas, como lo son los hidrocorales de la especie *M. alcicornis*, organismo del cual se obtuvo la secuencia del RNAm la proteína que se trabajó en la presente tesis.

En este trabajo se tuvo como objeto la expresión de una PFT del tipo hidralisina de *M. alcicornis* en células HEK293 en cultivo. Para ello, se generaron plásmidos de clonación y expresión que se transfectaron en las células HEK293 para finalmente probar su actividad funcional *in vitro*.

### VI.1 Generación de plásmidos

La primera parte del trabajo consistió en la construcción de un plásmido para expresar la hidralisina de *M. alcicornis* en células de mamífero. Esto se realizó en dos pasos, primero se introdujo en el plásmido pJET1.2 un fragmento de DNA que codifica para la hidralisina, pero con varias modificaciones que incluyeron la adición de seis residuos de histidina y dos sitios de restricción: Sall y EcoRI, el segundo paso fue la introducción de este marco de lectura en el plásmido pIRES2-EGFP, lo que resultó en el plásmido pIRES2-EGFP-HydMa-DH. Se obtuvo la secuencia de la hidralisina, lo que confirmó la preservación intacta del marco de lectura abierto y así se aseguró la conclusión de este objetivo.

### VI.2 Transfección en células HEK293

A las 24 horas de realizar la transfección de los vectores “pIRES2-EGFP” y “pIRES2-EGFP-HydMa-DH” en células HEK293, se observaron cambios en la integridad de la

membrana plasmática y la formación de vesículas en las células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH. Esta formación de vesículas ya ha sido reportada previamente por Babiychuk y colaboradores en 2011, quienes reportaron la formación de vesículas en células HEK293 debido a la exposición a estrés y sustancias citotóxicas, tales como la Estreptolisina O, una toxina formadora de poros de origen bacteriano. Estas vesículas son producto de un proceso de resellado de la membrana plasmática afectada (Pilzer y col., 2005) para evitar la pérdida del contenido intracelular debido a la formación de los poros, si este proceso falla aumenta el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular lo cual provoca la activación de fosfolipasas y proteasas celulares, provocando daño en la bicapa de fosfolípidos y al citoesqueleto (Idone y col., 2008) lo cual desencadena la formación de vesículas que son consideradas generalmente como indicio de muerte celular (Charras y col., 2008; Mills y col., 1998). La producción de vesículas en el control positivo puede explicarse debido al proceso de maduración de EGFP, el cual involucra una molécula de NADH y oxígeno ( $\text{O}_2$ ), en donde el NADH reduce la molécula de  $\text{O}_2$  aumentando la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) como radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) lo cual induce estrés oxidativo y citotoxicidad (Ansari y col., 2016) lo cual fue comprobado en un estudio realizado por Ganini y su equipo de trabajo en 2017; ellos utilizaron la línea celular HEK293 y el plásmido pDEST26-eGFP que expresa EGFP y concluyeron que las células que producen esta proteína fluorescente muestran mayor estrés oxidativo, mayor concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y un cambio en diversos procesos biológicos como lo son la sobreproducción de genes asociados a la inflamación como TNF- $\alpha$  a través de NF $\kappa$ B, afectando la homeostasis (Stone y Yang, 2006) y crecimiento celular (Ganini y col., 2017; Murrell y col., 1990). Además, la expresión de EGFP fue más prominente en las células del control positivo que en las que expresaron rPFT, lo cual podría deberse a la mayor cantidad de ROS presentes en estas últimas, ya que, como explicaba Babiychuk y su equipo de investigación en 2011, el provocar un daño citotóxico como el producido por la toxina recombinante ocasiona que se generen proteasas y fosfolipasas, las cuales están relacionadas a la producción de ROS por la degradación de ácidos grasos, de proteínas y disfunción de la mitocondria (Muralikrishna y Hatcher, 2006) lo cual

provoca que el ARNm se oxide (Shan y col., 2007) disminuyendo la traducción de la proteína. Este comportamiento de igual manera fue observado a las 48 y 72 horas de la transfección y se intensificaron las diferencias entre el control negativo, el control positivo y las células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH, ya que, mientras que en el control negativo apenas se observaban vacuolas, en el control positivo eran un poco más evidentes y en las células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH son muy evidentes, la fluorescencia en el control positivo era intensa, mientras que en las células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH se mostró débil y la confluencia celular a las 72 horas difirió bastante entre cada grupo, siendo el grupo más confluyente el control negativo, seguido del control positivo y el grupo menos confluyente resultó ser las células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH, esto debido directamente a la tasa de mortalidad que presentó cada grupo.

### VI.3 Evaluación de la viabilidad celular con azul tripano de las células transfectadas

La función de una toxina formadora de poros es anclarse a la membrana celular con ayuda de un marcador específico de membrana, posteriormente oligomerizarse con otros monómeros proteicos para finalmente formar un poro en la membrana (Parker y Feil, 2005). Al formarse el poro se altera la permeabilidad celular, comprometiendo la supervivencia y la sostenibilidad de la célula afectada (Li y col., 2021). Esta cualidad fue la que se utilizó medir el impacto que presentó el medio condicionado de las células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH sobre la viabilidad de las células que la expresaban. Para este propósito se utilizó azul de tripano: un colorante que es capaz de permear el interior de las células que poseen una membrana dañada pero no es capaz de hacerlo en aquellas que poseen una membrana intacta (Strober, 2015) y con ello conocer el porcentaje de células viables en cada caso. Al finalizar la incubación de 72 horas en el caso del control negativo se observó un porcentaje de viabilidad de 93.06 %, el cual se toma como el porcentaje de viabilidad basal, ya que es normal que las células mueran a un ritmo controlado, esto mediado por múltiples vías de señalización o factores físicos externos que pueden llevar a una muerte

celular programada o muerte celular accidental (Santagostino y col., 2021). Por su parte, el control positivo mostró un  $86.99 \pm 0.3536$  % de viabilidad, lo cual según el análisis de varianza es significativamente similar a lo observado en el control negativo y, finalmente, las células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH mostraron un porcentaje de viabilidad de  $72.30 \pm 4.452$  %, significativamente diferente a ambos controles ya que se obtuvo un valor P menor a 0.05, lo cual indica que tanto el control positivo como el control negativo tienen un comportamiento diferente. Tomando estos datos en cuenta se puede decir que el porcentaje de viabilidad es resultado de un factor intrínseco en el medio y no es producto de algún error sistemático o causado por aleatoriedad.

#### VI.4 Evaluación de la actividad citotóxica.

Para conocer el efecto que tiene el medio de las células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH, se colocaron placas de la línea celular HEK293 a una confluencia celular del 40 % con el medio de las células transfectadas previamente recolectado y medio nuevo (que proporciona nutrientes frescos) en una proporción 1:1 y 1:10 para el caso de rPFT y 1:1 para el caso de los controles, obteniendo en el caso de las células expuestas al medio de células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH la formación de vesículas muy similares a las observadas previamente en las células transfectadas, lo cual indica que se genera un daño en la membrana celular (Babiychuk y col., 2011). Este fenómeno se observa levemente en las células expuestas a la proporción 1:10, lo sustenta cierta dependencia de la concentración. Con respecto al control positivo, se observó una muy ligera formación de vacuolas que puede ser explicado por la concentración de ROS que posee el medio ya que este tipo de moléculas son citotóxicas (Ansari y col., 2016), y finalmente, en el control negativo no se observó la formación de vacuolas, lo cual nos indica que su formación es extrínseca a las células, la metodología y tratamiento aplicado. La vacuolización citoplasmática es un fenómeno generalmente observado en las células de mamíferos cuando son expuestas a patógenos (Aki y col., 2012; Henics y Wheatley, 1999). La toxina vacuolizante A (VacA) es una proteína formadora de poros secretada por

*Helicobacter pylori* y es su principal factor de virulencia, tiene la capacidad de interactuar con diversos componentes de la membrana plasmática, entre ellos la esfingomielinina (Gupta y col., 2008). Esta toxina es capaz de formar canales que transportan aniones, entre ellos cloruro, disminuyendo el potencial electroquímico de la membrana, lo cual aumenta la actividad de la V-ATPasa y disminuye el pH al interior de la célula lo cual protona diversas bases débiles que ocasionan un incremento en la presión osmótica que la célula trata de compensar con la difusión de agua desde el citoplasma, lo cual conduce a la formación de vacuolas que afectan la homeostasis celular (Shubin y col., 2016). Algo similar ocurre con la toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, la muerte celular se estudió en células murinas del conducto cortical renal en donde se demostró que esta toxina forma canales iónicos en la membrana celular que provocan la disminución en la concentración de  $K^+$  intracelular y aumenta las concentraciones de  $Cl^-$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (Zitzer y col., 1997). La toxina binaria de la bacteria *Lysinibacillus sphaericus* una toxina formadora de poros utilizada como biopesticida contra mosquitos de los géneros *Anopheles* y *Culex* (Regis y col., 2001) y que es capaz de producir vacuolización de autolisosomas provocando así la muerte celular (Silva-Filha y Peixoto, 2003), la citolisina de *Vibrio cholerae* (Figueroa-Arredondo y col., 2001; Mitra y col., 2000), la aerolisina de *Aeromonas hydrophila* (Abrami y col., 1998), entre otras.

VI.5 Evaluación de la viabilidad celular con azul tripano de las células expuestas al medio condicionado.

De forma similar al ensayo con azul tripano, se obtuvo el porcentaje de viabilidad celular al finalizar el periodo de incubación de 72 horas en las cuales las células estuvieron en contacto con el medio de las células transfectadas, obteniéndose en el caso de las células expuestas a una proporción 1:1 del medio control negativo de 93.43 %, porcentaje muy similar al observado en el ensayo de viabilidad celular previo en el control negativo, por lo que este porcentaje de igual forma puede considerarse como el porcentaje de viabilidad basal. Respecto al control positivo se obtuvo un porcentaje de viabilidad de  $91.07 \pm 0.3677$  %, un porcentaje

significativamente similar al basal debido a que al comparar ambas medias se obtiene un valor de P mayor a 0.05, indicativo que esta diferencia no es estadísticamente significativa y demuestra que la expresión del vector pIRES2-EGFP no tiene alguna repercusión en la viabilidad de las células expuestas al medio. En relación a las células expuestas al medio de las células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH en una relación 1:1 se obtuvo un porcentaje de viabilidad de  $82.55 \pm 0.9970$  %, el cual es significativamente diferente al observado en ambos controles, lo que quiere decir que el medio colocado tiene un efecto directo en la viabilidad celular y que ese efecto no es azaroso o causado por un error sistemático, respecto a las células expuestas a la toxina en una relación 1:10 en donde se observó un porcentaje de viabilidad de  $87.99 \pm 1.704$  % en la prueba Tukey se observa que si existe una diferencia significativa con el control negativo pero no así con el control positivo, lo cual indica que el efecto de la rPFT fue menor debido a la poca concentración de la toxina presente en las células expuestas, lo cual nos denota que se requiere una cantidad mayor de rPFT para poder observar un efecto significativamente diferente a los controles. Ensayos similares se han realizado para observar la viabilidad celular en células expuestas a componentes relacionados con las PFTs, como el estudio realizado por Mariottini y sus colaboradores en 2002 en donde trabajan con el veneno de la medusa *Pelagia noctiluca* perteneciente al filo cnidaria, en su trabajo extrajeron los nematocistos del animal, obtuvieron el veneno y expusieron fibroblastos V79 al veneno crudo, posteriormente realizaron la prueba de azul tripano en donde se observó una disminución severa de su supervivencia (39 % para una concentración de 150,000 N/mL a una exposición de 3 horas y 56 % para una concentración de 75,000 N/mL al mismo tiempo de exposición), efectos que aunque dramáticos, son menores que los observados al analizar los mismos ensayos con otras especies pertenecientes al filo cnidaria, como lo son: *Rhizostoma pulmo* (Allavena y col., 1998; Carli y col., 1996), *Anemonia sulcata* (Mariottini y col., 1993) y *Aequorea aequorea* (Carli y col., 1996).

## VI.6 Determinación de la actividad hemolítica

Se realizó una curva concentración-respuesta de la fosfolipasa A2 (PLA2) (Figura 40), una enzima que posee una capacidad hemolítica probada (Kemparaju y col., 1994) por lo que se utilizó como control positivo, esta enzima es capaz de lisar las membranas de los eritrocitos de una forma muy efectiva (Best y col., 2002), con esto además se comprueba que los eritrocitos utilizados son susceptibles a ser lisados y funcionan adecuadamente para realizar los ensayos hemolíticos. Al realizar los ensayos hemolíticos con los medios de las células transfectadas se observó una diferencia significativa entre el medio de las células que fueron transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH y las que se transfectaron con pIRES2-EGFP, ya que en el primero se observó un porcentaje de hemólisis superior al 90 % en la mayor concentración, mientras que en el segundo los porcentajes de hemólisis no superaron el 25 %. Adicionalmente, es importante mencionar que se observó el mismo comportamiento entre las dos repeticiones. El obtener la unidad hemolítica media (UH<sub>50</sub>) (Cuadro 9) es importante debido a que ésta indica la potencia o capacidad de producir daño (Morris-Schaffer y McCoy, 2021) que posee la toxina expresada en función de su concentración dentro de la muestra. La potencia hemolítica puede variar debido a diferentes factores como un plegamiento diferente, un cambio en el sitio de los aminoácidos que conforman a la proteína, intercambio de dominios, sustituciones o fusiones con otras proteínas (Deist y col., 2014) por lo que es importante este dato para poder comparar lo obtenido en este trabajo con otros. En el presente trabajo se obtuvo una UH<sub>50</sub> de  $3406 \pm 1.3228 \mu\text{g/mL}$  (Figura 40 y Cuadro 9), la cual es significativamente diferente a la obtenida en el control negativo y en trabajos previos. Este resultado puede compararse con diversos estudios en los que se determinó el valor de la UH<sub>50</sub> de otras PFTs, como el trabajo estrechamente relacionado que elaboró el M. en C. Jesús Eduardo Vega Tamayo en su tesis de maestría que presentó en 2022 en donde menciona que la PFT que expresó en la cepa *E. coli* C41(DE3) obtuvo un valor de UH<sub>50</sub> de  $17.5 \mu\text{g/mL}$ , otro trabajo muy importante a tomar en cuenta es el realizado por Sher y colaboradores en 2005, obtuvieron una PFT sintetizada por *H. viridissima* que presentó una UH<sub>50</sub> de 0.09



$\mu\text{g/mL}$ , otro trabajo como el realizado por Shewell y colaboradores en 2014 en donde trabajan con una toxina formadora de poros perteneciente a la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, la proteína pneumolisina, la cual es capaz de formar poros en las membranas celulares que contienen colesterol a través de un proceso de varios pasos en los que se reconoce el colesterol y posteriormente la proteína se une mediante un dominio que posee, posteriormente sucede la oligomerización de entre 34 a 50 monómeros que formarán un preporo para finalmente convertirse en un poro de barriles  $\beta$  transmembranal, obtuvieron que su  $\text{HU}_{50}$  es de alrededor de 20  $\text{ng/mL}$ .

Otro estudio en donde participó Chen y colaboradores en 2018 trabajaron con cuatro diferentes PFTs: la  $\alpha$ -hemolisina ( $\text{Hl}\alpha$ ) producida por la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), la listeriolisina O hemolítica (LLO) producida por *Listeria monocytogenes*, la streptolisina O (SLO) secretada por *Streptococcus* del grupo A y la melitina (MLT) que se encuentra presente en el veneno de *Apis mellifera* (Marques-Pereira y col., 2020). En su trabajo obtuvieron el  $\text{UH}_{50}$  de dos PFTs, siendo de  $0.20 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$  para LLO y de  $0.26 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$  para SLO, y obtuvieron la concentración de hemólisis total ( $\text{UH}_{100}$ ) de las cuatro PFTs con las que trabajaron, siendo para la melitina,  $\text{Hl}\alpha$ , LLO, y SLO de 7.5, 16, 0.63, and 1.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Por su parte, Mahmoodzadeh y colaboradores en 2015 reportaron el  $\text{UH}_{50}$  de la melitina, que es de 0.55  $\mu\text{g/mL}$ . Mientras que, el M. en C. Jesús Eduardo Vega Tamayo perteneciente a este mismo grupo de investigación, obtuvo una rPFT la cual obtuvo un  $\text{UH}_{50}$  de  $17.5 \pm 1.015 \mu\text{g/mL}$ . Estos resultados nos demuestran que se requiere una baja concentración de la PFT en cada caso para ocasionar la lisis del 50 % de los eritrocitos, en el caso de la  $\text{HU}_{50}$  obtenida en este trabajo de  $3406 \pm 1.3228 \mu\text{g}$  de proteína total/ $\text{mL}$ , un valor que puede interpretarse como una potencia hemolítica baja, pero hay que recordar que este valor toma en cuenta la proteína total presente en el medio, y es posible que la rPFT expresada es una mínima parte del total de las proteínas obtenidas del medio de cultivo.

## VII. CONCLUSIONES

En este trabajo se generó un plásmido que porta el DNAC de la hidralisina de *M. alcornis* con una inserción en fase de seis histidinas y un plásmido de expresión para células eucariotas basado en pIRES2-EGFP y que porta el DNAC de la hidralisina en tándem con GFP.

El medio de células HEK293 transfectado con el plásmido pIRES2-EGFP-HydMa-DH es tóxico para esta línea celular.

Se demostró que el medio celular de las células transfectadas con pIRES2-EGFP-HydMa-DH induce lisis en eritrocitos de rata con una  $UH_{50}$  de  $3406 \pm 1.3228 \mu\text{g/mL}$ .

La perspectiva inmediata de este proyecto de investigación es confirmar la expresión de la hidralisina, seguir con su purificación, probar su funcionalidad y determinar su blanco de unión y el tamaño del poro formado.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abrami, L., Fivaz, M., Glauser, P.-E., Parton, R. G., & van der Goot, F. (1998). A Pore-forming Toxin Interacts with a GPI-anchored Protein and Causes Vacuolation of the Endoplasmic Reticulum. *The Journal of Cell Biology*, *140*(3), 525–540. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.3.525>

Aki, T., Nara, A., & Uemura, K. (2012). Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biology and Toxicology*, *28*(3), 125–131. <https://doi.org/10.1007/s10565-012-9212-3>

Allavena, A., Mariottini, G. L., Carli, A. M., Contini, S., & Martelli, A. (1998). In vitro evaluation of the cytotoxic, hemolytic and clastogenic activities of *Rhizostoma pulmo* toxin(s). *Toxicon*, *36*(6), 933–936. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00171-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00171-2)

Ansari, A. M., Ahmed, A. K., Matsangos, A. E., Lay, F., Born, L. J., Marti, G., Harmon, J. W., & Sun, Z. (2016). Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Reviews and Reports*, *12*(5), 553–559. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9670-8>

Ashwood, L. M., Norton, R. S., Undheim, E. A. B., Hurwood, D. A. & Prentis, P. J. (2020). Characterising Functional Venom Profiles of Anthozoans and Medusozoans within Their Ecological Context. *Marine Drugs*, *18*(4), 202. <https://doi.org/10.3390/md18040202>

Ayalon, A., Shichor, I., Tal, Y. & Lotan, T. (2011). Immediate topical drug delivery by natural submicron injectors. *International Journal of Pharmaceutics*, *419*(1–2), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.07.042>

Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., & Draeger, A. (2011). Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death & Differentiation*, *18*(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.81>

Babonis, L. S. & Martindale, M. Q. (2014). Old Cell, New Trick? Cnidocytes as a Model for the Evolution of Novelty. *Integrative and Comparative Biology*, 54(4), 714–722. <https://doi.org/10.1093/icb/icu027>

Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., Baeshen, N. A. & Redwan, E. M. (2015). Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(7), 953–962. <https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079>

Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., Rahbarnia, L. & Aria, M. (2019). Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Molecular Biotechnology*, 61(5), 365–384. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00164-8>

Bakrač, B., Gutiérrez-Aguirre, I., Podlesek, Z., Sonnen, A. F.-P., Gilbert, R. J. C., Maček, P., Lakey, J. H. & Anderluh, G. (2008). Molecular Determinants of Sphingomyelin Specificity of a Eukaryotic Pore-forming Toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18665–18677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708747200>

Bakrač, B., Kladnik, A., Maček, P., McHaffie, G., Werner, A., Lakey, J. H. & Anderluh, G. (2010). A Toxin-based Probe Reveals Cytoplasmic Exposure of Golgi Sphingomyelin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22186–22195. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.105122>

Ballesteros, A., Östman, C., Santín, A., Marambio, M., Narda, M. & Gili, J.-M. (2021). Cnidome and Morphological Features of *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa) Throughout the Different Life Cycle Stages. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.714503>

Banagouro, K. C. Q., Viana, J., de Lima, L. P., Coelho, G. R., Rocha, T., Girardello, R., Russi, K. L., Kitahara, M. v. & Sciani, J. M. (2022). Biochemical and Toxinological Characterization of Venom from *Macrorhynchia philippina* (Cnidaria, Hydrozoa). *BioMed Research International*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/8170252>

Beckmann, A. & Özbek, S. (2012). The Nematocyst: a molecular map of the Cnidarian stinging organelle. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(6-7-8), 577–582. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113472ab>

Bentlage, B. & Collins, A. G. (2021). Tackling the phylogenetic conundrum of Hydrozoa (Cnidaria: Medusozoa: Hydrozoa) by assessing competing tree topologies with targeted high-throughput sequencing. *PeerJ*, 9, e12104. <https://doi.org/10.7717/peerj.12104>

Berk, A. J. (2005). Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene*, 24(52), 7673–7685. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209040>

Best, K. B., Ohran, A. J., Hawes, A. C., Hazlett, T. L., Gratton, E., Judd, A. M., & Bell, J. D. (2002). Relationship between Erythrocyte Membrane Phase Properties and Susceptibility to Secretory Phospholipase A 2. *Biochemistry*, 41(47), 13982–13988. <https://doi.org/10.1021/bi026796r>

Bischofberger, M., Gonzalez, M. R., & van der Goot, F. G. (2009). Membrane injury by pore-forming proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.04.003>

Blokesch, M. (2016). Natural competence for transformation. *Current Biology*, 26(21), R1126–R1130. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.058>

Bourne, D. G., Morrow, K. M. & Webster, N. S. (2016). Insights into the Coral Microbiome: Underpinning the Health and Resilience of Reef Ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 317–340. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095440>

Bove, C. B., Ingersoll, M. V. & Davies, S. W. (2022). Help Me, Symbionts, You're My Only Hope: Approaches to Accelerate our Understanding of Coral Holobiont Interactions. *Integrative And Comparative Biology*, 62(6), 1756–1769. <https://doi.org/10.1093/icb/icac141>

- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 289(8), 4798–4812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.534149>
- Brodie, E. D. (2009). Toxins and venoms. *Current Biology*, 19(20), R931–R935. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.011>
- Burnett, J. W. (2009). Treatment of Atlantic cnidarian envenomations. *Toxicon*, 54(8), 1201–1205. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.020>
- Burnett, M. J. B. & Burnett, A. C. (2019). Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, 2(2), 121–132. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10073>
- Calvete, J. J. (2017). Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochemical Journal*, 474(5), 611–634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160577>
- Cao, C., Li, M.-Y., Cirauqui, N., Wang, Y.-Q., Dal Peraro, M., Tian, H. & Long, Y.-T. (2018). Mapping the sensing spots of aerolysin for single oligonucleotides analysis. *Nature Communications*, 9(1), 2823. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05108-5>
- Carattoli, A. (2009). Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Carli, A., Bussotti, S., Mariottini, G. L., & Robbiano, L. (1996). Toxicity of jellyfish and sea-anemone venoms on cultured V79 cells. *Toxicon*, 34(4), 496–500. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00157-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00157-3)
- Cartwright, P., Evans, N. M., Dunn, C. W., Marques, A. C., Miglietta, M. P., Schuchert, P. & Collins, A. G. (2008). Phylogenetics of Hydroidolina (Hydrozoa: Cnidaria). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(8), 1663–1672. <https://doi.org/10.1017/S0025315408002257>

Charras, G. T., Coughlin, M., Mitchison, T. J., & Mahadevan, L. (2008). Life and Times of a Cellular Bleb. *Biophysical Journal*, *94*(5), 1836–1853. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.113605>

Chen, I. & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(3), 241–249. <https://doi.org/10.1038/nrmicro844>

Chen, Y., Chen, M., Zhang, Y., Lee, J. H., Escajadillo, T., Gong, H., Fang, R. H., Gao, W., Nizet, V., & Zhang, L. (2018). Broad-Spectrum Neutralization of Pore-Forming Toxins with Human Erythrocyte Membrane-Coated Nanosponges. *Advanced Healthcare Materials*, *7*(13). <https://doi.org/10.1002/adhm.201701366>

Cheng, K. (2021). Learning in Cnidaria: A systematic review. *Learning & Behavior*, *49*(2), 175–189. <https://doi.org/10.3758/s13420-020-00452-3>

Christensen, D., Korsholm, K. S., Rosenkrands, I., Lindenstrøm, T., Andersen, P. & Agger, E. M. (2007). Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert Review of Vaccines*, *6*(5), 785–796. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.5.785>

Clarke, P. B. S. (1992). The fall and rise of neuronal  $\alpha$ -bungarotoxin binding proteins. *Trends in Pharmacological Sciences*, *13*, 407–413. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90125-P](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90125-P)

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70*(11), 3240–3244. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240>

Cooper, R. A., de Freitas, J., Porreca, F., Eisenhour, C. M., Lukas, R. & Huxtable, R. J. (1995). The sea anemone purine, caissarone: Adenosine receptor antagonism. *Toxicon*, *33*(8), 1025–1031. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00047-P](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00047-P)

Correnti, C. E., Gewe, M. M., Mehlin, C., Bandaranayake, A. D., Johnsen, W. A., Rupert, P. B., Brusniak, M.-Y., Clarke, M., Burke, S. E., de Van Der Schueren, W., Pilat, K., Turnbaugh, S. M., May, D., Watson, A., Chan, M. K., Bahl, C. D., Olson, J. M. & Strong, R. K. (2018). Screening, large-scale production and structure-based

classification of cystine-dense peptides. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(3), 270–278. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0033-9>

Crook, Z. R., Girard, E., Sevilla, G. P., Merrill, M., Friend, D., Rupert, P. B., Pakiam, F., Nguyen, E., Yin, C., Ruff, R. O., Hopping, G., Strand, A. D., Finton, K. A. K., Coxon, M., Mhyre, A. J., Strong, R. K. & Olson, J. M. (2020). A TfR-Binding Cystine-Dense Peptide Promotes Blood–Brain Barrier Penetration of Bioactive Molecules. *Journal of Molecular Biology*, 432(14), 3989–4009. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.002>

D’Ambra, I. & Lauritano, C. (2020). A Review of Toxins from Cnidaria. *Marine Drugs*, 18(10), 507. <https://doi.org/10.3390/md18100507>

Davy, S. K., Lucas, I. A. N. & Turner, J. R. (1997). Uptake and Persistence of Homologous and Heterologous Zooxanthellae in the Temperate Sea Anemone *Cereus pedunculatus* (Pennant). *The Biological Bulletin*, 192(2), 208–216. <https://doi.org/10.2307/1542715>

De Maagd, R. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 17(4), 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02237-5)

Deist, B., Rausch, M., Fernandez-Luna, M., Adang, M., & Bonning, B. (2014). Bt Toxin Modification for Enhanced Efficacy. *Toxins*, 6(10), 3005–3027. <https://doi.org/10.3390/toxins6103005>

Delaney, B., Astwood, J. D., Cunny, H., Conn, R. E., Herouet-Guicheney, C., MacIntosh, S., Meyer, L. S., Privalle, L., Gao, Y., Mattsson, J. & Levine, M. (2008). Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food and Chemical Toxicology*, 46, S71–S97. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.045>

Demain, A. L. & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>



Diep, D. B., Nelson, K. L., Raja, S. M., Pleshak, E. N., & Buckley, J. T. (1998). Glycosylphosphatidylinositol Anchors of Membrane Glycoproteins Are Binding Determinants for the Channel-forming Toxin Aerolysin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2355–2360. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2355>

Domenger, C. & Grimm, D. (2019). Next-generation AAV vectors—do not judge a virus (only) by its cover. *Human Molecular Genetics*, 28(R1), R3–R14. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz148>

Doonan, L. B., Lynham, S., Quinlan, C., Ibiji, S. C., Winter, C. E., Padilla, G., Jaimes-Becerra, A., Morandini, A. C., Marques, A. C. & Long, P. F. (2019). Venom Composition Does Not Vary Greatly Between Different Nematocyst Types Isolated from the Primary Tentacles of *Olindias sambaquiensis* (Cnidaria: Hydrozoa). *The Biological Bulletin*, 237(1), 26–35. <https://doi.org/10.1086/705113>

Dumont, J., Eewart, D., Mei, B., Estes, S. & Kshirsagar, R. (2015). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1110–1122. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>

E. Dubé, C., A.F. Bourmaud, C., Mercière, A., Planes, S. & Boissin, E. (2019). Ecology, Biology and Genetics of *Millepora* Hydrocorals on Coral Reefs. In *Invertebrates - Ecophysiology and Management*. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89103>

Fautin, D. G. (2009). Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon*, 54(8), 1054–1064. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.024>

Ferreira, R. da G., Azzoni, A. R. & Freitas, S. (2018). Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant  $\beta$ -glucosidase. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1077-0>

Figuroa-Arredondo, P., Heuser, J. E., Akopyants, N. S., Morisaki, J. H., Giono-Cerezo, S., Enríquez-Rincón, F., & Berg, D. E. (2001). Cell Vacuolation Caused by

Vibrio cholerae Hemolysin. *Infection and Immunity*, 69(3), 1613–1624. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1613-1624.2001>

Folino-Rorem, N. C. (2015). Phylum Cnidaria. In Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. *Elsevier*. 159–179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00009-7>

Fox, J. W. & Serrano, S. M. T. (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 45(8), 969–985. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>

Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D. A., King, G. F., Nevalainen, T. J., Norman, J. A., Lewis, R. J., Norton, R. S., Renjifo, C. & de la Vega, R. C. R. (2009). The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10(1), 483–511. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>

Ganini, D., Leinisch, F., Kumar, A., Jiang, J., Tokar, E. J., Malone, C. C., Petrovich, R. M., & Mason, R. P. (2017). Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells. *Redox Biology*, 12, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.002>

Gold, D. A., Lau, C. L. F., Fuong, H., Kao, G., Hartenstein, V. & Jacobs, D. K. (2019). Mechanisms of cnidocyte development in the moon jellyfish Aurelia. *Evolution & Development*, 21(2), 72–81. <https://doi.org/10.1111/ede.12278>

Gorman, S., Viseshakul, N., Cohen, B., Hardy, S., Grant, G. A., Yost, C. S. & Forsayeth, J. R. (1997). A recombinant adenovirus that directs secretion of biologically active  $\kappa$ -bungarotoxin from mammalian cells. *Molecular Brain Research*, 44(1), 143–146. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(96\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(96)00250-1)

Gupta, S. K. & Shukla, P. (2016). Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1089–1098. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084264>

Gupta, S. K. & Shukla, P. (2017). Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(1), 31–42. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1150959>

Gupta, S. K., Dangi, A. K., Smita, M., Dwivedi, S. & Shukla, P. (2019). Effectual Bioprocess Development for Protein Production. *Applied Microbiology and Bioengineering*, 203–227. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815407-6.00011-3>

Gupta, V. R., Patel, H. K., Kostolansky, S. S., Ballivian, R. A., Eichberg, J., & Blanke, S. R. (2008). Sphingomyelin Functions as a Novel Receptor for Helicobacter pylori VacA. *PLoS Pathogens*, 4(5), e1000073. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000073>

Hamada, M., Satoh, N. & Khalturin, K. (2020). A Reference Genome from the Symbiotic Hydrozoan, Hydra viridissima. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 10(11), 3883–3895. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401411>

Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 139–150. <https://doi.org/10.1038/nrm2329>

Harrell, C. C., Choi, Y., Horne, L. P., Baker, L. A., Siwy, Z. S. & Martin, C. R. (2006). Resistive-Pulse DNA Detection with a Conical Nanopore Sensor. *Langmuir*, 22(25), 10837–10843. <https://doi.org/10.1021/la061234k>

Hauser, F., Koch, T. L. & Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2022). Review: The evolution of peptidergic signaling in Cnidaria and Placozoa, including a comparison with Bilateria. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.973862>

Heins, A., Glatzel, T. & Holst, S. (2015). Revised descriptions of the nematocysts and the asexual reproduction modes of the scyphozoan jellyfish Cassiopea andromeda (Forskål, 1775). *Zoomorphology*, 134(3), 351–366. <https://doi.org/10.1007/s00435-015-0263-x>

Henics, T., & Wheatley, D. N. (1999). Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: A view on new perspectives and features. *Biology of the Cell*, *91*(7), 485–498. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(00\)88205-2](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(00)88205-2)

Hernández-Elizárraga, V. H., Ocharán-Mercado, A., Olguín-López, N., Hernández-Matehuala, R., Caballero-Pérez, J., Ibarra-Alvarado, C. & Rojas-Molina, A. (2022). New Insights into the Toxin Diversity and Antimicrobial Activity of the “Fire Coral” *Millepora complanata*. *Toxins*, *14*(3), 206. <https://doi.org/10.3390/toxins14030206>

Hernández-Elizárraga, V. H., Olguín-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. *Marine Drugs*, *17*(7), 393. <https://doi.org/10.3390/md17070393>

Hernández-Matehuala, R., Rojas-Molina, A., Vuelvas-Solórzano, A. A., Garcia-Arredondo, A., Alvarado, C. I., Olguín-López, N. & Aguilar, M. (2015). Cytolytic and systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora alcicornis* collected in the Mexican Caribbean and detection of two types of cytolisins. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *21*(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0035-6>

Herrera, M., Klein, S. G., Schmidt-Roach, S., Campana, S., Cziesielski, M. J., Chen, J. E., Duarte, C. M. & Aranda, M. (2020). Unfamiliar partnerships limit cnidarian holobiont acclimation to warming. *Global Change Biology*, *26*(10), 5539–5553. <https://doi.org/10.1111/gcb.15263>

Hoadley, K. D., Lewis, A. M., Wham, D. C., Pettay, D. T., Grasso, C., Smith, R., Kemp, D. W., LaJeunesse, T. C. & Warner, M. E. (2019). Host–symbiont combinations dictate the photo-physiological response of reef-building corals to thermal stress. *Scientific Reports*, *9*(1), 9985. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46412-4>

Hoegh-Guldberg, O. (1999). Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine and Freshwater Research*. <https://doi.org/10.1071/MF99078>

Holland, P. (2011). *The Animal Kingdom*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/actrade/9780199593217.001.0001>

Hu, B., Guo, W., Wang, L., Wang, J., Liu, X. & Jiao, B. (2011). Purification and Characterization of Gigantoxin-4, a New Actinoporin from the Sea Anemone *Stichodactyla Gigantea*. *International Journal of Biological Sciences*, 7(6), 729–739. <https://doi.org/https://doi.org/10.7150%2Fijbs.7.729>

Hu, J., Wu, H., Wang, D., Yang, Z., Zhuang, L., Yang, N. & Dong, J. (2018). Weicao capsule ameliorates renal injury through increasing autophagy and NLRP3 degradation in UAN rats. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 96, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.01.001>

Huertas, M. J. & Michán, C. (2019). Paving the way for the production of secretory proteins by yeast cell factories. *Microbial Biotechnology*, 12(6), 1095–1096. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13342>

Hunter, M., Yuan, P., Vavilala, D. & Fox, M. (2019). Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. *Current Protocols in Protein Science*, 95(1), e77. <https://doi.org/10.1002/cpps.77>

Hussain, H., Fisher, D. I., Abbott, W. M., Roth, R. G. & Dickson, A. J. (2017). Use of a protein engineering strategy to overcome limitations in the production of “Difficult to Express” recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(10), 2348–2359. <https://doi.org/10.1002/bit.26358>

Iacovache, I., Bischofberger, M., & van der Goot, F. G. (2010). Structure and assembly of pore-forming proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(2), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.01.013>

Idone, V., Tam, C., Goss, J. W., Toomre, D., Pypaert, M., & Andrews, N. W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca<sup>2+</sup>-dependent endocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 180(5), 905–914. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708010>

Imbs, A. B., Ermolenko, E. v., Grigorchuk, V. P. & Dang, L. T. P. (2021). Seasonal variation in the lipidome of two species of Millepora hydrocorals from Vietnam coastal waters (the South China Sea). *Coral Reefs*, 40(3), 719–734. <https://doi.org/10.1007/s00338-021-02073-2>

Jafari, S. H., Saadatpour, Z., Salmaninejad, A., Momeni, F., Mokhtari, M., Nahand, J. S., Rahmati, M., Mirzaei, H. & Kianmehr, M. (2017). Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. *Journal of Cellular Physiology*, 233(7), 5200–5213. <https://doi.org/10.1002/jcp.26379>

Janus, A. & Robak, T. (2019). Moxetumomab pasudotox for the treatment of hairy cell leukemia. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 19(6), 501–508. <https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1614558>

Jayathilake, J. M. N. J. & Gunathilake, K. V. K. (2020). Cnidarian toxins: recent evidences for potential therapeutic uses. *The European Zoological Journal*, 87(1), 708–713. <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1837268>

Jiemy, W. F., Hiew, L. F., Sha, H. X., In, L. L. A. & Hwang, J. S. (2020). Evaluation of Hydra HALT-1 as a toxin moiety for recombinant immunotoxin. *BMC Biotechnology*, 20(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00628-9>

Jouiaei, M., Yanagihara, A., Madio, B., Nevalainen, T., Alewood, P. & Fry, B. (2015). Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins*, 7(6), 2251–2271. <https://doi.org/10.3390/toxins7062251>

Kasianowicz, J. J., Balijepalli, A. K., Ettetdgui, J., Forstater, J. H., Wang, H., Zhang, H., & Robertson, J. W. F. (2016). Analytical applications for pore-forming proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(3), 593–606. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.09.023>

Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., & Deamer, D. W. (1996). Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13770–13773. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13770>

Kass-Simon, G., & Scappaticci, Jr., A. A. (2002). The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Canadian Journal of Zoology*, 80(10), 1772–1794. <https://doi.org/10.1139/z02-135>

Kececi, K., Sexton, L. T., Buyukserin, F. & Martin, C. R. (2008). Resistive-pulse detection of short dsDNAs using a chemically functionalized conical nanopore sensor. *Nanomedicine*, 3(6), 787–796. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.6.787>

Kemparaju, K., Nijaguna Prasad, B., & Gowda, V. T. (1994). Purification of a basic phospholipase A2 from Indian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) venom: characterization of antigenic, catalytic and pharmacological properties. *Toxicon*, 32(10), 1187–1196. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90348-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90348-4)

Kirk, N. L. & Weis, V. M. (2016). Animal–Symbiodinium Symbioses: Foundations of Coral Reef Ecosystems. *The Mechanistic Benefits of Microbial Symbionts. Advances in Environmental Microbiology*, 10(2), 269–294. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28068-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28068-4_10)

Knowles, B. H. & Ellar, D. J. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 924(3), 509–518. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(87\)90167-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(87)90167-X)

Koch, M. S., Ward, J. M., Levine, S. L., Baum, J. A., Vicini, J. L. & Hammond, B. G. (2015). The food and environmental safety of Bt crops. *Frontiers in Plant Science*, 06. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00283>

Koch, T. L., Hauser, F. & Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2021). An evolutionary genomics view on neuropeptide genes in Hydrozoa and Endocnidozoa (Myxozoa). *BMC Genomics*, 22(1), 862. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08091-2>

Kulma, M., & Anderluh, G. (2021). Beyond pore formation: reorganization of the plasma membrane induced by pore-forming proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(17–18), 6229–6249. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03914-7>

Kyslík, J., Kosakyan, A., Nenarokov, S., Holzer, A. S. & Fiala, I. (2021). The myxozoan minicollagen gene repertoire was not simplified by the parasitic lifestyle: computational identification of a novel myxozoan minicollagen gene. *BMC Genomics*, 22(1), 198. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07515-3>

Laborde, R. J., Sanchez-Ferras, O., Luzardo, M. C., Cruz-Leal, Y., Fernández, A., Mesa, C., Oliver, L., Canet, L., Abreu-Butin, L., Nogueira, C. v., Tejuca, M., Pazos, F., Álvarez, C., Alonso, M. E., Longo-Maugéri, I. M., Starnbach, M. N., Higgins, D. E., Fernández, L. E. & Lanio, M. E. (2017). Novel Adjuvant Based on the Pore-Forming Protein Sticholysin II Encapsulated into Liposomes Effectively Enhances the Antigen-Specific CTL-Mediated Immune Response. *The Journal of Immunology*, 198(7), 2772–2784. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600310>

Lavado-García, J., González-Domínguez, I., Cervera, L., Jorge, I., Vázquez, J. & Gòdia, F. (2020). Molecular Characterization of the Coproduced Extracellular Vesicles in HEK293 during Virus-Like Particle Production. *Journal of Proteome Research*, 19(11), 4516–4532. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00581>

Lewis, J. B. (2006). Biology and Ecology of the Hydrocoral *Millepora* on Coral Reefs. *Advances in Marine Biology*, 50, 1–55. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(05\)50001-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(05)50001-4)

Li, B. N., Li, W. D., Lin, J. T., Feng, H. G., & Yuan, Z. Q. (2014). Construction and identification of pIRES2-LIF-NT-3 bicistronic eukaryotic expression vector. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 4691–4703. <https://doi.org/10.4238/2014.June.18.12>

Li, Y., Li, Y., Mengist, H. M., Shi, C., Zhang, C., Wang, B., Li, T., Huang, Y., Xu, Y., & Jin, T. (2021). Structural Basis of the Pore-Forming Toxin/Membrane Interaction. *Toxins*, 13(2), 128. <https://doi.org/10.3390/toxins13020128>



Lim, Y., Wong, N. S. C., Lee, Y. Y., Ku, S. C. Y., Wong, D. C. F. & Yap, M. G. S. (2010). Engineering mammalian cells in bioprocessing – current achievements and future perspectives. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55(4), 175–189. <https://doi.org/10.1042/BA20090363>

Liu, M., Wang, B., Wang, F., Yang, Z., Gao, D., Zhang, C., Ma, L. & Yu, X. (2019). Soluble expression of single-chain variable fragment (scFv) in *Escherichia coli* using superfolder green fluorescent protein as fusion partner. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(15), 6071–6079. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09925-6>

Lommel, M., Strompen, J., Hellewell, A. L., Balasubramanian, G. P., Christofidou, E. D., Thomson, A. R., Boyle, A. L., Woolfson, D. N., Puglisi, K., Hartl, M., Holstein, T. W., Adams, J. C. & Özbek, S. (2018). Hydra Mesoglea Proteome Identifies Thrombospondin as a Conserved Component Active in Head Organizer Restriction. *Scientific Reports*, 8(1), 11753. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30035-2>

Los, F. C. O., Randis, T. M., Aroian, R. v., & Ratner, A. J. (2013). Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 173–207. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-12>

Louis, N., Eveleigh, C. & Graham, F. L. (1997). Cloning and Sequencing of the Cellular–Viral Junctions from the Human Adenovirus Type 5 Transformed 293 Cell Line. *Virology*, 233(2), 423–429. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8597>

Macrander, J., Broe, M. & Daly, M. (2016). Tissue-Specific Venom Composition and Differential Gene Expression in Sea Anemones. *Genome Biology and Evolution*, 8(8), 2358–2375. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw155>

Mahmoodzadeh, A., Zarrinnahad, H., Bagheri, K. P., Moradia, A., & Shahbazzadeh, D. (2015). First report on the isolation of melittin from Iranian honey bee venom and evaluation of its toxicity on gastric cancer AGS cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, 78(10), 574–583. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2015.06.008>

Malm, M., Saghaleyni, R., Lundqvist, M., Giudici, M., Chotteau, V., Field, R., Varley, P. G., Hatton, D., Grassi, L., Svensson, T., Nielsen, J. & Rockberg, J. (2020). Evolution

from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. *Scientific Reports*, *10*(1), 18996. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76137-8>

Mamat, U., Wilke, K., Bramhill, D., Schromm, A. B., Lindner, B., Kohl, T. A., Corchero, J. L., Villaverde, A., Schaffer, L., Head, S. R., Souvignier, C., Meredith, T. C. & Woodard, R. W. (2015). Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0241-5>

Mancheño, J. M., Martín-Benito, J., Martínez-Ripoll, M., Gavilanes, J. G. & Hermoso, J. A. (2003). Crystal and Electron Microscopy Structures of Sticholysin II Actinoporin Reveal Insights into the Mechanism of Membrane Pore Formation. *Structure*, *11*(11), 1319–1328. <https://doi.org/10.1016/j.str.2003.09.019>

Margolin, E., Chapman, R., Williamson, A.-L., Rybicki, E. P. & Meyers, A. E. (2018). Production of complex viral glycoproteins in plants as vaccine immunogens. *Plant Biotechnology Journal*, *16*(9), 1531–1545. <https://doi.org/10.1111/pbi.12963>

Marillonnet, S. & Grützner, R. (2020). Synthetic DNA Assembly Using Golden Gate Cloning and the Hierarchical Modular Cloning Pipeline. *Current Protocols in Molecular Biology*, *130*(1). <https://doi.org/10.1002/cpmb.115>

Mariottini, G. L., Bussotti, S., & Carli, A. (1993). Cytotoxic effects produced on a continuous cell line by the nematocyst venom of *Anemonia sulcata* (Cnidaria: Anthozoa). *I. Cytotechnology*, *11*(S1), S158–S159. <https://doi.org/10.1007/BF00746088>

Mariottini, G. L., Sottofattori, E., Mazzei, M., Robbiano, L., & Carli, A. (2002). Cytotoxicity of the venom of *Pelagia noctiluca* forskål (Cnidaria: Scyphozoa). *Toxicon*, *40*(6), 695–698. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00262-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00262-8)

Marques-Pereira, A. F., Albano, M., Bérnago Alves, F. C., Murbach Teles Andrade, B. F., Furlanetto, A., Mores Rall, V. L., Delazari dos Santos, L., de Oliveira Orsi, R., & Fernandes Júnior, A. (2020). Influence of apitoxin and melittin from *Apis mellifera* bee

on *Staphylococcus aureus* strains. *Microbial Pathogenesis*, 141, 104011. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104011>

Matsumoto, Y., Piraino, S. & Miglietta, M. P. (2019). Transcriptome Characterization of Reverse Development in *Turritopsis dohrnii* (Hydrozoa, Cnidaria). *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 9(12), 4127–4138. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400487>

McFadden, C. S., Quattrini, A. M., Brugler, M. R., Cowman, P. F., Dueñas, L. F., Kitahara, M. v, Paz-García, D. A., Reimer, J. D. & Rodríguez, E. (2021). Phylogenomics, Origin, and Diversification of Anthozoans (Phylum Cnidaria). *Systematic Biology*, 70(4), 635–647. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syaa103>

Mendoza-Almanza, G., Esparza-Ibarra, E. L., Ayala-Luján, J. L., Mercado-Reyes, M., Godina-González, S., Hernández-Barrales, M., & Olmos-Soto, J. (2020). The Cytocidal Spectrum of *Bacillus thuringiensis* Toxins: From Insects to Human Cancer Cells. *Toxins*, 12(5), 301. <https://doi.org/10.3390/toxins12050301>

Merlin, M., Gecchele, E., Capaldi, S., Pezzotti, M. & Avesani, L. (2014). Comparative Evaluation of Recombinant Protein Production in Different Biofactories: The Green Perspective. *BioMed Research International*, 2014, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/136419>

Messerli, S. & Greenberg, R. (2006). Cnidarian Toxins Acting on Voltage-Gated Ion Channels. *Marine Drugs*, 4(3), 70–81. <https://doi.org/10.3390/md403070>

Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J., & Pittman, R. N. (1998). Apoptotic Membrane Blebbing Is Regulated by Myosin Light Chain Phosphorylation. *The Journal of Cell Biology*, 140(3), 627–636. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.3.627>

Mitra, R., Figueroa, P., Mukhopadhyay, A. K., Shimada, T., Takeda, Y., Berg, D. E., & Nair, G. B. (2000). Cell Vacuolation, a Manifestation of the El Tor Hemolysin of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, 68(4), 1928–1933. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.1928-1933.2000>

Montano, S., Fattorini, S., Parravicini, V., Berumen, M. L., Galli, P., Maggioni, D., Arrigoni, R., Seveso, D. & Strona, G. (2017). Corals hosting symbiotic hydrozoans are less susceptible to predation and disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1869), 20172405. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2405>

Moran, Y., Praher, D., Schlesinger, A., Ayalon, A., Tal, Y., & Technau, U. (2013). Analysis of Soluble Protein Contents from the Nematocysts of a Model Sea Anemone Sheds Light on Venom Evolution. *Marine Biotechnology*, 15(3), 329–339. <https://doi.org/10.1007/s10126-012-9491-y>

Morris-Schaffer, K., & McCoy, M. J. (2021). A Review of the LD 50 and Its Current Role in Hazard Communication. *ACS Chemical Health & Safety*, 28(1), 25–33. <https://doi.org/10.1021/acs.chas.0c00096>

Movileanu, L. (2009). Interrogating single proteins through nanopores: challenges and opportunities. *Trends in Biotechnology*, 27(6), 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.008>

Mukherjee, S., Zheng, H., Derebe, M. G., Callenberg, K. M., Partch, C. L., Rollins, D., Propheter, D. C., Rizo, J., Grabe, M., Jiang, Q.-X., & Hooper, L. v. (2014). Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*, 505(7481), 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature12729>

Muralikrishna Adibhatla, R., & Hatcher, J. F. (2006). Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(3), 376–387. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.044>

Murrell, G. A. C., Francis, M. J. O., & Bromley, L. (1990). Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochemical Journal*, 265(3), 659–665. <https://doi.org/10.1042/bj2650659>

Nagai, H., Takuwa, K., Nakao, M., Ito, E., Miyake, M., Noda, M. & Nakajima, T. (2000). Novel Proteinaceous Toxins from the Box Jellyfish (Sea Wasp) *Carybdea rastoni*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(2), 582–588. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3353>

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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(4), 731–735. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.006>

Ng, T. J., Teo, M. Y. M., Liew, D. S., Effiong, P. E., Hwang, J. S., Lim, C. S. Y. & In, L. L. A. (2019). Cytotoxic and apoptosis-inducing effects of wildtype and mutated Hydra actinoporin-like toxin 1 (HALT-1) on various cancer cell lines. *PeerJ*, 7, e6639. <https://doi.org/10.7717/peerj.6639>

Noakes, M. T., Brinkerhoff, H., Laszlo, A. H., Derrington, I. M., Langford, K. W., Mount, J. W., Bowman, J. L., Baker, K. S., Doering, K. M., Tickman, B. I. & Gundlach, J. H. (2019). Increasing the accuracy of nanopore DNA sequencing using a time-varying cross membrane voltage. *Nature Biotechnology*, 37(6), 651–656. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0096-0>

Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., Alves, L. de F., Monteiro, L. M. O., Guazzaroni, M.-E. & Silva-Rocha, R. (2018). The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial Biotechnology*, 12(1), 125–147. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13318>

Ogretmen, B. & Hannun, Y. A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Cancer*, 4(8), 604–616. <https://doi.org/10.1038/nrc1411>

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>

Ortíz González, I. C., Rivera-Vicéns, R. E. & Schizas, N. v. (2021). Description of four *Millepora* spp. transcriptomes and their potential to delimit the Caribbean fire coral

species. *Marine Genomics*, 59, 100863.  
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2021.100863>

Ostolaza, H., González-Bullón, D., Uribe, K. B., Martín, C., Amuategi, J., & Fernandez-Martínez, X. (2019). Membrane Permeabilization by Pore-Forming RTX Toxins: What Kind of Lesions Do These Toxins Form? *Toxins*, 11(6), 354.  
<https://doi.org/10.3390/toxins11060354>

Oukhaled, A., Bacri, L., Pastoriza-Gallego, M., Betton, J.-M. & Pelta, J. (2012). Sensing Proteins through Nanopores: Fundamental to Applications. *ACS Chemical Biology*, 7(12), 1935–1949. <https://doi.org/10.1021/cb300449t>

Owczarek, B., Gerszberg, A. & Hnatuszko-Konka, K. (2019). A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. *BioMed Research International*, 2019, 1–13.  
<https://doi.org/10.1155/2019/4216060>

Özbek, S., Balasubramanian, P. G. & Holstein, T. W. (2009). Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon*, 54(8), 1038–1045.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.006>

Paraskevopoulou, V. & Falcone, F. (2018). Polyionic Tags as Enhancers of Protein Solubility in Recombinant Protein Expression. *Microorganisms*, 6(2), 47.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms6020047>

Pardo-López, L., Soberón, M. & Bravo, A. (2013). Bacillus thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 3–22.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x>

Parker, M. W. & Feil, S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88(1), 91–142.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.009>

Petrou, K., Nunn, B. L., Padula, M. P., Miller, D. J. & Nielsen, D. A. (2021). Broad scale proteomic analysis of heat-destabilised symbiosis in the hard coral *Acropora millepora*. *Scientific Reports*, 11(1), 19061. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98548-x>

Pilzer, D., Gasser, O., Moskovich, O., Schifferli, J. A., & Fishelson, Z. (2005). Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Seminars in Immunopathology*, 27(3), 375–387. <https://doi.org/10.1007/s00281-005-0004-1>

Platzer, B., Stout, M. & Fiebiger, E. (2014). Antigen Cross-Presentation of Immune Complexes. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00140>

Podobnik, M., & Anderluh, G. (2017). Pore-forming toxins in Cnidaria. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 72, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.07.026>

Pollock, F. J., McMinds, R., Smith, S., Bourne, D. G., Willis, B. L., Medina, M., Thurber, R. V. & Zaneveld, J. R. (2018). Coral-associated bacteria demonstrate phylosymbiosis and cophylogeny. *Nature Communications*, 9(1), 4921. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07275-x>

Poulain, A., Perret, S., Malenfant, F., Mullick, A., Massie, B., & Durocher, Y. (2017). Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. *Journal of Biotechnology*, 255, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.009>

Prizad, H., Sheikholeslami, F., Mahmoudi, M., Fazeli, M., & Fadajan, Z. (2021). The role of assaying recombinant Beclin1 by in vitro and in vivo tests. *Gene Reports*, 24, 101221. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101221>

Puetz, J. & Wurm, F. M. (2019). Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes*, 7(8), 476. <https://doi.org/10.3390/pr7080476>

Putnam, H. M., Barott, K. L., Ainsworth, T. D. & Gates, R. D. (2017). The Vulnerability and Resilience of Reef-Building Corals. *Current Biology*, 27(11), R528–R540. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.047>

Rachamim, T., Morgenstern, D., Aharonovich, D., Brekhman, V., Lotan, T. & Sher, D. (2015). The Dynamically Evolving Nematocyst Content of an Anthozoan, a Scyphozoan, and a Hydrozoan. *Molecular Biology and Evolution*, 32(3), 740–753. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu335>

Radwan, F. F. Y., & Aboul-Dahab, H. M. (2004). Milleporin-1, a new phospholipase A2 active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 139(4), 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.12.002>

Ramírez-Carretero, S., Miranda-Zaragoza, B. & Rodríguez-Almazán, C. (2020). Actinoporins: From the Structure and Function to the Generation of Biotechnological and Therapeutic Tools. *Biomolecules*, 10(4), 539. <https://doi.org/10.3390/biom10040539>

Razak, T. B. & Hoeksema, B. W. (2003). The hydrocoral genus *Millepora* (Hydrozoa: Capitata: Milleporidae) in Indonesia. *Zoologische Verhandelingen*, 345, 313–336. <https://doi.org/https://repository.naturalis.nl/pub/220318/>

Regis, L., Silva-Filha, M. H., Nielsen-LeRoux, C., & Charles, J.-F. (2001). Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology*, 17(8), 377–380. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01953-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01953-5)

Reich, H. G., Robertson, D. L. & Goodbody-Gringley, G. (2017). Do the shuffle: Changes in Symbiodinium consortia throughout juvenile coral development. *PLOS ONE*, 12(2), e0171768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171768>

Rivera-de-Torre, E., Palacios-Ortega, J., Gavilanes, J., Martínez-del-Pozo, Á. & García-Linares, S. (2019). Pore-Forming Proteins from Cnidarians and Arachnids as Potential Biotechnological Tools. *Toxins*, 11(6), 370. <https://doi.org/10.3390/toxins11060370>



- Rivera-de-Torre, E., Rimbault, C., Jenkins, T. P., Sørensen, C. v., Damsbo, A., Saez, N. J., Duhoo, Y., Hackney, C. M., Ellgaard, L. & Laustsen, A. H. (2022). Strategies for Heterologous Expression, Synthesis, and Purification of Animal Venom Toxins. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.811905>
- Rohou, A., Nield, J. & Ushkaryov, Y. A. (2007). Insecticidal toxins from black widow spider venom. *Toxicon*, 49(4), 531–549. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.021>
- Rojko, N., & Anderluh, G. (2015). How Lipid Membranes Affect Pore Forming Toxin Activity. *Accounts of Chemical Research*, 48(12), 3073–3079. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00403>
- Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rosenberg, E. & Zilber-Rosenberg, I. (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, 6(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0457-9>
- Rubessa, M., Lotti, S. N., Kandel, M. E., Popescu, G., & Wheeler, M. B. (2019). SLIM microscopy allows for visualization of DNA-containing liposomes designed for sperm-mediated gene transfer in cattle. *Molecular Biology Reports*, 46(1), 695–703. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4525-9>
- Ruiz-Ramos, D. v, Weil, E. & Schizas, N. v. (2014). Morphological and genetic evaluation of the hydrocoral Millepora species complex in the Caribbean. *Zoological Studies*, 53(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1810-522X-53-4>
- Santagostino, S. F., Assenmacher, C.-A., Tarrant, J. C., Adedeji, A. O., & Radaelli, E. (2021). Mechanisms of Regulated Cell Death: Current Perspectives. *Veterinary Pathology*, 58(4), 596–623. <https://doi.org/10.1177/03009858211005537>

Santander, M. D., Maronna, M. M., Ryan, J. F. & Andrade, S. C. S. (2022). The state of Medusozoa genomics: current evidence and future challenges. *GigaScience*, 11. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giac036>

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2001). *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio* (NOM-062-ZOO-1999). [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf)

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2002). *Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo* (NOM-087-ECOL-SSA1-2002). [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=704675&fecha=17/02/2003#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=704675&fecha=17/02/2003#gsc.tab=0)

Shan, X., Chang, Y., & Glenn Lin, C. (2007). Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression. *The FASEB Journal*, 21(11), 2753–2764. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8200com>

Sher, D. & Zlotkin, E. (2009). A hydra with many heads: Protein and polypeptide toxins from hydra and their biological roles. *Toxicon*, 54(8), 1148–1161. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.036>

Sher, D., Fishman, Y., Melamed-Book, N., Zhang, M. & Zlotkin, E. (2008). Osmotically driven prey disintegration in the gastrovascular cavity of the green hydra by a pore-forming protein. *The FASEB Journal*, 22(1), 207–214. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9133com>

Sher, D., Fishman, Y., Zhang, M., Lebendiker, M., Gaathon, A., Mancheño, J.-M., & Zlotkin, E. (2005). Hydralysins, a New Category of  $\beta$ -Pore-forming Toxins in Cnidaria. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22847–22855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503242200>

Sher, D., Fishman, Y., Zhang, M., Lebendiker, M., Gaathon, A., Mancheño, J.-M. & Zlotkin, E. (2005b). Hydralysins, a New Category of  $\beta$ -Pore-forming Toxins in

Cnidaria. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22847–22855.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M503242200>

Sher, D., Knebel, A., Bsoor, T., Nesher, N., Tal, T., Morgenstern, D., Cohen, E., Fishman, Y. & Zlotkin, E. (2005a). Toxic polypeptides of the hydra—a bioinformatic approach to cnidarian allomones. *Toxicon*, 45(7), 865–879.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.004>

Shewell, L. K., Day, C. J., Jen, F. E.-C., Haselhorst, T., Atack, J. M., Reijneveld, J. F., Everest-Dass, A., James, D. B. A., Boguslawski, K. M., Brouwer, S., Gillen, C. M., Luo, Z., Kobe, B., Nizet, V., von Itzstein, M., Walker, M. J., Paton, A. W., Paton, J. C., Torres, V. J., & Jennings, M. P. (2020). All major cholesterol-dependent cytolysins use glycans as cellular receptors. *Science Advances*, 6(21).  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz4926>

Shewell, L. K., Harvey, R. M., Higgins, M. A., Day, C. J., Hartley-Tassell, L. E., Chen, A. Y., Gillen, C. M., James, D. B. A., Alonzo, F., Torres, V. J., Walker, M. J., Paton, A. W., Paton, J. C., & Jennings, M. P. (2014). The cholesterol-dependent cytolysins pneumolysin and streptolysin O require binding to red blood cell glycans for hemolytic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(49).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1412703111>

Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. & Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(18), 8794–8797. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8794>

Shubin, A. v., Demidyuk, I. v., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M., & Kostrov, S. v. (2016). Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*, 7(34), 55863–55889. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10150>

Silva-Filha, M. H. N. L., & Peixoto, C. A. (2003). Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus* (Diptera:

Culicidae) larvae midgut. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77(3), 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2003.07.002>

Skočaj, M., Resnik, N., Grundner, M., Ota, K., Rojko, N., Hodnik, V., Anderluh, G., Sobota, A., Maček, P., Veranič, P. & Sepčić, K. (2014). Tracking Cholesterol/Sphingomyelin-Rich Membrane Domains with the Ostreolysin A-mCherry Protein. *PLoS ONE*, 9(3), e92783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092783>

Soberón, M., Gill, S. S. & Bravo, A. (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(8), 1337–1349. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8330-9>

Song, X., Ruthensteiner, B., Lyu, M., Liu, X., Wang, J. & Han, J. (2021). Advanced Cambrian hydroid fossils (Cnidaria: Hydrozoa) extend the medusozoan evolutionary history. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1944), 20202939. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2939>

Stanley, K. K. & Luzio, J. P. (1984). Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: identification of cDNA clones coding for human liver proteins. *The EMBO Journal*, 3(6), 1429–1434. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb01988.x>

Stone, J. R., & Yang, S. (2006). Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(3–4), 243–270. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.243>

Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>

Sun, Y., Long, J., Yin, Y., Li, H., Jiang, E., Zeng, C., & Zhu, W. (2018). Characterization of CSF2A fusion gene and its effect on Epstein–Barr virus–positive tumor cells. *Journal of Medical Virology*, 90(11), 1750–1756. <https://doi.org/10.1002/jmv.25240>

Szczepanek, S., Cikala, M. & David, C. N. (2002). Poly- $\gamma$ -glutamate synthesis during formation of nematocyst capsules in Hydra. *Journal of Cell Science*, 115(4), 745–751. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.4.745>

Szczesny, P., Iacovache, I., Muszewska, A., Ginalski, K., van der Goot, F. G., & Grynberg, M. (2011). Extending the Aerolysin Family: From Bacteria to Vertebrates. *PLoS ONE*, 6(6), e20349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020349>

Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S. & Ng, S. K. (2021). HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>

Tanhaeian, A., Azghandi, M., Mousavi, Z. & Javadmanesh, A. (2020). Expression of Thanatin in HEK293 Cells and Investigation of its Antibacterial Effects on Some Human Pathogens. *Protein & Peptide Letters*, 27(1), 41–47. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190822162140>

Tansui, D. & Thammano, A. (2017). Nature-inspired optimization method: Hydrozoan algorithm for solving continuous problems. *2017 18th IEEE/ACIS International Conference on Software Engineering, Artificial Intelligence, Networking and Parallel/Distributed Computing (SNPD)*, 23–28. <https://doi.org/10.1109/SNPD.2017.8022695>

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211–222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>

Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>

Tripathi, N. K. & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>

- Vafadar, A., Taheri-Anganeh, M., Movahedpour, A., Jamali, Z., Irajie, C., Ghasemi, Y. & Savardashtaki, A. (2020). In Silico Design and Evaluation of scFv-CdtB as a Novel Immunotoxin for Breast Cancer Treatment. *International Journal of Cancer Management*, 13(1). <https://doi.org/10.5812/ijcm.96094>
- Valle, A., Alvarado-Mesén, J., Lanio, M. E., Álvarez, C., Barbosa, J. A. R. G. & Pazos, I. F. (2015). The multigene families of actinoporins (part I): Isoforms and genetic structure. *Toxicon*, 103, 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.028>
- Van Iten, H., Leme, J. M., Pacheco, M. L. A. F., Simões, M. G., Fairchild, T. R., Rodrigues, F., Galante, D., Boggiani, P. C. & Marques, A. C. (2016). Origin and Early Diversification of Phylum Cnidaria: Key Macrofossils from the Ediacaran System of North and South America. In *The Cnidaria, Past, Present and Future* (pp. 31–40). *Springer International Publishing*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_3)
- Van Iten, H., Marques, A. C., Leme, J. de M., Pacheco, M. L. A. F. & Simões, M. G. (2014). Origin and early diversification of the phylum Cnidaria Verrill: major developments in the analysis of the taxon's Proterozoic-Cambrian history. *Palaeontology*, 57(4), 677–690. <https://doi.org/10.1111/pala.12116>
- Van Oppen, M. J. H. & Blackall, L. L. (2019). Coral microbiome dynamics, functions and design in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*, 17(9), 557–567. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0223-4>
- Vega-Tamayo, J. E. (2022) Clonación de una toxina formadora de poros (PFT) sintetizada por el "coral de fuego" *Millepora alcicornis* y caracterización de su efecto citolítico [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/3891>
- Videira, M., Velasco, M., Malcher, C. S., Santos, P., Matos, P. & Matos, E. (2016). An outbreak of myxozoan parasites in farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon region, Brazil. *Aquaculture Reports*, 3, 31–34. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.11.004>

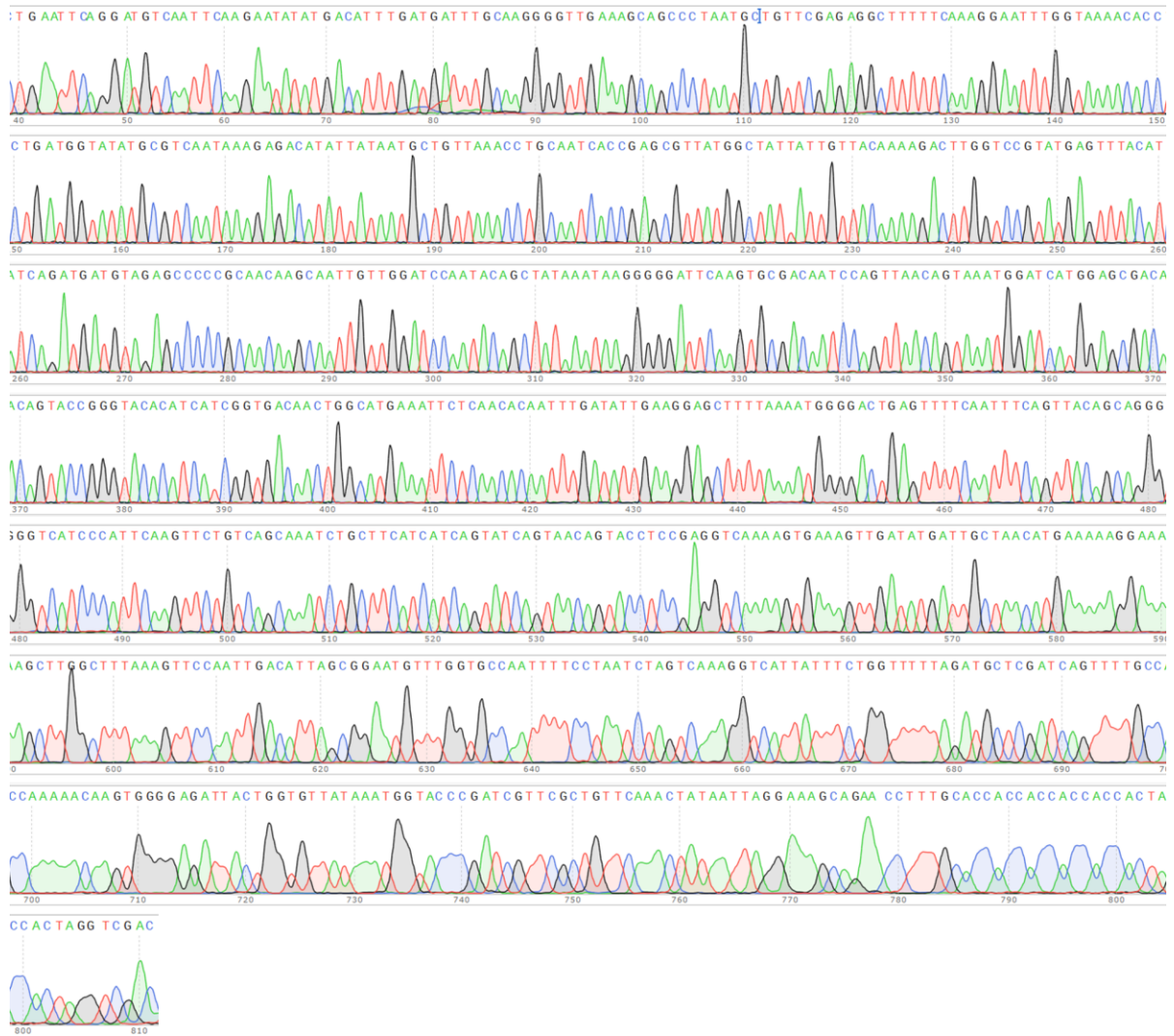
- Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, 36(12), 1136–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>
- Wang, Y., Lu, J., Engelstädter, J., Zhang, S., Ding, P., Mao, L., Yuan, Z., Bond, P. L. & Guo, J. (2020). Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation. *The ISME Journal*, 14(8), 2179–2196. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0679-2>
- Watanabe, H., Gubbiotti, A., Chinappi, M., Takai, N., Tanaka, K., Tsumoto, K. & Kawano, R. (2017). Analysis of Pore Formation and Protein Translocation Using Large Biological Nanopores. *Analytical Chemistry*, 89(21), 11269–11277. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01550>
- Webster, N. S. & Reusch, T. B. H. (2017). Microbial contributions to the persistence of coral reefs. *The ISME Journal*, 11(10), 2167–2174. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.66>
- Wei, J., Zhang, Y. & An, S. (2019). The progress in insect cross-resistance among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 102(3). <https://doi.org/10.1002/arch.21547>
- Weis, V. M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 211(19), 3059–3066. <https://doi.org/10.1242/jeb.009597>
- Weis, V., Reynolds, W., deBoer, M. & Krupp, D. (2001). Host-symbiont specificity during onset of symbiosis between the dinoflagellates *Symbiodinium* spp. and planula larvae of the scleractinian coral *Fungia scutaria*. *Coral Reefs*, 20(3), 301–308. <https://doi.org/10.1007/s003380100179>
- Xiong, W., Wu, D. M., Xue, Y., Wang, S. K., Chung, M. J., Ji, X., Rana, P., Zhao, S. R., Mai, S. & Cepko, C. L. (2019). AAV cis -regulatory sequences are correlated with ocular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(12), 5785–5794. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821000116>

- Yamaji-Hasegawa, A., Hullin-Matsuda, F., Greimel, P., & Kobayashi, T. (2016). Pore-forming toxins: Properties, diversity, and uses as tools to image sphingomyelin and ceramide phosphoethanolamine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(3), 576–592. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.012>
- Yanagihara, A. A. & Shohet, R. v. (2012). Cubozoan Venom-Induced Cardiovascular Collapse Is Caused by Hyperkalemia and Prevented by Zinc Gluconate in Mice. *PLoS ONE*, 7(12), e51368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051368>
- Zaharenko, A. J., Picolo, G., Ferreira, W. A., Murakami, T., Kazuma, K., Hashimoto, M., Cury, Y., de Freitas, J. C., Satake, M. & Konno, K. (2011). Bunodosine 391: An Analgesic Acylamino Acid from the Venom of the Sea Anemone *Bunodosoma cangicum*. *Journal of Natural Products*, 74(3), 378–382. <https://doi.org/10.1021/np100738m>
- Zeng, L., Wan, L., Chen, L., Li, S., Lu, Y., Huang, Q., Wang, L., Li, Y., Cheng, J. & Lu, X. (2006). Selective Depletion of Activated T Cells by Recombinant Immunotoxin Containing Anti-CTLA-4 Single-Chain Fragment of Variable Antibody and N-Terminal Fragment of Perforin. *Transplantation Proceedings*, 38(7), 2151–2153. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.06.045>
- Zhang, M., Fishman, Y., Sher, D., & Zlotkin, E. (2003). Hydralysin, a Novel Animal Group-Selective Paralytic and Cytolytic Protein from a Noncnidocystic Origin in Hydra. *Biochemistry*, 42(30), 8939–8944. <https://doi.org/10.1021/bi0343929>
- Zhu, J., Zhang, M., Zhou, S., Zhang, J., & Wang, J. (2024). Construction of eukaryotic expression vector of Apoptin-etag and TAT-Apoptin-etag and their effects on human esophageal squamous cell carcinoma in vitro. *ResearchSquare*, 1–13. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3992497/v1>
- Zinder, N. D., & Lederberg, J. (1952). GENETIC EXCHANGE IN SALMONELLA. *Journal of Bacteriology*, 64(5), 679–699. <https://doi.org/10.1128/jb.64.5.679-699.1952>



Zitzer, A., Wassenaar, T. M., Walev, I., & Bhakdi, S. (1997). Potent membrane-permeabilizing and cytotoxic action of *Vibrio cholerae* cytolysin on human intestinal cells. *Infection and Immunity*, 65(4), 1293–1298. <https://doi.org/10.1128/iai.65.4.1293-1298.1997>

# ANEXOS



Anexo 1. Electroforetograma de la secuencia de la hidralisina de *M. alcicornis*.



C.U., Querétaro, febrero 14, 2024  
No. de oficio. CBQ24/011

**Dra. María Alejandra Rojas Molina**  
Investigadora responsable

**Diego Domingo Herrera Mejía**  
Estudiante responsable

**Dr. Ataulfo Martínez Torres**  
**Dr. César Ibarra Alvarado**  
**M.C. Jesús Eduardo Vega Tamayo**  
Colaboradores

El protocolo de investigación titulado “**Expresión de una toxina formadora de poros de tipo hidralisina (PFT) mediante un sistema heterólogo de células HEK293**” sometido a evaluación por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Química **involucra el uso de animales de experimentación**. Las características del diseño del protocolo de investigación son resumidas a continuación:

<b>Tipo de estudio</b>	<i>Ex vivo</i>
<b>Modelo experimental</b>	Ratas macho Wistar (275-325 g)
<b>Tamaño de muestra</b>	3 ratas
<b>Alojamiento</b>	Jaulas de acrílico (187 cm <sup>2</sup> /animal) en el bioterio de INB-UNAM durante 1 día
<b>Alimentación</b>	Alimento estándar (ABENE BDL-7100) y agua <i>ad libitum</i>
<b>Inducción de enfermedad</b>	No aplica
<b>Monitoreo de animales</b>	No aplica
<b>Administración de tratamiento</b>	No aplica
<b>Método de eutanasia</b>	Decapitación con guillotina
<b>Manejo de RPBI</b>	Se realizará el almacenamiento y posterior disposición de los RPBI de acuerdo a la norma
<b>Recolección de órganos</b>	Recolección de sangre
<b>VARIABLES DE MEDICIÓN</b>	Evaluación de la actividad hemolítica



Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado **“Expresión de una toxina formadora de poros de tipo hidralisina (PFT) mediante un sistema heterólogo de células HEK293”**, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **aprobado en lo referente a los aspectos bioéticos del proyecto.**

Cabe mencionar que ningún integrante del Comité declaró conflicto de interés para la evaluación del protocolo de investigación. Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes.

**Iza Fernanda Pérez Ramírez**

Presidente

Comité de Bioética de la Facultad de Química

Universidad Autónoma de Querétaro

