

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**CLONACIÓN DE UNA TOXINA FORMADORA DE POROS (PFT)
SINTETIZADA POR EL "CORAL DE FUEGO" *Millepora alcicornis* Y
CARACTERIZACIÓN DE SU EFECTO CITOLÍTICO**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE**

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. JESÚS EDUARDO VEGA TAMAYO

DIRIGIDA POR:

DRA. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

CO-DIRIGIDA POR:

DR. ATAULFO MARTÍNEZ TORRES

**QUERÉTARO
AGOSTO DE 2022
MÉXICO**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

CLONACIÓN DE UNA TOXINA FORMADORA DE POROS (PFT) SINTETIZADA
POR EL “CORAL DE FUEGO” *Millepora Albicornis* Y CARACTERIZACIÓN DE SU
EFECTO CITOLÍTICO

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. JESÚS EDUARDO VEGA TAMAYO

DIRIGIDA POR:

DRA. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

CO-DIRIGIDA POR:

DR. ATAULFO MARTÍNEZ TORRES

COMITÉ TUTORAL

Dra. Alejandra Rojas Molina
Presidente

Dr. Ataulfo Martínez Torres
Secretario

M. en C. Víctor Hugo Hernández Elizárraga
Vocal

Dr. César Ibarra Alvarado
Suplente

Dra. Juana Isela Rojas Molina
Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Ciencias Químicas

Dra. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro
Agosto de 2022

ÍNDICE

	Página
Resumen	12
Abstract	13
1. Introducción	14
2. Antecedentes	17
2.1 Filo cnidaria	17
2.2 Género <i>Millepora</i> : “corales de fuego”	19
2.3 Células en las cuales se sintetizan las toxinas de los cnidarios	21
2.4 Toxinas en los cnidarios	24
2.4.1 Enzimas	24
2.4.1.1 Fosfolipasas A2 (PLA2)	24
2.4.1.2 Metaloproteasas	25
2.4.2 Neurotoxinas	26
2.4.2.1 Toxinas que modulan canales de sodio dependientes de voltaje (NaTx)	26
2.4.2.2 Toxinas que modulan canales de potasio dependientes de voltaje (KTx)	26
2.4.2.3 Pequeños péptidos ricos en cisteína (SCRiP)	27
2.4.2.4 Bloqueadores de canales ASIC y canales TRPV1	27
2.5 Toxinas formadoras de poros (PFTs) en cnidarios	28
2.5.1 Actinoporinas	28
2.5.2 Toxinas de medusas (CxTx)	29
2.5.3 Hidralisinas	31
2.6 Aplicaciones de las PFTs	32

2.6.1 Toxinas formadores de poros y su potencial aplicación para el tratamiento del cáncer	33
2.6.2 Toxinas formadoras de poros y su potencial aplicación para la administración de agentes terapéuticos	34
2.6.3 Toxinas formadoras de poros y su potencial aplicación como biosensores	35
2.7 Producción de proteínas recombinantes	36
3. Justificación	39
4. Pregunta de investigación	41
5. Hipótesis	41
6. Objetivos	42
6.1 Objetivo general	42
6.2 Objetivos específicos	42
7. Materiales y métodos	43
7.1 Desarrollo experimental	43
7.1.1 Obtención de un vector de clonación con la secuencia de nucleótidos de la PFT detectada en el transcriptoma de <i>M. alvicornis</i>	43
7.1.2 Construcción del vector de expresión con la secuencia de nucleótidos de la PFT detectada en el transcriptoma de <i>M. alvicornis</i>	43
7.1.3 Inducción de la expresión	44
7.1.4 Purificación de la PFT clonada de <i>M. alvicornis</i> , mediante cromatografía de afinidad	44
7.1.5 Detección de la actividad citolítica, mediante la prueba de difusión en pozo	45
7.1.6 Determinación del efecto hemolítico de la PFT clonada sobre eritrocitos de humano	45
7.1.7 Determinación del efecto del colesterol, la fosfoetanolamina y algunos carbohidratos sobre la actividad hemolítica de la PFT clonada	46

7.1.8 Determinación del tamaño de poro formado por la PFT clonada en las membranas eritrocitarias, mediante el ensayo de protección osmótica	46
7.2 Análisis estadísticos	46
8. Resultados	48
8.1 Obtención del vector de clonación	48
8.2 Construcción del vector de expresión	55
8.3 Inducción de la expresión y purificación	59
8.4 Detección de la actividad citolítica del extracto total que contenía la toxina recombinante	61
8.5 Determinación del efecto hemolítico del extracto total que contenía la toxina recombinante	64
8.6 Determinación del blanco de unión	64
8.7 Estimación del tamaño de poro formado por el extracto total que contenía la hidralisina recombinante en la membrana de los eritrocitos	65
9. Discusión	67
9.1 Predicciones bioinformáticas sobre la secuencia de la hidralisina recombinante	69
9.2 Inducción de la expresión y purificación de la proteína recombinante PFTma	72
9.3 Detección de la actividad citolítica	74
9.4 Determinación del efecto hemolítico sobre eritrocitos humanos	75
9.5 Determinación del blanco de unión utilizando diferentes lípidos y carbohidratos	77
9.6 Estimación del tamaño de poro formado sobre membranas eritrocitarias	79
10. Conclusiones	81
11. Perspectivas	82
12. Referencias	83

Anexos

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Toxinas formadoras de poros (PFTs) provenientes de medusas	30
2	Secuencias de nucleótidos obtenidas del análisis de secuenciación	51
3	Secuencias de aminoácidos predichas utilizando ExPASy translate	53
4	Resultados del análisis de estabilidad con I-Mutant 2.0	59
5	Cuantificación de proteína total, mediante el método de Bradford, en los lisados de bacterias que produjeron hidralisina	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación del filo Cnidaria	17
2	Representación esquemática de la morfología de los cnidarios	18
3	Organismos representativos del género <i>Millepora</i>	19
4	Representación esquemática de un cnidocito y un nematocisto	22
5	Representación del sistema de administración de las toxinas de los cnidarios	23
6	Representación esquemática del uso de las PFTs para la citólisis dirigida de células cancerígenas	34
7	Representación esquemática del principio de detección de analitos mediante poros de α -hemolisina	36
8	Esquema de un diseño de clonación para la producción de compuestos de interés farmacéutico	38
9	Transcrito que codifica para la PFT de tipo hidralisina encontrado en el transcriptoma de <i>M. alcicornis</i> (Caribe Puertorriqueño)	48
10	Amplicon correspondiente a la secuencia codificante para la hidralisina en gel de agarosa al 0.7%	49
11	Clonas seleccionadas para el análisis de confirmación de la clonación en gel de agarosa al 0.7%	50
12	Análisis de restricción utilizando la enzima BgIII en gel de agarosa al 0.7%	51
13	Alineamiento global de las secuencias de aminoácidos predichas utilizando Clustal Omega	54
14	Mapa del vector de clonación pJET 1.2/EVT_HydMa	54
15	Digestión del vector pJET 1.2/EVT_HydMa y el vector pET-28b utilizando las enzimas de restricción NcoI y XhoI en gel de agarosa al 0.7%	55
16	Primer paso de confirmación de la clonación en gel de agarosa al 0.7%	56

17	Esquema y secuencia de la construcción del vector de expresión pET28bEVT_HydMa	56
18	Mapa del vector de expresión pET28bEVT_HydMa	57
19	Alineamiento global de la secuencia >Hydralis-AA_Ncol-XhoI_N6 contra hidralisinas de cnidarios y bacterias	58
20	SDS-PAGE de los lisados completos en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones nativas	60
21	SDS-PAGE de las fracciones obtenidas después del proceso de purificación, empleando gel de poliacrilamida al 15% en condiciones nativas	61
22	Detección de la actividad citolítica por difusión en pozo en gel de agarosa al 1.5% enriquecido con eritrocitos de humano	62
23	Detección de la actividad citolítica por difusión en pozo de las muestras purificadas en gel de agarosa al 1.5% enriquecido con eritrocitos de humano	63
24	Actividad hemolítica del extracto total que contenía la hidralisina recombinante	64
25	Determinación del posible blanco de unión utilizando diferentes carbohidratos y lípidos de membrana	65
26	Estimación del tamaño de poro mediante el ensayo de protección osmótica utilizando diferentes polietilenglicoles (PEGs)	66

ACRÓNIMOS

ASIC:	Canales iónicos de sodio sensibles al ácido
CDC:	Citolisinas dependientes de colesterol
CxTX:	Toxinas de medusas
DL50:	Dosis letal media
GPI:	Proteínas con anclajes de glicosilfosfatidilinositol
GST:	Glutación-S-transferasa
Hla:	α -hemolisina
HIns:	Hidralisinas
IPTG:	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
KTx:	Toxinas que interaccionan con canales de potasio sensibles a voltaje
LLO:	Listeriolisina
MACPF:	Complejo de ataque a la membrana/familia de perforinas
NaTx:	Toxinas que interaccionan con canales de sodio sensibles a voltaje
PEG:	Polietilenglicol
PFT:	Toxinas formadoras de poro
α-PFT:	Toxinas formadoras de poro de la familia alfa
β-PFT:	Toxinas formadoras de poro de la familia beta
PFTma:	Toxina formadora de poro recombinante
PLA2:	Fosfolipasa A2
cPLA2:	Fosfolipasa A2 citosólica
sPLA2:	Fosfolipasa A2 secretada
SCRiP:	Pequeños péptidos ricos en cisteína
UH50:	Unidad hemolítica media
6xHis:	Etiqueta de hexahistidina

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE.

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



ATENTAMENTE
Q.F.B. JESÚS EDUARDO VEGA TAMAYO

RESUMEN

Millepora alcicornis es un importante organismo constructor de arrecifes en el Caribe Mexicano. Este cnidario es miembro de la familia Milleporidae, la cual incluye a los hidrocorales conocidos comúnmente como “corales de fuego”, debido a que producen lesiones similares a quemaduras. Los agentes causales de dichos efectos son principalmente toxinas de naturaleza proteica sintetizadas para la captura de presas y defensa, entre las que se encuentran algunas toxinas formadoras de poros (PFTs,). Las PFTs tienen un gran potencial para su aplicación en las áreas de la biotecnología, la farmacia y la agricultura. A la fecha, se desconoce la estructura química y el mecanismo de acción de las toxinas producidas por los "corales de fuego", lo cual ha impedido el diseño de terapias adecuadas para tratar la toxicidad ocasionada por estos organismos. En un estudio previo, mediante una estrategia bioinformática, nuestro grupo de trabajo detectó en el transcriptoma de *M. alcicornis* tres transcritos que codifican para citolisinas y un transcrito que codifica para una PFT. En este contexto, la secuencia codificante para una hidralisina se clonó en el vector pET28b entre los sitios de restricción NcoI y XhoI. Posteriormente, el vector se transformó en bacterias *Escherichia coli* C41 (DE3) competentes para su expresión. El análisis, mediante SDS-PAGE, del extracto conteniendo las proteínas expresadas por vía recombinante reveló la presencia de una banda a 27 kDa que concuerda con el peso molecular predicho de las hidralisinas. La determinación de la actividad hemolítica reveló que el extracto total que contenía la toxina recombinante provocaba hemólisis en eritrocitos de humano con una UH_{50} igual a $17.5 \pm 1.015 \mu\text{g/mL}$. No obstante, las pruebas para la determinación del blanco de unión y estimación del tamaño de poro no mostraron resultados concluyentes debido a la alta complejidad del extracto total. En conclusión, los resultados de este trabajo mostraron que es posible expresar en la cepa de *E. coli* C41(DE3) la PFT de tipo hidralisina identificada en el transcriptoma de *M. alcicornis*. Sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales para obtener resultados contundentes, que a la postre, ayuden a proponer a la hidralisina como un prototipo estructural para el desarrollo de herramientas biotecnológicas y/o farmacológicas.

Palabras clave: *M. alcicornis*, hidrocoral, toxinas formadoras de poros, clonación, expresión heteróloga

ABSTRACT

Millepora alcicornis is an important reef-building organism in the Mexican Caribbean. This cnidarian is a member of the Milleporidae family, which includes hydrocorals commonly known as "fire corals", since they produce burn-like injuries in human skin. The molecules that cause these effects are mainly protein toxins synthesized for prey capture and defense. Among the main cnidarian toxins are pore-forming toxins (PFTs), which have a great potential for application in the biotechnological, pharmaceutical, and agricultural areas. To date, the chemical structure and the mechanism of action of the toxins produced by "fire corals" are unknown and therefore, to date there is no effective treatment to relieve the symptoms of intoxication caused by hydrocorals. In a previous study, using a bioinformatics strategy, our research group detected three transcripts encoding cytolysins and one transcript encoding a PFT in the *M. alcicornis* transcriptome. In the present work, the coding sequence for a hydralysin was cloned into the pET28b vector between the NcoI and XhoI restriction sites. Subsequently, the vector was transformed into competent *Escherichia coli* C41 (DE3) for its expression. SDS-PAGE analysis of the extract containing the recombinant proteins revealed the presence of a band at 27 kDa that is consistent with the predicted molecular weight of hydralysins. Determination of hemolytic activity indicated that the total extract containing the recombinant toxin caused hemolysis in human erythrocytes with a UH_{50} value of $17.5 \pm 1.015 \mu\text{g/mL}$. However, the assays carried out for determining the molecular binding target and the pore size did not show conclusive results due to the high complexity of the total extract. In conclusion, the results of this work showed that the hydralysin-type PFT identified in the *M. alcicornis* transcriptome can be expressed in *E. coli* C41(DE3). However, it is necessary to carry out additional experiments to obtain conclusive results that ultimately help to propose hydralysin as a structural prototype for the development of biotechnological and/or pharmacological tools.

Keywords: *M. alcicornis*, hydrocoral, pore-forming toxins, cloning, heterologous expression

1. INTRODUCCIÓN

Los arrecifes de coral son ecosistemas que comprenden una amplia biodiversidad, ya que proveen sustento a la cuarta parte de todas las especies marinas. Los organismos que habitan en los arrecifes coralinos dependen de su existencia para obtener alimento y refugio. Por otro lado, estos ecosistemas acuáticos albergan una amplia gama de organismos, los cuales representan una fuente potencial valiosa de moléculas bioactivas (Li et al., 2018; Thampi et al., 2018). La formación de los arrecifes de coral depende, en primer lugar, de corales escleractinios (clase Anthozoa), en tanto que los hidrocorales (clase Hydrozoa) son las segundas especies formadoras de arrecifes más importantes en la construcción de estructuras arrecifales (Ben-Ari et al., 2018). Los hidrocorales del género *Millepora* comúnmente se identifican como “corales de fuego”, debido a que al entrar en contacto con la piel humana pueden causar lesiones dolorosas similares a quemaduras (Rojas-Molina et al., 2012). Por otra parte, los cnidarios formadores de arrecifes mantienen asociaciones simbióticas con algas fotosintéticas de la familia Symbiodiniaceae, denominadas comúnmente como zooxantelas, las cuales les proveen a sus hospedantes nutrientes derivados de la fotosíntesis. Sin embargo, se conoce que los cnidarios también son capaces de obtener alimento por medio de la vía heterótrofa, esto es posible gracias a su capacidad de sintetizar toxinas, principalmente de naturaleza proteica, que son utilizadas para la captura de presas y/o defensa contra depredadores (Fransolet et al., 2012; Barott et al., 2015). El espectro completo de las toxinas provenientes de cnidarios aún no se conoce en su totalidad, pero comprende una gran variedad de componentes, tales como las toxinas formadoras de poros (PFTs, por sus siglas en inglés). Este tipo de toxinas citolíticas se han identificado en todas las clases del filo Cnidaria, incluidas medusas, anémonas de mar e hidroides. No obstante, la función de las PFT de cnidarios no se ha estudiado detalladamente y, por lo tanto, la mejor manera de diferenciarlas es con base en su peso molecular. Siguiendo este criterio, las PFTs se han clasificado en: actinoporinas (20 – 22 kDa), toxinas relacionadas con hidralisinas (27 – 31 kDa), toxinas de medusas (42 – 46 kDa) y complejo de ataque de membrana/familia de perforinas (MACPF) (60 kDa) (Yap y Hwang, 2018). Las PFTs exhiben una estructura dual, la primera de ellas es monomérica y es estable

en agua y se encarga de unirse a los receptores en la célula diana. Mientras que la segunda estructura consta de moléculas oligoméricas encargadas de formar poros integrales en las membranas celulares. En general, estas toxinas actúan vía penetración en la membrana de la célula diana permitiendo la difusión de pequeñas moléculas y solutos que conducen al desequilibrio osmótico y a la posterior lisis celular (Yap y Hwang, 2018; Ostolaza et al., 2019). En la actualidad, se ha descrito que estas toxinas pueden ser empleadas para múltiples propósitos. Por ejemplo, para el diseño de marcadores para el reconocimiento específico de elementos moleculares, el desarrollo de sistemas de liberación intracelular de fármacos e inclusive como biosensores capaces de acoplarse a métodos analíticos para la identificación, cuantificación y caracterización de moléculas individuales (Parker y Feil, 2005; Majd et al., 2010; Xu et al., 2015; Kasianowicz et al., 2016). En este sentido, se puede considerar que el hidrocoral *M. alcicornis* representa una fuente valiosa de toxinas que pueden ser utilizadas para el desarrollo de medicamentos y herramientas biotecnológicas y/o de investigación. Al ser especies protegidas no es posible recolectar grandes cantidades de estos organismos para llevar a cabo estudios de purificación y caracterización estructural de alguna de las toxinas sintetizadas por las especies del género *Millepora* y consecuentemente tampoco se conoce de manera específica, su mecanismo de acción. Asimismo, no se ha llevado a cabo la expresión heteróloga de alguna toxina proveniente de organismos de este género. En un estudio zimográfico, realizado por nuestro grupo de trabajo, se encontró la presencia de dos tipos de hemolisinas en el extracto acuoso de *M. alcicornis*, unas de ellas tenían pesos moleculares en un rango de 20 a 30 kDa y presentaban actividad de PLA2. En tanto que otras, tenían un peso molecular aproximado de 200 kDa y no inducían este efecto enzimático, lo cual sugirió la presencia de toxinas formadoras de poros, algunas de las cuales podrían ser citolisinas poliméricas (Hernández-Matehuala et al., 2015). En otro estudio más reciente, nuestro grupo de trabajo realizó un análisis bioinformático sobre el transcriptoma de un espécimen de *M. alcicornis* recolectado en el Caribe Mexicano. Dicho estudio permitió la identificación de un transcrito que codifica para una hidralisina con similitud a una toxina presente en *Hydra vulgaris*. Posteriormente, en colaboración con el Dr. Ataulfo Martínez Torres y su grupo de investigación del

Instituto de Neurobiología de la UNAM, se logró detectar la presencia de un transcrito que codifica para una PFT de tipo hidralisina en el transcriptoma de *M. alcicornis*. En este contexto, el presente trabajo de tesis tuvo por objetivo sintetizar un gen que codifique para la toxina formadora de poros (PFT) previamente detectada en el transcriptoma del “coral de fuego” *M. alcicornis* a fin de caracterizar su estructura primaria, determinar su blanco de unión y estimar el tamaño del poro que forma en las membranas eritrocitarias.

2. ANTECEDENTES

2.1 Filo Cnidaria

El filo Cnidaria es un grupo formado por más de 13,000 especies vivas de animales acuáticos, que se encuentran distribuidos por todo el mundo en ambientes oceánicos poco profundos (Park et al., 2012). Estos organismos son diploblásticos, es decir, sólo cuentan con dos capas celulares: el epitelio endodérmico que funciona como una barrera química, mientras que el epitelio ectodérmico representa una barrera fisicoquímica (Stabili et al., 2018). Por otro lado, el filo Cnidaria se encuentra clasificado filogenéticamente en dos grandes grupos: el subfilo Anthozoa (Hexacorallia y Octacorallia) y el subfilo Medusozoa (Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa, Staurozoa y Polipozoa) (Chang et al., 2015; Stabili et al., 2018). No obstante, los estudios taxonómicos recientes han demostrado la existencia de una clase de animales parásitos microscópicos, conocidos como mixozoos, que se han clasificado dentro del filo Cnidaria como un tercer subfilo llamado Endocnidozoa el cual se compone únicamente de la clase Myxozoa (Figura 1) (Chang et al., 2015).

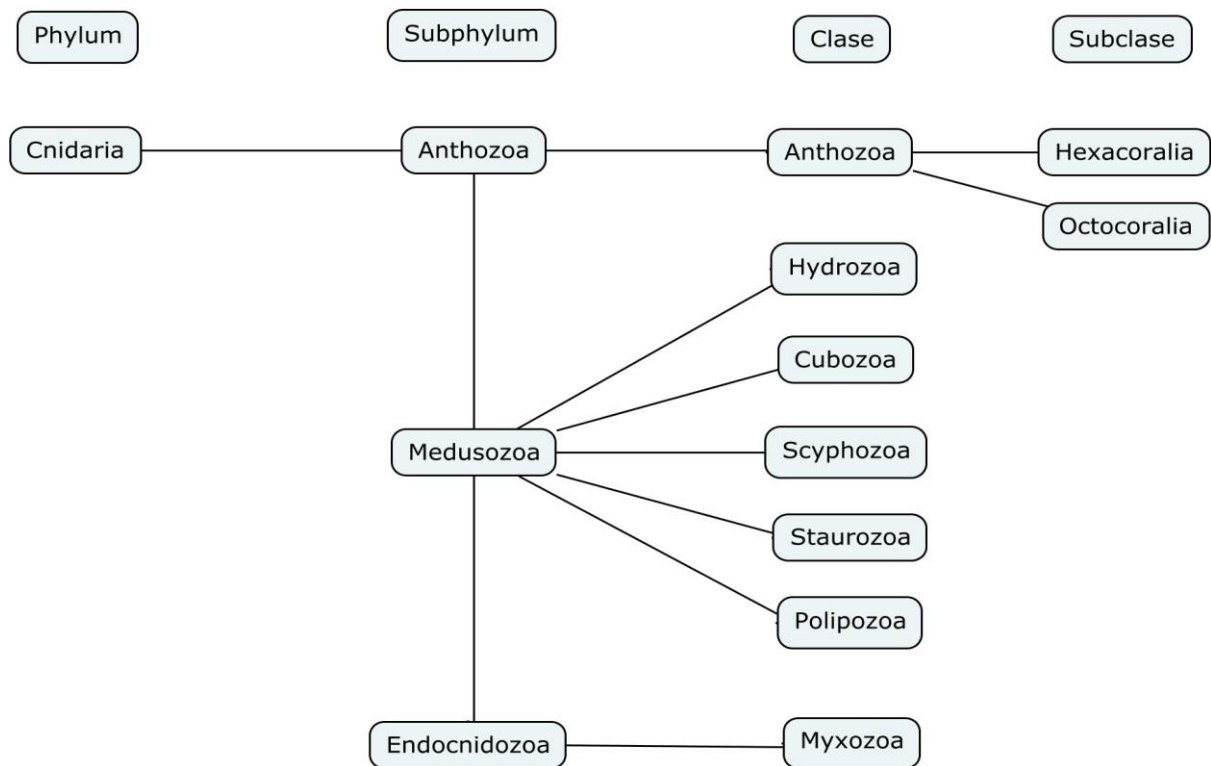


Figura 1. Clasificación del filo Cnidaria (Modificado de Chang et al., 2015)

Los miembros que pertenecen a este filo en su mayoría son depredadores, sin embargo, hay ciertas especies que se alimentan de carroña o que pueden obtener nutrientes por vía intracelular, al llevar a cabo asociaciones simbióticas con algas fotosintéticas pertenecientes a la familia Symbiodiniaceae, conocidas comúnmente como zooxantelas (Allemand y Furla, 2018) Los cnidarios exhiben dos tipos de ciclos de vida, en el caso de las especies pertenecientes al subfilo Anthozoa, el ciclo de vida se constituye por tres fases: embrión, larva y pólipo. En cambio, en las especies que pertenecen al subfilo Medusozoa, el ciclo de vida está compuesto por cuatro fases: embrión, larva, pólipo y medusa (Figura 2), siendo esta última forma la que posee actividad sexual (Fautin, 2002). Adicionalmente, los cnidarios son el grupo más antiguo de animales venenosos existentes y reciben su nombre debido a la presencia de células urticantes denominadas cnidocitos, las cuales se encuentran conectadas a células y neuronas de soporte. Estas células especializadas se encargan de la captura de las presas y de la defensa contra los depredadores. Además, los cnidocitos contienen orgánulos especializados denominados nematocistos, en los cuales se almacenan las toxinas que son liberadas tras un estímulo químico o mecánico (Jaimes-Becerra et al., 2019).

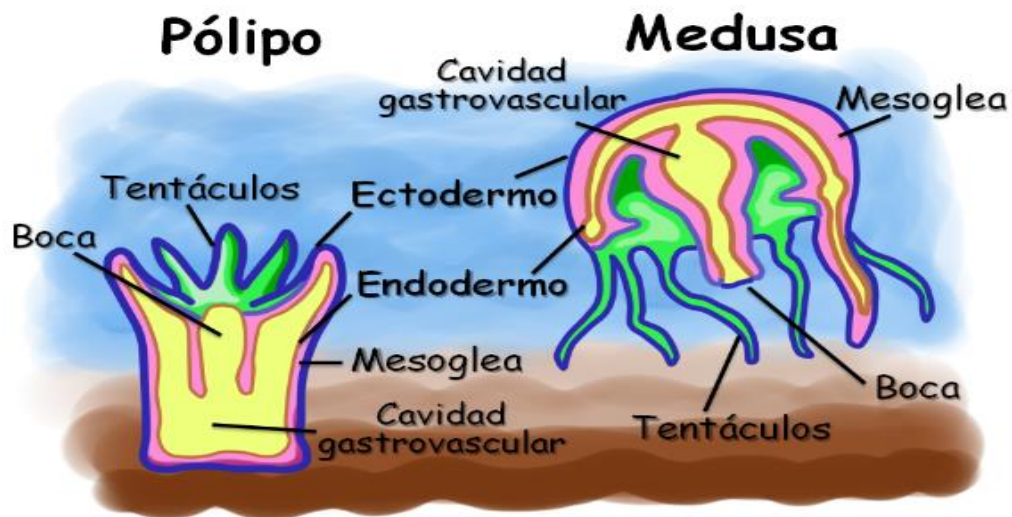


Figura 2. Representación esquemática de la morfología de los cnidarios (Modificado de Curtis y Schnek et al., 2006).

2.2 Género *Millepora*: “corales de fuego”

Entre las diferentes clases que conforman al filo Cnidaria se encuentra la clase Hydrozoa, la cual abarca a los organismos del género *Millepora*. Estos organismos (millepóridos) son hidrocorales coloniales cuyos exoesqueletos calcáreos poseen una forma incrustante o vertical. Los millepóridos se pueden localizar en ambientes acuáticos tropicales y subtropicales poco profundos, además, se encuentran entre los animales más destacados en la formación de estructuras arrecifales. De hecho, los hidrocorales son los segundos organismos formadores de arrecifes más comunes, sólo por debajo de los corales escleractinios (Ruiz-Ramos et al., 2014; Dubé et al., 2018). Las colonias de *Millepora* se pueden presentar en diferentes formas y pueden alcanzar los 60 cm de altura. Además, se les puede encontrar como incrustaciones sobre corales u otras superficies duras y suelen presentar diferentes tonalidades debido a las algas dinoflageladas con las cuales establecen asociaciones (Figura 3).



Figura 3. Organismos representativos del género *Millepora*: a) *Millepora dichotoma* b) *Millepora alcicornis* c) *Millepora complanata* (Ortiz-Sotomayor, 2005).

Otro aspecto interesante sobre los cnidarios del género *Millepora* es que no son corales verdaderos, sino hidrozoos más estrechamente relacionados con las medusas y las ortigas marinas, que es bien sabido que son animales carnívoros. Adicionalmente, estos cnidarios poseen cnidocitos, los cuales contienen a los nematocistos. Éstos se encargan de almacenar una compleja mezcla de compuestos bioactivos y toxinas que son utilizadas para cazar a sus presas, o bien, como defensa para ahuyentar a los depredadores. Además, se conoce que los nematocistos pueden perforar la piel de los humanos inyectando su veneno y

produciendo lesiones cutáneas muy semejantes a quemaduras, es por esto que son conocidos como “corales de fuego”. Lo que sucede en estos casos es que existe un contacto directo entre la piel con el coral de fuego, lo cual desencadena una reacción punzante como consecuencia de la liberación de innumerables hilos de púas microscópicas contenidos dentro de los nematocistos, que se encuentran en la superficie del animal. Las lesiones provocadas inmediatamente después de entrar en contacto con el hidrocoral inducen irritación, ardor y un dolor severo correspondiente a la dimensión de la superficie cutánea que estuvo en contacto con el cnidario y la sensibilidad del lugar de contacto (Hernández-Matehuala et al., 2015; Bosch et al., 2017; Kropp et al., 2018).

Existen pocos reportes relacionados con el aislamiento y caracterización de las toxinas producidas por las especies del género *Millepora*. En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha abordado el estudio bioquímico, toxicológico y farmacológico de dos especies de este género: *M. complanata* y *M. alcicornis*. Por ejemplo, en un estudio realizado sobre el extracto acuoso obtenido de *M. complanata* se detectó la presencia de proteínas que poseen un rango de peso molecular entre 17 a 44 kDa y otros péptidos pequeños menores de 1.8 kDa, los cuales estimulan las contracciones en íleon aislado de cobayo, presumiblemente por un mecanismo que involucra la entrada de calcio (Ca^{+2}) hacia el interior de las células del músculo liso intestinal (Rojas-Molina et al., 2012). Adicionalmente, se demostró que el extracto acuoso de *M. complanata*, al ser suministrado vía intravenosa, induce fuertes convulsiones y la muerte en ratones en menos de un minuto, con una dosis letal media (DL50) de 4.62 µg de proteína/g de peso. Además, se encontró que dosis menores a la DL50 causaron daños histopatológicos en el tejido pulmonar y renal asociado a la presencia de citolisinas. Adicionalmente, el análisis cromatográfico del extracto acuoso de *M. complanata* permitió la purificación de una proteína de 61 kDa con efecto vasoconstrictor. También fueron detectados otros compuestos de naturaleza no proteica que inducen letalidad en ratones (García-Arredondo et al., 2015). Por otra parte, el extracto acuoso preparado a partir de *M. alcicornis*, administrado por vía intravenosa, fue letal para los ratones con una DL50 de 17 µg de proteína/g, causando daños histopatológicos en riñones, hígado y pulmones. Se demostró también que dicho extracto contiene dos tipos de hemolisinas, unas

presentan pesos moleculares entre 28 y 30 kDa y poseen actividad de PLA2. En cambio, las otras presentan pesos moleculares de aproximadamente 200 kDa, que no presentan actividad de PLA2 (Hernández-Matehuala et al., 2015).

Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo realizó un análisis bioinformático sobre el transcriptoma de un espécimen de *M. alcicornis* recolectado en el Caribe Mexicano en noviembre del 2016 con el fin de identificar los transcritos asociados con la síntesis de toxinas en dicho organismo. Se lograron identificar 22 transcritos asociados con la síntesis de toxinas, de los cuales 11 transcritos codificaron para toxinas previamente reportadas, entre las que se encontraron: fosfolipasas A2 y B, proteasas, fosfodiesterasas, neurotoxinas que interaccionan con canales iónicos, pequeños péptidos ricos en cisteína (SCRISP), toxinas similares a la trombina, activadores del plasminógeno y toxinas que afectan la liberación de neurotransmisores. Además, se identificaron 3 transcritos correspondientes a toxinas con actividad citolítica, destacando la presencia de un transcrito que codifica para una hidralisina con similitud a la toxina presente en *Hydra vulgaris* (No. acceso WP_094166315.1). Adicionalmente, el Dr. Ataulfo Martínez Torres y su grupo de investigación del Instituto de Neurobiología de la UNAM, lograron detectar la presencia de un transcrito que codifica para una PFT de tipo hidralisina en el transcriptoma de un espécimen de *M. alcicornis* recolectado en el Caribe en la zona de Puerto Rico.

2.3 Células en las cuales se sintetizan las toxinas de los cnidarios

Las células punzantes o cnidocitos representan una característica evolutiva que define a los miembros del filo Cnidaria. Este tipo de células pueden variar con respecto a su morfología y cumplen funciones especializadas relacionadas con atrapar, someter y digerir presas, así como para disuadir y repeler depredadores y competidores (Orts et al., 2013; Jouiaei et al., et al., 2015a). Además, se encuentran distribuidas en varias partes del cuerpo del cnidario y contienen a los cnidocistos que, como ya se mencionó anteriormente, son los organelos que almacenan las mezclas de compuestos bioactivos y toxinas. Los cnidocistos se conforman por un túbulo hueco eversible que está enrollado y en algunas ocasiones posee espinas. (Figura 4). Estos orgánulos que se encuentran en los cnidocitos (cnidoblastos) son

secretados desde el aparato de Golgi. Los cnidocistos sufren diversas modificaciones estructurales en la matriz extracelular antes de migrar por completo a la superficie del tentáculo (Beckmann y Özbek, 2012).

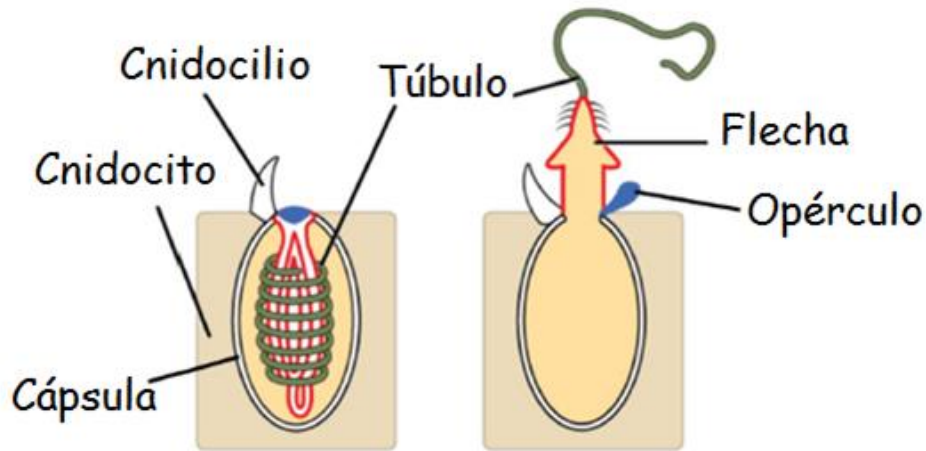


Figura 4. Representación esquemática de un cnidocito y un nematocisto (Modificado de Özbek, 2012).

Los cnidocistos se clasifican en tres tipos: nematocistos, espirocistos y pticocistos (Jouiaei et al., 2015a). Los nematocistos se encargan de la administración del veneno en el organismo objetivo. Esta clase de cnidocistos se encuentra en todos los cnidarios y son morfológica y funcionalmente el grupo más diverso de cnidocistos. Además, son el arma principal para capturar presas, repeler depredadores y son una forma útil de competir por el espacio en los arrecifes. Aunque los nematocistos se encuentran de manera abundante en los tentáculos, también se pueden presentar en el exterior de las campanas, en brazos orales e inclusive en la cavidad gastrovascular (Americus et al., 2020). En cambio, los espirocistos están presentes en la mayoría de los miembros de la clase Anthozoa y no presentan toxinas. La pared de la cápsula del espirocisto es delgada mientras que, el tubo evertido está doblado de manera helicoidal. Además, el tubo carece de espinas, pero contiene sustancias hidrosópicas adherentes que inmovilizan mecánicamente a la presa facilitando su captura. Por otro lado, los pticocistos son propios de la clase Anthozoa y subclase Hexacoralia, al igual que los espirocistos, estos cnidocistos carecen de espinas y tienen una función adhesiva que es útil para

sujetar a las presas; aunque también son usados para construir el tubo en el que viven este tipo de organismos (Özbek et al., 2009; Doonan et al., 2019). Aunque los nematocistos representan al grupo más diverso y estudiado de cnidocistos, aún no se comprende en su totalidad su mecanismo de descarga en respuesta a estímulos externos (mecánicos y químicos). Sin embargo, se cree que la presión osmótica del líquido intracápsular aumenta temporalmente como resultado de la exposición de los cnidos a la solución externa y la posterior exocitosis de cationes de la cápsula. Estas diferencias de presión osmótica a través de la pared de la cápsula se mantienen hasta el punto de que la presión intracápsular existente supera el valor umbral crítico y desencadena la descarga del nematocisto. El veneno que se encuentra en la superficie interna del túbulo invertido que, durante la descarga, se evierte de manera que el exterior ahora queda expuesto y es inyectado en la presa. Esto hace que el interior del túbulo permanezca contiguo al interior de la cápsula y el contenido del nematocisto se expulsa (Figura 5) (Özbek et al., 2009; Jouiaei et al., 2015a).

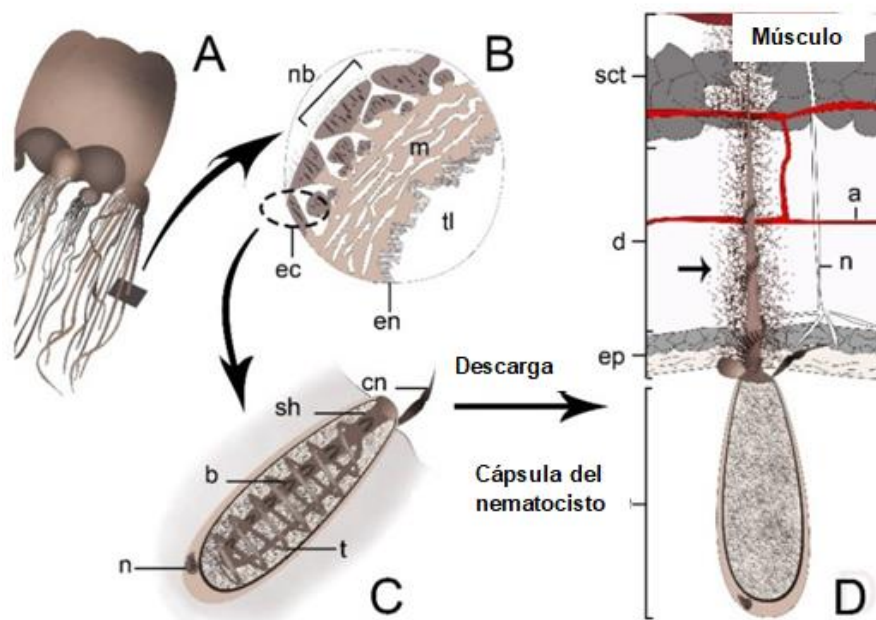


Figura 5. Representación del sistema de administración de las toxinas de los cnidarios (Modificado de Jouiaei et al., 2015).

2.4 Toxinas en los cnidarios

Los cnidarios se caracterizan por ser especies animales sumamente venenosas, razón por la cual numerosos estudios analíticos y observaciones clínicas han evidenciado la diversidad toxicológica de los venenos que sintetizan (Fry et al., 2009; Jouiaei et al., 2015a). El gran arsenal toxicológico de los miembros del filo Cnidaria incluye aminas biogénicas de bajo peso molecular (serotonina, histamina, budonosina y caissarona), neurotoxinas peptídicas (moduladoras de canales iónicos, péptidos ricos en cisteína, entre otras), así como proteínas de alto peso molecular con actividad enzimática o de formación de poros en las membranas celulares (Lee et al., 2011; Jouiaei et al., 2015b; Frazão et al., 2017). Se ha demostrado que las toxinas que componen los venenos de los cnidarios se producen generalmente como pre-toxinas y algunas de ellas son similares a toxinas producidas por otros animales venenosos (Brinkman et al., 2015).

2.4.1 Enzimas

2.4.1.1 Fosfolipasa A2 (PLA2)

La superfamilia de las fosfolipasas A2 se encuentra ampliamente distribuida en diferentes formas de vida como animales, plantas, bacterias, hongos, entre otros (Choudhary et al., 2019). Además, se han caracterizado dos grupos principales de PLA2s: el primero comprende a las fosfolipasas citosólicas de 80 – 120 kDa (cPLA2) que están implicadas en el metabolismo intracelular del ácido araquidónico; y el segundo se conforma por las fosfolipasas de secreción de 13 – 19 kDa (sPAL2) (Cuevas-Cruz et al., 2019). Estas últimas tienen como objetivo la hidrólisis del enlace acilo *sn*-2 de los glicerofosfolípidos y están implicadas en la patogenia de diversos procesos inflamatorios y tumores, así como en la toxicidad del veneno de diversos animales (Hariprasad et al., 2013; Cuevas-Cruz et al., 2019). Adicionalmente, las sPLA2 han presentado neurotoxicidad central cuando se agregan a cultivos de células neuronales o durante la inyección intracerebrovascular en animales (Montecucco et al., 2008; de Carvalho et al., 2014). Se ha detectado la presencia de PLA2s en los venenos de cnidarios de los subfilos Anthozoa, Schyphozoa, Hydrozoa y Cubozoa. En estos organismos, las PLA2s desempeñan

funciones de defensa e inmovilización, digestión de presas y actividad hemolítica (Jouiaei et al., 2015a; Lee y Bae, 2016). Adicionalmente, Cuevas-Cruz et al. lograron aislar, purificar y caracterizar una sPLA2 proveniente de *Palythoa carbaeorum*, esta toxina mostró similitud con el dominio neurotóxico de otras sPLA2 provenientes de cnidarios (Cuevas-Cruz et al., 2019).

2.4.1.2 Metaloproteasas

Las metaloproteasas son componentes importantes del veneno de animales terrestres. Estas enzimas inducen hemorragia y necrosis al degradar la matriz extracelular y prevenir la formación de coágulos sanguíneos. Por lo tanto, promueven el envenenamiento al permitir la difusión de otros componentes tóxicos del veneno (Hernández-Elizárraga et al., 2019). Estas funciones comúnmente se asocian con varios de los síntomas recurrentes de las picaduras de animales venenosos, tales como: daño cutáneo, edema, formación de ampollas, mionecrosis e inflamación. Además, se han identificado metaloproteasas contenidas en el veneno de cnidarios de cuerpo blando como *Podocorune cornea*, *Olindias sambaquiensis*, *Nemopilema nomurai*, *Stomolophus meleagris* y *Chironex fleckeri* (Li et al., 2014; Jouiaei et al., 2015b). Un estudio realizado por Lee et al. en el año 2011, reveló que las metaloproteasas de medusas presentan efectos proteolíticos, actividades gelatinolíticas, caseinolíticas y fibrinolíticas (Lee et al., 2011). Otro estudio realizado en la anémona de mar *Nematostella vectensis* reveló la presencia de una zinc metaloproteasa de la familia de las astacinas. Además, se encontró que esta toxina se expresaba tanto en células glandulares, como en células urticantes (Moran et al., 2013). En nuestro grupo de investigación se detectó la presencia de una proteína que mostró homología con una metaloproteasa 5 similar a la astacina en el proteoma soluble de *M. complanata*. Esta toxina es una zinc-metaloproteasa proveniente de la araña *Loxosceles gaucho*, la cual provoca la muerte de las células endoteliales y la degradación del fibrinógeno, fibronectina y gelatina (Hernández-Elizárraga et al., 2019).

2.4.2 Neurotoxinas

2.4.2.1 Toxinas que modulan canales de sodio dependientes de voltaje (NaTx)

Estas toxinas generalmente se unen a canales de sodio dependientes de voltaje, resultando en una liberación considerable de neurotransmisores en las sinapsis (Moran et al., 2009). Algunos estudios han demostrado que los aminoácidos básicos que contienen las toxinas interaccionan, mediante uniones electrostáticas, con aminoácidos ácidos localizados en el sitio 3 del poro del canal, permitiendo que el segmento S4 sea bloqueado, lo que inhibe los cambios conformacionales del canal que son necesarios para su inactivación rápida (Catterall et al., 2007). Estas toxinas se dividen en 3 grupos: 1) las NaTx tipo I, 2) las NaTx tipo II, que presentan una gran similitud en su secuencia, además, comparten la misma función y 3) las NaTx tipo III, las cuales presentan homología parcial con los otros dos tipos de NaTx y poseen un mecanismo de acción similar. Estas toxinas son péptidos cortos, de aproximadamente 30 aminoácidos de largo que han mostrado tener una actividad similar al resto de las toxinas de los tipos de NaTx (Jouiaei et al., 2015b).

2.4.2.2 Toxinas que modulan canales de potasio dependientes de voltaje (KTx)

Las toxinas de cnidarios que interaccionan con canales de potasio dependientes de voltaje presentan cinco grupos divididos, según su similitud de secuencia y afinidad de unión hacia diferentes familias de canales de potasio (Jouiaei et al., 2015a). Las KTx del tipo I inhiben la corriente de potasio a través de canales Kv1 y Kv3, tienen un peso molecular de 4 kDa con presencia de 3 puentes disulfuro. Las KTx del tipo II actúan sobre las proteasas de tripsina y quimiotripsina para inhibir la degradación rápida del veneno, presentan pesos moleculares de 6 kDa y poseen 3 puentes disulfuro (Miagawa et al., 2008; Frazão et al., 2012). Las KTx del tipo III bloquean el canal Kv3.4 perteneciente a los canales Kv que se inactivan rápidamente, éstas tienen un peso molecular de entre 3 – 4 kDa y cuentan con 3 puentes disulfuro. Las KTx del tipo IV son péptidos presentes en la anémona *Stichodactyla haddoni*, las cuales exhiben actividad parálitica en crustáceos y tienen 2 puentes disulfuro (Honma et al., 2008). Por último, están las KTx del tipo V presentes en la anémona *Bunodosoma caissarum*, éstas poseen 4 puentes disulfuro (Orts et al., 2013).

2.4.2.3 Pequeños péptidos ricos en cisteína (SCRiP)

Los pequeños péptidos ricos en cisteína (SCRiP, por sus siglas en inglés) se identificaron originalmente a partir de genes presentes en los corales escleractinios. Anteriormente, se creía que este tipo de péptidos sólo se encontraban involucrados en los procesos de biomineralización de los corales. Sin embargo, se demostró que poseen un dominio muy similar a los dominios miotóxicos básicos presentes en las toxinas crotamínicas de la serpiente de cascabel. Estas observaciones, apoyaron la hipótesis de que los SCRiP podrían representar una nueva clase de toxinas y no sólo proteínas calcificantes como se había pensado anteriormente (Jouiaei et al., 2015c). Un estudio llevado a cabo en larvas de pez cebra, a las cuales se les suministró una inyección de estos péptidos extraídos del coral *Acropora millepora* dio como resultado efectos neurotóxicos graves. Los peces mostraron espasmos y temblores frecuentes, dejaron de reaccionar al tacto y finalmente se paralizaron por completo. Aunque el mecanismo de acción de estos péptidos aún no se comprende en su totalidad, se ha sugerido que su actividad es potente y específica en la modulación de distintos canales iónicos. Por lo tanto, esta clase de toxinas nuevas, representan la primera familia de neurotoxinas peptídicas descritas a partir de corales escleractinios (Jouiaei et al., 2015a).

2.4.2.4 Bloqueadores de canales ASIC y canales TRPV1

Los canales iónicos de sodio sensibles al ácido (ASIC) son expresados en el sistema nervioso periférico. Estos canales se han asociado con dolor durante afecciones patológicas como inflamación e isquemia (Rodrigues et al., 2017). Por ejemplo, en los venenos de las anémonas de mar *Urticina grebelnyi* y *Phymanthus crucifer* se han encontrado dos nuevas toxinas, π -AnmTx Ugr 9a-1 y PhcrTx1, cuyo blanco de acción son los canales ASIC. Estos péptidos están reticulados por dos puentes disulfuro y no poseen homología de secuencia con otros péptidos de tipo neurotoxina de cnidarios (Rodríguez et al., 2014).

Por otro lado, los TRPV1 son canales de cationes no selectivos expresados en el sistema nervioso central y periférico de mamíferos. Estos canales se encargan de iniciar la respuesta neuronal durante estímulos de inflamación, lo que les permite

ser considerados como uno de los desencadenantes moleculares más importantes de la sensación de dolor. En cnidarios, específicamente en la anémona de mar *Heteractis crispa*, se ha detectado la presencia del primer bloqueador peptídico de canales TRPV1 aislado a partir de un cnidario (APHC1). Posteriormente, se aislaron dos péptidos homólogos (APHC2 y APHC3) que actúan sobre los canales TRPV1. Estas nuevas neurotoxinas son modelos prometedores para diseñar una nueva generación de analgésicos (Jouiaei et al., 2015a; Rodrigues et al., 2017).

2.5 Toxinas formadoras de poros (PFTs) en cnidarios

Las toxinas formadoras de poros (PFT) son un componente común en todos los venenos de cnidarios. En general, estas toxinas actúan vía penetración de la membrana de la célula diana permitiendo la difusión de pequeñas moléculas y solutos que conducen al desequilibrio osmótico y la posterior lisis celular (Ostolaza et al., 2019). Las PFT exhiben una estructura dual: (a) una estructura estable en agua que es monomérica y se une a los receptores en la célula diana y (b) una estructura unida a la membrana que consta de moléculas oligoméricas que forman poros integrales en las membranas (Yap y Hwang, 2018). Además, las PFTs de cnidarios se clasifican en dos categorías, según el tipo de estructura secundaria que utilizan para penetrar la membrana: α -PFT, que tienen un contenido alto de α hélices y forman estructuras de barril α -helicoidal, y las β -PFT que son ricas en láminas β y forman poros en forma de barril β (Jouiaei et al., 2015a).

2.5.1 Actinoporinas

Las actinoporinas son una familia multigénica de α -PFT que se sintetizan como una pre-pro-toxina que se procesa enzimáticamente para generar una proteína madura de 170 – 180 aminoácidos, deficiente en residuos de cisteína. Son proteínas básicas de aproximadamente 20 kDa con estructuras primarias y terciarias altamente conservadas (Ramírez-Carreto et al., 2020). Estas toxinas se encargan de mediar diferentes tipos de toxicidad y bioactividad, como paro cardiovascular y respiratorio, hemólisis y efectos citotóxicos. Todas estas reacciones son causadas por la formación de poros (Glasser et al., 2014; Jouiaei et al., 2015a; Tanaka et al., 2017). Una de las características más importantes de estas PFTs es que se unen a la

esfingomielina, la cual es considerada como un receptor específico de las actinoporinas. Estudios realizados con las esticolisinas I y II, y la equinatoxina II, revelaron que la esfingomielina desempeña un papel fundamental en el reconocimiento y permeabilización de las membranas de este tipo de toxinas. Algunos estudios sugieren que las actinoporinas interactúan exclusivamente con membranas ricas en esfingomielina, sin embargo, un estudio sobre la esticolisina II de *Stichodactyla helianthus* evidenció que algunos tipos de actinoporinas también pueden interactuar con membranas ricas en fosfatidilcolina (García-Ortega et al., 2011; Jouiaei et al., 2015a). El mecanismo de penetración de la membrana que emplean las actinoporinas involucra tres pasos: (i) inicialmente se da la unión a la membrana diana, que se logra mediante un bucle expuesto rico en aminoácidos aromáticos; (ii) posteriormente, se da la orientación lateral y consecuente oligomerización por un sitio de unión de fosfolipina; por último (iii) se da la inserción en la membrana lipídica de un segmento anfifílico de hélice α en la porción N-terminal (García-Ortega et al., 2011). Este segmento N-terminal de las actinoporinas es esencial para la permeabilización de la membrana, debido a que aporta la flexibilidad necesaria para que este tipo de toxinas se trasladen a la interfaz lípido-agua y así llevar a cabo el mecanismo de formación de poros. Estudios de mutagénesis han revelado que la adición de residuos de cisteína al segmento N-terminal de las actinoporinas produce restricciones en la flexibilidad, dando como resultado la inactivación de la toxina (Ramírez-Carretero et al., 2020). Además, análisis realizados mediante cristalografía de rayos X y microscopía electrónica han sugerido que, durante la penetración de la membrana, el segmento de la hélice α anfifílica de la porción N-terminal de las actinoporinas se desprende del cuerpo principal y se inserta en la membrana diana para producir poros con un diámetro de 1 – 3 nm (Glasser et al., 2014; Tanaka et al., 2017).

2.5.2 Toxinas de medusas (CxTX)

Las medusas se encuentran dentro del filo Cnidaria, estos animales nadan libremente y representan a las clases Scyphozoa, Cubozoa e Hydrozoa. En los venenos de estos organismos se han encontrado PFTs que constituyen las toxinas más potentes y de acción más rápida de todo el filo Cnidaria (Frazão y Antunes,

2016). Son proteínas básicas con un peso molecular de 40 a 46 kDa, que contienen dominios tanto α como β . Originalmente, esta familia de toxinas se encontró en *Carybdea alata* como la CaTx-A / B, y posteriormente se identificó en todos los organismos de la clase Cubozoa. No obstante, con el paso del tiempo se identificaron homólogos de CaTx en cnidarios de las clases Scyphozoa, Hydrozoa y Anthozoa, lo que sugiere un origen evolutivo común en estas toxinas (Brinkman et al., 2015; Jouiaei et al., 2015a). El mecanismo de acción de estas toxinas aún no se establece en su totalidad, sin embargo, se ha sugerido que la formación de poros implica la oligomerización de varias hélices α anfífilas e hidrófobas en la región N-terminal de la toxina, provocando la distorsión de la membrana plasmática y la posterior muerte celular. Este mecanismo de inserción es congruente con el tamaño de los poros de 12 nm (interno) y 25 nm (externo) de diámetro formados por las toxinas CxTX (Yanagihara y Wilcox, 2017). En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios destinados a determinar la composición del veneno de las medusas de la clase Cubozoa. En el Cuadro 1, se muestran las PFTs identificadas hasta la fecha en cubozoos.

Cuadro 1. Toxinas formadoras de poros (PFTs) provenientes de medusas.

Especie	Toxina	Referencia
<i>Carybdea alata</i>	CaTX-A	Nagai et al., 2000
	CaTX-B	
<i>Carybdea rastoni</i>	CrTX-A	Nagai et al., 2000
	CrTX-B	
<i>Chironex fleckeri</i>	CfTX-1	Brinkman y
	CfTX-2	Burnell, 2007;
	CfTX-A	Brinkman et al.,
	CfTX-B	2015
<i>Chiropsalmus quadrigatus</i>	CqTX-A	Nagai et al., 2002
<i>Cyanea capillata</i>	CcTX-1	Lassen et al., 2011

2.5.3 Hidralisinas

Además de las PFTs mencionadas anteriormente, en los últimos años se ha reportado la presencia de una nueva familia de β -PFTs secretadas por las células endodérmicas digestivas de la hidra verde *Chlorohydra viridissima*. Esta nueva familia de PFTs posee una similitud importante con la aerolisina, la cual es una toxina que pertenece al grupo de las β -PFT. La aerolisina es una toxina de origen bacteriano que desempeña una función citolítica al formar poros. Esta toxina formadora de poros heptamérica puede insertarse espontáneamente en las bicapas lipídicas para formar un poro a nanoescala, lo cual es importante para desempeñar su papel durante un proceso de infección microbiana (Wang et al., 2018). Las hidralisinas (HIns) son toxinas no nematocísticas, es decir, que su origen no se encuentra en los nematocistos, además son los miembros más estudiados de la familia de las PFTs similares a aerolisina en cnidarios (Jouiaei et al., 2015a). Sus ortólogos se pueden encontrar en varias especies de hidra y se ha demostrado que las HIns exhiben actividad paralítica, citolítica y hemolítica, pero no tienen actividad proteolítica, ni de fosfolipasa. Adicionalmente, la actividad citotóxica de estas toxinas es selectiva del tipo de célula, lisando eficazmente células de insectos, pero no así de mamíferos (Sher et al., 2005; Yap y Hwang, 2018). Dado que las HIns no reconocen los lípidos o carbohidratos de la membrana de los mamíferos, se cree que interactúan con un lípido o carbohidrato análogo o inclusive con una proteína membranal específica. Por otro lado, el hecho de que estas toxinas no se unen a las membranas celulares de las hidras, sugiere que su función está determinada por su sitio de unión específico (Podobnik y Anderluh, 2017). Por otro lado, las HIns forman poros estrechos con un radio aproximado de 1.2 nm, similares al de otras toxinas similares a la aerolisina. De hecho, la alineación de múltiples secuencias reveló que las HIns comparten un conjunto de secuencias conservadas de toxinas formadoras de poros de la familia de las aerolisinas. La región que presenta similitud en la secuencia de aminoácidos contiene un motivo que muestra un patrón alterno de residuos hidrófobos, que está flanqueado por dos motivos ricos en residuos de serina o treonina, correspondiente al dominio transmembranal de la familia de las aerolisinas. Además de compartir características estructurales con las aerolisinas,

las Hlns también comparten similitud estructural con otras toxinas formadoras de poros como: la α -toxina de *Clostridium* spp., la citolisina LSL del hongo *Laetiporus sulphureus* y la parasporina-2 de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Podobnik y Anderluh, 2017; Yap y Hwang, 2018). Se ha demostrado que la hidralisina proveniente de la hidra *Chlorohydra viridissima* se produce en grandes cantidades como una potente toxina, que no forma parte del veneno de dicho organismo. Además, los experimentos de localización revelaron que la expresión de esta toxina se da en la base de las células digestivas endodérmicas que recubren la cavidad gastrovascular. Por otra parte, estudios inmunohistoquímicos demostraron que las Hlns maduras se encuentran, tanto en la región basal, como en la apical de estas células. Esta translocación desde su sitio de traducción hacia la parte apical de las células de la cavidad gastrovascular sugiere que dichas proteínas desempeñan un papel importante en la digestión de las presas (Sher et al., 2008; Podobnik y Anderluh, 2017). Para demostrar esto, se realizaron experimentos con nauplios de *Artemia salina*, en los cuales se encontró que la toxina se secretaba inmediatamente después de la ingestión de la presa, uniéndose a las membranas de la presa para llevar a cabo la digestión de la misma. A concentraciones biológicamente relevantes, las Hlns se unen a las membranas de las presas y forman poros, lisan las células y desintegran el tejido (Sher et al., 2008).

2.6 Aplicaciones de las PFTs

Las moléculas formadoras de poros pueden ser: a) péptidos cortos que tienen la capacidad de autoensamblarse hasta formar poros que presentan una selectividad débil hacia iones específicos o b) proteínas grandes que forman parte de canales iónicos (Majd et al., 2010; Ostolaza et al., 2019). En la naturaleza, los nanoporos biológicos desempeñan distintas funciones importantes, tales como: detección de señales biológicas; mecanismos de señalización y comunicación; defensa contra patógenos y transporte de proteínas y nucleótidos a través de las membranas. En los últimos años, ha aumentado el interés en la aplicación de las moléculas que forman poros en las membranas celulares, particularmente, debido a la creciente disponibilidad de información estructural sobre las proteínas de membrana. Se han realizado varios esfuerzos para obtener las estructuras cristalinas de las proteínas

formadoras de poros y comprender los mecanismos moleculares de la formación de los poros. En este contexto, las PFTs ofrecen una amplia gama de aplicaciones en diferentes campos de la ciencia y la tecnología (Majd et al., 2010).

2.6.1 Toxinas formadoras de poros y su potencial aplicación para el tratamiento del cáncer

Un campo de aplicación interesante para el desarrollo de las PFTs es la nanomedicina, ya que los nanoporos biológicos podrían tener una aplicación importante en el tratamiento contra el cáncer. Los enfoques actuales para tratar esta enfermedad involucran tratamientos, tales como la radiación y la quimioterapia. Sin embargo, este tipo de estrategias no son tan efectivas en los casos en los que existe metástasis y resistencia a la quimioterapia. Adicionalmente, estos tratamientos presentan diversos efectos secundarios derivados de la falta de especificidad del efecto citotóxico y el consecuente daño que se provoca a las células sanas. En este contexto, se están buscando nuevas estrategias terapéuticas que sean más específicas y que presenten mejor eficacia y menor toxicidad. Entre estas estrategias se encuentra el empleo de PFTs para matar a las células cancerosas (Majd et al., 2010). Existen diversos estudios en los que se ha examinado el potencial de algunas PFTs para producir citólisis de células cancerosas. Entre las toxinas que han sido evaluadas se encuentran: la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, la equinatoxina II de la anémona de mar *Actinia equina*, la esticolisina I de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus* y la toxina diftérica producida por *Corynebacterium diphtheriae*. Para el desarrollo de este tipo de abordajes terapéuticos se propone que la PFT se combine con un ligando que reconozca ciertas proteínas receptoras específicas del tumor. De esta forma, una vez que el ligando se une a la superficie de una célula cancerígena, la PFT se insertaría en la membrana de dicha célula y formará un poro lítico (Figura 6) (Majd et al., 2010; Clement et al., 2015).

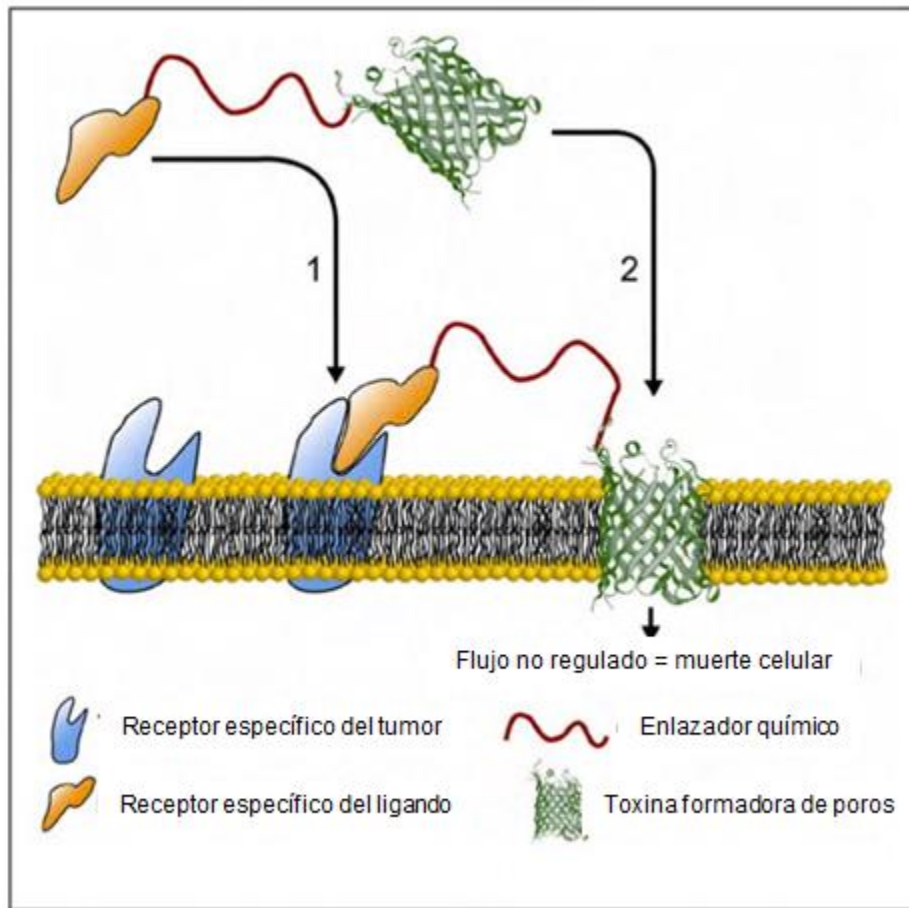


Figura 6. Representación esquemática del uso de las PFTs para la citólisis dirigida de células cancerígenas (Modificado de Majd et al., 2010).

2.6.2 Toxinas formadoras de poros y su potencial aplicación para la administración de agentes terapéuticos

Otra función muy interesante de los nanoporos biológicos es la capacidad que pueden tener para mediar el transporte de diversas moléculas, tales como agentes terapéuticos, al interior de las células. La biodisponibilidad de los fármacos en muchas ocasiones se encuentra limitada, debido a que éstos no poseen propiedades fisicoquímicas que posibiliten su paso a través de las membranas celulares. Sin embargo, las PFT tienen la capacidad de penetrar las membranas de las células y de esta manera podrían facilitar el acceso de los agentes al interior de las células. Por ejemplo, Legendre y Szoka desarrollaron un sistema de administración de genes no virales. En este caso concreto, se empleó el complejo

gramicidina-lípido-ADN para administrar un plásmido de ADN a una variedad de células de mamíferos en cultivo (Legendre y Szoka, 1993). Otro estudio interesante fue el desarrollado por Stier et al, quienes exploraron la aplicación de la listeriolisina (LLO) del patógeno *Listeria monocytogenes*, como vehículo para la distribución de macromoléculas en las células (Stier et al., 2005).

2.6.3 Toxinas formadoras de poros y su potencial aplicación como biosensores

En áreas como la biotecnología, las PFTs representan una potencial herramienta para la detección de diferentes analitos que se puedan transportar a través de los nanoporos. La detección de moléculas individuales representa una ventaja para diferentes campos de la ciencia, así como un avance útil para la medicina y el monitoreo de la contaminación ambiental. Es por eso que el desarrollo de biosensores capaces de detectar moléculas individuales se ha convertido en un campo importante de investigación (Majd et al., 2010; Bhalla et al., 2016). Se ha reportado, por ejemplo, que los poros formados por la α -hemolisina pueden ser utilizados como biosensores para determinados analitos. Esto es posible gracias a modificaciones que se realizan sobre los poros, de tal manera que se les proporciona un sitio de unión artificial para el analito de interés. La actividad de estos poros se da en presencia de un potencial de membrana, al momento de que el analito interacciona con el sitio de unión artificial se desencadena un bloqueo parcial del poro. Estas acciones conjuntas desencadenan fluctuaciones en la corriente iónica que pasa a través del poro, las cuales son detectadas (Figura 7) (Luchian et al., 2003; Majd et al., 2010).

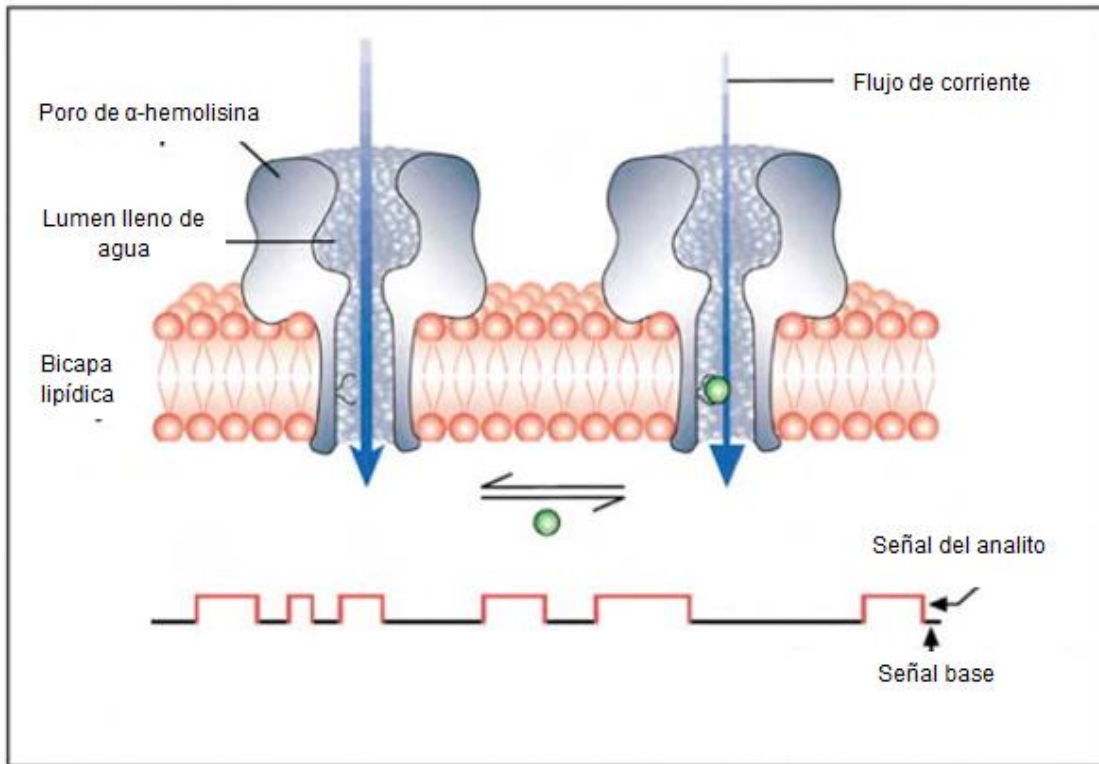


Figura 7. Representación esquemática del principio de detección de analitos mediante poros de α -hemolisina (Modificado de Majd et al., 2010).

2.7 Producción de proteínas recombinantes

Escherichia coli es uno de los organismos procariotes más usados para manipulaciones genéticas y para la producción industrial de proteínas de interés terapéutico y/o comercial. Comparado con otros sistemas de expresión, *E. coli* ofrece ventajas como: (i) facilidad de manejo, (ii) disponibilidad de vectores, (iii) crecimiento en fuentes de carbono económicas, (iv) acumulación rápida de biomasa, (v) escalamiento sencillo y (vi) fermentaciones de alta densidad celular. Comúnmente este organismo produce proteínas recombinantes en niveles del 10 – 30% respecto a la proteína total. Además, debido a su larga historia como modelo biológico, los aspectos genéticos de *E. coli* están totalmente caracterizados, permitiendo que su cromosoma haya sido manipulado para facilitar la clonación y expresión génica (Baneyx y Mujacic, 2004; Birkholtz et al., 2008). Si las proteínas heterólogas no requieren modificaciones pos-traduccionales complejas y son expresadas en forma soluble, *E. coli* es la primera opción para obtener suficiente

material para estudios bioquímicos y/o estructurales, y para la subsecuente producción a gran escala de productos con valor agregado. Sin embargo, existen problemas comunes en la producción de proteínas recombinantes como: (i) problemas en el plegamiento, (ii) degradación proteolítica o (iii) aglomeraciones entre las proteínas, lo que posteriormente promueve la formación de agregados insolubles (Baneyx y Mujacic, 2004). No obstante, estos problemas se pueden resolver mediante la optimización del sistema de expresión. Esto permite garantizar la estabilidad del plásmido de expresión, la ausencia de proteasas nocivas y la disponibilidad de los elementos genéticos pertinentes. Asimismo, los consorcios de genómica estructural han demostrado que la combinación de los vectores pET y la cepa *E. coli* BL21 (DE3) es la más popular entre los científicos, debido a que se ha logrado la expresión y purificación de proteínas recombinantes de manera eficiente (Sørensen y Mortensen, 2005; Birkholtz et al., 2008).

La expresión génica también puede ser controlada mediante la tasa de descomposición del ARNm y las cepas huésped que son deficientes en ARNasas específicas pueden mejorar la expresión al proteger el ARNm de la degradación. Adicionalmente, se pueden emplear varias estrategias para superar el sesgo de codones y ayudar a la formación de enlaces disulfuro, la fosforilación de proteínas y el replegamiento de las mismas. Además, las etiquetas de fusión como hexahistidina (6xHis), glutatión-S-transferasa (GST) y otras, a menudo mejoran la solubilidad de la proteína recombinante y facilitan su purificación (Esposito y Chatterjee, 2006; Sahdev et al., 2007).

Por otro lado, el desarrollo de técnicas y métodos para la purificación de una proteína es un prerrequisito esencial para muchas aplicaciones. Las claves para lograr una purificación eficiente de proteína residen en la selección de las técnicas adecuadas y en la optimización del proceso, de manera que se aumente el rendimiento y disminuya el número de pasos requeridos. De hecho, la mayoría de esquemas de purificación involucran alguna forma de cromatografía, como lo son: cromatografía de afinidad (especificidad por un ligando), cromatografía de intercambio iónico (carga), cromatografía por exclusión de tamaño (tamaño de

molécula), cromatografía en fase reversa (hidrofobicidad), por mencionar algunas (Sørensen y Mortensen, 2005).

Adicionalmente, se ha comprobado que el sistema de expresión utilizando *E. coli* como huésped tiene la capacidad de producir toxinas de naturaleza proteica como los son las PFTs. De hecho, a la fecha existen diversos estudios de este tipo para la producción de toxinas formadoras de poros identificadas en cnidarios. Por ejemplo, Imani et al. en el año 2017 produjeron y purificaron una PFT proveniente de la anémona de mar *Actinia fragacea*, por vía recombinante en un sistema heterólogo de *E. coli* (Imani et al, 2017). Otro ejemplo de clonación de PFT, fue el realizado por Tsutsui y Sato, en este trabajo se llevó a cabo la clonación y expresión heteróloga en un sistema de *E. coli* de dos actinoporinas provenientes de la anémona de mar *Cribrinopsis japónica* (Tsutsui y Sato, 2018).



Figura 8. Esquema de un diseño de clonación para la producción de compuestos de interés farmacéutico (Recuperado de BIOMEDAL, 2022).

3. JUSTIFICACIÓN

Los arrecifes de coral son ecosistemas sumamente relevantes debido a que alojan una cuarta parte de la biodiversidad marina. Estos ecosistemas representan una barrera natural contra las inundaciones y erosiones de las costas. Además, producen beneficios económicos importantes derivados del turismo, la pesca y el desarrollo costero (Harris et al., 2018). Los organismos que forman estos sistemas arrecifales pertenecen al filo Cnidaria, un grupo de animales venenosos. Es un hecho bien documentado que los compuestos tóxicos sintetizados por estos organismos producen implicaciones graves a la salud humana como: neurotoxicidad, citotoxicidad y daño tisular. No obstante, estas toxinas representan una fuente muy valiosa de nuevas entidades químicas novedosas y prometedoras para el desarrollo de fármacos, herramientas biotecnológicas y de investigación (Jouiaei et al., 2015a; Morabito et al., 2015). Entre las diferentes toxinas que conforman el veneno de los cnidarios, se encuentran las toxinas formadoras de poros (PFTs), las cuales actúan mediante la penetración en la membrana de las células diana provocando el desequilibrio osmótico y la posterior lisis celular (Jouiaei et al., 2015a). Se ha descrito que estas toxinas pueden ser empleadas para el diseño de marcadores para el reconocimiento específico de elementos moleculares, como, por ejemplo, lípidos de membrana para el desarrollo de terapias contra el cáncer guiadas a dianas específicas. También, se ha demostrado su potencial para el desarrollo de sistemas de liberación intracelular de fármacos. Asimismo, se ha propuesto el uso de las PFTs para su aplicación en métodos analíticos para la identificación, cuantificación y caracterización de moléculas individuales (Xu et al., 2015; Kasianowicz et al., 2016). Por otro lado, *M. alvicornis* representa una fuente valiosa de toxinas que pueden ser utilizadas para el desarrollo de medicamentos y herramientas biotecnológicas y/o de investigación. A la fecha no ha sido posible purificar las toxinas producidas por los cnidarios del género *Millepora*, tampoco se ha caracterizado completamente su mecanismo de acción, lo cual es indispensable para el diseño de terapias adecuadas para tratar el daño ocasionado por estos organismos. Por otra parte, es importante mencionar que a la fecha no se ha realizado la expresión heteróloga de alguna de las toxinas sintetizadas por

organismos del género *Millepora*. En un estudio realizado previamente por nuestro grupo de trabajo, se demostró que el extracto acuoso de *M. alcicornis* contenía hemolisinas con un peso molecular aproximado de 200 kDa que no presentaban actividad de PLA2, lo cual sugirió la presencia de citolisinas poliméricas formadoras de poros (Hernández-Matehuala et al., 2015). Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo realizó un análisis bioinformático sobre el transcriptoma de un espécimen de *M. alcicornis* recolectado en el Caribe Mexicano en noviembre del 2016, con el fin de identificar los transcritos asociados con la síntesis de toxinas. Se logró identificar un transcrito que codifica para una hidralisina con similitud a la toxina presente en *Hydra vulgaris* (No. acceso WP_094166315.1). Posteriormente, en colaboración con el grupo de trabajo del Dr. Ataulfo Martínez Torres del Instituto de Neurobiología de la UNAM se logró detectar en el transcriptoma de un espécimen de *M. alcicornis*, recolectado en la zona del Caribe Puertorriqueño, la presencia de una toxina formadora de poros (PFT) de tipo hidralisina. Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo de tesis se planteó realizar la clonación de la PFT, previamente detectada en el transcriptoma del “coral de fuego” *Millepora alcicornis*, a fin de caracterizar su estructura primaria, determinar su blanco de unión y estimar el tamaño del poro que forma en las membranas eritrocitarias.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto sobre la membrana de los eritrocitos de la toxina formadora de poros (PFT), expresada por vía recombinante en un sistema heterólogo de *Escherichia coli* a partir del gen que codifica para una hidralisina, cuyo transcrito se encontró en el transcriptoma de *M. alcornis*?

5. HIPÓTESIS

La toxina formadora de poros (PFT) expresada por vía recombinante en un sistema heterólogo de *Escherichia coli* a partir del gen que codifica para una hidralisina, cuyo transcrito se encontró en el transcriptoma de *M. alcornis* mediante un análisis bioinformático, produce un efecto citolítico en eritrocitos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Expresar una toxina formadora de poros previamente detectada en el transcriptoma del “coral de fuego” *Millepora alcicornis* (PFTma), a fin de caracterizar su actividad en membranas eritrocitarias.

6.2 Objetivos específicos

- Generar un plásmido para expresión en *E. coli* con la secuencia de nucleótidos que codifica para la PFTma
- Expresar en *E. coli* la PFTma
- Purificar la PFTma, mediante cromatografía de afinidad
- Determinar la actividad de la PFTma, mediante un ensayo de hemólisis en eritrocitos humanos
- Determinar el blanco de unión de la PFTma en los componentes de las membranas celulares, mediante un ensayo de hemólisis en eritrocitos humanos
- Estimar el tamaño de poro formado por la PFTma en las membranas de los eritrocitos, mediante el ensayo de protección osmótica en eritrocitos humanos

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Desarrollo experimental

7.1.1 Obtención de un vector de clonación con la secuencia de nucleótidos de la PFT detectada en el transcriptoma de *M. alcicornis*

La secuencia del gen de la PFT detectada a partir del transcriptoma de *M. alcicornis* fue sintetizada por la compañía GenScript en el vector pUC57. La secuencia codificante de la PFT fue amplificada mediante PCR utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Thermofisher) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización 98 °C por 10 seg, 30 ciclos (98 °C por 10 seg, 52 °C por 20 seg y 72 °C por 1 min) y la extensión final se implementó por 7 min a 72 °C. Se usaron los siguientes cebadores para la amplificación: cebador sentido 5' **CC ATG GCA** ATT CAA GAA TAT ATG ACA 3' y como cebador inverso 5' **CTC GAG** CAA AGG TTC TGC TTT CCT AAT TAT 3'. El cebador sentido contiene el sitio de restricción para NcoI mientras que el cebador antisentido contiene un sitio de restricción para XhoI (secuencia subrayada). Una vez que se amplificó la secuencia codificante de la PFT, el producto de la PCR se cargó en gel de agarosa al 0.7% y la banda esperada (750 pb) se cortaron del gel y se purificaron usando el kit de extracción en gel de ADN. Después de la purificación del inserto con el kit de extracción (Qiagen), la reacción de ligación comenzó mezclando el gen de la PFT con el vector de clonación pJET 1.2/blunt (Thermofisher Scientific) en una proporción 16:1 y ADN ligasa (5 U/μL) a 16°C durante 24 horas. La construcción resultante se denominó pJET 1.2/EVT_HydMa (Imani et al., 2017).

7.1.2 Construcción del vector de expresión con la secuencia de nucleótidos de la PFT detectada en el transcriptoma de *M. alcicornis*

Para la construcción del vector de expresión de la PFT encontrada en *M. alcicornis* se utilizó el vector de clonación pJET 1.2/EVT_HydMa y el vector de expresión pET28b que contiene un marco seguido de nucleótidos que codifican una secuencia de etiqueta de 6 histidinas (6xHis) disponible en el

cuerpo del vector, con los cuales se llevó a cabo una digestión con las enzimas de restricción correspondientes. Los productos digeridos se visualizaron en gel de agarosa al 0.7%. A continuación, se cortaron los fragmentos de interés a partir del gel. Con los fragmentos obtenidos, se realizó la ligación, las muestras se incubaron a 16 °C durante toda una noche. La construcción resultante se denominó pET28bEVT_HydMa. Posteriormente, se llevó a cabo la transformación de las células *E. coli* XL1blue competentes por medio de choque térmico (Froger y Hall, 2007; Imani et al., 2017).

7.1.3 Inducción de la expresión

Una colonia bacteriana que portaba el plásmido de expresión pET28bEVT_HydMa se usó para inocular 5 mL de medio LB que contenía 50 µg/mL de kanamicina. A continuación, el cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante durante toda la noche. Posteriormente, se inocularon 50 mL de medio LB con 50 µL de cultivo O/N y se cultivaron a 37 °C a 180 rpm durante 4 horas. Pasadas las 4 horas se añadió IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a la concentración final de 1 mM y el cultivo se hizo crecer a temperatura ambiente durante toda la noche. Las bacterias que expresan la PFT se recogieron y se resuspendieron en 630 µL de tampón de lisis y se ultracongelaron con Nitrogeno liquido. El lisado se descongeló y se le agregó un volumen de 70 µL de lisozima 10 mg/mL incubándolo por 30 min en un baño de hielo. Posteriormente el lisado se centrifugó a 4 °C durante 20 min a 14,500 rpm (Imani et al., 2017).

7.1.4 Purificación de la PFT clonada de *M. alcicornis* mediante cromatografía de afinidad

La purificación de la PFT de fusión marcada con His6x se llevó a cabo usando una columna giratoria Ni-NTA (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, la columna se equilibró con 600 µL de tampón de lisis. Se transfirió un volumen de 600 µL del lisado total en la columna Ni-NTA. Luego, la columna se lavó dos veces con 600 µL de tampón de lavado.

Finalmente, la PFT clonada se eluyó dos veces con 300 μ L de un tampón de elución (tampón de fosfato con imidazol 300 mM). Finalmente, la PFT se analizó mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones nativas y teñido con Coomassie Brilliant Blue. La concentración de la proteína se determinó mediante el ensayo de Bradford utilizando BSA como estándar (Imani et al., 2017)

7.1.5 Detección de la actividad citolítica mediante la prueba de difusión en pozo

Para la detección de la actividad citolítica se prepararon 18.5 mL de agarosa al 1.5% en buffer PBS pH 7.4 adicionado con 10 mM de cloruro de calcio. La agarosa fue disuelta mediante ebullición durante 1 min. Para la detección de la actividad hemolítica, se adicionó como sustrato 1.5 mL de eritrocitos de humano lavados con solución Alsever cuando la temperatura de la solución de agarosa descendió a 40 °C. Después de adicionar el sustrato, la mezcla se vertió en una caja Petri estéril y se dejó gelificar. Una vez formado el gel, se realizó la perforación de los pocillos utilizando un sacabocados; se colocaron dentro de los pocillos 100 μ g de proteína total de los extractos obtenidos a partir de las células de *E. coli* que expresaban la toxina formadora de poros. Como control positivo se usaron 20 μ L de PLA2 (sPLA2 Assay Kit Kayman No. 7650001) y como control negativo 20 μ L de células de *E. coli* que no expresaban la toxina. Las cajas Petri fueron incubadas a 37 °C durante 16 horas para la observación de la actividad hemolítica.

7.1.6 Determinación del efecto hemolítico de la PFT clonada sobre eritrocitos de humano

La extracción de la sangre de los donadores se realizó a partir de la vena cubital (0.5 mL). Se emplearon tres donadores. Para determinar el efecto hemolítico de la PFT clonada de *M. alcornis*. Se utilizaron 0.5 mL de una suspensión de eritrocitos de humano al 1% en solución Alsever pH 7.4 adicionado con 10 mM de cloruro de calcio. Los eritrocitos se incubaron durante 16 horas a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones de la

toxina clonada, la mezcla de reacción se centrifugó durante 3 minutos a 2400 rpm, y la actividad hemolítica se evaluó espectrofotométricamente a 415 nm (Olguín-López et al., 2019)

7.1.7 Determinación del efecto del colesterol, la fosfoetanolamida y algunos carbohidratos sobre la actividad hemolítica de la PFT clonada

Con la finalidad de determinar la molécula blanco de unión de la PFT clonada en las membranas celulares, se determinó su efecto hemolítico realizando pre-tratamientos con una concentración 5 mM de colesterol, fosfoetanolamida, glucosa, fructosa y galactosa. Estos compuestos se incubaron por 30 minutos con la PFT clonada y se determinó el efecto hemolítico como se describió en el punto anterior (Tejuca et al., 2001).

7.1.8 Determinación del tamaño del poro formado por la PFT clonada en las membranas eritrocitarias, mediante el ensayo de protección osmótica

Para conocer el tamaño del poro formado por la PFT clonada de *M. alvicornis* se utilizaron diferentes glicoles para suprimir la lisis osmótica. Las pruebas de hemólisis se realizaron, como se mencionó en el ensayo de la determinación del efecto hemolítico, en eritrocitos de humano, excepto que los eritrocitos fueron resuspendidos en solución Alsever, la cual contenía una concentración 5 mM de los correspondientes polietilenglicoles: PEG 400, PEG 1000, PEG 3350 y PEG 8000 (Tejuca et al., 2001).

7.2 Análisis estadísticos

Los resultados derivados de los ensayos de determinación de la actividad hemolítica, los cuales también se emplearon para determinar el blanco de unión y el tamaño del poro formado, fueron expresados como la media \pm S.E.M de $n = 3$ a 4 experimentos. Las curvas concentración-respuesta (CCR) se repitieron tres veces. Las CCR se graficaron y ajustaron a la ecuación de Boltzman, mediante el programa de análisis de datos y gráficas Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Las comparaciones múltiples se realizaron mediante un ANOVA de una vía, seguida por una prueba posthoc

de Tukey. En todos los casos la significancia estadística esta indicada por $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención del vector de clonación

Inicialmente, tras la colaboración con el grupo de trabajo del Dr. Ataulfo Martínez Torres del Instituto de Neurobiología de la UNAM se detectó en el transcriptoma de un espécimen de *M. alcicornis* recolectado en la zona del Caribe Puertorriqueño, la presencia de un transcrito que codifica para una toxina formadora de poros de tipo hidralisina como se observa en la Figura 9.

>Hidralisina_Millepora alcicornis

```
Attggaatttagtctcgcgttcgccaacattgatgagacacggatcaaaaacacaatgtcaattcaagaatatgacattgatgattgcaag
gggtgaaagcagcccaatgctgttcgagaggcttttcaaaggaattggtaaacacctgatggtatgctgcaataaagagacataftataatgct
gttaaacctgcaatcacggagcgttatggctattattgttacaagaacttgggtccgatgagttacatcagatgatgtagagccccgcaacaagcaat
tgttgatccaatacagctataaataagggggattcaagtgcgacaatccagtaaacagtaaatggatcatggagcgcagctaccgggtacacatcat
cggtgacaactggcatgaaattcaacacaatttgatattgaaggagcttttaaaatggggactgagtttcaattcagttacagcaggggtacccatt
caagttctgtagcaaatctgcttcatcatcagatcagtaacagctaccctccagggtcaaaagtgaagttgatgattgctaacatgaaaaggaaaa
gcttgctttaaagttcaattgacattagcggatgttgggtccaattttcctaactagtagcaaaagtcattatttctggttttagatgctcgcagctttg
ccaaaaacaagtggggagattactggtgttataaatggtaccgatcgttcgctgttcaactataatfaggaaagcagaacctttagaattaatgaact
cttaattgatt
```

Figura 9. Transcrito que codifica para la PFT de tipo hidralisina encontrado en el transcriptoma de *M. alcicornis* (Caribe Puertorriqueño).

La secuencia codificante para la PFT de tipo hidralisina fue sintetizada y posteriormente clonada en el vector pUC57 por la empresa GenScript. Este vector fue utilizado como molde para llevar a cabo la inserción de los sitios para reconocimiento de las enzimas de restricción NcoI y XhoI, y amplificación de la secuencia codificante. En el gel de agarosa se observó la presencia de una banda de aproximadamente 750 pb, la cual concuerda con la longitud de la secuencia que codifica para la hidralisina.

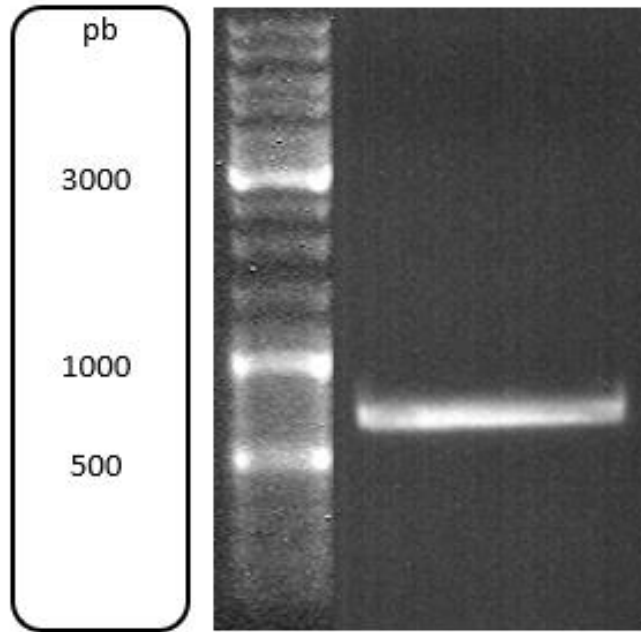


Figura 10. Amplicón correspondiente a la secuencia codificante para la hidralisina en gel de agarosa al 0.7%.

El amplicón resultante del ensayo de mutagénesis por PCR se ligó al vector abierto pJET 1.2/blunt para su posterior transformación en células competentes de *E. coli* XL1-Blue. Una vez que el plásmido fue propagado en las células competentes se llevó a cabo su extracción para corroborar la ligación de la secuencia de la PFT con el vector. En la Figura 11 se observan las clonas seleccionadas para confirmar la clonación.

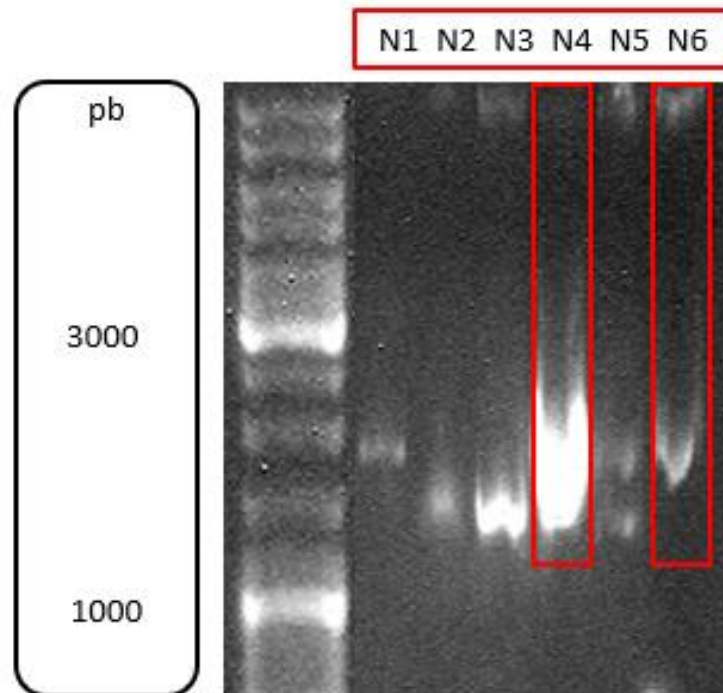


Figura 11. Clonas seleccionadas para el análisis de confirmación de la clonación en gel de agarosa al 0.7%.

Para confirmar que la secuencia de la PFT se encontraba en estas clonas, los plásmidos seleccionados se sometieron a un análisis de restricción utilizando la enzima BgIII, que corta justamente detrás de los sitios de restricción NcoI-XhoI que flanquean a la secuencia de interés. En la Figura 12 se observa que efectivamente la secuencia que codifica para la PFT se unió al vector, esto se debe a que BgIII liberó el fragmento de ADN de aproximadamente 750 pb el cual pertenece a la secuencia de la PFT.

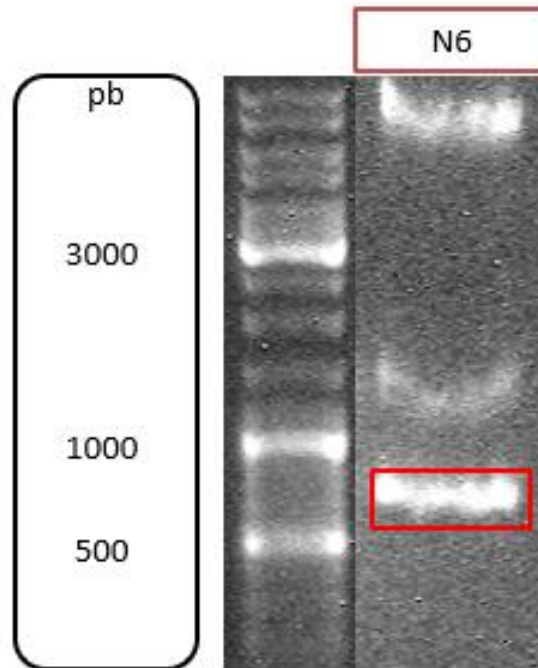


Figura 12. Análisis de restricción utilizando la enzima BgIII en gel de agarosa al 0.7%.

Las clonas positivas, es decir, aquellas que si presentaron la secuencia de la PFT fueron seleccionadas para secuenciación. A continuación, se muestran las secuencias de nucleótidos que se obtuvieron del análisis de secuenciación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencias de nucleótidos obtenidas del análisis de secuenciación.

ID	Secuencia
>Hydralis_Ncol-XhoI_N4	CTCGAGTTTTTCAGCAAGATTCCATGGCAATTCAAGAAT ATATGACATTTGATGATTTGCAAGGGGTTGAAAGCAGC CCTAATGCTGTTGAGAGGCTTTTTCAAAGGAATTTGGT AAAACACCTGATGGTATATGCGTCAATAAAGAGACATAT TATAATGCTGTAAACCTGCAATCACCGAGCGTTATGGC TATTATTGTTACAAAAGACTTGGTCCGTATGAGTTTACA TCAGATGATGTAGAGCCCCGCAACAAGCAATTGTTGG ATCCAATACAGCTATAAATAAGGGGGATTCAAGTGCGA CAATCCAGTTAACAGTAAATGGATCATGGAGCGACAGT ACCGGGTACACATCATCGGTGACAACTGGCATGAAATT CTCAACACAATTTGATATTGAAGGAGCTTTTAAATGGG

	<p>GACTGAGTTTTCAATTTTCAGTTACAGCAGGGTCATCCCA TTCAAGTTCTGTCAGCAAATCTGCTTCATCATCAGTATC AGTAACAGTACCTCCGAGGTCAAAGTGAAAGTTGATA TGATTGCTAACATGAAAAAGGAAAAGCTTGGCTTTAAAG TTCCAATTGACATTAGCGGAATGTTTGGTGCCAATTTTC CTAATCTAGTCAAAGGTCATTATTTCTGGTTTTTAGATG CTCGATCAGTTTTGCCAAAACAAGTGGGGAGATTACT GGTGTATAAATGGTACCCGATCGTTGCTGTTCAAAC ATAATTAGGAAAGCAGAACCTTTGCTCGAGATCTTTCTA GAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGG</p>
<p>>Hydralis_Ncol-Xhol_N6</p>	<p>CTCGAGCAAAGGTTCTGCTTTCCTAATTATAGTTTGAAC AGCGAACGATCGGGTACCATTTATAACACCAGTAATCT CCCCACTTGTTTTGGCAAACCTGATCGAGCATCTAAAA ACCAGAAATAATGACCTTTGACTAGATTAGGAAAATTGG CACCAAACATTCCGCTAATGTCAATTGGAACCTTAAAGC CAAGCTTTTCCTTTTCATGTTAGCAATCATATCAACTTT CACTTTTGACCTCGGAGGTACTGTTACTGATACTGATGA TGAAGCAGATTTGCTGACAGAACTTGAATGGGATGACC CTGCTGTAACCTGAAATTGAAAACCTCAGTCCCCATTTTAA AAGCTCCTTCAATATCAAATTGTGTTGAGAATTTTCATGC CAGTTGTCACCGATGATGTGTACCCGGTACTGTGCGCTC CATGATCCATTTACTGTTAACTGGATTGTGCGCACTTGAA TCCCCCTTATTTATAGCTGTATTGGATCCAACAATTGCT TGTTGCGGGGGCTCTACATCATCTGATGTAAACTCATA CGGACCAAGTCTTTTGTAAACAATAATAGCCATAACGCTC GGTGATTGCAGGTTTAAACAGCATTATAATATGTCTCTTT ATTGACGCATATACCATCAGGTGTTTTACCAAATTCCTT TGAAAAAGCCTCTCGAACAGCATTAGGGCTGCTTTCAA CCCCTTGCAAATCATCAAATGTCATATATTCTTGAATTG CCATGG</p>

Una vez que se obtuvieron las secuencias de nucleótidos, éstas se tradujeron a su secuencia de aminoácidos mediante el software ExPASy translate como se observa en la Cuadro 3.

Cuadro 3. Secuencias de aminoácidos predichas utilizando ExPASy translate.

ID	Secuencia
>Hydralis-AA_Ncol-XhoI_N4	MAIQEYMTFDDLQGVESPNAVREAFSKEFGKTPDGICV NKETYNAVKAITERYGYYCYKRLGPYEFTSDDVEPPQ QAIVGSNTAINKGDSSATIQLTVNGSWSDSTGYTSSVTTG MKFSTQFDIEGAFKMGTEFISISVTAGSSHSSSVSKSASSS VSVTVPPRSKVKVDMIANMKKEKLGFKVPIDISGMFGANF PNLVKGHYFWFLDARSVLPKTSGEITGVINGTRSFVQTII RKAEPLEIFLEDLLQYSQLPW
>Hydralis-AA_Ncol-XhoI_N6	MAIQEYMTFDDLQGVESPNAVREAFSKEFGKTPDGICV NKETYNAVKAITERYGYYCYKRLGPYEFTSDDVEPPQ QAIVGSNTAINKGDSSATIQLTVNGSWSDSTGYTSSVTTG MKFSTQFDIEGAFKMGTEFISISVTAGSSHSSSVSKSASSS VSVTVPPRSKVKVDMIANMKKEKLGFKVPIDISGMFGANF PNLVKGHYFWFLDARSVLPKTSGEITGVINGTRSFVQTII RKAEPLE

Posteriormente, con las secuencias de aminoácidos se realizó un alineamiento global utilizando Clustal Omega para descartar posibles modificaciones en las secuencias. Afortunadamente, los alineamientos no mostraron cambios significativos en cuanto a la estructura primaria de las secuencias de aminoácidos predicha (Figura 13).

Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N4	MAIQEYMTFDDLQGVESSPNAVREAFSKEFGKTPDGICVNKETYNAVKPAITERYGYYC	60
Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N6	MAIQEYMTFDDLQGVESSPNAVREAFSKEFGKTPDGICVNKETYNAVKPAITERYGYYC	60

Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N4	YKRLGPYEFTSDDVEPPQQAIVGSNTAINKGDSSATIQLTVNGSWSDSTGYTSSVTTGMK	120
Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N6	YKRLGPYEFTSDDVEPPQQAIVGSNTAINKGDSSATIQLTVNGSWSDSTGYTSSVTTGMK	120

Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N4	FSTQFDIEGAFKMGTEFESISVTAGSSHSSSVSKSASSSVSVTPPPRSKVKVDMIANMKKE	180
Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N6	FSTQFDIEGAFKMGTEFESISVTAGSSHSSSVSKSASSSVSVTPPPRSKVKVDMIANMKKE	180

Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N4	KLGFKVPIDISGMFGANFPNLVKGHYFWFLDARSVLPKTSGEITGVINGTRSFVAVQTIIR	240
Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N6	KLGFKVPIDISGMFGANFPNLVKGHYFWFLDARSVLPKTSGEITGVINGTRSFVAVQTIIR	240

Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N4	KAEPILLEIFLEDLLQYSQLPW	261
Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N6	KAEPILLE-----	247

Figura 13. Alineamiento global de las secuencias de aminoácidos predichas utilizando Clustal Omega.

Como resultado de nuestra estrategia de clonación se obtuvo el vector de clonación denominado pJET 1.2/EVT_HydMa, el cual alberga la secuencia codificante para la PFT de tipo hidralisina. A continuación, se muestra el mapa del vector (Figura 14).

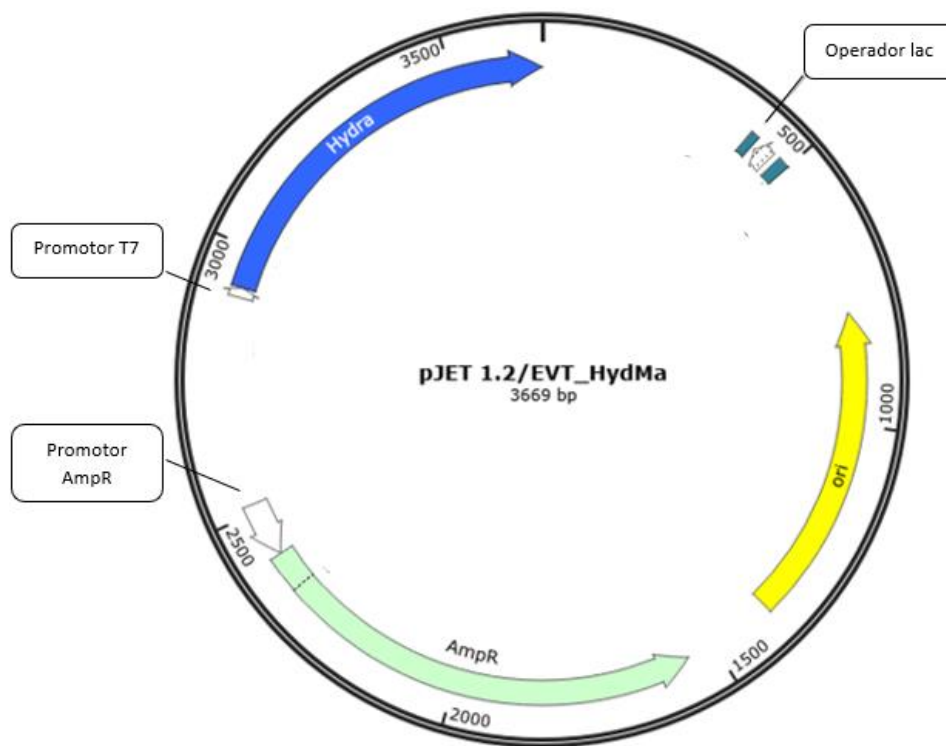


Figura 14. Mapa del vector de clonación pJET 1.2/EVT_HydMa.

8.2 Construcción del vector de expresión

En el siguiente paso de clonación, para subclonar el gen de la hidralisina amplificado (>Hydralis_NcoI-XhoI_N6) en el vector de expresión pET-28b, el vector fue digerido por dos enzimas de restricción NcoI y XhoI. Los sitios de restricción de NcoI y XhoI se eligieron para la clonación de la hidralisina de modo que la etiqueta N-terminal His-tag y el sitio de digestión con proteasa de trombina se eliminaron y solo la etiqueta 6His se fusionaría en el extremo C-terminal de la hidralisina, lo que ayudaría a purificarla en un solo paso. El vector pET-28b digerido, así como el vector pJET 1.2/EVT_HydMa digeridos se muestran en la Figura 15. El vector de clonación digerido está en forma linealizada, el cual corresponde a la banda de 2919 pb después de liberar 750 pb entre los dos sitios de restricción mencionados anteriormente. En el caso de pET-28b digerido, se observa la forma linealizada en la banda de aproximadamente 5230 pb después de excluir 137 pb.

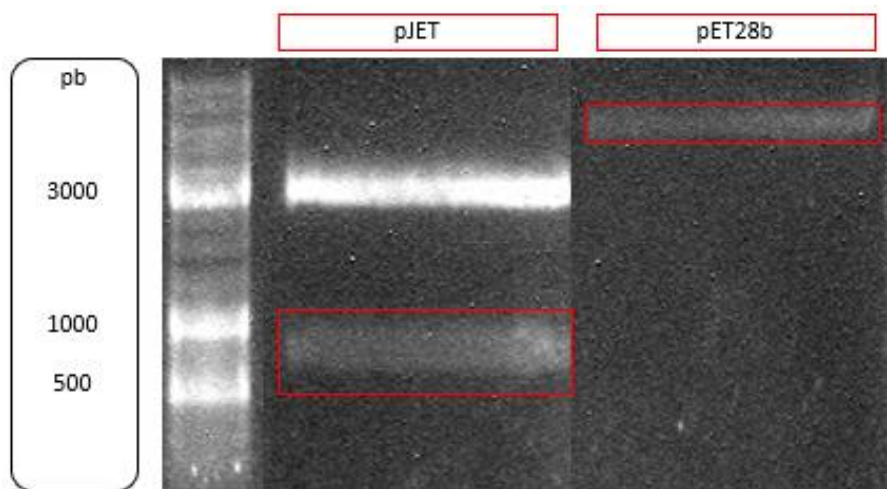


Figura 15. Digestión del vector pJET 1.2/EVT_HydMa y el vector pET-28b utilizando las enzimas de restricción NcoI y XhoI en gel de agarosa al 0.7%.

Para confirmar la inserción de la secuencia de nucleótidos de hidralisina en pET-28b, se utilizaron dos métodos. Primero, con la ayuda de electroforesis de nucleótidos, se verificó que cuatro colonias fueran positivas para la inserción de la secuencia de nucleótidos de la hidralisina. En la Figura 16 se observa que las cuatro clonas analizadas presentaban la construcción completa debido a que sus

desplazamientos en el gel de agarosa eran diferentes al del vector pET-28b sin la presencia de la secuencia de nucleótidos de la hidralisina. Una vez obtenidos estos resultados, para la confirmación final se seleccionaron las construcciones provenientes de dos clonas (Clona 2 y Clona 4) que fueron sometidas a secuenciación utilizando cebadores universales de promotor y terminador T7.

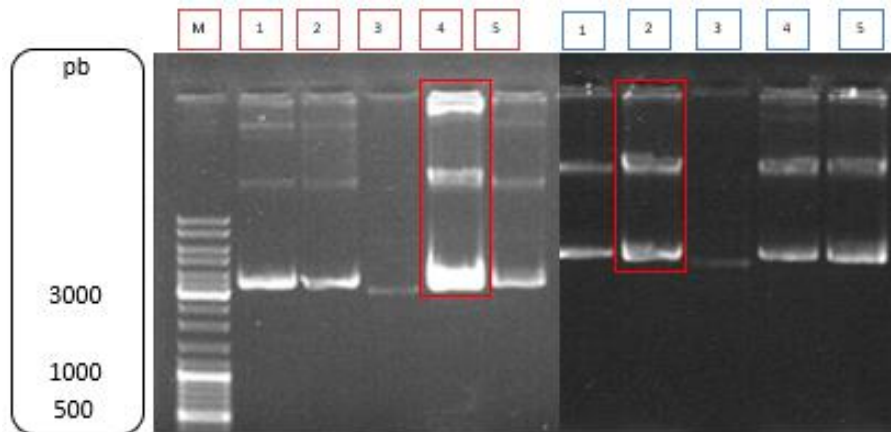


Figura 16. Primer paso de confirmación de la clonación en gel de agarosa al 0.7%.

El análisis de secuenciación nos reveló que los clonas presentaban la construcción del vector de expresión intacta como se puede observar en la Figura 17. Por otro lado, en la Figura 18 se observa el mapa del vector de expresión denominado pET28bEVT_HydMa que porta la secuencia de nucleótidos que codifica para la PFT del tipo hidralisina.



>Gen_Hydralis-pET28b-Clona_H2

```

CTCCTT AAGAAGGAGATATA CCATGG CAATTCAAGAATATATGACATTTGATGATTTGCAAGGGGTTGAAA
GCAGCCCTAATGCTGTTTCGAGAGGCTTTTTCAAAGGAATTTGGTAAAACACCTGATGGTATATGCGTCAATA
AAGAGACATATTATAATGCTGTTAAACCTGCAATCACCGAGCGTTATGGCTATTATTGTTACAAAAAGACTTG
GTCCGTATGAGTTTACATCAGATGATGTAGAGCCCCCGCAACAAGCAATTGTTGGATCCAATACAGCTATAA
ATAAGGGGGATTCAAGTGCGACAATCCAGTTAACAGTAAATGGATCATGGAGCGACAGTACCGGGTACAC
ATCATCGGTGACAACCTGGCATGAAATTCTCAACACAATTTGATATTGAAGGAGCTTTTAAAATGGGGACTGA
GTTTTCAATTTCAAGTTACAGCAGGGTCAATCCATTCAAGTTCTGTCAGCAAATCTGCTTCATCATCAGTATCA
GTAACAGTACCTCCGAGGTCAAAAGTGAAAAGTTGATATGATTGCTAACATGAAAAAGGAAAAGCTTGGCTT
TAAAGTTCCAATTGACATTAGCGGAATGTTTGGTGCCAATTTTCTAATCTAGTCAAAGGTCATTATTTCTGG
TTTTAGATGCTCGATCAGTTTTGCCAAAAACAAGTGGGGAGATTACTGGTGTATAAATGGTACCCCGATCG
TTCGCTGTTCAAACATAATTAGGAAAAGCAGAACCCTTTGCTCGAGCACCACCACCACCACCTAG

```

Figura 17. Esquema y secuencia de la construcción del vector de expresión

pET28bEVT_HydMa. Zona Verde: Sitio de unión al ribosoma; Zona Amarilla: Sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción NcoI y XhoI; Letras color Azul: Codón de inicio; Secuencia de la hidralisina; Zona Morada: Tag 6x-His; Letras color Rojo: Codón de paro

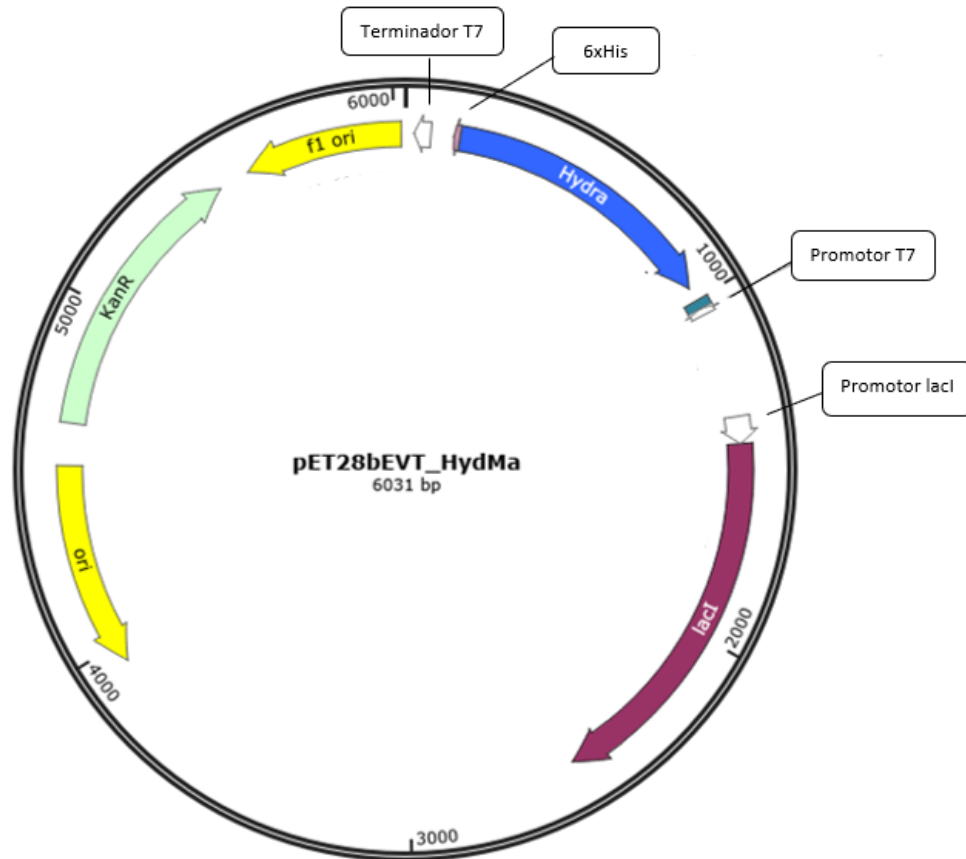


Figura 18. Mapa del vector de expresión pET28bEVT_HydMa.

Adicionalmente, utilizando técnicas bioinformáticas se llevó a cabo el alineamiento de la secuencia >Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N6 contra las hidralisinas presentes en los cnidarios *Chlorohydra viridissima* (No. acceso Q86LR2; Hln-1 y Q564A5; Hln-2) e *Hydra vulgaris* (No. acceso Q52SK7), además de otras hidralisinas presentes en bacterias como *Lysinibacillus mangiferihumi* (No. acceso A0A4U2Z2J9) y *Bacillus thuringiensis serovar* (No. acceso M1PXN2). En los alineamientos se encontraron residuos de aminoácidos específicos involucrados con la funcionalidad de la proteína, por ejemplo: el remplazo de los residuos Q28, G125 y V140 por el conjunto de residuos E28, E125 y L140 lo que provoca una disminución o incluso la pérdida de la toxicidad de la proteína. Se encontró además un residuo de N altamente

conservado, que al parecer es importante para la estabilidad de la proteína (Sher et al., 2005, 2008) aunque a la fecha no se ha reportado evidencia de esto. Por otro lado, se observa la presencia de un motivo VTVPPRSK que contiene una diada de prolinas, el cual se encuentra altamente conservado entre las hidralisinas provenientes de cnidarios. Hasta el momento no existe información relativa sobre la posible función de este motivo en la estructura de las hidralisinas (Figura 19).

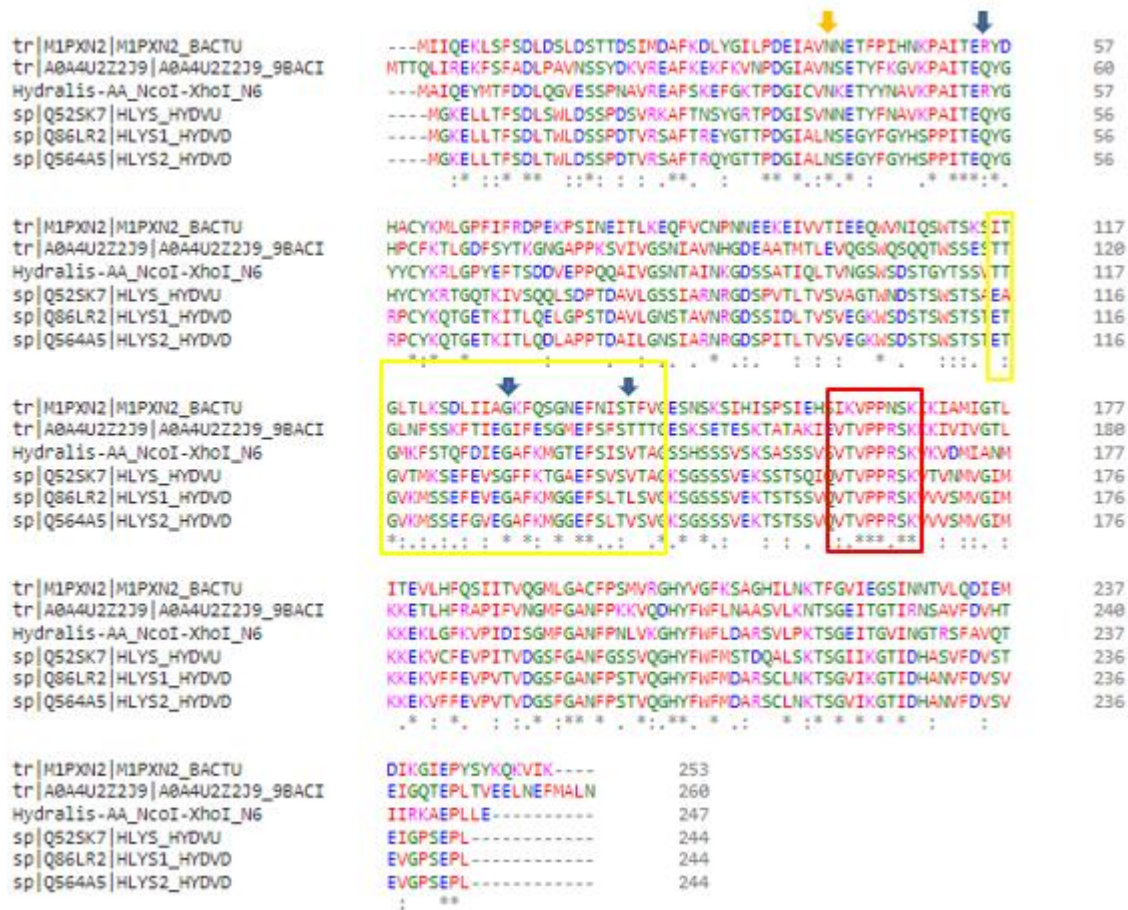


Figura 19. Alineamiento global de la secuencia >Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N6 contra hidralisinas de cnidarios y bacterias. Flechas azules: residuos involucrados con la funcionalidad de la proteína; Flecha naranja: residuo N; Recuadro amarillo: aminoácidos del poro transmembrana; Recuadro rojo: motivo conservado en hidralisinas de cnidarios

Con el objeto de obtener información preliminar sobre la función que pudieran desempeñar los aminoácidos conservados en la hidralisina recombinante obtenida

y otras hidralisinas, se llevó a cabo un análisis de estabilidad utilizando el software I-Mutant 2.0. En el Cuadro 4 podemos observar que al momento de intercambiar los residuos N46, P164 y P165 por A46, A164 y A165, hay una disminución considerable en la estabilidad de la proteína.

Cuadro 4. Resultados del análisis de estabilidad con I-Mutant 2.0.

Posición	Residuo Original	Residuo Nuevo	Estabilidad	Índice de Confiabilidad	T (°C)	pH
46	N	A	Disminución	5	37	7.4
164	P	A	Disminución	6		
165	P	A	Disminución	6		

8.3 Inducción de la expresión y purificación

La expresión de la hidralisina se indujo con IPTG 1 mM. El análisis del lisado por SDS-PAGE, reveló la presencia de una banda alrededor de los 27 kDa que concuerda con el peso molecular que presentan las toxinas del tipo hidralisina (Figura 20). No obstante, para confirmar que se obtuvo la producción de la hidralisina se llevó a cabo la purificación correspondiente por medio de cromatografía de afinidad Ni⁺²-NTA.

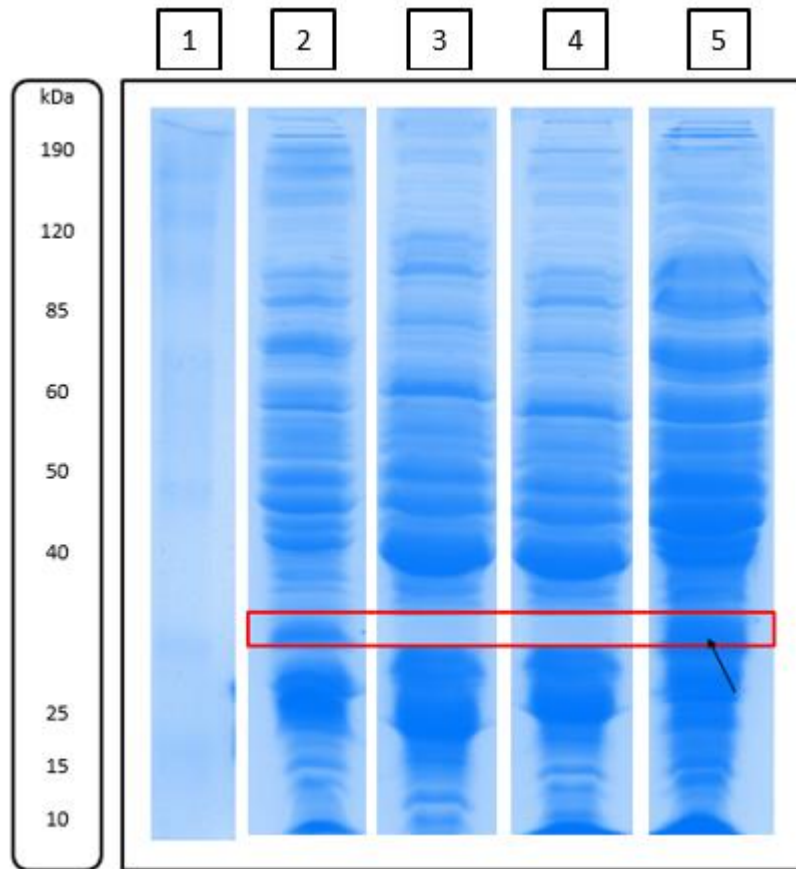


Figura 20. SDS-PAGE de los lisados completos en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones nativas. Carril 1: Marcador de peso; Carril 2: Control Positivo (Lisado de bacterias con GFP); Carril 3: Control Negativo (Lisado de bacterias con pET28b); Carril 4: Lisado del proceso de inducción con *E. coli* BL21; Carril 5: Lisado del proceso de inducción con *E. coli* C41.

El análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas después del proceso de purificación mostró evidencia satisfactoria de la presencia de una banda en la zona de 27 kDa que correspondería a la hidralisina. Como se esperaba, en el control negativo se observó la ausencia de alguna banda en esta zona, con lo cual se confirmó que el proceso de inducción de la expresión fue exitoso. El análisis mediante SDS-PAGE evidenció que la muestra obtenida después del proceso de purificación, aún contenía otras proteínas, que acuerdo a sus pesos moleculares,

podrían corresponder a multímeros de moléculas de hidralisina, sin embargo, esta hipótesis debe corroborarse (Figura 21).

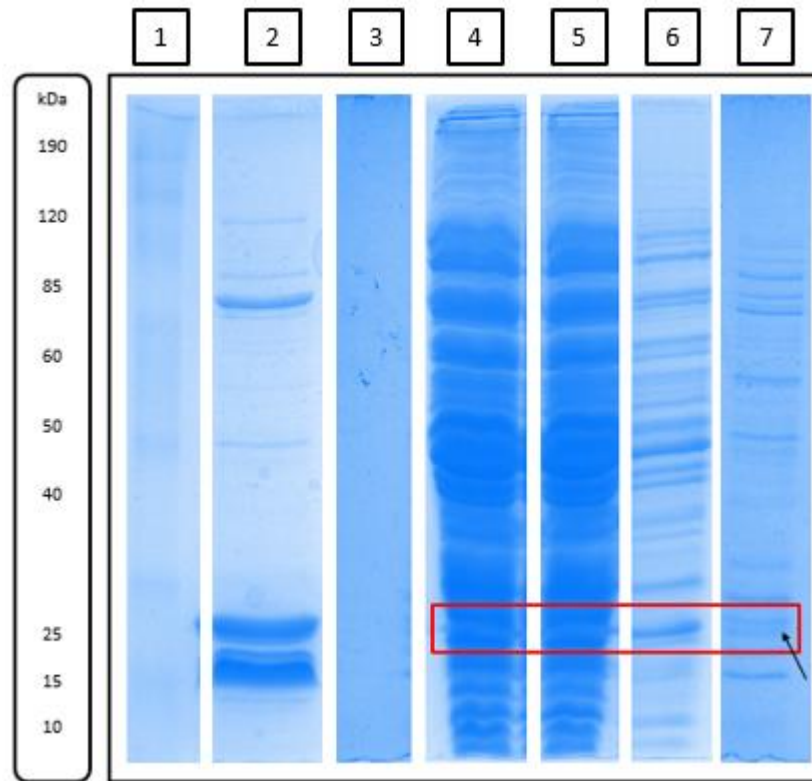


Figura 21. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas después del proceso de purificación, empleando gel de poliacrilamida al 15% en condiciones nativas. Carril 1: Marcador de peso; Carril 2: Control Positivo (Lisado de bacterias con GFP); Carril 3: Control Negativo (Lisado de bacterias con pET28b); Carril 4: Lisado del proceso de inducción; Carril 5: Flujo del proceso de centrifugación; Carril 6: Flujo del proceso de lavado; Carril 7: Fracción purificada

8.4 Detección de la actividad citolítica del extracto total que contenía la toxina recombinante

Primeramente, se determinó la actividad citolítica del lisado de bacterias obtenido después del proceso de inducción. Esta prueba mostró un halo de hemólisis en el pocillo correspondiente a la muestra del lisado, lo cual indicaba que éste efectivamente contenía la hidralisina expresada por vía recombinante (Figura 22).

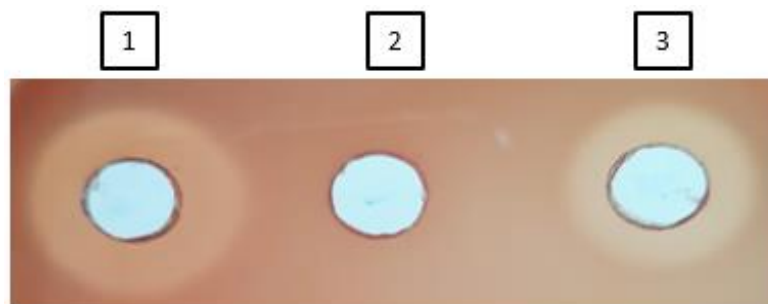


Figura 22. Detección de la actividad citolítica por difusión en pozo en gel de agarosa al 1.5% enriquecido con eritrocitos de humano. Pocillo 1: Control Positivo (Fosfolipasa A₂); Pocillo 2: Control Negativo (Lisado de bacterias con pET28b); Pocillo 3: Lisado de bacterias que producen hidralisina

Una vez que se comprobó la existencia de actividad citolítica por parte de la hidralisina recombinante, se llevó a cabo la cuantificación de proteína total de 10 extractos de lisados diferentes provenientes de la misma clona de expresión. En el Cuadro 5 se observan las concentraciones de proteína total en los diferentes extractos. Se seleccionaron los extractos Ec-1, Ec-4, Ec-7 y Ec-10 que eran los que poseían la mayor cantidad de proteína total. Esto con la finalidad de someterlos a un proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad Ni⁺²-NTA.

Cuadro 5. Cuantificación de proteína total, mediante el método de Bradford, en los lisados de bacterias que produjeron hidralisina.

No. de muestra	Proteína total (µg/mL)
Ec-1	7390.67
Ec-2	7097.33
Ec-3	6617.33
Ec-4	9404.00
Ec-5	6630.67
Ec-6	7377.33
Ec-7	8497.33
Ec-8	7257.33

Ec-9

7457.33

Ec-10

7777.33

Desafortunadamente, las muestras obtenidas después del proceso de purificación no presentaron actividad citolítica. Esta ausencia de efecto hemolítico podría atribuirse a la precipitación de la hidralisina una vez que se purificó por cromatografía de afinidad (Figura 23). Por esta razón, se decidió llevar a cabo las pruebas siguientes con el extracto total que contenía la toxina recombinante, en lugar de utilizar las muestras purificadas.

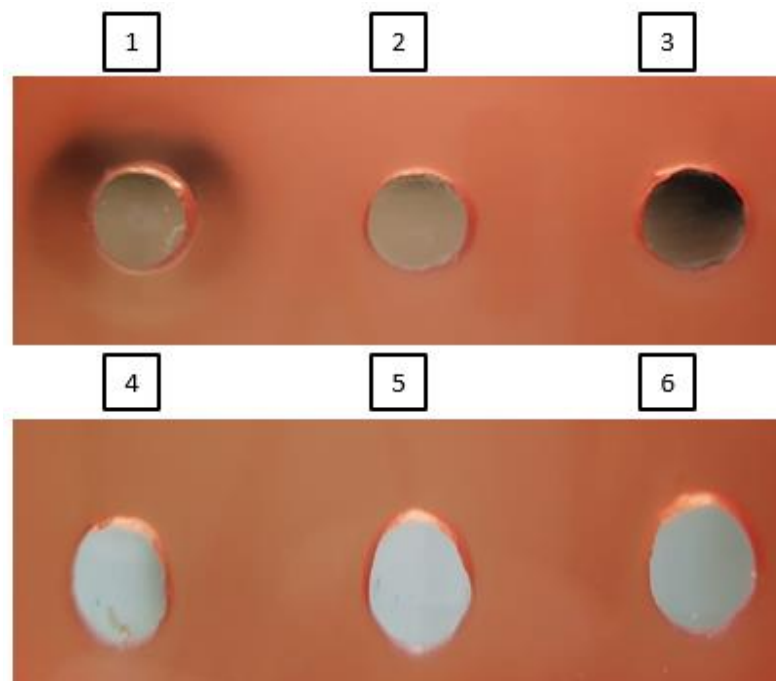


Figura 23. Detección de la actividad citolítica por difusión en pozo de las muestras purificadas en gel de agarosa al 1.5% enriquecido con eritrocitos de humano. Pocillo 1: Control Positivo (Fosfolipasa A₂); Pocillo 2: Control Negativo (Lisado de bacterias con pET28b); Pocillo 3: Muestra Ec-1; Pocillo 4: Muestra Ec-4; Pocillo 5: Muestra Ec-7; Pocillo 6: Muestra Ec-10

8.5 Determinación del efecto hemolítico extracto total que contenía la toxina recombinante

El efecto hemolítico del extracto total que contenía la hidralisina recombinante se evaluó y la respectiva curva concentración-respuesta (CCR) se muestra en la Figura 20. De acuerdo a la CCR, a una concentración de 35 μg de proteína/mL se observó una hemólisis del 90 – 95% de los eritrocitos. En tanto que la unidad hemolítica 50 (UH50) fue de $17.5 \pm 1.015 \mu\text{g/mL}$.

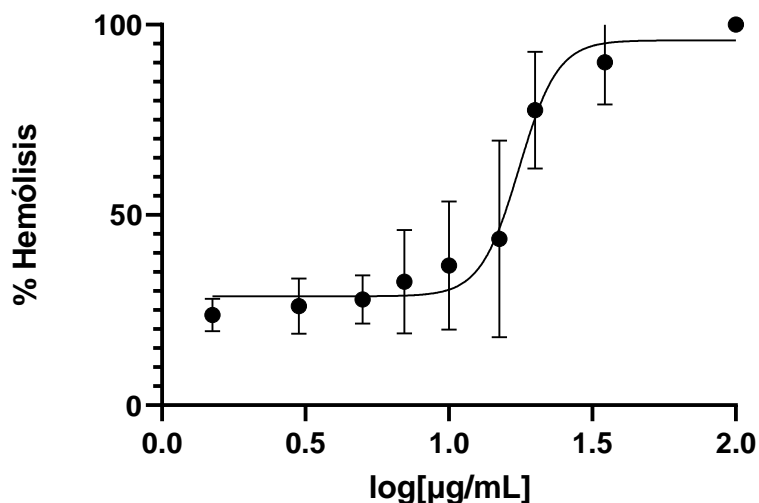


Figura 24. Actividad hemolítica del extracto total que contenía la hidralisina recombinante.

8.6 Determinación del blanco de unión

En la Figura 25 se muestran las respectivas CCR obtenidas para el efecto hemolítico del extracto total que contenía la hidralisina recombinante en presencia de diferentes carbohidratos y lípidos de membrana. Como puede observarse, no se observó una disminución del efecto hemolítico.

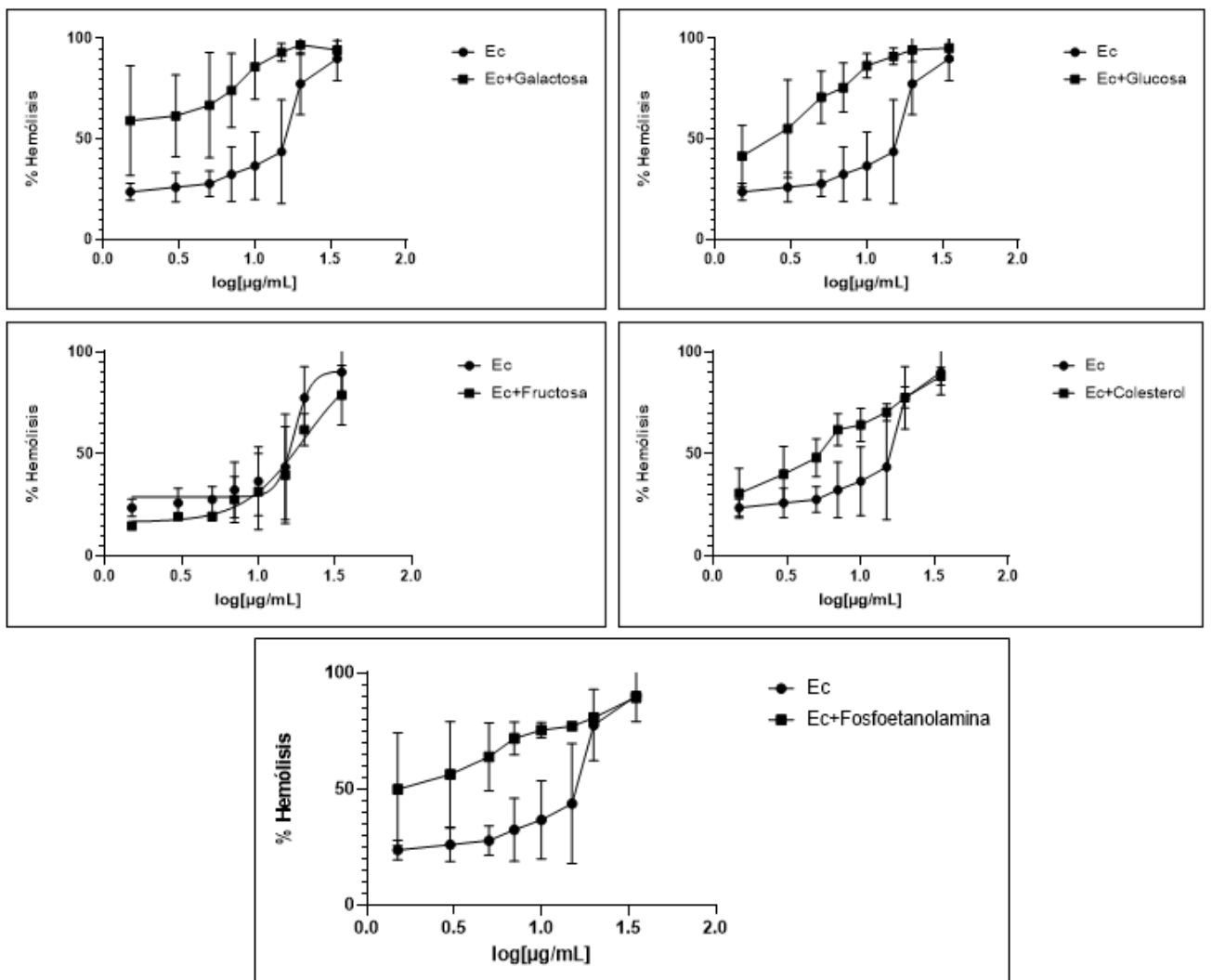


Figura 25. Determinación del posible blanco de unión utilizando diferentes carbohidratos y lípidos de membrana.

8.7 Estimación del tamaño de poro formado por el extracto total que contenía la hidralisina recombinante en la membrana de los eritrocitos

En el caso del ensayo de protección osmótica, se encontró que únicamente el tratamiento con PEG-8000 indujo una disminución en el efecto hemolítico del extracto total que contenía la hidralisina recombinante (Figura 26). Sin embargo, el tamaño del poro formado por la hidralisina no pudo determinarse de manera más precisa y considerando que el PEG-8000 posee un tamaño mayor a los 3 nm es probable que éste este provocando una disminución del efecto hemolítico

provocado por la formación de un poro más pequeño (de aproximadamente 1.2 nm) como el que se esperaría que formara la hidralisina.

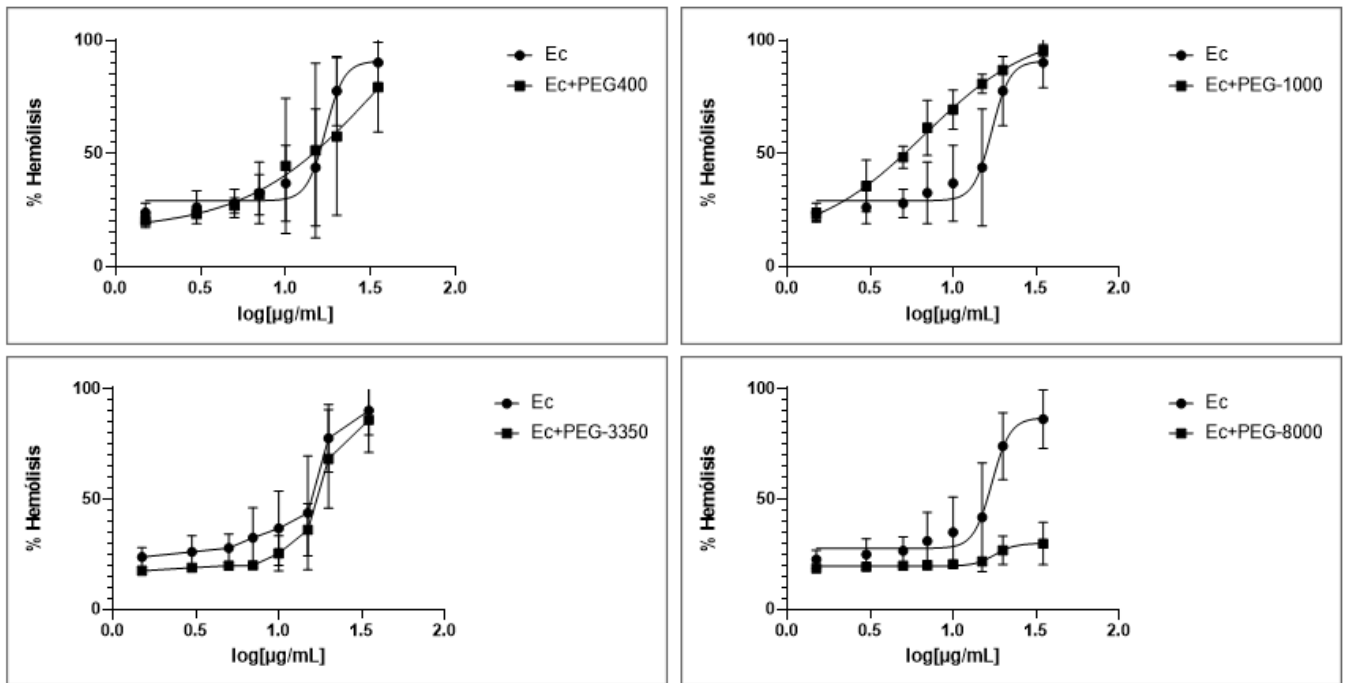


Figura 26. Estimación del tamaño de poro mediante el ensayo de protección osmótica utilizando diferentes polietilenglicoles (PEGs).

9. DISCUSIÓN

En los últimos años, las toxinas formadoras de poros (PFTs) han adquirido relevancia e interés por parte de los investigadores, debido a la creciente disponibilidad de información sobre su estructura y el mecanismo mediante el cual actúan sobre las membranas celulares. Estas toxinas proteicas poseen características estructurales que les brindan una gran versatilidad conformacional, lo cual posibilita que sean solubles en agua y que una vez que se unen a blancos moleculares en la membrana, cambien su conformación para formar poros en las integrales que atraviesan la membrana celular. Debido a esta capacidad de formar poros en las membranas, se han considerado diferentes aplicaciones potenciales para las PFTs en las áreas biotecnológica, farmacéutica y de investigación (Liew et al., 2015). Las hidralisinas son un tipo de β -PFTs secretadas por las células endocrinas digestivas de las hidras. Estas PFTs fueron descritas por primera vez por Sher y su grupo de investigación, quienes demostraron sus efectos citolíticos y neurotóxicos. Estos mismos investigadores encontraron evidencia de que las hidralisinas son β -PFTs, cuyos monómeros hidrosolubles son ricos en láminas β y al unirse a moléculas diana en las membranas celulares, se oligomerizan y forman poros transmembrana (Sher et al., 2005, 2008). Es importante mencionar que las hidralisinas sólo se habían reportado en cnidarios del género *Hydra* que pertenecen a la clase Hydrozoa al igual que los hidrocorales. Considerando la relevancia tanto ecológica, como toxinológica de las especies del género *Millepora*, era interesante investigar si efectivamente los hidrocorales sintetizan este tipo de toxinas. Así fue como nuestro grupo de investigación realizó un análisis bioinformático sobre el transcriptoma del hidrocoral *M. alcicornis*, recolectado en el Caribe Mexicano, el cual reveló la presencia de transcritos asociados con la síntesis de PFTs del tipo hidralisina. Adicionalmente, el grupo de trabajo del Dr. Ataulfo Martínez Torres del Instituto de Neurobiología de la UNAM logró detectar en el transcriptoma de un espécimen de *M. alcicornis*, recolectado del Caribe Puertorriqueño, la presencia de un transcrito que codifica para una PFT del tipo hidralisina.

Las hidralisinas (HIns) son toxinas no nematocísticas, es decir, que su origen no se encuentra en los nematocistos sino en la cavidad gastrovascular de las hidras. Sus

ortólogos se pueden encontrar en varias especies de hidra y se ha demostrado que exhiben actividad parálitica, citolítica y hemolítica. Adicionalmente, la actividad citotóxica de estas toxinas es selectiva del tipo de célula, lisando eficazmente células de insectos, pero no así de mamíferos (Sher et al., 2005; Yap y Hwang, 2018). Por otro lado, el hecho de que estas toxinas no se unen a las membranas celulares de las hidras, sugiere que su función está determinada por su sitio de unión específico (Podobnik y Anderluh, 2017). En los últimos años las PFTs han llamado la atención de los científicos debido a que sus características estructurales únicas pudieran permitir el desarrollo de múltiples aplicaciones en las áreas farmacéutica, biotecnológica, agrícola, etc. Particularmente, hablando de las hidralisinas, éstas podrían ser de gran utilidad en la agricultura, debido a que se podrían desarrollar bioinsecticidas a partir de estas toxinas, ya que se ha reportado que presentan mayor afinidad hacia las células de insectos. Por otro lado, a la fecha no se tiene información relevante acerca del posible blanco de unión, la cantidad de monómeros necesarios para la formación del poro o el tamaño exacto del poro formado por las hidralisinas. Indudablemente, es necesario profundizar en el análisis estructural de las hidralisinas y los mecanismos moleculares mediante los cuales forman poros en las membranas. De esta manera, será posible explorar su potencial para ser empleadas como herramientas biotecnológicas, farmacéuticas, en el área de la agricultura y en el ámbito de la investigación. En este sentido, es importante tener en cuenta que la obtención de toxinas a partir de especies del phylum Cnidaria es un proceso complicado, no solamente por la dificultad para recolectar los especímenes, que en muchos de los casos se trata de especies protegidas, sino también por los problemas técnicos implicados en su purificación. De tal forma que una alternativa idónea para obtener este tipo de toxinas involucra el empleo de tecnologías de clonación y expresión heteróloga.

En el presente trabajo de investigación, se llevó a cabo la clonación y posterior expresión heteróloga de una hidralisina, cuyo transcrito había sido identificado previamente en el transcriptoma de *M. alciconis*. Con este fin, se empleó el plásmido pET-28b y la cepa de *E. coli* C41 como huésped. En primer término, se realizó la clonación de la secuencia codificante para una hidralisina en el sistema de expresión pET, específicamente pET-28b, utilizando cebadores específicos para

la amplificación de la secuencia codificante de la hidralisina que portan los sitios de restricción NcoI y XhoI. El producto de la PCR indicó que los cebadores podían unirse y amplificar específicamente la secuencia de la toxina. En el último paso de la clonación, la secuencia del ADN del constructo pET28bEVT_HydMa confirmó que la secuencia codificante se insertó correctamente en marco del promotor T7. Adicionalmente, se comprobó que el extracto total que contenía la hidralisina expresada presentaba un efecto hemolítico sobre eritrocitos humanos.

9.1 Predicciones bioinformáticas sobre la secuencia de la hidralisina recombinante

En un estudio previo, llevado a cabo por Sher et al, se realizaron alineamientos globales de múltiples secuencias de aminoácidos correspondientes a diversas β -PFTs y se encontró que todas las secuencias presentaban un motivo que contenía un patrón alterno de residuos hidrófobos, que se denominó “loop flexible transmembrana” (Sher et al., 2005). Adicionalmente, se encontró que la sustitución de los residuos G125 y V140 provocaba una disminución e incluso pérdida de la toxicidad de las hidralisinas, lo cual era indicativo de la importancia de estos aminoácidos para la actividad biológica de estas toxinas. Más aún, se encontró que el aminoácido Q28, que se encuentra fuera del motivo formador de poros, también es importante a nivel funcional. Estos residuos se encontraron altamente conservados en la secuencia >Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N6 que se predijó a partir de la secuencia de nucleótidos mediante el portal ExPASy. De tal forma que es muy probable que la PFT de *M. alvicornis* (PFTma) obtenida por vía recombinante tenga un mecanismo de formación de poros similar al de las hidralisinas (Sher et al., 2005). También se encontró que la secuencia >Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N6 posee dos motivos ricos en aminoácidos hidroxilados como serina (S) y treonina (T). Estos motivos forman las estructuras de β -sándwich de las β PFT y se encargan de mantener protegida a la zona hidrofóbica de la proteína, confiriéndole hidrosolubilidad. Por otro lado, en la segunda región rica en residuos hidroxilados cerca del C-terminal se observa una “diada” de residuos de prolina en el centro. En los alineamientos realizados sobre las secuencias de diferentes hidralisinas se observó un motivo altamente conservado en esta zona compuesto por VTVPPRSK, que presenta la diada de prolinas mencionada anteriormente. Hasta el momento no

se tiene información acerca del papel que este motivo desempeña en las β -PFTs, sin embargo, es un componente altamente conservado en este tipo de toxinas (Sher et al., 2005). En este punto es importante mencionar que la cadena lateral de la prolina puede formar enlaces con la columna vertebral de las proteínas. De hecho, un estudio sobre las interacciones estereoespecíficas de los residuos de prolina en estructuras y complejos de proteína mostró que este aminoácido está involucrado en interacciones con residuos aromáticos (45%), debido a que generalmente la prolina se encuentra cerca de la superficie de la proteína, lo que conlleva a que tenga un número menor de contactos con otros átomos. Adicionalmente, el 30% de las cadenas laterales de W interactúan con el anillo de P, mientras que para los demás aminoácidos aromáticos (F y Y) alrededor del 20% de sus anillos mantienen interacciones. Además de este tipo de interacciones con residuos aromáticos, la P mantiene interacciones del tipo puente de hidrógeno C-H \cdots O no convencional que involucran a los grupos C-H del anillo (74%) (Bhattacharyya y Chakrabarti, 2003). De tal forma que este aminoácido está presente en algunos elementos conformacionales de las cadenas polipeptídicas, tales como giros β y hélices α , permitiendo así diferentes tipos de torsiones endocíclicas que confieren movilidad a las proteínas (Ho, 2005). Lo cual podría sugerir que la presencia de la diada de prolinas en las hidralisinas es de suma importancia a nivel estructural, debido a que podría estar permitiendo la movilidad de las zonas ricas en aminoácidos hidroxilados, para dejar al descubierto el sitio de interacción con su molécula diana en la membrana celular, lo cual desencadena la formación del poro en la membrana. Adicionalmente, se encontró un residuo de asparagina altamente conservado en los alineamientos de las hidralisinas. En la bibliografía se ha sugerido que este aminoácido es importante para la estabilidad de estas toxinas, sin embargo, no se tiene mucha evidencia al respecto (Sher et al., 2005). No obstante, se tiene información respecto a que este aminoácido es susceptible de glicosilarse, representando un sitio de N-glicosilación, lo cual es una de las modificaciones postraduccionales más comunes en las proteínas. Se sabe que los oligosacáridos modifican la polaridad y solubilidad de las proteínas y que algunas proteínas requieren de esta modificación postraduccionales para poderse plegar o bien para evitar la degradación proteolítica (Aebi, 2013). Tomando esto en cuenta, resulta

factible hipotetizar que la presencia de dicho residuo en las hidralisinas juega un papel importante en su plegamiento para adoptar una conformación estable y/o activa o para evitar su degradación en el organismo que las produce.

Por otro lado, uno de los principales retos en la expresión de las proteínas recombinantes es conocer el efecto que alguna mutación tendrá sobre la estabilidad de la proteína expresada de forma heteróloga. Una alternativa para abordar este problema es el empleo de herramientas computacionales que permitan predecir el efecto de una mutación sobre la estabilidad proteica. El software I-Mutant 2.0, el cual es uno de los más utilizados con esta finalidad, se basa en una gran base de datos termodinámicos de proteínas mutadas y permite predecir la dirección (signo $\Delta\Delta G$) de los cambios en la estabilidad de la proteína, así como los valores asociados a $\Delta\Delta G$ (Capriotti et al., 2005). Considerando la presencia de aminoácidos altamente conservados en las hidralisinas, cuya función no es clara, en el presente trabajo se realizaron experimentos in silico, mediante el software I-Mutant 2.0, para determinar la influencia de los residuos N46, P164 y P16 sobre la estabilidad de la hidralisina recombinante. Estos experimentos involucraron el intercambio de estos aminoácidos por alanina en la secuencia >Hydralis-AA_NcoI-XhoI_N6. Se utilizaron condiciones fisiológicas de temperatura y pH (37 °C y pH = 7.4) para simular el ambiente nativo de la toxina. Los resultados de este análisis revelaron que la sustitución de estos residuos por A, provocaron una disminución considerable en la estabilidad de la proteína. Adicionalmente, el índice de confiabilidad (RI, por sus siglas en inglés) presentó un valor de 5 para la modificación N46 → A46, mientras que, en el caso de las modificaciones P164 → A164 y P165 → A165 el valor de RI fue igual a 6. Este valor identifica la relación entre el valor de confiabilidad y la precisión de la predicción, facilitando la selección de qué mutaciones son más adecuadas para aumentar o disminuir la estabilidad de la proteína. Con base en los valores de RI obtenidos para las mutaciones en los sitios N46, P164 y P165 se puede concluir que estos aminoácidos son muy importantes para la estabilidad de la toxina y probablemente tienen un papel relevante en la estructura de la proteína plegada (Capriotti et al., 2004).

9.2 Inducción de la expresión y purificación de la proteína recombinante PFTma

La inducción de la expresión de PFTma se llevó a cabo utilizando el inductor IPTG, empleando un tiempo de 16 horas de incubación a 25 °C. En este ensayo se utilizaron dos cepas distintas de *E. coli* competentes, la cepa BL21 (DE3) y la cepa C41 (DE3). Estas cepas son de las más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes, debido a que presentan ciertas mutaciones que permiten la expresión de las proteínas, sin que éstas sean degradadas por la misma bacteria. En este trabajo, se observó que la cepa BL21 (DE3) presentaba una expresión muy reducida de la PFTma, en comparación con la cepa C41 (DE3). Esto podría deberse a que en BL21 (DE3) se está reconociendo a la secuencia codificante de la PFT como un elemento exógeno extraño que pudiera ser tóxico para las bacterias y, por ende, no se está produciendo la proteína de manera adecuada. En contraste, en la cepa C41 si se pudo expresar adecuadamente la toxina de interés. Esta cepa presenta mutaciones favorables para la expresión heteróloga de proteínas, entre las que se incluyen mutaciones en 4 genes: (1) PlacUV5 ha adquirido 3 mutaciones que debilitan al promotor. (2) El sistema YehU/T que regula la expresión del transportador de péptidos YjiY, este presenta una mutación que conduce al incremento de los niveles del transportador. (3) rbsD que codifica para una ribosa íranasa, la ausencia de IS 150 en rbsD permite el crecimiento eficiente de C41 en presencia de ribosa como única fuente de carbono. (4) dcuS que codifica para el sensor histidina quinasa del sistema regulador DcuS/DcuR encargado de regular la captación y utilización de carboxilatos. En C41 dcuS presenta una delección de 5 pb, permitiendo la utilización eficiente de dicarboxilatos (Schlegel et al., 2015). Estas mutaciones observadas en C41(DE3) han permitido que esta cepa sea más eficiente para la expresión de genes exógenos tóxicos, como es el caso concreto de la PFTma.

Actualmente, existen diferentes sistemas para la clonación y expresión de proteínas mediante sistemas de células bacterianas, de mamíferos o insectos. No obstante, el sistema pET es el más utilizado para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* impulsado por el potente promotor del bacteriófago T7 (Mierendorf et al., 1998). En el caso particular de producción de PFTs recombinantes identificadas en

cnidarios, las actinoporinas han sido las toxinas que más se han explorado para su expresión heteróloga. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Imani et al, se logró clonar y expresar la fragaceatoxina C (FraC) proveniente de *Actinia fragacea*, utilizando el sistema pET. Adicionalmente, Mei Liew en 2015 logró clonar y expresar en el sistema pET una PFT similar a las actinoporinas denominada “HALT-1”, la cual se identificó en *Hydra magnipapillata*. Cabe mencionar que el sistema de expresión pET también se ha utilizado para la obtención de 3 isoformas de hidralisinas identificadas por primera vez en la hidra *Chlorohydra viridissima* (Sher et al., 2005; Liew et al., 2015; Imani et al., 2017) Otra de las ventajas que ofrece el sistema pET es el sitio 6xHis, el cual codifica para un sitio de polihistidina que facilita la purificación de la proteína recombinante cuando ésta es sometida a cromatografía de afinidad. Esto permite que, en el mejor de los casos, el proceso de purificación pueda llevarse en un solo paso y se recupere un alto porcentaje de la proteína. En nuestro caso particular, el sistema pET permitió la expresión de PFTma, como se observó en el análisis por SDS-PAGE, ya que se obtuvo una banda de aproximadamente 27 kDa, que coincide con el rango del peso molecular de las hidralisinas, el cual es de 27 a 31 kDa (Sher et al., 2005; Podobnik y Anderluh, 2017). Desafortunadamente, la cantidad de proteína expresada no fue suficiente y adicionalmente, el proceso de purificación empleado no permitió obtener la toxina pura, como lo indicó el análisis mediante SDS-PAGE. El gel de electroforesis reveló una disminución en la intensidad de la banda de 27 kDa, después del análisis mediante cromatografía de afinidad. Además, se observó la presencia de bandas adicionales con pesos moleculares más bajos y más altos que el de la toxina de interés. La determinación de proteína total después de la purificación indicó que se obtuvieron en promedio 0.4 mg de proteína total/mL. Evidentemente, esta concentración no representa la de la hidralisina recombinante, sino la concentración total de todas las proteínas presentes en la fracción obtenida después de la cromatografía. Considerando estos resultados, es necesario optimizar el proceso de purificación, empleando además de cromatografía de afinidad, sistemas cromatográficos de exclusión molecular o de intercambio iónico.

El análisis electroforético, permitió observar que algunas de las bandas proteicas presentaban pesos moleculares que eran múltiplos de 27, lo cual permite plantear la hipótesis de que estas proteínas representan polímeros de unidades monoméricas de la PFTma y que pudieron purificarse debido a que poseen la etiqueta de polihistidina. Esta hipótesis se sustenta en evidencia previa proporcionada por Sher et al, en donde sus experimentos de transferencia de Western blot se han observado oligómeros de hidralisina con pesos alrededor de los 46 y 120 kDa (Sher et al., 2005) los cuales corresponden con los pesos de algunas de las bandas obtenidas en nuestro gel de electroforesis. Esta hipótesis requiere ser comprobada, por ejemplo, mediante análisis de espectrometría de masas para confirmar que efectivamente se está presentando un fenómeno de oligomerización de la PFTma recombinante.

9.3 Detección de la actividad citolítica

Se determinó, de forma cualitativa, el efecto hemolítico inducido por el extracto de proteína total obtenido a partir del lisado de las bacterias que expresaron la PFTma. Fue posible observar que este extracto total inducía un efecto citolítico al agregar una cantidad igual a 100 µg de proteína total. En un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo se encontró en un extracto acuoso preparado a partir de especímenes de *M. alcicornis* la presencia de dos tipos de citolisinas: unas eran enzimas con actividad de PLA2 con pesos moleculares de 15 kDa y 20 – 35 kDa y otras eran hemolisinas con un peso molecular aproximado de 200 kDa (Hernández-Matehuala et al., 2015). En dicho estudio no fue posible identificar las hemolisinas de alto peso molecular, sin embargo, considerando que dichas toxinas no presentaban actividad enzimática de PLA2, pudiera tratarse de toxinas formadoras de poros que se encontraban presentes en el extracto acuoso de *M. alcicornis* en forma oligomérica. En el caso de las hidralisinas, es bien conocido el hecho de que éstas presentan una estructura multimérica. Sin embargo, hasta el momento no se conoce con certeza el número de monómeros que conforman el poro integral. Se ha propuesto, debido a su similitud con toxinas de la familia de las aerolisinas, que los poros que forman las hidralisinas podrían ser heptaméricos (7 unidades) con un peso molecular cercano a los 190 – 217 kDa (Peraro y van der Goot, 2016).

Si bien en el ensayo de difusión en pozo se observó que el extracto del lisado de las bacterias que expresaron la hidralisina producía un halo de hemolisis, cuando se evaluó el efecto con la muestra que se había sometido a la cromatografía de afinidad no presentó ninguna actividad hemolítica. Es importante hacer mención de que en el último paso del proceso de purificación se formó un precipitado insoluble en agua, lo cual indicaba que algunas de las proteínas, incluyendo la hemolisina recombinante cambiaron su conformación y perdieron su solubilidad en agua. Esto puede atribuirse debido a varios factores, tales como: la temperatura, el pH del buffer de elución o la misma composición de dicha solución, la interacción con el soporte de las columnas Ni-NTA que pudiera promover una pérdida de la estructura plegada, entre otros. Estas modificaciones en el entorno de las proteínas pueden provocar su desnaturalización y favorecer la formación de compuestos insolubles que tienden a precipitar en el medio (Kramer et al., 2012; McPherson y Gavira, 2014).

9.4 Determinación del efecto hemolítico sobre eritrocitos humanos

El extracto total de las bacterias que expresaron la PFT de tipo hidralisina provocó una hemolisis dependiente de la concentración de eritrocitos humanos con un valor de unidad hemolítica 50 (HU50) de 17.5 ± 1.015 μg de proteína por mL. En estudios previamente realizados por nuestro grupo de investigación sobre *M. complanata* y *M. alcicornis*, se observó que los extractos acuosos de ambos hidrocorales presentaban actividad hemolítica sobre eritrocitos de humano. En el caso del extracto de *M. complanata* el valor de la HU50 fue de 9.49 ± 1.03 μg de proteína por mL, en tanto que el correspondiente extracto de *M. alcicornis* presentó una HU50 de 1.0 ± 0.31 μg de proteína por mL. De tal manera que los extractos acuosos de ambos hidrocorales indujeron un efecto hemolítico más potente que el del extracto del lisado bacteriano que contenía la hidralisina recombinante. Esto se explica considerando que el extracto acuoso de los hidrocorales contenía una mezcla de diferentes toxinas sintetizadas por estos cnidarios, todas contribuyendo al efecto hemolítico del extracto. De hecho, recientemente nuestro grupo de trabajo mostró evidencia de la participación de diferentes tipos de toxinas en la actividad hemolítica inducida por el extracto acuoso de *M. complanata*, mediante ensayos de inhibición

con inhibidores enzimáticos específicos. Por ejemplo, el EDTA fue capaz de reducir el 44.2% de la hemólisis, lo que implica que casi la mitad de las citolisinas responsables de esta actividad son toxinas dependientes de iones divalentes. Se encontró también que el efecto hemolítico disminuía significativamente en presencia de inhibidores de tripsina, quimiotripsina, serina-proteasa y metaloproteasas indicando la participación de varias proteasas en la hemólisis. Adicionalmente, el Varespladip, un inhibidor de PLA2, disminuyó en un 19.6% la actividad hemolítica, confirmando que este efecto es provocado, en parte, por PLA2s. Tomando en cuenta estos resultados, los autores de dicho trabajo hipotetizaron que el porcentaje restante del efecto hemolítico (aproximadamente un 36%) era inducido por PFTs. (Hernández-Elizárraga et al., 2022). Más aún, un análisis realizado también por nuestro grupo de investigación indicó que el proteoma soluble de especímenes blanqueados de *M. complanata* presentaban niveles elevados de dos proteínas que mostraban una secuencia de aminoácidos similar a las PFTs, ecotoxina-2 y DELTA-actitoxina-Oor1b (Hernández-Elizárraga et al., 2019). Adicionalmente, se identificó, mediante un enfoque de minería de datos, una toxina similar a la hidralisina en el transcriptoma de *M. complanata*., cuya secuencia proteica fue similar a la de las hidralisinas de la hidra verde *Chlorohydra viridissima* (Hernández-Elizárraga et al., 2022). Es importante mencionar que una hidralisina sintetizada por *C. viridissima* indujo hemólisis sobre eritrocitos de humano con una HU50 de 0.09 µg de proteína por mL. De tal manera, que indudablemente, la actividad hemolítica presentada por el extracto acuoso de *M. complanata* puede atribuirse en parte a la presencia de toxinas de tipo hidralisina (Sher et al., 2005).

En el caso de este estudio, el efecto hemolítico inducido por el extracto total de las bacterias que expresaron la hidralisina recombinante con una HU50 = 17.5 ± 1.0 µg de proteína/mL fue aproximadamente 200 veces menos potente que la hidralisina sintetizada por *C. viridissima*. Esto puede deberse a diferentes causas, por ejemplo, evidentemente el lisado bacteriano contiene una mezcla de componentes, algunos de los cuales podrían interferir con el proceso de reconocimiento y unión a la membrana de la hidralisina. Por otra parte, como ya se mencionó anteriormente, si realmente estuviera ocurriendo un proceso de pre-oligomerización, existirían pocos monómeros activos en el extracto que contiene la hidralisina recombinante que

podieran interactuar con la membrana de los eritrocitos, lo cual disminuiría la actividad hemolítica. También podría estar influyendo la composición de las membranas de los eritrocitos de humano. En este sentido, en un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio se demostró que existían diferencias en la susceptibilidad de hemólisis de diferentes tipos de eritrocitos ante la presencia del extracto acuoso de *M. alaicornis*, siendo los eritrocitos de rata los más susceptibles a hemolisarse, en tanto que los menos susceptibles resultaron ser los eritrocitos de pollo (Hernández-Matehuala et al., 2015). Además, estudios llevados a cabo por Zhang et al y Akiko et al muestran que las hidralisinas tienen un rápido efecto citotóxico sobre células de insectos y en menor grado sobre las células de mamíferos. En ambos estudios se sugiere que esto se debe a que las membranas de las células de los insectos son ricas en fosfoetanolamina y que posiblemente este compuesto sea el blanco de unión de las hidralisinas (Zhang et al., 2003; Yamaji-Hasegawa et al., 2016). Si esta hipótesis es correcta, entonces esto podría explicar la diferencia en la susceptibilidad de los eritrocitos provenientes de diferentes especies. De hecho, se estima que en los eritrocitos de pollo la proporción de fosfoetanolamina es de 10 – 14%, mientras que en los eritrocitos de rata la proporción de este fosfolípido es de aproximadamente un 21.5% y en eritrocitos de humano se encuentra cerca de 28%. Además, en células de insectos aún no se sabe con certeza la proporción exacta en la que se encuentra la fosfoetanolamina, pero se estima que esté por encima del 30% (Nelson, 1967). Sería interesante realizar experimentos para determinar el efecto de la hidralisina recombinante sobre células de insectos para demostrar si realmente esta toxina presenta un mayor efecto citolítico.

9.5 Determinación del blanco de unión utilizando diferentes lípidos y carbohidratos

Las PFTs se unen a componentes membranales específicos, lo cual inicia el proceso de oligomerización para la formación del poro. Este blanco de unión puede ser un componente de la membrana lipídica, como el colesterol, en el caso de las citolisinas dependientes de colesterol (CDC) o la esfingomielina, en el caso de las actinoporinas. Asimismo, en algunas ocasiones la unión a la membrana se da por la interacción de las PFTs con carbohidratos o proteínas. Por ejemplo, la aerolisina

se une a dos restos de azúcar en proteínas con anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) o la α -hemolisina (Hla) interactúa con el primer dominio extracelular de la proteína ADAM10 que contiene el dominio de desintegrina y metaloproteinasa (Tewten, 2005; Hu et al., 2013). En el caso particular de las hidralisinas se desconoce el posible blanco de unión, sin embargo, como se mencionó anteriormente las hidralisinas tienen un rápido efecto citotóxico sobre células de insectos y en menor grado sobre las células de mamíferos, ya que en principio las células de insectos presentan grandes cantidades de fosfoetanolamina y probablemente exista una interacción con este esfingolípido de membrana (Zhang et al., 2003; Yamaji-Hasegawa et al., 2016). Por otro lado, el estudio realizado por Sher et al demostró que las hidralisinas provenientes de *Chlorohydra viridissima* se unen a las membranas de eritrocitos humanos. Además, reportaron que la actividad hemolítica de las hidralisinas no se veía afectada por los tratamientos de las proteínas con colesterol, esfingomielina o fosfatidilcolina. De manera similar, los tratamientos con galactosa, manosa y lactosa no afectaron la actividad hemolítica de la proteína, lo que sugiere que estos componentes de membrana no son los receptores directos responsables de la unión a la membrana (Sher et al., 2005). En nuestro caso, los resultados son similares a los descritos anteriormente por Sher et al, ya que los tratamientos con galactosa, glucosa, fuctosa, colesterol y fosfoetanolamina (concentración 5 mM) no presentaron ningún efecto sobre la actividad hemolítica del extracto total. No obstante, se esperaba observar una disminución de la actividad hemolítica con la adición de fosfoetanolamina debido a la evidencia mostrada por otros grupos de investigación. Por tal motivo, se sugiere que hay una interferencia de matriz, es decir, las proteínas, carbohidratos, lípidos, etc; que son propios del extracto total que contenía la hidralisina recombinante se encuentran interfiriendo con las moléculas de prueba, provocando que no se pueda apreciar si existe o no una modificación en la actividad hemolítica de la PFTma. De tal forma que resulta indispensable implementar una nueva estrategia de purificación para la obtención de la PFTma con un alto porcentaje de pureza. Adicionalmente, el uso de técnicas computacionales para el modelado molecular podrían ser una herramienta idónea para tratar de predecir el posible blanco de

unión de la hidralisina como parte de un estudio complementario a los estudios biológicos (Lipkin y Lazaridis, 2017).

9.6 Estimación del tamaño de poro formado sobre membranas eritrocitarias

Finalmente, después de la unión a la membrana y del proceso de oligomerización, las PFTs experimentan cambios conformacionales que hacen que una parte de la toxina penetre en las membranas, formando los poros transmembranales. Los poros permiten la fuga de pequeñas moléculas, como neurotransmisores, iones mono y divalentes y metabolitos, seguidos de una afluencia de agua que provoca el estallido final de la célula (Jouiaei et al., 2015a; Peraro y van der Goot, 2016). Este tipo de lisis se denomina “lisis coloido-osmótica”, y se puede inhibir mediante la adición de moléculas que no son electrolitos y que poseen una elevada masa molecular a la solución extracelular. Debido a que, si el diámetro hidratado del protector no electrolítico es tal que no puede entrar a través de los poros, contrarrestará la osmolaridad de la hemoglobina intracelular, inhibiendo así la hemólisis (Sher et al., 2005, 2008). En este caso, el estudio de Sher et al. mostró evidencia de que la actividad hemolítica de la hidralisina se reduce notablemente con la adición de PEGs arriba de los 1500 Da, determinando así un tamaño putativo del poro de aproximadamente 1.2 nm. Estos resultados mostraron que el tamaño de poro formado por la hidralisina es muy similar a los poros formados por la aerolisina, α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* y la toxina α de *Clostridium septicum* (AT) (Ballard et al., 1993; Sekiya y Futaesaku, 1998; Sher et al., 2005). En nuestros resultados se observó que el único tratamiento que presentó una disminución de la actividad hemolítica provocada por el extracto total conteniendo la hidralisina recombinante fue el PEG-8000 (concentración 5 mM). Si comparamos estos resultados con los de los trabajos descritos anteriormente, existe concordancia. Sin embargo, esta aproximación del tamaño de poro está muy por arriba del tamaño reportado de 1.2 nm, debido principalmente a que el PEG-8000 presenta un tamaño de diámetro hidratado por encima de los 3 nm, lo cual facilitaría eventualmente la disminución del daño hemolítico provocado por el extracto total. De acuerdo a los ensayos de determinación del blanco de unión, es muy probable que se esté presentando nuevamente la interferencia de matriz en este ensayo. Una alternativa

viable para obtener una estimación más confiable sobre el tamaño de poro sería utilizar una variedad más amplia de PEGs o el uso ya sea de técnicas computacionales o electrofisiológicas para obtener un dato más exacto acerca del tamaño de poro e inclusive tratar de predecir la cantidad de monómeros que están participando en el proceso de oligomerización (Lipkin y Lazaridis, 2017; Talavera y Nilius, 2011).

10. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se reporta por primera vez la expresión heteróloga de una toxina formadora de poros de tipo hidralisina identificada en el transcriptoma de un organismo del género *Millepora*.

Se encontró que el vector de expresión pET28b permite expresar en la cepa de *E. coli* C41 (DE3) la hidralisina detectada en el transcriptoma de *M. alcicornis*.

El uso de la etiqueta 6xHis en la hidralisina recombinante contribuyó a facilitar su purificación parcial mediante cromatografía de afinidad. Sin embargo, no fue posible obtener la toxina pura. Es recomendable probar otras estrategias a fin de optimizar el proceso de purificación.

El lisado bacteriano obtenido tras la expresión de la hidralisina recombinante indujo un efecto hemolítico de eritrocitos humanos, el cual es dependiente de la concentración, con un valor de UH50 de 17.5 µg proteína /ml. Este hecho constituye una evidencia de que el proceso de clonación y expresión de la PFT de *M. alcicornis* logró producir una toxina funcional.

La alta complejidad del extracto total obtenido a partir del lisado de las bacterias que expresaron la hidralisina no permitió obtener resultados concluyentes acerca de la molécula diana con la cual interacciona esta toxina en la membrana celular. El empleo de técnicas computacionales, tales como el modelado molecular de proteínas, podría proporcionar información preliminar acerca de las interacciones que esta toxina pudiera establecer con diferentes componentes membranales.

Los ensayos de protección osmótica mostraron que el tratamiento con PEG-8000 disminuyó la hemólisis provocada por extracto total obtenido a partir del lisado de las bacterias que expresaron la hidralisina. Sin embargo, no se logró establecer con mayor precisión el tamaño del poro formado por esta PFT. Indudablemente, es importante purificar la toxina y realizar más estudios a fin de determinar de forma inequívoca el tamaño del poro que forma la hidralisina recombinante en las membranas celulares.

11.PERSPECTIVAS

A partir de los resultados derivados de la presente investigación, resulta evidente que es necesario optimizar el proceso de producción de la PFT recombinante identificada en el transcriptoma de *M. alaicornis*. También es prioritario purificar la toxina, a fin de poder obtener resultados concluyentes sobre la molécula diana con la cual interacciona en la membrana celular y el tamaño del poro que forma. Más aún, el contar con la toxina pura, posibilitaría llevar a cabo su secuenciación mediante espectrometría de masas, con lo cual se obtendría información relevante acerca de su estructura primaria. Adicionalmente, mediante el empleo de técnicas *in silico*, se podría modelar la proteína y predecir la forma en que ésta estaría interaccionando con la membrana celular y el mecanismo mediante el cual forma los poros membranales.

12. REFERENCIAS

- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(11), 2430–2437. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.001>
- Allemand, D., y Furla, P. (2018). How does an animal behave like a plant? Physiological and molecular adaptations of zooxanthellae and their hosts to symbiosis. *Comptes Rendus Biologies*, 341(5), 276–280. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2018.03.007>
- Americus, B., Lotan, T., Bartholomew, J. L., y Atkinson, S. D. (2020). A comparison of the structure and function of nematocysts in free-living and parasitic cnidarians (Myxozoa). *International Journal for Parasitology*, 50(10–11), 763–769. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.04.012>
- Ballard, J., Sokolov, Y., Yuan, W.-L., Kagan, B. L., y Tweten, R. K. (1993). Activation and mechanism of Clostridium septicum alpha toxin. *Molecular Microbiology*, 10(3), 627–634. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00934.x>
- Baneyx, F., y Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399–1408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>
- Barott, K. L., Venn, A. A., Perez, S. O., Tambutté, S., y Tresguerres, M. (2015). Coral host cells acidify symbiotic algal microenvironment to promote photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), 607–612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413483112>
- Ben-Ari, H., Paz, M., y Sher, D. (2018). The chemical armament of reef-building corals: inter- and intra-specific variation and the identification of an unusual actinoporin in Stylophora pistillata. *Scientific Reports*, 8(1), 251. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18355-1>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., y Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Bhattacharyya, R., y Chakrabarti, P. (2003). Stereospecific interactions of pro-line residues in protein structures and complexes. *Journal of Molecular Biology*, 331(4), 925–940. doi: 10.1016/s0022-2836(03)00759-9.
- Birkholtz, L.-M., Blatch, G., Coetzer, T. L., Hoppe, H. C., Human, E., Morris, E. J., Ngcete, Z., Oldfield, L., Roth, R., Shonhai, A., Stephens, L., y Louw, A. I.

- (2008). Heterologous expression of plasmodial proteins for structural studies and functional annotation. *Malaria Journal*, 7(1), 197. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-197>
- Bosch, T. C. G., Klimovich, A., Domazet-Lošo, T., Gründer, S., Holstein, T. W., Jékely, G., Miller, D. J., Murillo-Rincon, A. P., Rentzsch, F., Richards, G. S., Schröder, K., Technau, U., y Yuste, R. (2017). Back to the Basics: Cnidarians Start to Fire. *Trends in Neurosciences*, 40(2), 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.11.005>
- Brinkman, D., y Burnell, J. (2007). Identification, cloning and sequencing of two major venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, 50(6), 850–860. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.06.016>
- Brinkman, D. L., Jia, X., Potriquet, J., Kumar, D., Dash, D., Kvaskoff, D., y Mulvenna, J. (2015). Transcriptome and venom proteome of the box jellyfish *Chironex fleckeri*. *BMC Genomics*, 16(1), 407. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1568-3>
- Capriotti, E., Fariselli, P., y Casadio, R. (2004). A neural-network-based method for predicting protein stability changes upon single point mutations. *Bioinformatics*, 20(Suppl 1), i63–i68. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth928>
- Capriotti, E., Fariselli, P., y Casadio, R. (2005). I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server), W306–W310. <https://doi.org/10.1093/nar/gki375>
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., y Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49(2), 124–141. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.022>
- Chang, E. S., Neuhof, M., Rubinstein, N. D., Diamant, A., Philippe, H., Huchon, D., y Cartwright, P. (2015). Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(48), 14912–14917. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511468112>
- Choudhary, I., Hwang, D., Lee, H., Yoon, W., Chae, J., Han, C., Yum, S., Kang, C., y Kim, E. (2019). Proteomic Analysis of Novel Components of *Nemopilema nomurai* Jellyfish Venom: Deciphering the Mode of Action. *Toxins*, 11(3), 153. <https://doi.org/10.3390/toxins11030153>
- Clement, H., Flores, V., Diego-Garcia, E., Corrales-Garcia, L., Villegas, E., y Corzo, G. (2015). A comparison between the recombinant expression and chemical synthesis of a short cysteine-rich insecticidal spider peptide. *Journal*

of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 21(1), 19.
<https://doi.org/10.1186/s40409-015-0018-7>

Cuevas-Cruz, M., Lazcano-Pérez, F., Hernández-Guzmán, U., Díaz de la Vega-Castañeda, K. H., Román-González, S. A., Valdez-Cruz, N. A., Velasco-Bejarano, B., Colín-González, A. L., Santamaría, A., Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., y Arreguín-Espinosa, R. (2019). A Novel Phospholipase A2 Isolated from *Palythoa caribaeorum* Possesses Neurotoxic Activity. *Toxins*, 11(2), 89. <https://doi.org/10.3390/toxins11020089>

de Carvalho, N. D., Garcia, R. C., Kleber Ferreira, A., Rodrigo Batista, D., Carlos Cassola, A., Maria, D., Lebrun, I., Mendes Carneiro, S., Castro Afeche, S., Marcourakis, T., y Sandoval, M. R. L. (2014). Neurotoxicity of coral snake phospholipases A2 in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research*, 1552, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.008>

Doonan, L. B., Lynham, S., Quinlan, C., Ibiji, S. C., Winter, C. E., Padilla, G., Jaimes-Becerra, A., Morandini, A. C., Marques, A. C., y 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>

Dubé, C. E., Boissin, E., Mercière, A., y Planes, S. (2018). *Dispersal limitations of early life stages and sibling aggregations in a broadcasting Millepora hydrocoral, as revealed by parentage analysis*. *Ecology*. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/413963>

Esposito, D., y Chatterjee, D. K. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.003>

Fautin, D. G. (2002). Reproduction of Cnidaria. *Canadian Journal of Zoology*, 80(10), 1735–1754. <https://doi.org/10.1139/z02-133>

Fransolet, D., Roberty, S., y Plumier, J.-C. (2012). Establishment of endosymbiosis: The case of cnidarians and Symbiodinium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 420–421, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.03.015>

Frazão, B., y Antunes, A. (2016). Jellyfish Bioactive Compounds: Methods for Wet-Lab Work. *Marine Drugs*, 14(4), 75. <https://doi.org/10.3390/md14040075>

Frazão, B., Campos, A., Osório, H., Thomas, B., Leandro, S., Teixeira, A., Vasconcelos, V., y Antunes, A. (2017). Analysis of *Pelagia noctiluca* proteome

- Reveals a Red Fluorescent Protein, a Zinc Metalloproteinase and a Peroxiredoxin. *The Protein Journal*, 36(2), 77–97.
<https://doi.org/10.1007/s10930-017-9695-0>
- Frazão, B., Vasconcelos, V., y Antunes, A. (2012). Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Marine Drugs*, 10(12), 1812–1851.
<https://doi.org/10.3390/md10081812>
- Froger, A., y Hall, J. E. (2007). Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. *Journal of Visualized Experiments*, 6, 253.
<https://doi.org/10.3791/253>
- 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., y 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>
- García-Arredondo, A., Rojas-Molina, A., Bah, M., Ibarra-Alvarado, C., Gallegos-Corona, M. A., y García-Servín, M. (2015). Systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora complanata* and partial purification of thermostable neurotoxins with lethal effects in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 169, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.12.004>
- García-Ortega, L., Alegre-Cebollada, J., García-Linares, S., Bruix, M., Martínez-del-Pozo, Á., y Gavilanes, J. G. (2011). The behavior of sea anemone actinoporins at the water–membrane interface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(9), 2275–2288.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.05.012>
- Glasser, E., Rachamim, T., Aharonovich, D., y Sher, D. (2014). Hydra actinoporin-like toxin-1, an unusual hemolysin from the nematocyst venom of *Hydra magnipapillata* which belongs to an extended gene family. *Toxicon*, 91, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.004>
- Hariprasad, G., Srinivasan, A., y Singh, R. (2013). Structural and phylogenetic basis for the classification of group III phospholipase A2. *Journal of Molecular Modeling*, 19(9), 3779–3791. <https://doi.org/10.1007/s00894-013-1913-x>
- Harris, D. L., Rovere, A., Casella, E., Power, H., Canavesio, R., Collin, A., Pomeroy, A., Webster, J. M., y Parravicini, V. (2018). Coral reef structural complexity provides important coastal protection from waves under rising sea

levels. *Science Advances*, 4(2), eaao4350.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aao4350>

Hernández-Elizárraga, V. H., Ocharán-Mercado, A., Olguín-López, N., Hernández-Matehuala, R., Caballero-Pérez, J., Ibarra-Alvarado, C., y 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., y 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., y 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>

Ho, B. K. (2005). The flexibility in the proline ring couples to the protein backbone. *Protein Science*, 14(4), 1011–1018. <https://doi.org/10.1110/ps.041156905>

Honma, T., Kawahata, S., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y., y Shiomi, K. (2008). Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. *Peptides*, 29(4), 536–544. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.12.010>

Hu, C.-M. J., Fang, R. H., Luk, B. T., y Zhang, L. (2013). Nanoparticle-detained toxins for safe and effective vaccination. *Nature Nanotechnology*, 8(12), 933–938. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.254>

Imani, M., Zarei Jaliani, H., Kheirandish, M. H., y Azadpour, M. (2017). Recombinant production and affinity purification of the FraC pore forming toxin using hexa-His tag and pET expression cassette. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(4). <https://doi.org/10.22038/ijbms.2017.8577>

Jaimes-Becerra, A., Gacesa, R., Doonan, L. B., Hartigan, A., Marques, A. C., Okamura, B., y Long, P. F. (2019). “Beyond Primary Sequence”—Proteomic Data Reveal Complex Toxins in Cnidarian Venoms. *Integrative and Comparative Biology*, 59(4), 777–785. <https://doi.org/10.1093/icb/icz106>

- Jouiaei, M., Casewell, N., Yanagihara, A., Nouwens, A., Cribb, B., Whitehead, D., Jackson, T., Ali, S., Wagstaff, S., Koludarov, I., Alewood, P., Hansen, J., y Fry, B. (2015b). Firing the Sting: Chemically Induced Discharge of Cnidae Reveals Novel Proteins and Peptides from Box Jellyfish (*Chironex fleckeri*) Venom. *Toxins*, 7(3), 936–950. <https://doi.org/10.3390/toxins7030936>
- Jouiaei, M., Sunagar, K., Federman Gross, A., Scheib, H., Alewood, P. F., Moran, Y., y Fry, B. G. (2015c). Evolution of an Ancient Venom: Recognition of a Novel Family of Cnidarian Toxins and the Common Evolutionary Origin of Sodium and Potassium Neurotoxins in Sea Anemone. *Molecular Biology and Evolution*, 32(6), 1598–1610. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv050>
- Jouiaei, M., Yanagihara, A., Madio, B., Nevalainen, T., Alewood, P., y Fry, B. (2015a). 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., y 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>
- Kramer, R. M., Shende, V. R., Motl, N., Pace, C. N., y Scholtz, J. M. (2012). Toward a Molecular Understanding of Protein Solubility: Increased Negative Surface Charge Correlates with Increased Solubility. *Biophysical Journal*, 102(8), 1907–1915. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.01.060>
- Kropp, L. M., Parsley, C. B., y Burnett, O. L. (2018). Millepora species (Fire Coral) Sting: A Case Report and Review of Recommended Management. *Wilderness & Environmental Medicine*, 29(4), 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2018.06.012>
- Lassen, S., Helmholz, H., Ruhnau, C., y Prange, A. (2011). A novel proteinaceous cytotoxin from the northern Scyphozoa *Cyanea capillata* (L.) with structural homology to cubozoan haemolysins. *Toxicon*, 57(5), 721–729. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.004>
- Lee, G., y Bae, H. (2016). Bee Venom Phospholipase A2: Yesterday's Enemy Becomes Today's Friend. *Toxins*, 8(2), 48. <https://doi.org/10.3390/toxins8020048>
- Lee, H., Jung, E., Kang, C., Yoon, W. D., Kim, J.-S., y Kim, E. (2011). Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. *Toxicon*, 58(3), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.06.007>

- Legendre, J. Y., y Szoka, F. C. (1993). Cyclic amphipathic peptide-DNA complexes mediate high-efficiency transfection of adherent mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(3), 893–897. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.3.893>
- Li, R., Yu, H., Xue, W., Yue, Y., Liu, S., Xing, R., y Li, P. (2014). Jellyfish venomics and venom gland transcriptomics analysis of *Stomolophus meleagris* to reveal the toxins associated with sting. *Journal of Proteomics*, 106, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.011>
- Li, T., Ding, T., y Li, J. (2018). Medicinal Purposes: Bioactive Metabolites from Marine-derived Organisms. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 19(2), 138–164. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170927113143>
- Liew, Y., Soh, W., Jiemy, W., y Hwang, J. (2015). Mutagenesis and Functional Analysis of the Pore-Forming Toxin HALT-1 from *Hydra magnipapillata*. *Toxins*, 7(2), 407–422. <https://doi.org/10.3390/toxins7020407>
- Lipkin, R., y Lazaridis, T. (2017). Computational studies of peptide-induced membrane pore formation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1726), 20160219. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0219>
- Luchian, T., Shin, S.-H., y Bayley, H. (2003). Kinetics of a Three-Step Reaction Observed at the Single-Molecule Level. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(17), 1926–1929. <https://doi.org/10.1002/anie.200250666>
- Majd, S., Yusko, E. C., Billeh, Y. N., Macrae, M. X., Yang, J., y Mayer, M. (2010). Applications of biological pores in nanomedicine, sensing, and nanoelectronics. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(4), 439–476. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.05.002>
- McPherson, A., y Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 70(1), 2–20. <https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141>
- Mierendorf, R. C., Morris, B. B., Hammer, B., y Novy, R. E. (1998). Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. In *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases* (pp. 257–292). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-485-2:257>
- Minagawa, S., Sugiyama, M., Ishida, M., Nagashima, Y., y Shiomi, K. (2008). Kunitz-type protease inhibitors from acrorhagi of three species of sea anemones. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry*

and Molecular Biology, 150(2), 240–245.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.03.010>

- Montecucco, C., Gutiérrez, J. M., y Lomonte, B. (2008). Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(18), 2897–2912. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8113-3>
- Morabito, R., Spada, G., Crupi, R., Esposito, E., y Marino, A. (2015). Crude Venom from Nematocysts of the Jellyfish *Pelagia noctiluca* as a Tool to Study Cell Physiology. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 15(2), 68–73. <https://doi.org/10.2174/1871524914666141028150212>
- Moran, Y., Gordon, D., y Gurevitz, M. (2009). Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels – molecular and evolutionary features. *Toxicon*, 54(8), 1089–1101. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.028>
- Moran, Y., Praher, D., Schlesinger, A., Ayalon, A., Tal, Y., 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>
- Nagai, H., Takuwa, K., Nakao, M., Sakamoto, B., Crow, G. L., y Nakajima, T. (2000). Isolation and Characterization of a Novel Protein Toxin from the Hawaiian Box Jellyfish (Sea Wasp) *Carybdea alata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(2), 589–594. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3352>
- Nagai, H., Takuwa-Kuroda, K., Nakao, M., Oshiro, N., Iwanaga, S., y Nakajima, T. (2002). A Novel Protein Toxin from the Deadly Box Jellyfish (Sea Wasp, *Habukura*) *Chiropsalmus quadrigatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(1), 97–102. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.97>
- Nelson, G. J. (1967). Lipid composition of erythrocytes in various mammalian species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 144(2), 221–232. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(67\)90152-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(67)90152-X)
- Olguín-López, N., Hernández-Elizárraga, V. H., Hernández-Matehuala, R., Cruz-Hernández, A., Guevara-González, R., Caballero-Pérez, J., Ibarra-Alvarado, C., y 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>

- Orts, D., Peigneur, S., Madio, B., Cassoli, J., Montandon, G., Pimenta, A., Bicudo, J., Freitas, J., Zaharenko, A., y Tytgat, J. (2013). Biochemical and Electrophysiological Characterization of Two Sea Anemone Type 1 Potassium Toxins from a Geographically Distant Population of *Bunodosoma caissarum*. *Marine Drugs*, *11*(12), 655–679. <https://doi.org/10.3390/md11030655>
- Ostolaza, H., González-Bullón, D., Uribe, K. B., Martín, C., Amuategi, J., y 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>
- Özbek, S., Balasubramanian, P. G., y 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>
- Park, E., Hwang, D.-S., Lee, J.-S., Song, J.-I., Seo, T.-K., y Won, Y.-J. (2012). Estimation of divergence times in cnidarian evolution based on mitochondrial protein-coding genes and the fossil record. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *62*(1), 329–345. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.10.008>
- Parker, M. W., y 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>
- Peraro, M. D., y van der Goot, F. G. (2016). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(2), 77–92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3>
- Podobnik, M., y Anderluh, G. (2017). Pore-forming toxins in Cnidaria. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *72*, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.026>
- Ramírez-Carretero, S., Miranda-Zaragoza, B., y 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>
- Rodrigues, V., Rocha, C., Périco, L., Santos, R., Ohara, R., Nishijima, C., Ferreira Queiroz, E., Wolfender, J.-L., Rocha, L., Santos, A., Vilegas, W., y Hiruma-Lima, C. (2017). Involvement of Opioid System, TRPM8, and ASIC Receptors in Antinociceptive Effect of *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11), 2304. <https://doi.org/10.3390/ijms18112304>

- Rodríguez, A. A., Salceda, E., Garateix, A. G., Zaharenko, A. J., Peigneur, S., López, O., Pons, T., Richardson, M., Díaz, M., Hernández, Y., Ständker, L., Tytgat, J., y Soto, E. (2014). A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels. *Peptides*, *53*, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.06.003>
- Ruiz-Ramos, D. v, Weil, E., y 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>
- Sahdev, S., Khattar, S. K., y Saini, K. S. (2007). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *307*(1–2), 249–264. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9603-6>
- Schlegel, S., Genevaux, P., y de Gier, J.-W. (2015). De-convoluting the Genetic Adaptations of *E. coli* C41(DE3) in Real Time Reveals How Alleviating Protein Production Stress Improves Yields. *Cell Reports*, *10*(10), 1758–1766. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.029>
- Sekiya, K., y Futaesaku, Y. (1998). Characterization of the damage to membranes caused by bacterial cytolysins. *Journal of Electron Microscopy*, *47*(6), 543–552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jmicro.a023627>
- Sher, D., Fishman, Y., Melamed-Book, N., Zhang, M., y 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., y Zlotkin, E. (2005). Hydralysins, a New Category of β -Pore-forming Toxins in Cnidaria. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(24), 22847–22855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503242200>
- Sørensen, H. P., y Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, *115*(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004>
- Stabili, L., Parisi, M., Parrinello, D., y Cammarata, M. (2018). Cnidarian Interaction with Microbial Communities: From Aid to Animal's Health to Rejection Responses. *Marine Drugs*, *16*(9), 296. <https://doi.org/10.3390/md16090296>
- Stier, E. M., Mandal, M., y Lee, K.-D. (2005). Differential Cytosolic Delivery and Presentation of Antigen by Listeriolysin O-Liposomes to Macrophages and

- Dendritic Cells. *Molecular Pharmaceutics*, 2(1), 74–82.
<https://doi.org/10.1021/mp049896v>
- Talavera, K., y Nilius, B. (2011). Electrophysiological Methods for the Study of TRP Channels. In M. Zhu (Ed.), *TRP CHANNELS*.
- Tanaka, K., Caaveiro, J. M. M., Morante, K., y Tsumoto, K. (2017). Haemolytic actinoporins interact with carbohydrates using their lipid-binding module. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1726), 20160216. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0216>
- Tejuca, M., Dalla Serra, M., Potrich, C., Alvarez, C., y Menestrina, G. (2001). Sizing the Radius of the Pore Formed in Erythrocytes and Lipid Vesicles by the Toxin Sticholysin I from the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Journal of Membrane Biology*, 183(2), 125–135.
<https://doi.org/10.1007/s00232-001-0060-y>
- Thampi, V. A., Anand, M., y Bauch, C. T. (2018). Socio-ecological dynamics of Caribbean coral reef ecosystems and conservation opinion propagation. *Scientific Reports*, 8(1), 2597. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20341-0>
- Tsutsui, K., y Sato, T. (2018). Identification of the two new, functional actinoporins, CJTOX I and CJTOX II, from the deep-sea anemone *Cribrinopsis japonica*. *Toxicon*, 148, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.008>
- Tweten, R. K. (2005). Cholesterol-Dependent Cytolysins, a Family of Versatile Pore-Forming Toxins. *Infection and Immunity*, 73(10), 6199–6209.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6199-6209.2005>
- Wang, Y., Gu, L.-Q., y Tian, K. (2018). The aerolysin nanopore: from peptidomic to genomic applications. *Nanoscale*, 10(29), 13857–13866.
<https://doi.org/10.1039/C8NR04255A>
- Xu, C., Chinte, U., Chen, L., Yao, Q., Meng, Y., Zhou, D., Bi, L.-J., Rose, J., Adang, M. J., Wang, B.-C., Yu, Z., y Sun, M. (2015). Crystal structure of Cry51Aa1: A potential novel insecticidal aerolysin-type β -pore-forming toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462(3), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.068>
- Yamaji-Hasegawa, A., Hullin-Matsuda, F., Greimel, P., y 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., y Wilcox, C. (2017). Cubozoan Sting-Site Seawater Rinse, Scraping, and Ice Can Increase Venom Load: Upending Current First Aid Recommendations. *Toxins*, 9(3), 105. <https://doi.org/10.3390/toxins9030105>
- Yap, W., y Hwang, J. (2018). Response of Cellular Innate Immunity to Cnidarian Pore-Forming Toxins. *Molecules*, 23(10), 2537. <https://doi.org/10.3390/molecules23102537>
- Zhang, M., Fishman, Y., Sher, D., y 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>

ANEXOS



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

DGOPA -PF-01

FOLIO No.139/15

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

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

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

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

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

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

Sitio de Desembarque Autorizado o Puerto Base:

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

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

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

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

AUTORIDAD EXPEDIDORA
DIRECTOR GENERAL

VICTOR MANUEL ARRIAGA HARO **FIRMA**
NOMBRE **CARGO** **HOJA 1 DE 3**

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

INTERESADO



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

DGOPA -PF -02

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

DIRECCIÓN GENERAL DE ORDENAMIENTO PESQUERO Y ACUÍCOLA

PERMISO DE PESCA DE FOMENTO

FOLIO No.139/15

TÉRMINOS Y CONDICIONES:

1.- Objetivo general:

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

2. Participantes:

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

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

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

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

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

AUTORIDAD EXPEDIDORA

VICTOR MANUEL ARRIAGA HARO
NOMBRE

DIRECTOR GENERAL
CARGO

FIRMA

HOJA 2 DE 3



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

DGOPA -PF -02

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

COMISIÓN NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA

DIRECCIÓN GENERAL DE ORDENAMIENTO PESQUERO Y ACUÍCOLA

PERMISO DE PESCA DE FOMENTO

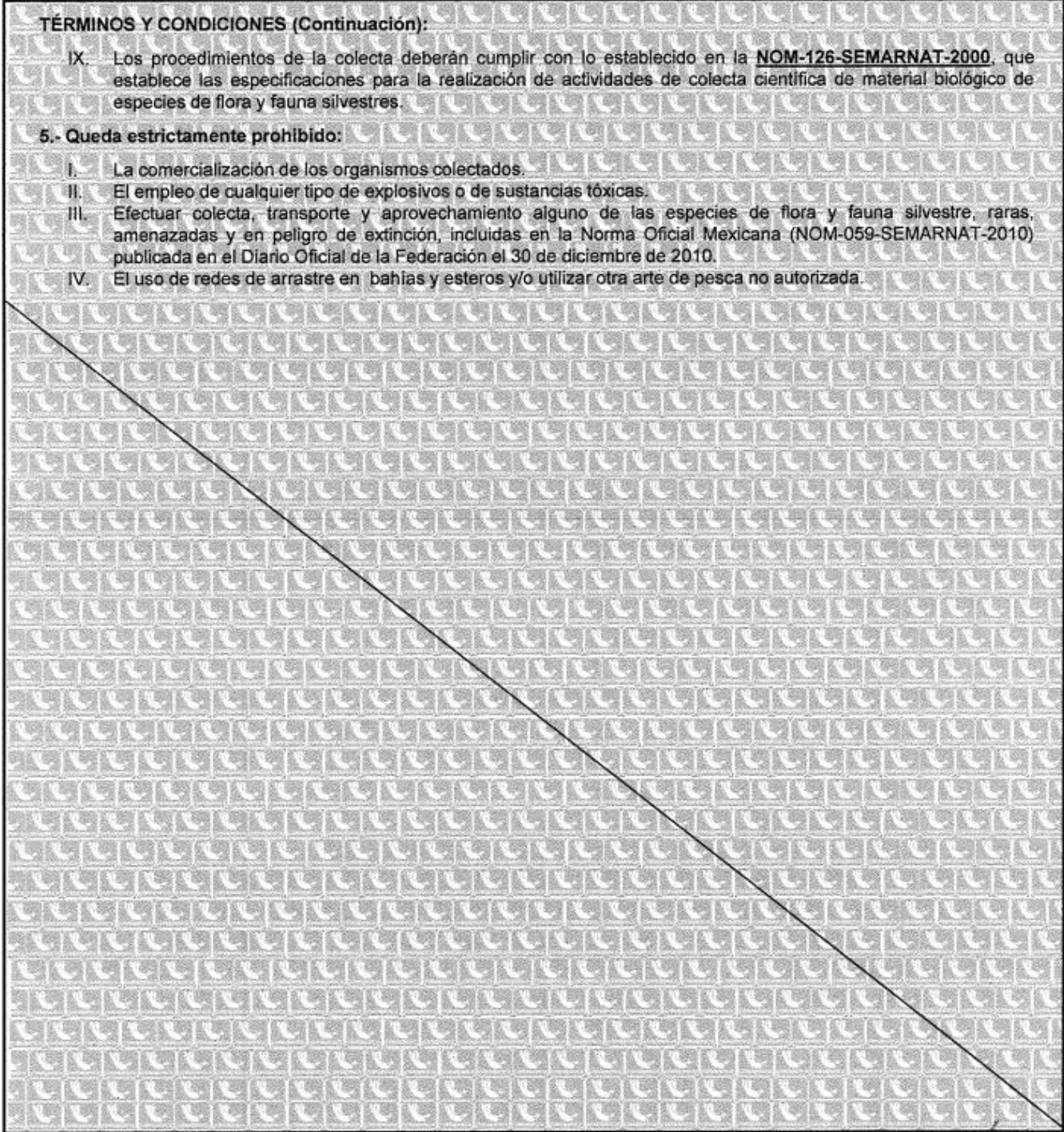
FOLIO No.139/15

TÉRMINOS Y CONDICIONES (Continuación):

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

5.- Queda estrictamente prohibido:

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



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

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

INTERESADO

ca