

**Mecanismos inmunológicos en Cnidaria: Caracterización *in silico* de
Péptidos antimicrobianos.**

Edwar Armando Leal Parada

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas

Universidad de Pamplona

Pamplona, Colombia

2022

**Mecanismos inmunológicos en Cnidaria: Caracterización *in silico* de
Péptidos antimicrobianos.**

Edwar Armando Leal Parada

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Biólogo

Director

Dr. Luis Parmenio Suescún Bolívar

Codirector

Dr. Marlon Múnera Gómez

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas

Universidad de Pamplona

Pamplona, Colombia

2022

Agradecimientos

Al programa de Biología, en especial a aquellos docentes que de algún modo influyeron y enaltecieron mi formación académica en las ciencias básicas.

A mi Madre por su apoyo incondicional durante toda mi formación profesional.

Al Dr. Luis Parmenio y Marlon Múnera, por su gran apoyo durante la elaboración de este trabajo

Abreviaturas

AMPs: Antimicrobial peptides	MDA5: melanoma differentiation-associated protein 5
PAMP: Pathogen-associated molecular patterns	LGP2: Probable ATP-dependent RNA helicase DHX58
PRR: Pattern Recognition Receptor	IFIH1: interferon induced with helicase C domain 1. Gen que codifica a MDA5
NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	LBP: Lipopolysaccharide binding protein
TGF-β: transforming growth factor beta	LPS: lipopolisacáridos
TSR: trombospondina	ECSIT: Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial
TLR: Toll-like receptor	IRAK: Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
TIR: Toll interleukin receptor	TAK1: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
MyD88: Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88	IκK: The I κ B kinase
IL-1R: Interleukin-1 receptor	MEKK1: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
TNF: tumor necrosis factor	MKK: Mitogen-activated Kinase Kinase
TRAF: TNF receptor associated factors	JNK: Jun N-terminal Kinase
TBK1: TANK-binding kinase 1	IFN: Interferón
NIK: NF- κ B inducer kinase	IRF3: Interferon regulatory factor 3
IRF: Interferon regulatory factors	TRAM: Translocating chain-associating membrane protein
AP-1: Activator Protein 1	MASP: mannose-associated serine protease
MACPF: Membrane Attack Complex/Perforin	PPO: inactive prophenoloxidase
CTLD: C-type lectin-like domain	PO: active phenoloxidase
EGF: epidermal growth factor	TMD: transmembrane domain
MBL: mannose-binding lectin	CSM: capa superficial de moco
NLR: Nucleotide-binding and oligomerization domain NOD-like receptors	ROS: reactive oxygen species
NACHT, NOD: nucleotide-binding domain	SOD: Enzima superóxido dismutasa
MAPK: mitogen-activated protein kinases	HSP: Heat Shock Proteins
CARD: caspase activation and recruitment domain	
RLR: RIG-like receptors	
RIG-I: gen I inducible por ácido retinoico	

Tabla de contenido

1. Resumen	8
2. Abstract	9
3. Introducción.....	10
4. Marco Teórico y antecedentes	11
4.1. Generalidades de los cnidarios	11
4.2. Sistema inmune en cnidarios	12
4.3. Simbiosis e inmunidad.....	13
4.4. Reconocimiento inmunológico en cnidarios.....	14
4.4.1. Receptores tipo Toll (TLR)	15
4.4.2. Lectinas	16
4.4.3. Receptores similares a NOD.....	17
4.4.4. Los receptores tipo RIG-I (RLR).....	18
4.4.5. Otros PRR	18
4.5. Señalización inmunitaria.....	18
4.6. Respuestas efectoras en cnidarios	21
4.7. Péptidos antimicrobianos	23
4.7.1. Estructura de los péptidos antimicrobianos	25
4.7.2. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.....	26
4.7.3. Mecanismo de acción intracelular.....	29
4.7.4. AMP pertenecientes a la familia de las defensinas	29
4.8. Aplicaciones biotecnológicas	30
5. Justificación	31
6. Hipótesis.....	32
7. OBJETIVOS	32
7.1. Objetivo general.....	32
7.2. Objetivos específicos	32
8. Métodos	32
8.1. Búsqueda en bases de datos.....	33
8.2. Modelamiento estructural de péptidos.....	33
8.3. Refinamiento y evaluación de los modelos 3D	33
8.4. Caracterización fisicoquímica de péptidos	33

8.5. Predicción de actividad contra especies microbianas específicas	33
8.6. Análisis de relaciones filogenéticas	33
9. Resultados	34
9.1 Modelamiento estructural de péptidos	34
9.2. Evaluación de la calidad de los modelos	38
9.3. Caracterización fisicoquímica de péptidos	41
9.4. Predicción de actividad contra especies microbianas específicas	44
9.5. Análisis de relaciones filogenéticas	45
10. Discusión.....	47
10.1. Modelamiento estructural de péptidos.....	47
10.2. Propiedades fisicoquímicas.....	48
10.3. Predicción de actividad contra especies microbianas específicas	49
10.4. Análisis de relaciones filogenéticas	50
11. Conclusiones	52
12. Referencias	53
13. Datos suplementarios	66

Índice de figuras

Figura 1: Esquema general de los principales receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) y posibles respuestas efectoras de la inmunidad en invertebrados identificados en Cnidaria.	15
Figura 2: Estructuras típicas de AMP	26
Figura 3: Mecanismos de acción de los AMP	28
Figura 4: Estructura 3D de péptidos con potencial antimicrobiano modelados en 11 especies de cnidarios	35
Figura 5: Alineación de secuencias de los diferentes modelos estructurales obtenidos en Cnidaria, con las secuencias de defensinas utilizadas como plantilla	38
Figura 6: Diagramas de Ramachandran para cada uno de los modelos descritos en Cnidaria	39
Figura 7: Estructura 3D de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de 12 péptidos con potencial antimicrobiano modelados en 11 especies de cnidarios.	42
Figura 8: Árbol filogenético de potenciales AMP identificados en Cnidaria y defensinas descritas en diferentes organismos.	46
Figura 9: Graphical Abstract	52

Índice de tablas

Tabla 1: Componentes de diferentes vías de señalización asociados con la respuesta inmune en cnidarios.	19
Tabla 2: Secuencias de péptidos antimicrobianos hallados en Cnidaria a los cuales se les determino su estructura 3D	34
Tabla 3: Evaluación de la calidad de los modelos	41
Tabla4: Características fisicoquímicas de potenciales AMP en cnidarios	42
Tabla 5: Predicción de actividad contra especies microbianas	45

Índice de Tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1. Secuencias peptídicas de cnidarios similares a defensinas	66
---	----

1. Resumen

Los cnidarios son un grupo de invertebrados que surgieron hace 700 millones de años atrás. Presentan una gran complejidad que se ve reflejada en el genoma del sistema inmune. La caracterización de estos mecanismos de defensa ha sido posible gracias a los análisis genómicos y transcriptómicos llevados a cabo en diferentes cnidarios, los cuales han mostrado la presencia de varios genes que codifican moléculas de respuesta inmune conservadas en vertebrados. Para Cnidaria se han descrito diversos receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), y moléculas de señalización intracelular que tienen como fin hacer efectiva la transcripción de genes con funciones inmunes, y moléculas efectoras, cuyo objetivo es la eliminación del patógeno.

Los péptidos antimicrobianos favorecen la respuesta efectora contra patógenos y son moléculas claves dada su capacidad de acción contra hongos, virus y bacterias. Además, son altamente conservados y en Cnidaria tienen capacidad bactericida, lo cual los convierte en moléculas que pueden ser modelos para estudios evolutivos y de bioprospección. El objetivo de esta investigación fue caracterizar estructuralmente péptidos antimicrobianos (AMP) pertenecientes a la familia de las defensinas en diferentes especies de cnidarios mediante análisis computacional. Para alcanzar este propósito se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de secuencias homólogas a péptidos antimicrobianos pertenecientes a la familia de las defensinas en los proteomas disponibles para cnidarios, también se realizó un modelamiento 3D por homología de secuencias y una caracterización funcional de los péptidos con una herramienta desarrollada bajo un enfoque de aprendizaje automático. El modelamiento 3D por homología permitió la caracterización estructural de doce péptidos en 11 especies de cnidarios, los cuales mostraron similitud estructural con defensinas descritas en las especies *Nasonia vitripennis*, *Pisum sativum*, *Solanum lycopersicum* y *Aurelia aurita*. A estos péptidos también se les realizó una evaluación de diferentes propiedades fisicoquímicas como momento hidrofóbico, hidrofobicidad, carga neta, índice de anfifilia y punto isoeléctrico, mostrando valores que son ideales para AMP. La caracterización funcional mostró potencial bactericida de 20 péptidos contra las bacterias multirresistentes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Por último, se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético, donde se evidencia que la defensina Nuetrophil, descrita en *Homo sapiens*, comparte un ancestro común cercano con diferentes péptidos descritos en cnidarios, caracterizados por mostrar un potencial bactericida y una estructura α hélice rica en cisteínas (seis), típica de defensinas de mamíferos e insectos. Los resultados obtenidos muestran que Cnidaria presenta AMP con características estructurales y fisicoquímicas similares a las descritas en defensinas de insectos, mamíferos y plantas. Las características estructurales de estos péptidos, sus propiedades fisicoquímicas y su potencial funcional los perfila como moléculas prometedoras para hallazgo de nuevos antibióticos.

Palabras claves: Cnidaria, péptidos antimicrobianos, defensinas, propiedades fisicoquímicas, potencial de acción.

2. Abstract

Cnidarians are invertebrates that emerged 700 million years ago. They present a great complexity that is reflected in the genome of the immune system. The characterization of these defense mechanisms in Cnidarians has been possible thanks to genomic and transcriptomic analyses, which have shown the presence of several genes that encode immune response molecules conserved in vertebrates. For Cnidaria, various pathogen recognition receptors (PRR) have been described, signaling molecules that have the purpose of making the transcription of genes with immune functions effective, and effector molecules, whose objective is the elimination of the pathogen.

Antimicrobial peptides favor the effector response against pathogens and are key molecules given their ability to act against fungi, viruses and bacteria. In addition, they are highly conserved and in Cnidaria they have bactericidal capacity, which makes them molecules that can be models for evolutionary and bioprospecting studies. The objective of this research was to structurally characterize antimicrobial peptides (AMP) belonging to the defensin family in different species of Cnidarians by computational analysis. To achieve this purpose, an exhaustive search was carried out for sequences homologous to antimicrobial peptides belonging to the defensin family in the proteomes available for Cnidarians, as well as 3D modeling by sequence homology and a functional characterization of the peptides with a tool developed under a machine learning approach. 3D homology modeling allowed the structural characterization of twelve peptides in 11 Cnidarian species, which showed structural similarity with defensins described in the species *Nasonia vitripennis*, *Pisum sativum*, *Solanum lycopersicum* and *Aurelia aurita*. These peptides were also evaluated for different physicochemical properties such as hydrophobic moment, hydrophobicity, net charge, amphiphilic index and isoelectric point, showing values that are ideal for AMP. The functional characterization showed bactericidal potential of 20 peptides against multiresistant bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. Finally, the construction of a phylogenetic tree was carried out, where it is evident that the Nuetrophil defensin, described in *Homo sapiens*, shares a close common ancestor with different peptides described in Cnidarians, characterized by showing a bactericidal potential and an α helix structure rich in cysteines (six), typical of mammalian and insect defensins. The results obtained show that Cnidaria present AMP with structural and physicochemical characteristics similar to those described in defensins of insects, mammals and plants. The structural characteristics of these peptides, their physicochemical properties and their functional potential outline them as promising molecules for the discovery of new antibiotics.

Keywords: Cnidaria, antimicrobial peptides, defensins, physicochemical properties, action potential

3. Introducción

Los cnidarios son un filo primitivo de invertebrados que surgieron hace 700 millones de años. Son organismos de anatomía simple y ciclo de vida dismórfico que les permite utilizar ambientes y recursos variados. Este filo está representado por especies pelágicas tanto de agua dulce (Jankowski et al., 2008) como marinos (Collins, 2002), y organismos sésiles bentónicos como los corales hermatípicos (Veron, 2000). Entre sus representantes se encuentran los corales, hidras, medusas, anemonas de mar, barcos de guerra portugueses, plumas de mar, látigos de mar y abanicos de mar (Stabili et al., 2018).

A pesar de su morfología primitiva, los genomas de los cnidarios presentan una gran complejidad que se ve reflejada en el repertorio de genes inmunes innatos. Diferentes investigaciones han permitido la descripción de una variedad de moléculas implicadas en los procesos inmunológicos de la inmunidad innata. Uno de estos procesos es el reconocimiento inmunológico, en el cual se reconocen patrones moleculares en un patógeno con el fin de inducir una respuesta que conduzca a su destrucción. Entre los receptores que más han sido estudiados se encuentran: los receptores de tipo Toll (TLR), asociados con la activación de los factores de transcripción de la familia NF- κ B; los receptores similares a NOD, a los cuales se les ha atribuido la capacidad de activar varias vías inmunes, como la vía NF- κ B, interferón, proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), e inflammasoma (Elinav, Strowig, Henao-Mejia, & Flavell, 2011); las lectinas, proteínas de unión a carbohidratos involucradas en la activación de la cascada de complemento y la opsonización (Dunn, 2009); y los receptores tipo RIG-I (RLR), asociados con la activación del sistema de interferón (Yoneyama et al., 2005). También se han identificado mediadores de traducción de señales que junto con los receptores tienen la función de activar factores de transcripción que inducen la activación de genes inmunes que inician respuestas efectoras adecuadas como fagocitosis, opsonización, lisis y producción de péptidos antimicrobianos (Cerenius, Kawabata, Lee, Nonaka, & Söderhäll, 2010).

Esta investigación se enfocó en la búsqueda de péptidos antimicrobianos en diferentes especies de cnidarios, un componente vital en la respuesta efectora del sistema inmunológico innato en invertebrados, cuyo conocimiento puede ayudar a comprender la forma en que estos organismos enfrentan amenazas como el cambio climático actual y la contaminación local, que traen consigo un aumento de patógenos causantes de enfermedades (Mydlarz et al., 20016). El interés por estos péptidos también se traslada a la necesidad actual de buscar nuevas moléculas antimicrobianas debido al aumento de la resistencia a los antibióticos en especies bacterianas (Alós, 2015).

En este trabajo se caracterizaron péptidos similares a defensinas descritas en distintos organismos; además se detectó potencial de acción contra tres especies microbianas de interés médico en 20 péptidos, lo cual postula a estas moléculas como compuestos bioactivos con un alto potencial de acción contra diferentes patógenos y enfermedades.

4. Marco Teórico y antecedentes

4.1. Generalidades de los cnidarios

Los cnidarios son un grupo primitivo de invertebrados que surgieron hace 700 millones de años atrás y cuya característica principal es la presencia de cnidocitos, células localizadas en la epidermis y que alojan cnidocistos, estructuras que constan de una capsula invaginada de pared doble, un opérculo y un filamento que se encuentra enrollado y que comúnmente esta armado con espinas para ser utilizado en la captura de presas, la defensa y adhesión (Genzano & Schiariti, 2016). Una de las principales peculiaridades de este grupo es que en algunos individuos se presenta un ciclo de vida dimórfico, con una morfología pólipo adaptada a la vida sésil en el ambiente bentónico, y una morfología medusa de vida libre y nadadora en el ambiente pelágico (Gasca & Ramos, 2014), característica que representa una ventaja adaptativa ya que una especie puede utilizar ambientes y recursos totalmente diferentes. Estos metazoos son simples anatómicamente y fisiológicamente; presentan un sistema digestivo o celenterón con forma de saco simple o ramificado, con un solo orificio con funciones de boca y ano (Gasca & Ramos, 2014). Poseen dos hojas embrionarias, el ectodermo y el endodermo que en la fase adulta son la epidermis y la gastrodermis separadas por una tercera capa acelular llamada mesoglea; presentan simetría radial o birradial que implica disposiciones anatómicas concretas en estructuras relacionadas con la alimentación y en la disposición de los órganos sensoriales (Rupper & Barnes, 1996). La epidermis contiene cinco tipos de células principales: epiteliomusculares, intersticiales, glandulares, cnidocitos, sensoriales y nerviosas; por su parte, la gastrodermis recubre la cavidad gastrovacular con células nutritivas musculares (células epiteliomusculares), intersticiales y glandulares (Genzano & Schiariti, 2016). La célula epiteliomuscular es el tipo de célula muscular más sobresaliente en los cnidarios, presentan filamentos lisos y constituyen el componente principal de las dos capas corporales; se caracteriza por su multifuncionalidad ya que intervienen en tareas relacionadas con la absorción de nutrientes durante el proceso digestivo, en la adhesión al sustrato y soporte para cnematocitos (Leclère & Röttinger, 2017). Las células intersticiales son células indiferenciadas y capaces de transformarse en cualquiera de los demás tipos de célula (Rupper & Barnes, 1996). Por su parte las células glandulares secretan mucus que se utiliza para la fijación y funciones antisépticas, en algunos casos también secretan gas que se acumula en una burbuja en especies que lo utilizan para la flotación (Genzano & Schiariti, 2016). Como se mencionaba al inicio los cnidocitos son células que contienen cnidocistos, orgánulos con diferentes funciones como captura de presas, la defensa y la adhesión. Estas estructuras se presentan en tres formas: nematocistos presentes en todos los cnidarios, los espirocistos únicamente en los hexacorales, y los pticocistos en los ceriantarios (Terrón et al., 2018). La presencia de un plexo nervioso en la base de ambas capas celulares los convierte en los animales más simples con células nerviosas y órganos de los sentidos. Las células sensoriales están esparcidas a lo largo de la epidermis concentrándose particularmente alrededor de la boca, en los tentáculos y en el discopodio, estructuras donde también se encuentran mayormente alojados los cnidocitos (Genzano & Schiariti, 2016).

En general en Cnidaria destaca dos tipos de morfología, la fase pólipo y la fase medusa. La fase pólipo está presente en todas las clases de cnidarios, esta forma es bentónica, sésil y generalmente

se encuentra en agregaciones de organismos similares (Gasca & Ramos, 2014), tienen forma tubular con una boca en el extremo oral que suele estar rodeada de tentáculos y un extremo aboral generalmente unido al sustrato a través del discopodio (Genzano & Schiariti, 2016). El celénteron o cavidad gastrovascular actúa tanto en la circulación como en la digestión de nutrientes (Rupper & Barnes, 1996). Por su parte la fase medusa es planctónica, solitaria y libre nadadora, normalmente presente simetría tetrámera o polímera, tienen cuerpo en forma de campana (umbrela) con una superficie externa y cóncava (exumbrela) y una interna convexa (subumbrela) (Gasca & Ramos, 2014). La boca se encuentra presente en el centro de la subumbrela frecuentemente en el extremo de una extensión tubular llamadas manubrio, la cavidad gastrovascular ubicada en la parte central de la umbrela se prolonga hacia el borde umbrelar en forma de canales radiales (Rupper & Barnes, 1996).

Entre los representantes del filo Cnidaria podemos encontrar corales, hidras, medusas, anemonas de mar, barcos de guerra portugueses, plumas de mar, látigos de mar y abanicos de mar (Stabili et al., 2018). Todos estos grupos se encuentran distribuidos en dos subfilos: Medusozoa, con fase pólipo y medusa, y Anthozoa solo con fase pólipo. La mayoría de los cnidarios son carnívoros, el contacto con la presa se presenta generalmente a través de los tentáculos con la ayuda de cnidocitos que inmovilizan y capturan presas a través de toxinas paralizantes (Genzano & Schiariti, 2016). Algunos establecen relaciones simbióticas que representan un rol importante en la vida y desarrollo de estos organismos; un ejemplo de esto son las relaciones de mutualismo existentes entre corales escleractinios y algas zooxantelas, donde los cnidarios se benefician de los productos bioquímicos de la fotosíntesis y brindan soporte y protección a sus simbioses.

4.2. Sistema inmune en cnidarios

La respuesta inmune se clasifica en inmunidad innata, que representa la primera línea de defensa, tiene limitada variabilidad, especificidad y es ancestral (de origen evolutivo basal); y la inmunidad adaptativa, que está presente sólo en vertebrados mandibulados y se caracteriza por la alta diversidad y especificidad de sus respuestas mediadas por linfocitos y receptores de antígeno (Cadavid, 2016).

Se conoce hasta ahora que los cnidarios, como invertebrados, dependen de la inmunidad innata. Esta se caracteriza por presentar dos mecanismos de defensa: el celular, representado por células fagocíticas, y el humoral, representado por la síntesis y liberación de compuestos químicos que incluyen melanina, especies reactivas de oxígeno (ROS), péptidos antimicrobianos (AMP) y metabolitos secundarios (Stabili et al., 2018). Mientras que existen tres procesos inmunológicos principales del sistema inmune de los cnidarios: 1) reconocimiento inmunológico, 2) señalización intracelular, y 3) respuesta efectora (Mydlarz et al., 2016), los cuales serán abordados más adelante.

La inmunidad innata presenta limitada especificidad y por esto su capacidad está basada en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que son estructuras moleculares bien conservadas expresadas por varios agentes infecciosos como virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos (Buchmann, 2014). Estos patrones moleculares son detectados por receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) (Fig. 1), proteínas presentes en la membrana celular con un dominio extracelular y uno citoplasmático que reconocen y se unen a diferentes

componentes de la pared celular del patógeno tales como, lipopolisacáridos (LPS), flagelina, ARN bicatenario, peptidoglicanos y carbohidratos estructurales (Buchmann, 2014). Los receptores inducen una señal activadora bien sea de origen extracelular o intracelular, que termina en una respuesta efectora y la muerte del agente infeccioso (Cadavid, 2016). En este mecanismo de respuesta también actúan mediadores de traducción de señales, donde destaca la activación de una diversidad de factores de transcripción y cascadas de señalización intracelular que inducen la transcripción de genes inmunes que inician las respuestas efectoras adecuadas como fagocitosis, opsonización, lisis y producción de péptidos antimicrobianos (Cerenius et al., 2010). Finalmente, el organismo debe sellar la infección y desintoxicar el tejido para curar la herida (Mydlarz et al., 2016).

4.3. Simbiosis e inmunidad

Los cnidarios como algunos corales, anémonas y medusas, establecen mutualismo con algas dinoflageladas de la familia Symbiodiniaceae que generalmente residen dentro de las células de la gastrodermis del huésped cnidario (Davy, Allemand, & Weis, 2012). En esta asociación los cnidarios aportan nutrientes a las algas, así como dióxido de carbono derivado de la respiración; las algas fotosintéticas por su parte producen azúcares, lípidos y oxígeno que contribuyen a la producción de energía para la actividad metabólica del huésped (Allemand, Furla, & Bénazet, 1998). Se cree que este fenómeno subyace en cuatro fases: a) reconocimiento y fagocitosis, b) regulación de la biomasa huésped simbiote, c) intercambio metabólico y tráfico de nutrientes, d) calificación, en el caso de los corales escleractíneos (Davy et al., 2012). La primera fase es crucial ya que la especie hospedadora debe desarrollar mecanismos que reconozcan y toleren los microbios beneficiosos sin quedar vulnerable al ataque de agentes infecciosos, y por su parte los microbios beneficiosos deben tener la capacidad para invadir y poder sobrevivir dentro de su anfitrión (Neubauer et al., 2017).

Se ha planteado que la fase de reconocimiento está mediada por interacciones lectina - glucano, una relación común de PAMP - PRR en repertorios inmunes innatos de animales (Davy et al., 2012). Un estudio con la anémona de mar *Aiptasia pulchella* demostró que la eliminación de glucanos en la superficie de Symbiodinium disminuyó significativamente el éxito de la infección (Lin, Wang, & Fang, 2000). En tres especies de Symbiodiniaceae se midió la afinidad de gliconjugados presentes en su superficie celular con diferentes tipos de lectinas, se pudo determinar que tanto los residuos de D - manosa como D - glucosa son probablemente componentes funcionales de la superficie del simbiote que participan en el reconocimiento de Symbiodiniaceae y el mantenimiento del mutualismo, además se encontró que lectinas específicas para manosas BC2L-A, CALSEPA, GRFT y ORYSATA reconocieron glicoproteínas en las tres especies de simbiotes (Tortorelli et al., 2021). En *Pocillopora damicornis* mediante experimentos de inmunolocalización se encontró PdC-Lectina en células de coral pertenecientes al tejido endodérmico en contacto con simbiotes dinoflagelados libres presentes transitoriamente en el coelenteron, lo cual sugiere un papel putativo de PdC-Lectina en la interacción y adquisición de zooxantelas (Vidal-Dupiol et al., 2009). En este mismo estudio se demostró que PdC-Lectina muestra grandes similitudes con lectinas denominadas Millectinas, aisladas en el coral *Acropora millepora* con capacidad para unirse a patógenos bacterianos como a ciertos miembros de la familia Symbiodiniaceae (Kvennefors, Leggat, Guldborg, Degnan, & Barnes, 2008).

La regulación negativa de la expresión de algunos genes de la inmunidad parece ser necesaria para la simbiosis en cnidarios. Esto se evidencia en *Exaiptasia daiphana* (anteriormente *Exaiptasia pallida*) cuya expresión y actividad del factor de transcripción NF- κ B estuvo regulado negativamente al introducir células de *Symbiodinium* en larvas aposimbióticas, y regulado positivamente con la pérdida de la simbiosis (Mansfield et al., 2017). Por otra parte, se ha planteado que la regulación de citocinas del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) cumple un papel importante en el establecimiento de la simbiosis. En *Exaiptasia daiphana*, la adición de TGF- β humano exógeno suprimió la respuesta inmune inducida por LPS, mientras que la adición anti TGF- β previno la aparición de simbiosis, lo cual sugiere que los simbioses dinoflagelados promueven la tolerancia del huésped a través de la activación de las vías inmunes tolerogénicas (Detournay, Schnitzler, Poole, & Weis, 2012). En esta especie también se caracterizó la glucoproteína trombospondina (TSR), donde se demostró que el dominio TSR estimula la adquisición de simbioses (Neubauer et al., 2017). Sin embargo, ciertos corales blanqueados se encuentran inmuno-suprimidos, esto puede observarse en el coral *Orbicella faveolata*, donde se demostró que vías relacionadas con el sistema inmunitario, como la apoptosis y el sistema de complemento, se suprimen durante el blanqueamiento y se mantienen así después de un año del evento (Pinzón et al., 2015).

Estos hallazgos sugieren que los genes de la inmunidad innata se regulan regulados positiva o negativamente según las condiciones necesarias para el establecimiento de la simbiosis. Por ejemplo, la regulación positiva de genes relacionados con la expresión de lectinas puede resultar crucial para el reconocimiento y unión del simbioses, y la inhibición del factor de transcripción NF- κ B puede conducir a una supresión de diferentes vías inmunes, lo cual puede facilitar su adaptación. Estudios futuros deben estar encaminados a evaluar la actividad de diferentes genes y vías de señalización inmunes durante el blanqueamiento, con el fin de establecer si la pérdida de la simbiosis aumenta la vulnerabilidad a enfermedades de carácter infeccioso.

4.4. Reconocimiento inmunológico en cnidarios

Cómo se mencionó anteriormente, los PRR son receptores que reconocen patrones moleculares en patógenos e inducen una respuesta básica que puede operar en tres niveles: 1) estimula la ingestión microbiana a través de fagocitosis e ingestión enzimática, 2) estimula la movilización de moléculas a los sitios donde se produce la infección e 3) induce la formación de moléculas efectoras que activan cascadas de señalización que conducen a respuestas inmunes efectivas (Dunn, 2009; Cadavid, 2016) (Fig. 1). A continuación, se describen los principales receptores de reconocimiento presentes en cnidarios.

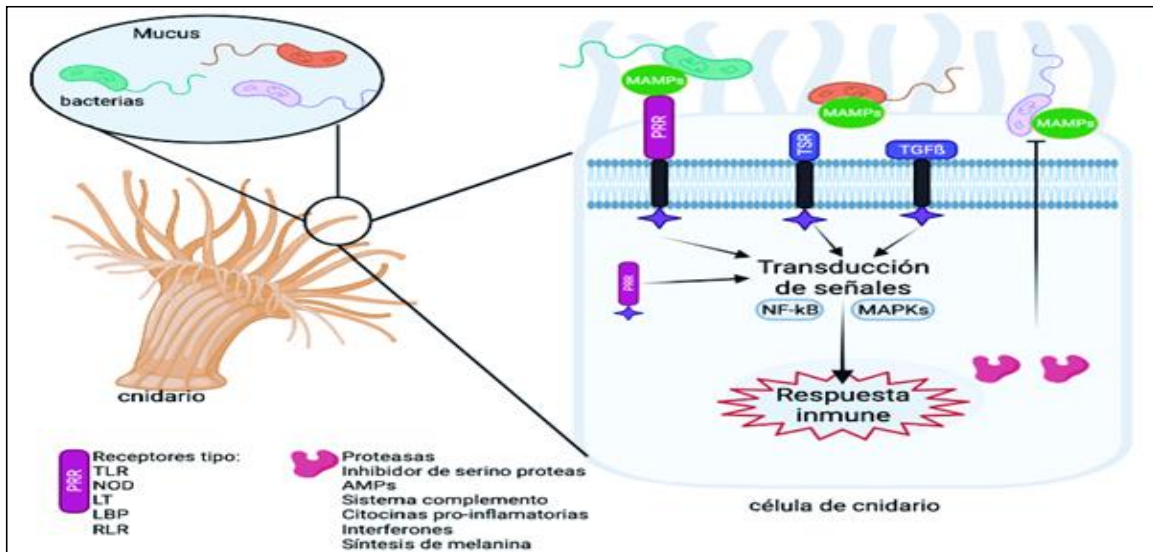


Figura 1: Esquema general de los principales receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) y posibles respuestas efectoras de la inmunidad en invertebrados identificados en Cnidaria. Receptores PRR: Receptor de tipo Toll (TLR), Receptor de tipo NOD (NLR), Lectinas (LT), Receptor de tipo RIG-I (RLR) y proteínas de unión a polisacáridos (LBP). Receptores asociados con la regulación del sistema inmune: glucoproteína trombospondina (TSR) y el receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β). Respuestas efectoras asociadas con la síntesis de proteasas e inhibidores de Serino proteasas, péptidos antimicrobianos, sistema de complemento, citocinas proinflamatorias, interferones, fagocitosis, opsonización y encapsulación. Esquema creado en BioRender.com.

4.4.1. Receptores tipo Toll (TLR)

Los TLRs son proteínas transmembranales presentes en el huésped, que poseen dominios específicos para unirse a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Parisi et al., 2020). Estas proteínas se caracterizan por presentar un dominio N-terminal extracelular con repeticiones ricas en leucinas (LRR) encargadas del proceso de reconocimiento, un dominio rico en cisteína, un dominio transmembrana y un receptor Toll / interleucina - 1 intracelular (TIR) (O'Neill, Golenbock, & Bowie, 2013). Este último dominio receptor media la trasmisión de la señal intracelular conduciendo a la traslocación nuclear de los factores de transcripción de la familia NF-κB (Hoffmann, Kafatos, Janeway, & Ezekowitz, 1999), los cuales han sido asociados con la activación de genes que codifican péptidos antimicrobianos, y con la expresión de citocinas proinflamatorias (Cadavid, 2016).

A partir de datos genómicos, Miller et al., (2007) pudo rastrear 5 proteínas de tipo TLR que tienen el dominio TIR en *Nematostella vectensis*. Estas proteínas incluyen a NvTLR-1 que está claramente relacionada con miembros de las proteínas Toll /TLR ya que se caracteriza por la presencia de repeticiones ricas en leucina y motivos de cisteínas. También, se encontraron tres proteínas receptoras con dominios de inmunoglobulinas (NvIL-1R1, NvIL - 2R2, NvIL- 1R3), y una proteína relacionada a un homólogo de MyD88 (NvMyD88). En este mismo estudio para *Hydra magnipapillata*, se encontraron 4 proteínas con dominios TIR, HyLRR-1 y LyTRR-2, con dominios extracelulares que carecen de LRR, y HyTRR-1, HyTRR-2 ambas proteínas relacionadas con MyD88 (HmMyD88-1) y con un dominio DEAH. Para *Acropora millepora* se encontró la proteína AmTIR-1, la cual se caracterizó por la presencia de un dominio extracelular corto carente de LRR. Las proteínas HyTRR-1 y HyTRR-2 han sido relacionadas con la producción de péptidos antimicrobianos como Hydracin-1 (Augustin, Fraune, & Bosch, 2010).

El genoma de *Acropora digitifera* muestra que su sistema inmune puede ser más complejo y sofisticado que el de *Hydra* y *Nematostella*. En *A. digitifera* se han descrito al menos 4 proteínas canónicas Toll/TLR, 5 proteínas relacionadas con IL-1R y numerosas proteínas TIR con dominios de inmunoglobulinas (Shinzato et al., 2011). Emery, Dimos y Mydlarz (2021) en un análisis genómico a 15 especies de cnidarios evidencio la presencia de TLR prototípicos solo en antozoos. Este estudio reveló que especies como *Dendronephyta gigantea* y *Acropora millepora* presentan TLR prototípicos con expansiones, 4 en *Dendronephyta gigantea* y diez en *Acropora millepora*, la presencia de proteínas similares a TLR con un dominio TIR y transmembrana fue común en todas las especies estudiadas excepto para *Clytia hemisphaerica* y *orbakka virulenta*.

El rastreo de distintas proteínas involucradas en la respuesta inmune de los cnidarios ha permitido caracterizar su comportamiento funcional. Brennan et al., (2017) caracterizaron funcionalmente Nv-TLR- 1 en *Nematostella vectensis*, donde demostraron que este receptor tiene la capacidad de activar la señalización de NF-κB en células humanas en respuesta a *Vibrio coralliilyticus* y flagelina, además de tener un papel fundamental en su desarrollo embrionario. En *Exaiptasia daiphana* la exposición a este patógeno evidenció una fuerte expresión de la proteína primaria de la diferenciación mielóide (MyD88) (Roesel & Vollmer, 2019), y ante la infección con *Vibrio parahaemolyticus* se identificaron varios componentes de la vía TLR- NF-κB, donde resaltan homólogos con dominios bien conservados como MyD88, TRAF, TBK1, NIK, IRF, NF-κB y AP-1 (Seneca, Davtian, Boyer, & Czerucka, 2020).

4.4.2. Lectinas

Las lectinas constituyen otra familia de receptores en cnidarios, son proteínas de unión a carbohidratos involucradas en la activación de la cascada de complemento y la opsonización (Dunn, 2009). En la vía de complemento de los cnidarios, la lectina se une al azúcar presente en la superficie del patógeno, lo cual conduce a la formación del complejo C3 y al ataque de proteínas efectoras del complejo de ataque de membrana / perforina (MACPF), para realizar un agujero en la membrana microbiana y en efecto la lisis del patógeno (Parisi et al., 2020).

Unas de las lectinas más comunes en cnidarios es la Tachylectina, la cual experimentalmente ha mostrado actividad antimicrobial por medio de reconocimiento de PAMPs como LPS y peptidoglucanos (Beisel, Kawabata, Iwanaga, Huber, & Bode, 1999). Burge, Mouchka, Harvell, y Roberts (2013) pudieron determinar que la Tachylectina - 2 aumentó su expresión en *Gorgonia ventalina* después de estar expuesta al parásito *Aplanochytrium*. Además, estudios han documentado la presencia de un homólogo de Tachylectina - 2 en la especie *Oculina varicosa*, el cual muestra una elevada diversidad de aminoácidos y una fuerte señal de selección positiva que se ve reflejada en una alta variación alélica no sinónima (Hayes, Eytan, & Hellberg, 2010). De igual forma, se ha determinado que *Gorgonia ventalina* al ser infectado con copépodos y *Aspergillus*, presenta un aumento de 38.9% en la expresión del gen de reconocimiento inmune taquilectina-5 (Tracy, Weil, & Burge, 2021).

Como respuesta a *Vibrio parahaemolyticus*, *Exaiptasia daiphana* expresa varios tipos de lectinas, así como varios componentes de la vía lectina -complemento. Entre las lectinas expresadas se encuentran homólogos de colectina-12 (colec12), lectinas de unión a L-ramnosa (Ep_RBL) y una secuencia que contiene LRR de lectina de tipo C única (Seneca et al., 2020). En un estudio realizado por Emery et al., (2021) a 15 cnidarios, se pudo determinar la existencia de un amplio repertorio de lectinas tipo C, (CTL), con su dominio proteico CTLD asociado a 70 dominios proteicos diferentes. Entre los dominios más comunes resaltan el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el dominio de lectina similar a la concanavalina A. En los medusozos *Clytia hemisphaerica* y *Morbakka virulenta* se encontraron los factores de Von Willebrand y los dominios secretores ricos en cisteína. En este estudio también se encontraron proteínas con la organización del dominio de lectina de unión a manosa (MBL) (CTLD, colágeno) en *Cassiopea xamachana* y *Clytia hemisphaerica*. Para *Nematostella vectensis* ha sido posible la identificación de 92 genes putativos que codifican para lectinas tipo C (Wood & Weis, 2009).

4.4.3. Receptores similares a NOD

Los receptores de tipo dominio de oligomerización por unión de nucleótidos (NLR), son receptores intracelulares con una estructura que consta de un dominio LRR C - terminal para el reconocimiento de PAMP, un dominio central de unión a nucleótidos denominado dominio NACHT, y un dominio efector N - terminal (Parisi et al., 2020). Los NLR tienen la capacidad de activar varias vías inmunes, como la vía NF- κ B, interferón, proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), e inflammasoma (Elinav, Strowig, Henao-Mejia, & Flavell, 2011).

La disponibilidad de recursos genómicos ha permitido la caracterización de NLR en diferentes especies de Cnidaria. En un estudio realizado por Hamada et al., (2013) se pudo determinar que el genoma de *Acropora digitifera* incluye casi 500 loci NLR putativos con receptores tipo NOD, con una diversidad amplia de dominios proteicos en comparación con los observados en los vertebrados, lo cual evidencia que los receptores NLR constituyen un elemento esencial en la inmunidad de los antozoos. Esto también puede observarse en el estudio realizado por Emery et al., (2021) donde se describe la presencia de NLR prototípicos que contienen dominios NACHT y LRR en todos los antozoos analizados. También, se destaca la ausencia de NLR en todas las especies de medusozos (Tabla 1). En este estudio se describen dominios en combinación con NACHT asociados con la inmunidad, como el dominio de reclutamiento de caspasa (CARD), la nucleasa HEPN similar a Dzip3 / hRUL138, el dominio de muerte (DD), glicosiltransferasas, y el dominio del receptor de Toll / interleucina (TIR) entre otros.

Exaiptasia daiphana, al ser infectada con *Vibrio parahaemolyticus* muestra una respuesta temprana del huésped contra patógenos bacterianos a lo largo del tiempo, donde se presentan secuencias reguladas al alza con dominios similares a NACHT y LRR (Seneca et al., 2020). La infección con *V. parahaemolyticus* a *E. daiphana* bajo condiciones simbióticas y aposimbióticas también muestra una regulación positiva de MyD88, el factor 3 asociado al receptor de TNF (TRAF3), y el regulador de apoptosis 1 similar a Bcl-2, Bcl-X (Bcl-2), proteínas reguladoras claves de la vía NOD y TLR (Roesel &

Vollmer, 2019). La amplia diversidad de NLR en antozoos puede representar una adaptación que supla la falta de inmunidad adaptativa (Mydlarz et al., 2016).

4.4.4. Los receptores tipo RIG-I (RLR)

Son PRR con la capacidad de detectar patrones moleculares de patógenos (PAMP) dentro del ARN viral (Loo & Gale, 2011). Tres proteínas altamente relacionadas constituyen la familia de las RLR: El miembro fundador RIG-I (gen I inducible por ácido retinoico), MDA5 (el gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma), que contiene el dominio C helicasa inducida por interferón (IFIH1), y LGP2 (La ARN helicasa DHX58) (Dixit & Kagan, 2013). Se caracterizan por la presencia de una ATPasa central de caja DExD / H que funcionan como sensores citoplasmáticos (Loo & Gale, 2011), también comparten un dominio helicasa de ARN funcional común cerca del C - terminal (HELICc) que se une específicamente a las moléculas de ARN de origen viral (Yoneyama et al., 2005). RIG-1 y MDA5 contiene dominios CARD en tándem N- terminales que median la señalización aguas abajo, lo que desencadena la respuesta del sistema de interferón. LGP2 al igual que RIG-1 albergan un dominio represor (RD) en sus dominios reguladores C - terminales (Dixit & Kagan, 2013).

En cnidarios se han detectado secuencias similares a RLR. En *Nematostella vectensis* se identificaron dos loci que contenían prototipos homólogos de RIG - I/MDA5 de dos genes independientes que codifican dos moléculas similares a CARD (Zou, Chang, Nie, & Secombes, 2009). En *Exaiptasia daiphana* al ser infectada con *Vibrio parahaemolyticus* se detectó la presencia de ocho secuencias que contenían el dominio IFIH1 y tres secuencias del receptor 3 similar a RIG (RLR -3) (Seneca et al., 2020). Emery et al., (2021) encontraron receptores similares a RIG-I / MDA5 en los proteomas de nueve especies de antozoos, donde además fue posible el rastreo de proteínas con dominios característicos de LGP2 en las especies *Xenia sp*, *Actinia tenebrosa*, *Acropora millepora* y *Montipora capitata*. Para este mismo estudio, en ninguna de las especies analizadas de medusozoos se encontraron RLR.

4.4.5. Otros PRR

En Cnidaria también se han identificado proteínas de unión a lipopolisacáridos (LBP), una familia de PRR que reconoce LPS de bacterias Gram negativas y que conducen a la activación de la vía NF- κ B (Parisi et al., 2020). Estas proteínas han sido detectadas en los genomas de *Hydra magnipapillata* y *Nematostella vectensis* (Miller et al., 2007). En *Acropora palmata* y *Montastraea faveolata* se han identificado 4 receptores potenciales de reconocimiento putativos LRR, que se cree desempeñan un papel fundamental durante el establecimiento de la simbiosis (Schwarz et al., 2014). De igual forma en *Aiptasia pallida* se ha sido posible la identificación de un receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el cual como ya se mencionó, posiblemente está implicado en la regulación de los mutualismos cnidario-dinoflagelados (Detournay et al., 2012).

4.5. Señalización inmunitaria

La activación de la respuesta inmune es llevada a cabo por moléculas que participan en las vías de señalización intracelular y que modulan la activación de las moléculas efectoras (Cadavid, 2016). Se han identificado mediadores intracelulares de la vía de señalización Toll / TLR en *Nematostella* y *Acropora*, asociados con la localización nuclear de NF- κ B, y con la activación de la vía ECSIT que

conduce a la transcripción de una variedad genes diana a través de los factores AP1. También se han encontrado elementos de señalización asociados a la vía interferón (Miller et al., 2007) (Tabla 1).

Tabla 1

Componentes de diferentes vías de señalización asociados con la respuesta inmune en cnidarios. + indica presencia, - indica ausencia.

Vías/Elementos de señalización	Anthozoa		Medusozoa	Referencias
	<i>Nematostella vectensis</i>	<i>Acropora millepora</i>	<i>Hydra magnipapillata</i>	
Vía NF-κB				Miller et al., 2007
LBP	+	-	+	
TLR prototípicos (presencia de dominio LRR y TIR)	+	-	-	
Dominios TIR	+	+	+	
MyD88	+	-	+	
IRAK	+	-	+	
TRAF6	+	+	+	
TAK1	+	+	+	
IκK	+	-	+	
NF-κB	+	+	-	
Vía ECSIT				
ECSIT	+	-	+	
MEKK1	+	+	+	
MKK	+	-	+	
JNK	+	-	+	
P38	+	+	+	
AP1	+	+	+	
Vía de IFN				
TRAM	+	+	+	
IRF3	+	-	+	
Vía lectina – complemento				
C3	+	+	+	
Dominio MACPF	+	+	+	
Vía NF-κB				Emery et al., 2021
TLR prototípicos (presencia de dominio TIR, LRR, y un dominio transmembrana)	<i>Actinia tenebrosa</i> , <i>Acropora millepora</i> , <i>Montipora capitata</i> , <i>Nematostella vectensis</i> , <i>Pocillopora damicornis</i> , <i>Orbicella faveolata</i> , <i>Dendronephyta gigantea</i>		Ausente en todas las especies de medusozoos analizadas	
NLR prototípicos (Dominio NACHT y LRR)	Todas las especies de la casilla anterior más <i>Xenia sp</i> y <i>Exaiptasia daiphana</i>		Ausente en todas las especies de medusozoos analizadas	
NF-κB	Todas las especies de antozoos estudiadas		<i>Aurelia sp</i> , <i>Cassiopeia xamachana</i> , <i>Clytia</i>	

		<i>hemisphaerica, Hydra vulgaris, Morbakka virulenta. Calavadosia cruxmelitensis</i>	
Vía de IFN			
RLR (RIG-I / MDA5)	Todas las especies de antozoos analizadas	Ausente en todas las especies de medusozoos.	
RLR (LGP2)	<i>Xenia sp, Actinia tenebrosa, Acropora millepora, Montipora capitata</i>	Ausente	
Vía lectina – complemento			
C2	Todas las especies de antozoos analizadas	<i>Aurelia sp, Cassiopeia xamachana, Morbakka virulenta. Calavadosia cruxmelitensis</i>	
C3	Todas las especies de antozoos analizadas	<i>Clytia hemisphaerica, Hydra vulgaris, Morbakka virulenta. Calavadosia cruxmelitensis</i>	
MASP	Todas las especies de antozoos analizadas	<i>Aurelia sp, Cassiopeia xamachana, Clytia hemisphaerica, Morbakka virulenta</i>	
Vía NF-κB	<i>Exaiptasia pallida</i>		Seneca et al., 2020
	MyD88, TRAF6, IRF, AP-1, NF-κB, NLR prototípicos		
Vía de IFN	RLR-3 (RIG -I), IFIH1		
Vía lectina – complemento	C2, C3, C4		

También se han identificado sistemas proteicos que participan en la respuesta inmunitaria, como el sistema de la profenoloxidasa el cual conduce a la síntesis de melanina, un componente esencial en la inmunidad de los invertebrados durante la encapsulación de patógenos y el proceso de curación de heridas (Parisi et al., 2020). Esta vía es iniciada por una variedad de PRR incluidos TLR y lectinas que desencadenan varias reacciones proteolíticas que conllevan a la síntesis de melanina (Mydlarz et al., 2016). La activación de la cascada da como resultado una proteólisis limitada de la profenoloxidasa inactiva (PPO) para formar fenoloxidasa activa (PO). La enzima activa cataliza dos tipos de reacciones: la oxigenación de monofenoles a o-difenoles y la oxidación de o-difenoles a quinonas, las cuales son necesarias para la síntesis de melanina (Satoh et al., 1999). Los PPO y los PO, se pueden encontrar en distintas isoformas, incluidas la tirosinasa y la lacasa (Parisi et al., 2020). En *Pocillopora damicornis* el gen lacasa-3 y un homólogo de una enzima de la profenoloxidasa fueron regulados al alza en presencia de *Vibrio coralliilyticus* (Vidal-Dupiol et al., 2014). También se han identificado genes de tirosinasa en los genomas de *Hydra magnipapillata* y *Nematostella vectensis* (Esposito et al., 2012). Mydlarz et al., 2008, encontraron un aumento de amebocitos

granulares acidófilos en la mesoglea de *Gorgonia ventalina* al ser infectado con el hongo *Aspergillus sydowii*. De igual forma, se evidenció un aumento en la deposición de melanina y en la actividad de la profenoloxidasa con formación de melanosomas, sugiriendo que los amebocitos son sitios de síntesis de melanina que se encuentra en forma de melanosomas y cuya producción está mediada por la cascada de la profenoloxidasa.

Otro sistema proteico importante de la inmunidad innata identificado en los cnidarios es el sistema de complemento, el cual presenta funciones efectoras de citotoxicidad, opsonización, regulación de respuestas inflamatorias y lisis bacteriana (Sarma & Ward, 2011). Este sistema se activa mediante tres cascadas proteolíticas paralelas conocidas como la vía clásica, la vía de la lectina, y la vía alternativa (Parisi et al., 2020). En última instancia, todas estas vías activan el complejo de la proteína C3 para aumentar las respuestas inflamatorias como la fagocitosis, la lisis celular y la coagulación (Mydlarz et al., 2016). La vía de la lectina se ha detectado ampliamente en los cnidarios y su función inicia con la unión de una lectina a un azúcar del patógeno, lo cual conduce a una cascada de señalización activando serina proteasas asociadas a lectinas de unión a manosa (MASP), que luego activan las proteínas C2 y similares a C4 para iniciar la formación del complejo C3 (Endo et al., 2006). Una vez formado el complejo, las proteínas efectoras de ataque a membrana - perforina (MACPF) son secretadas para formar un agujero en la membrana microbiana produciéndose de esta forma la lisis del patógeno (Endo et al., 2006). En cnidarios se han identificado varios componentes de la vía de complemento de la lectina, incluidas las proteínas MASP, C3 y MACPF (Mydlarz et al., 2016). En *Nematostella vectensis* han sido encontrados dos genes C3, dos factores de serina proteasa de vía alternativa B y uno de serina proteasa asociadas a proteínas de unión a manosa (Endo et al., 2003). El gen C3 se ha registrado en especies de coral como, *Swiftia exserta*, *Acropora millepora*, *Acropora digitifera*, *Porites lobata* (Dishaw et al., 2005) y en las anemonas *Haliplanella lineata* y *Anemonia viridis* (Fujito et al., 2010). Miller et al., 2007 identificó proteínas que contienen el dominio MACPF similar al presente en el componente C6 del sistema de complemento en *Hydra magnipapillata* y *Nematostella vectensis*.

En estudios recientes *Exaiptasia daiphana*, en presencia de *Vibrio parahaemolyticus*, demostró una regulación positiva de los componentes del complemento C2, C3, C4 y el factor B de *Exaiptasia* (Ep_Bf-1), también se encontró la regulación positiva en paralelo de homólogos de Ficolin-1 que contiene TMD / Ig, lo cual sugiere una defensa activa contra el patógeno (Seneca et al., 2020). En un estudio realizado a 15 especies de cnidarios, en la mayoría se encontraron homólogos de MASP, C2 y C3. Sin embargo, en ninguna especie se pudo detectar la proteína de la familia C6, lo cual indicaría que los cnidarios no pueden formar el complejo de ataque a la membrana (MAC), y en cambio utilizan el complemento para la opsonización a través de C3 (Emery et al., 2021).

4.6. Respuestas efectoras en cnidarios

Los cnidarios se caracterizan por presentar una gran diversidad de respuestas efectoras que los protegen contra patógenos, estas incluyen una capa superficial de moco que impide el acceso de patógenos a huésped cnidario, actividad microbiana debido a péptidos antimicrobianos, especies

reactivas de oxígeno, antioxidantes, y productos formados en diversas vías de señalización (Mydlarz et al., 2016).

El moco representa la primera línea de defensa contra patógenos en antozoos, y está compuesto por un complejo de lípidos, proteínas y polisacáridos que recubre el cuerpo del animal. Está involucrado en diferentes funciones biológicas como la locomoción, atrapamiento de partículas de alimento, defensa contra depredadores y agentes infecciosos como parásitos y patógenos (Parisi et al., 2020). El moco actúa como barrera física, y la presencia de cilios en las células endodérmicas permite el transporte de partículas extrañas a través del moco hacia la boca del pólipo donde se pueden digerir o eliminar (Mydlarz et al., 2016). La capa de mucosa superficial en Cnidaria representa la fuente de nutrientes para muchos microorganismos que pueden ser de índole benéfico o patógeno, y se cree que la necesidad de controlar los microbios beneficiosos residentes indujo la evolución del sistema inmunológico (Stabili et al., 2018). Se han aislado diferentes biomoléculas que conforman esta barrera protectora. En los corales *Goniopora djiboutiensi*, *Acropora millepora* y *Montastraea faveolata*, se logró demostrar la presencia de mucinas poliméricas de alto peso molecular similares a las que se encuentran en vertebrados, y cuya principal característica es la capacidad para formar gel (Jatkar et al., 2010). Rivera 2018 identificó la presencia de colágeno, melanina y fenoloxidasa en el moco de *Pseudodiploria strigosa*, *Exaiptasia pallida* y *Cassiopea xamachana*. Además, demostró que la capa superficial de moco (CSM) de estas tres especies presenta actividad antimicrobiana contra los patógenos *Serratia marcescens* y *Aurantimonas sp.* También se evidenció un incremento de la hidroxiprolina (aminoácido único del colágeno) y la fenoloxidasa en corales de *P. strigosa* enfermos, y en *E. pallida* y *C. xamachana* blanqueados, lo cual sugiere una mayor respuesta inmune mediada por estos componentes presentes en CSM. Estudios realizados al moco de *Actinia equina* han demostrado que este presenta una actividad antibacteriana similar a la lisozima, además de exhibir actividad hemolítica sobre eritrocitos de conejo, y citotóxica contra la línea celular tumoral K562 (leucemia eritromieloblastoide humana) (Stabili et al., 2015), hallazgos que ponen en evidencia la importancia que tiene esta barrera protectora en el sistema de defensa de esta especie contra patógenos invasores.

En cuanto a las especies reactivas de oxígeno (ROS), en dosis bajas actúan como moléculas de señalización en la respuesta inmune y la apoptosis, mientras que en dosis más altas produce un estrés oxidativo peligroso para los componentes celulares del huésped y los patógenos. Estas moléculas son liberadas por células fagocíticas o amibocitos móviles para ayudar a matar a los agentes infecciosos (Parisi et al., 2020). Se ha demostrado que las anémonas contienen fagocitos dentro de la mesoglea que producen ROS por medio de un estallido respiratorio, que genera la liberación de cromática y junto con el moco, forman mallas complejas que permiten la captura de microbios (Robb et al., 2014). Los antioxidantes, por su parte, son utilizados por la célula para limitar los niveles de ROS y así prevenir el estrés oxidativo (Mydlarz et al., 2016).

Otro mecanismo de defensa importante de la inmunidad innata es la síntesis de inhibidores proteasas de serina. Se ha planteado que las proteasas de serina tienen un efecto directo en el

proceso de patogénesis, con capacidad de dañar el tejido del huésped destruyendo células y proteínas del mismo, además de tener la capacidad de activar proteasas endógenas que afectan al propio organismo al inactivar distintos mediadores del sistema inmune importantes para la defensa del huésped (Lantz et al 1997). En humanos, estudios in vitro han demostrado que la serina proteasa aumenta la entrada de bacilos y su multiplicación en macrófagos (Upadhye et al., 2009). *E. coli* enteropatógena secreta enterotoxinas de serina proteasa (EspC y Pet) que alteran el citoesqueleto de actina del huésped afectando su estabilidad (Navarro et al., 2010), de igual forma, se ha podido establecer que la serina proteasa de *Mycobacterium tuberculosis*, produce virulencia por evasión inmune (Upadhye et al., 2009). También se han puesto a prueba inhibidores de serina proteasa mostrando una actividad inhibitoria de 92% de la serina proteasa micobacteriana ES-31 (Upadhye et al., 2009). Los inhibidores de serino proteasas procedentes de invertebrados marinos han sido clasificados en tres familias: Kunitz-BPTI, Kazal y Serpinas, siendo los inhibidores de la familia Kunitz-BPTI los más abundantes para Cnidaria (González et al., 2013). En *Anemonia sulcata*, se purificaron dos toxinas con actividad inhibitoria de proteasas, caliclutinas y caliseptinas, con una estructura homóloga a los inhibidores de tipo Kunitz-BPTI (Wunderer et al., 1976). En esta especie también ha sido posible la identificación de inhibidores pertenecientes a la familia Kazal, como es el caso del inhibidor elastasa, el cual ha mostrado actividad inhibitoria frente a elastasas del páncreas y neutrófilos humanos (Kolkenbrock & Tschesche, 1987). En el veneno de la medusa *Chironex fleckeri* se encontró un inhibidor plesiotípico de serina proteasa (tipo kazal); sin embargo, se desconoce el posible papel de esta toxina (Jouiaei et al., 2015). En la anémona de mar *Heteractis crispa* se aisló un nuevo inhibidor de proteasa de tipo Kunitz, InhVJ, el cual demostró ser un inhibidor específico de dos serinas proteasas, la tripsina y α -quimotripsina (Gladkikh et al., 2012). De igual forma, las Serino proteasas controlan múltiples procesos en organismos multicelulares, en los que se incluye la muerte celular, el remodelado de tejidos y la inmunidad a las infecciones (Ashton, 2013), y dado que son moléculas altamente conservadas, su presencia también puede desempeñar funciones importantes en la defensa contra patógenos en Cnidaria.

Otro mecanismo de respuesta inmunológico en cnidarios es la fagocitosis, la cual esta mediada por células capaces de envolver y destruir invasores extraños. Muchos cnidarios pueden generar una respuesta de inflamación con el fin de destruir la fuente de daño y cualquier célula huésped infectada, esto implica una infiltración del tejido lesionado por las células inmunitarias y el inicio de la fagocitosis (Mydlarz et al., 2016). Un ejemplo de esto lo encontramos en *Gorgonia ventalina*, especie en la cual se han identificado células especializadas en el proceso de fagocitosis (amebocitos) contra el hongo patógeno *Aspergillus sydowii* (Mydlarz et al., 2008). También, se ha identificado un mecanismo de defensa en corales escleractíneos y gorgonias relacionado con la encapsulación, los microbios invasores son encapsulados con el aumento de la deposición de esqueleto y material proteico, como colágeno o gorgonina, para formar un nódulo que rodea al organismo extraño (Mullen et al., 2004).

4.7. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMP) son típicamente péptidos catiónicos con regiones hidrofóbicas, con un amplio espectro bactericida en contra de bacterias, hongos y virus (Smith et al., 2010). Todos

están genéticamente codificados; es decir, un gen codifica para cada péptido específico (Rivas et al., 2006). Su tamaño puede afectar de manera diferente a los componentes estructurales del patógeno. Por ejemplo, los péptidos pequeños (23 aminoácidos de longitud) destruyen la integridad de la membrana celular de los invasores, mientras que los péptidos más grandes presentan propiedades líticas, o pueden ser proteínas con dominios específicos que secuestran nutrientes esenciales de los microbios (Stabili et al., 2018).

En general la interacción se basa en la atracción inicial del péptido a la superficie bacteriana y su posterior unión con la membrana citoplasmática mediada por la interacción electrostática entre los péptidos cargados positivamente y las moléculas cargadas negativamente de la pared celular bacteriana (Smith et al., 2010). Los péptidos pueden destruir estructuras de la membrana bacteriana produciendo lisis celular o formando poros transitorios para transportar el péptido dentro de la célula para provocar procesos como la inhibición de la síntesis de la pared celular y la citocinesis bacteriana (Teixeira et al., 2012). Según la composición de aminoácidos de los péptidos, el tamaño y la estructuras que lo conforman, estos pueden clasificarse en varias categorías: 1) péptidos con estructura de hélice alfa; 2) péptidos con estructura de hoja beta estabilizadas con puentes disulfuro; 3) péptidos con estructuras extendidas; 4) péptidos ricos en glicina (Ortiz 2019). Características como la carga, el tamaño, la conformación, estructura secundaria, la hidrofobicidad y la antipaticidad son fundamentales para determinar la actividad antibacteriana (Smith et al., 2010).

Dado que los péptidos antimicrobianos son un componente vital del sistema inmunológico innato en invertebrados, se han identificado varios representantes en cnidarios (Mydlarz et al., 2016). Damicornina, el primer AMP informado en un coral escleractinio (*Pocillopora damicornis*), es un AMP catiónico de 39 residuos plegado por tres puentes disulfuro intramoleculares que implica seis dominios de cisteína en su secuencia con una amidación C-terminal; presenta actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y el hongo filamentoso *Fusarium oxysporum* (Vidal-Dupiol et al., 2011). En un estudio realizado por Franzenburg et al., (2013) fue posible detectar ortólogos de armininas disponibles en *Hydra oligactis*, *Hydra viridissima* y en *Hydra vulgaris*, donde se determinó que este péptido antimicrobiano tiene un papel determinante en la selección de parejas bacterianas adecuadas. Estudios recientes en *Hydra magnipapillata* permitió la localización del péptido arminina 1a, cuyo dominio C-terminal cargado positivamente de 31 aminoácidos mostró un amplio grado de eficacia contra patógenos humanos multirresistentes (Augustin et al., 2009). Además, se pudo observar su falta de eficacia contra células eucariotas y su capacidad para matar bacterias en concentraciones de sal que imita a las de la sangre humana, lo cual convierte a este péptido en una plantilla prometedora para una nueva clase de antibióticos.

En *Aurelia aurita* se purificó el péptido antimicrobiano Aurelin, el cual exhibe actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, y se caracteriza por la presencia de seis cisteínas que forman tres enlaces disulfuro (Ovchinnikova et al., 2006). En *Hydra vulgaris* se identificaron 5 miembros de la familia de genes de la Perculina (Fraune et al., 2010), péptido antimicrobiano

también hallado en *Hydra magnipapillata* con alta actividad bactericida contra *Bacillus megaterium* (Bosch et al., 2009).

Martínez et al., 2019 investigaron la capacidad antimicrobiana de 4 péptidos predichos del transcriptoma de *Hydractinia symbiolongicarpus* contra patógenos bacterianos humanos. Pudieron determinar que estos péptidos muestran actividad antimicrobiana tanto en bacterias gram positivas como gram negativas, además de mayor eficiencia en la inhibición del crecimiento bacteriano en comparación con la ampicilina.

Los péptidos antimicrobianos presentan características que les permiten ser modelos para estudios de evolución y bioprospección. Son moléculas altamente conservadas codificadas a partir de genes específicos, que en Cnidaria han mostrado una alta eficiencia contra bacterias multirresistentes. Se han encontrado homólogos de péptidos antimicrobianos en diferentes especies, por ejemplo, las defensinas, presentes en plantas, invertebrados y vertebrados (Rivas et al., 2006). Sin embargo, los estudios para organismos primitivos aún siguen siendo escasos, y Cnidaria puede ser un modelo que contribuya en gran medida al conocimiento sobre el estado de conservación de estas moléculas, y su respuesta ante diferentes patógenos que muestran alta capacidad de resistencia

4.7.1. Estructura de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos se dividen en cuatro categorías en función de su estructura (Fig. 2). Encontramos a los AMP α -helicoidales catiónicos, los cuales se caracterizan por tener una carga neta de +2 a +9, y una longitud no mayor a 40 aminoácidos en su mayoría con el extremo C terminal aminado (Teixeira et al., 2012). Están compuestos aproximadamente de 50 % de residuos hidrófobos dando lugar a la formación de estructuras anfifílicas (Lewies et al., 2015). La hélice α permite que el péptido forme dos caras, una cara polar cargada positivamente que interactúa con las cabezas polares de los lípidos, y la cara hidrofóbica que permite la inserción en la membrana a través de interacciones hidrofóbicas (Zhang et al., 2016).

En un segundo subgrupo se encuentran los AMP catiónicos de hoja β , estos péptidos presentan de seis a ocho residuos de cisteína, que establecen dos o más enlaces disulfuro, dando lugar a la formación de una estructura de hoja β estabilizada (Lewies et al., 2015). Estos péptidos son en su mayoría defensinas (Zhang et al., 2021).

Otro subgrupo son los AMP catiónicos extendidos, los cuales se caracterizan por contener aminoácidos específicos como la prolina, glicina, arginina, triptófano e histidina (Lewies et al., 2015). Sus estructuras se encuentran estabilizadas por enlaces de hidrógenos y las fuerzas de van der Waals que les permite interactuar con los lípidos de la membrana (Zhang et al., 2021).

En un último grupo se encuentran los AMP de hélice α y hoja β , un ejemplo de este péptido es la lisozima, la primera proteína antimicrobiana descubierta. Esta proteína tiene un fragmento extracelular de 130 aminoácidos y una estructura de hélice α y hoja β (Zhang et al., 2021).

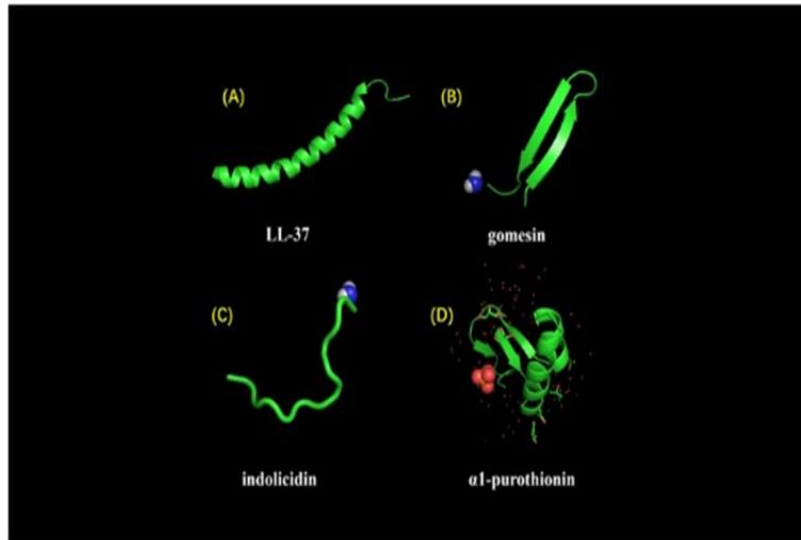


Figura 2: Estructuras de AMP. (A) LL-37 adopta una conformación α -helicoidal típica. (B) La gomesina es un péptido de hoja β estabilizado por enlaces disulfuro. (C) La indolicidina es un AMP con una estructura de extensión lineal. (D) α 1-purotionina adopta una conformación tanto de hélice alfa como de hoja beta. Figura tomada de Huan et al., 2020.

4.7.2. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos

La conformación anfipática de los AMP y su carácter catiónico permiten una mayor interacción con superficies cargadas negativamente en membranas bacterianas (Kumar et al., 2018). Compuestos como la fosfatidilserina (PS), la cardiolipina (CL) y el fosfatidilglicerol (PG), se encuentran cargados negativamente y son característicos de patógenos bacterianos; de igual forma, componentes como los lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas y el ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas transportan un gran número de cargas negativas, lo cual aumenta la cantidad de carga negativa presente en la membrana (Zhang et al., 2021). En consecuencia, estas condiciones dan lugar a interacciones electrostáticas entre la membrana cargada negativamente y los AMP catiónicos. Durante la interacción del AMP y la membrana bacteriana hay dos factores que determinan el mecanismo de acción del péptido. El cambio conformacional del AMP, y la relación péptido-lípido, ambos determinados por las propiedades de la membrana lipídica y las características estructurales y fisicoquímicas del AMP (Bechinger & Gorr, 2017). Se ha determinado que los AMP experimentan una transición conformacional de una estructura desordenada en solución acuosa a una estructura más rígida al interactuar con una membrana, como es el caso de los AMP α -helicoidales, los cuales transforman su estructura desordenada a una estructura anfifílica α -helicoidal para facilitar la interacción. Por otro lado, los AMP de hoja β no experimentan un cambio conformacional ya que en solución estos se estabilizan mediante enlaces disulfuro o ciclación del esqueleto peptídico (Lee et al., 2016). En cuanto a la relación péptido - lípido, se ha determinado que, ante una proporción baja de péptidos, los AMP se disponen en paralelo a la superficie de la membrana plasmática. Con el aumento de la relación péptido-lípido, los AMP se disponen verticalmente y se insertan en el centro hidrofóbico de la membrana (Zhang et al., 2021).

Se han propuesto diferentes modelos que describen el mecanismo de acción de los AMP direccionados a la membrana (Fig. 3):

- A) Modelo de agregados.** En este modelo, los péptidos forman un complejo de péptidos y lípidos similares a micelas que conducen a la formación de canales irregulares con una variedad de tamaños y tiempos de vida (Jenssen et al., 2006). Estos canales conducen a la fuga de iones intracelulares y metabolitos, además de permitir que los AMP atraviesen la membrana hacia el citoplasma para ejercer su acción sobre las sustancias intracelulares (Zhang et al., 2021).
- B) Modelo Toroidal:** Los AMP se insertan verticalmente en la membrana celular, lo cual induce a una curvatura de la bicapa lipídica, permitiendo que las cabezas de lípidos se incrusten dentro del centro hidrofóbico de la bicapa (Zhang et al., 2021). Esto permite la formación de un poro toroidal, con los AMP y los grupos de cabeza de lípidos formando la pared del poro (Rashid et al., 2016). La formación de poros en el modelo de barril como en el toroidal, conducen a la despolarización de la membrana y, por consiguiente, la muerte celular (Kumar et al., 2018). Estos poros también pueden estar involucrados en la translocación de AMP al interior del citoplasma con el fin de desplegar su potencial de acción sobre componentes intracelulares (Kumar et al., 2018).
- C) Modelo de la duela de barril:** en este modelo, los AMP se insertan perpendicularmente en la bicapa lipídica, donde las regiones hidrofóbicas helicoidales de los péptidos hélice α y los péptidos de hoja β interactúan con los lípidos de la bicapa, y los residuos hidrofílicos forman la luz de los canales (Kumar et al., 2018).
- D) Modelo alfombra:** En este modelo los AMP se unen de forma paralela a la superficie de la membrana cubriéndola en grupos para formar micelas y destruir la membrana microbiana (Zhang et al., 2021). Se requieren altas concentraciones de AMP para cubrir la superficie de la membrana, formando así una “alfombra”, que conduce a la pérdida de la integridad con un efecto similar a un detergente. A diferencia del modelo de barril y toroidal, en este no se presenta la formación de poros ni la inserción de los péptidos en el centro hidrofóbico de la membrana, ya que hay una ruptura completa de la membrana celular (Zhang et al., 2021).

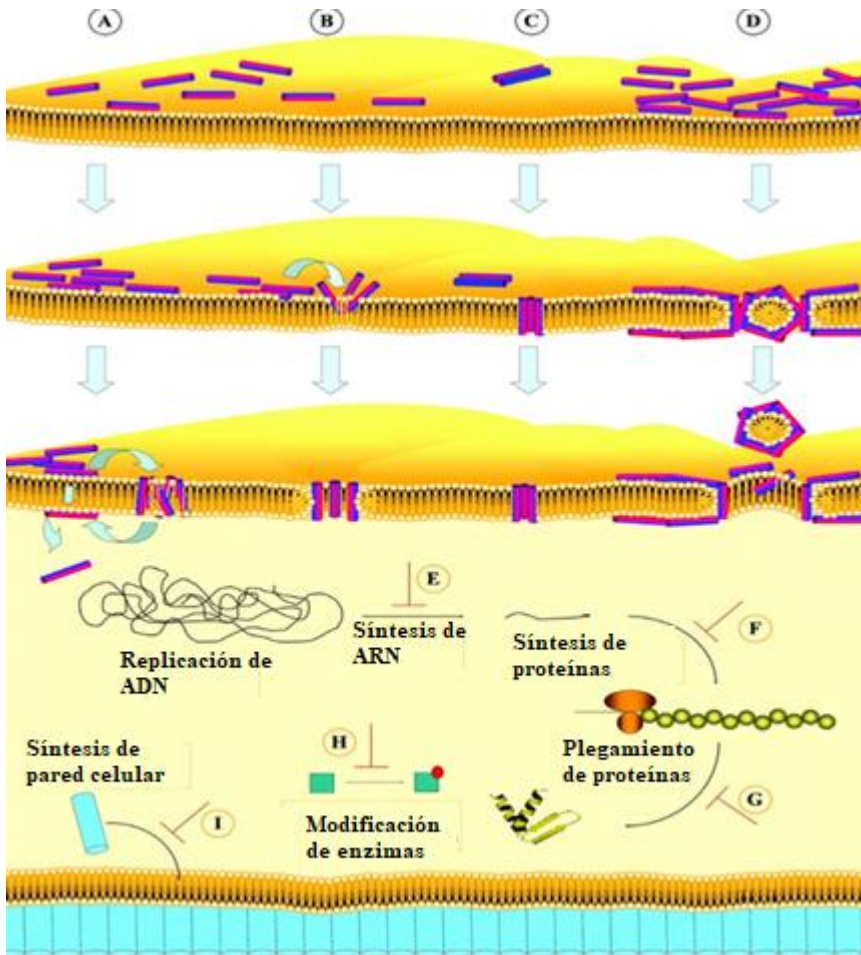


Figura 3. Mecanismos de acción de los AMP. Los péptidos están representados por cilindros, con las regiones hidrofílicas en rojo y las hidrofóbicas en azul oscuro. Los peptidoglicanos de la pared celular están representados por cilindros azul claro. Los modelos de permeación de membrana están indicados con la letra A, B, C y D. (A) representa el modelo de agregados, (B) Modelo toroidal, (C) Modelo de duela de barril, (D) Modelo de alfombra. E, F, G, H, I representan mecanismos de acción intracelular. (E) inhibición de la síntesis de ARN y ADN, (F) inhibición de la síntesis de proteínas, (G) inhibición de plegamientos de proteínas, (H) inhibición de enzimas, (I) inhibición de la síntesis de la pared celular. Figura modificada de Jenssen et al., 2006.

También se ha planteado que la acción de los péptidos antimicrobianos está dirigida a focos discretos asociados con la deslocalización de dominios de proteínas y lípidos presentes en la pared y membrana bacteriana (Rashid et al., 2016). En un estudio se demostró ruptura en la pared celular de bacterias Gram positivas mediada por el péptido GL13K (Chen et al., 2014). Se pudo observar que la ruptura de la célula ocurría en un septum, área de alta actividad enzimática donde inicia el corte de la célula durante la división bacteriana, lo cual sugiere un aumento de la actividad del péptido durante la división celular (Chen et al., 2014). Además, se ha demostrado que la nisina lantibiótica altera el patrón de distribución septal y helicoidal del lípido II, un componente de la maquinaria biosintética de la pared celular (Hasper et al., 2006).

4.7.3. Mecanismo de acción intracelular

Se ha demostrado que los AMPs tienen la capacidad de translocarse a través de la membrana para actuar intracelularmente (Fig. 3) (Jenssen et al., 2006). Su acción está dirigida sobre los ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas, la actividad enzimática y la síntesis de la pared celular (Jenssen et al., 2006). Estudios han demostrado que AMP como la indolicidina y buforina II, tienen la capacidad de unirse al ADN y RNA afectando los procesos de replicación y transcripción (Cardoso et al., 2019). De igual modo, se ha demostrado que la región C terminal de TFPI-1 (El inhibidor 1 de la vía del factor tisular), tiene capacidad antibacteriana por la destrucción de la integridad de la membrana celular, y degradación del ADN genómico y ARN en *Staphylococcus aureus* y *Vibrio vulnificus* (He et al., 2017). Péptidos derivados de la pleurocidina de platija y dermaseptina de rana, inhiben la síntesis de ARN, de proteínas y de ADN en *Escherichia coli* (Patrzykat et al., 2002). PR-39 un péptido aislado del intestino delgado del cerdo inhibe la síntesis de proteínas y ADN dando como resultado la degradación de estos componentes (Boman et al., 1993). También, se ha demostrado que péptidos derivados de la oncocina tienen la capacidad de unirse al ribosoma 70s de la bacteria Gram negativa *Thermus thermophilus*, para inhibir la traducción de RNA mensajero al bloquear simultáneamente el centro de la peptidil transferasa, y el túnel de salida del péptido del ribosoma (Roy et al., 2015). Se ha informado que las estructuras cristalinas de los péptidos microcina J25 (MccJ25) y capistruina (Cap) tienen como objetivo la ARN polimerasa bacteriana (RNAP). Ambos péptidos se unen al canal secundario de la RNAP, a través del cual, los sustratos NTP ingresan al sitio activo. Esto bloquea el plegamiento del bucle desencadenante, que es esencial para la catálisis eficiente por parte de RNAP (Braffman et al., 2019).

4.7.4. AMP pertenecientes a la familia de las defensinas

Las defensinas representan una de las familias más grandes de AMPs (Rivas et al., 2006)., son péptidos catiónicos de bajo peso molecular ricos en cisteínas que se encuentran subdivididos en tres subfamilias (Dong et al., 2016): defensinas α , las cuales han sido identificadas ampliamente en humanos, monos y varias especies de roedores; defensinas β , subfamilia ampliamente estudiada, con la distribución taxonómica más amplia, incluidos los invertebrados y las plantas; y por último se encuentran las θ -defensinas, las cuales presentan estructura circular siendo la familia menos numerosa en mamíferos.

En mamíferos las defensinas contienen 6 residuos de cisteína, los cuales se encuentran unidos entre sí por tres puentes disulfuro (Rivas et al., 2006). Las α -defensinas contienen de 29 a 35 aminoácidos, principalmente arginina, por su parte, las β defensinas tienen de 36 a 42 residuos de aminoácidos (Rivas et al., 2006). Estos péptidos son eficaces frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, y muestran actividad tanto a nivel intracelular como extracelular (Dong et al., 2016). En cuanto a las defensinas vegetales, estas poseen de 45 a 54 residuos de aminoácidos, con un pliegue $\alpha\beta$ estabilizado con cisteínas ($CS\alpha\beta$) (Kovaleva et al., 2020). La mayoría tienen ocho residuos de cisteína para la formación de 3 o 4 enlaces disulfuro, y muestran un amplio espectro de acción contra bacterias, hongos y virus, siendo más común la actividad antifúngica (Kovaleva et al., 2020). En invertebrados, la descripción más amplia de estos péptidos se encuentra en los insectos, estas defensinas constan alrededor de 34 a 51 residuos, y al igual que las defensinas de mamíferos, contienen seis cisteínas conservadas que forman 3 puentes disulfuro intramoleculares (Manniello

et al., 2021). Estos péptidos también forman un pliegue CS α β (Kovaleva et al., 2020), y han demostrado que son particularmente activos contra bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus* y *S. aureus* (Manniello et al., 2021). En Cnidaria, hasta el momento solo se ha reportado un péptido antimicrobiano que presenta características similares a las defensinas de insectos y mamíferos (Shenkarev et al., 2012). Aurelin, es un péptido descrito en la medusa *Aurelia aurita* compuesto por 40 residuos de aminoácidos con dos regiones α hélice entrecruzadas por tres enlaces disulfuro, formados a partir de 6 residuos de cisteína (Shenkarev et al., 2012). Se ha reportado que este péptido es activo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Ovchinnikova et al., 2006). En general, las cisteínas son los únicos residuos totalmente conservados en esta familia de péptidos antimicrobianos (Kovaleva et al., 2020).

4.8. Aplicaciones biotecnológicas

Hasta el 2015 se conocían cerca de 30 mil productos de origen marino, caracterizados por su diversidad estructural y complejidad (Kiuru et al., 2014; Hu et al., 2015). Cnidaria ha demostrado que es una fuente importante de productos bioactivos de carácter nutracéuticos, cosmeceúticos, biomédicos y biomateriales (Merquiol et al., 2019). Por ejemplo, el colágeno tipo II de *Stomolophus meleagris* es útil para el tratamiento de la artritis reumatoide (Hsieh, 2005). También, se ha demostrado que el colágeno de la medusa *Stomolophus nomuraise* presenta actividad de inmunoestimulación aumentando la producción de inmunoglobulinas, de interferón y factor de necrosis tumoral (TNF) (Sugahara et al., 2006). La administración a largo plazo de péptidos de colágeno de la medusa *Rhopilema esculentum* en ratas reduce la presión arterial sistólica y la presión arterial diastólica (Zhuang et al., 2012). Esta proteína extraída principalmente de las campanas de medusa, tienen capacidad protectora ante la exposición a rayos UV, debido a que disminuye la destrucción de la piel y la formación de arrugas, además de tener la capacidad de reparar fibras proteicas endógenas de colágeno y elastina, y de mantener la proporción natural de colágeno de tipo I a tipo III (Fan et al., 2013).

En las especies *Aurelia sp.*, *Cotylorhiza tuberculata* y *Rhizostoma pulmo* se han caracterizado las propiedades bioquímicas y antioxidantes de las biomásas gelatinosas, en las cuales se encontró altas cantidades de colágeno, péptidos antioxidantes y otras moléculas bioactivas que resaltan su valor nutracéutico, cosmeceútico y farmacológico (Leone et al., 2015). El extracto de medusa *Chiropsalmus quadrumanus* incubado en neuronas SH-SY5Y humanas genera una mayor longitud en el crecimiento de neuritas y uniones ramificadas, amplificando el contacto entre neuronas SH-SY5Y, sin afectar el cuerpo celular ni la viabilidad, lo cual proyecta esta proteína como una herramienta prometedora para la recuperación de la conexión neuronal, condición que es esencial en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Arruda et al., 2021).

En el coral *Cladiella pachyclados* se han aislado diterpenos de eunicelina que exhiben una función anti-migratoria y anti-invasiva de células de cáncer de próstata PC3, siendo la paquicladina A el compuesto que presenta mayor efectividad (Hassan et al., 2010). De igual forma, han sido aislados varios tipos de diterpenos en el coral *Sarcophyton crassocaule*, con actividad citotóxica significativa contra las líneas celulares de carcinoma Daoy, HEP-2, MCF-7 y WiDr, además de actividad antiinflamatoria en la línea celular de macrófagos RAW264.7 (Lin et al., 2011). También, se han evaluado los efectos antitumorales de 11-deshidrosinulariolido, un compuesto bioactivo aislado del coral blando *Sinularia leptoclados*, el cual induce apoptosis en células cancerosas escamosas orales

CAL-27. Además, tiene efectos sobre la regulación de algunas proteínas específicas que pueden estar involucradas en la proliferación celular (Liu et al., 2011). La proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés, "Green Fluorescent Protein") es probablemente el compuesto derivado de las medusas con más aplicaciones en el campo biomédico. Obtenida de la hidromedusa *Aequorea victoria*, esta biomolécula tiene grandes aplicaciones en el campo de la oncología y desarrollo de células nerviosas debido a su capacidad para marcar células (Merquiol et al., 2019).

Retomando el cóctel principal de compuestos activos producto de los cnidarios, comúnmente conocido "veneno", quien aunque merece una revisión aparte vale la pena abordarlo aquí, contienen compuestos no proteicos como prostaglandinas, palitoxinas, psuedopterosina, sarcodictinas, y compuestos proteicos como citotoxinas, toxinas formadoras de poros, hidralisinas, fosfolipasas, metaloproteasas, neurotoxinas, inhibidores de transportadores de iones regulados por voltaje y protones, inhibidores de proteasas, y péptidos inductores de necrosis (revisado en Mariottini & Pane, 2010; Menezes & Thakur, 2022). Dichos compuestos, poseen un gran abanico de aplicaciones a nivel farmacológico, por su actividad apoptótica y de despolarización de membranas, como antitumorales, analgésicos, anestésicos y antibióticos (revisado en Mariottini & Pane, 2010; Menezes & Thakur, 2022). Un ejemplo es el Dalazatide, un derivado del péptido ShK aislado de la anémona del caribe *Stichodactyla helianthus* (Castañeda et al., 1995), que inhibe específicamente canales de potasio, actualmente está siendo probado contra varias enfermedades autoinmunes (Tarcha et al., 2017; Menezes & Thakur, 2022). Mientras que otras biomoléculas derivadas del veneno de *Palythoa caribaeorum*, retrasan e inhiben el proceso de inactivación de canales de iones activados por voltaje en ratas, sugiere una posible aplicación en la modulación del sistema neuronal (Lazcano et al., 2016).

En conjunto, esta gran diversidad de compuestos producidos por los cnidarios, revisados aquí a través de los mecanismos de protección propios de estos invertebrados, abre una gran puerta hacia el hallazgo de nuevos antibióticos y compuestos bioactivos contra diferentes patógenos y enfermedades.

5. Justificación

A pesar de la morfología primitiva, sus genomas presentan una gran complejidad que se ve reflejada en el repertorio de genes inmunes innatos, los cuales manifiestan similitud a los de los mamíferos, convirtiendo a este filo en candidatos excepcionales para investigaciones sobre la evolución inmune innata (Miller et al., 2007). Esto lo demuestran diferentes estudios, donde ha sido posible el rastreo de diferentes moléculas de reconocimiento, señalización y respuestas efectoras contra patógenos (Emery et al., 2021; Seneca et al., 2020; Martínez et al., 2019; Augustin et al., 2009; Miller et al., 2007). Un grupo de biomoléculas efectoras, fundamentales en la defensa contra microbios son los péptidos antimicrobianos, moléculas altamente conservadas expresadas en genes individuales con capacidad de matar bacterias, hongos, parásitos y virus (Zaslhoff, 2002), los cuales en Cnidaria han mostrado una alta eficiencia contra patógenos humanos multirresistentes (Martínez et al., 2019; Augustin et al., 2009). Estas características les permiten a estos péptidos ser modelos para estudios de evolución y bioprospección. También, es importante estudiar estos mecanismos de defensa primitivos, debido a las enfermedades de carácter infeccioso que ponen en riesgo la estructura y función de los arrecifes de coral, por la pérdida de tejido vivo de las colonias de corales constructores

(hermatípicos) (Álvarez-Filip et al., 2019; Estrada-Saldívar et al., 2020; Weil et al., 2006). Por lo tanto, con el presente estudio se busca contribuir al conocimiento sobre el arsenal de péptidos antimicrobianos presentes en Cnidaria, su posible papel en la defensa contra diversos patógenos y su valor como moléculas basales para estudios evolutivos y de bioprospección.

6. Hipótesis

Los péptidos antimicrobianos son moléculas efectoras claves de la inmunidad innata que se han conservado en los distintos procesos evolutivos. En particular las defensinas han sido descritas en diferentes organismos incluyendo mamíferos, invertebrados y plantas. AMP con estas características también han sido descritos en Cnidaria. Por lo tanto, se espera que diferentes especies de cnidarios presenten AMP con características estructurales de defensinas.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

- Caracterizar estructuralmente péptidos antimicrobianos (AMP) pertenecientes a la familia de las defensinas en diferentes especies de cnidarios mediante análisis computacional.

7.2. Objetivos específicos

- Crear una base de datos local con las secuencias proteómicas de potenciales péptidos antimicrobianos encontrados en diferentes organismos del filo Cnidaria.
- Obtener los modelos 3D de los péptidos antimicrobianos identificados en Cnidaria
- Evaluar el potencial de acción de los péptidos antimicrobianos identificados en Cnidaria
- Clasificar filogenéticamente los péptidos antimicrobianos encontrados en cnidarios.

8. Métodos

Para alcanzar los objetivos propuestos en esta investigación, los métodos se desarrollaron en cuatro fases. En la primera fase se llevó a cabo la búsqueda exhaustiva de secuencias homologas a péptidos antimicrobianos pertenecientes a la familia de las defensinas en los proteomas disponibles para cnidarios, con la cual se obtuvo una base de datos local. En la segunda fase se realizó un modelamiento 3D por homología de secuencias, lo cual permitió la caracterización estructural de los péptidos. En la tercera fase se realizó una caracterización físicoquímica de los péptidos modelados estructuralmente, además del modelamiento 3D de las superficies hidrofóbicas e hidrofílicas. En la cuarta fase se llevó a cabo una caracterización funcional mediante una herramienta computacional. Por último, se realizó un árbol filogenético con las secuencias caracterizadas estructuralmente y funcionalmente y las diferentes defensinas utilizadas como plantilla para la caracterización de estos péptidos.

8.1. Búsqueda en bases de datos

Los datos de las secuencias de péptidos antimicrobianos de distintos vertebrados, plantas e insectos se descargaron de la base de datos publica Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para la búsqueda de secuencias de aminoácidos relacionadas con péptidos antimicrobianos en Cnidaria se utilizó la herramienta Blast en bases de datos en línea como REEFGENOMICS (<http://reefgenomics.org/>), OIST Marine Genomics Unit (<https://marinegenomics.oist.jp/gallery>), National Human Genome Research Institute (NHGRI) (<https://research.nhgri.nih.gov/hydra/>), CassiopeaBase (<https://cassiopeabase.org/resources/c-xamachana-genome/>), UniProt (<https://www.uniprot.org/>), y Blast NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

8.2. Modelamiento estructural de péptidos

La estructura 3D de los péptidos predichos en el proteoma de cnidarios se realizó por modelamiento basado en homología, usando el servidor swiss model (Schwede et al., 2003).

8.3. Refinamiento y evaluación de los modelos 3D

La optimización de los modelos se realizó con el software UCF Chimera (Pettersen et al., 2004). La evaluación de la calidad de los modelos se hizo mediante un análisis de ramachandran plot y los estimadores QMEANDisCo Global y GMQE.

8.4. Caracterización fisicoquímica de péptidos

Se analizaron las propiedades fisicoquímicas tales como, hidrofobicidad, momento hidrofóbico, carga neta, índice de anfifilia, punto isoelectrico y peso con la herramienta Property Calculation de la base de datos DBAASP (Pirtskhalava et al., 2021).

8.5. Predicción de actividad contra especies microbianas específicas

Se predijo el potencial antimicrobiano de los péptidos obtenidos en Cnidaria utilizando la herramienta PAASS en la base de datos DBAASP (<https://dbaasp.org/>)

8.6. Análisis de relaciones filogenéticas

Para el análisis filogenético se creó un archivo en formato fasta para realizar una alineación múltiple con la herramienta MUSCLE en el programa MEGA X (Tamura et al., 2021). Se halló el modelo evolutivo más probable y se construyó un árbol filogenético por el método de Maximum Likelihood (ML), con 1000 réplicas de arranque y el modelo Dayhoff (Schwarz & Dayhoff, 1979). Se utilizó una distribución gamma discreta, calculada con las secuencias de la base local construida en este trabajo, para modelar las diferentes tasas evolutivas entre sitios (+G, parámetro = 5,0564).

9. Resultados

Tras la búsqueda de péptidos con potencial antimicrobiano, se obtuvo 51 secuencias en diferentes especies de cnidarios que mostraron una similitud superior del 25% con AMP pertenecientes a la familia de las defensinas descritas en organismos superiores (Tabla suplementaria 1). Estas 51 secuencias fueron sometidas a diferentes análisis con el fin de describir potenciales péptidos antimicrobianos estructuralmente similares a las defensinas, y así mismos péptidos con potencial de acción contra especies microbianas particulares.

9.1 Modelamiento estructural de péptidos

El modelamiento 3D por homología de secuencias permitió la obtención de 12 estructuras de potenciales péptidos antimicrobianos para 11 especies de cnidarios. Cinco péptidos presentaron conformaciones hélice α , y siete conformaciones hélice α y hoja β antiparalelas (Fig. 4. Tabla 2). Los péptidos antimicrobianos utilizados como modelos para la conformación de las estructuras 3D fueron la defensina nasonin-1 (2KP0), descrita en *Nasonia vitripennis*, a partir de la cual se modelaron 3 péptidos (1N, 2N, 3N); el péptido Defensin-1 (Psd1) (1JKZ) descrito en *Pisum sativum*, a partir del cual se modelaron 2 péptidos (4P, 5P); la defensina gamma-thionin (TPP3) (4uj0), descrita en *Solanum lycopersicum*, a partir de la cual se modelaron 2 péptidos (6S, 7S); y la defensina Aurelin (2lg4), descrita en *Aurelia aurita*, que permito el modelamiento estructural de 5 péptidos (8A, 9A, 10A, 11A, 12A). En la Fig. 5, se observa la alineación de las secuencias de los diferentes modelos estructurales obtenidos en Cnidaria, con las secuencias de defensinas utilizadas como plantilla.

Tabla 2

Secuencias de péptidos antimicrobianos hallados en Cnidaria a los cuales se les determino su estructura 3D

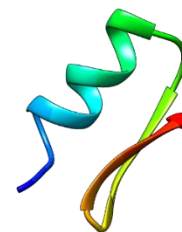
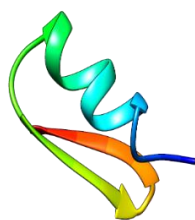
Péptido	Cod. Acceso	Organismo	Cod. Péptido	templado	% de identidad
SCNVQPCPSVCPAGQNGGTCVNSKCQCSQ	plut2.m8.894.m1/	<i>Porites lutea</i>	1N	2kp0.1.A	37.93%
CNVQPCPSVCPAGQNGGTCVNSKCQCNQG	ffun1.m4.1645.m1/	<i>Fungia spp</i>	2N	2kp0.1.A	37.93%
CNTQPCPSVCPAGHNGGTCVNAQCQCSQG	gasp1.m3.12137.m1/	<i>Goniastrea aspera</i>	3N	2kp0.1.A	37.93%
KCSPLSYLYEKDGLTRDECVQHCKDNRYPYAGFDHCRKCFCG	XP_020616187 *	<i>Orbicella faveolata</i>	4P	1jkz.1.A	32.50%
KDGLTRDECVQHCKDNRYPYAGFDNCRKCFCG	gasp1.m3.2313.m1/	<i>Goniastrea aspera</i>	5P	1jkz.1.A	33.33%
RLSCTDICQSVNYSVGRCSKFRQRCYCEKN	mcac_s0259.g27.t1_	<i>Montipora cactus</i>	6S	4uj0.1.A	34.48%
SCTDICQSVNYSVGRCSKFRQRCYCEKNAS	meff_s0541.g2.t1_	<i>Montipora efflorescens</i>	7S	4uj0.1.A	34.48%
CQDLFKEKCEQFASYEGYCGHWKRFMRKWCPKSCGFC	evm.model.scaffold_3.183/	<i>Discosoma sp</i>	8A	2lg4.1.A	33.33%
PVCRDSYGRCLRLEFYCPKPGKYGFVRYHCFKTCGWG	XP_020632384.1 *	<i>Orbicella faveolata</i>	9A	2lg4.1.A	33.33%
PVCRDSYRRLCKLFGHLCSQKGTSGKFVRYHCFQTCGWG	XP_027037007 *	<i>Pocillopora damicornis</i>	10A	2lg4.1.A	33.33%
ACADLRGKAFCHLFKSYCHKKGIRGRLLRHKCSYSCG	Spis3445/	<i>Stylophora pistillata</i>	11A	2lg4.1.A	37.14%
CKDFSRLCRRFSAFCTRESKNGRVMRHYCKRTCEQ	jgi Casxa1 20619 +	<i>Cassiopea xamachana</i>	12A	2lg4.1.A	34.38%

Nota: Los códigos de acceso con el símbolo / pertenecen a la base datos REEFGENOMICS, * NCBI, _ OIST Marine Genomics Unit y + CassiopeaBase. Se presentan los valores del % de identidad entre los péptidos obtenidos en Cnidaria y las plantillas utilizadas para el modelamiento estructural.

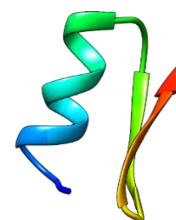
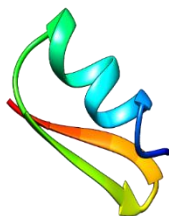
Cod. Péptido

Estructuras 3D

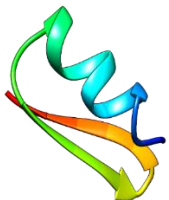
1N (*Porites lutea*)



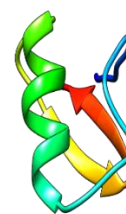
2N (*Fungia spp*)



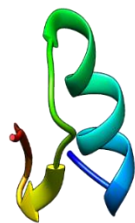
3N (*Goniastrea aspera*)



4P (*Orbicella faveolata*)



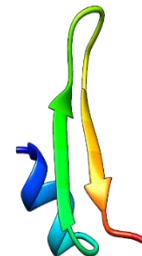
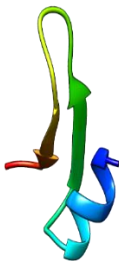
5P (*Goniastrea aspera*)



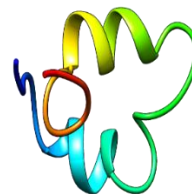
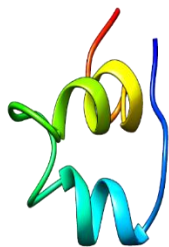
6S (*Montipora cactus2*)



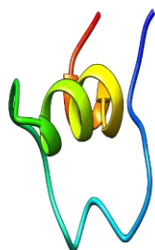
7S (*Montipora efflorescens*)



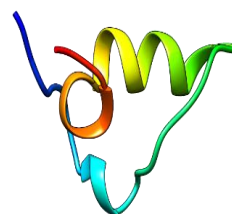
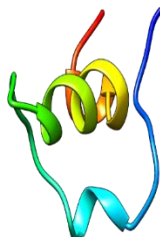
8A (*Discosoma sp*)



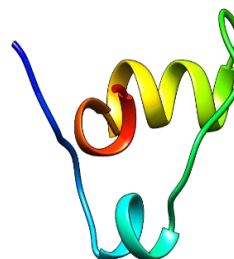
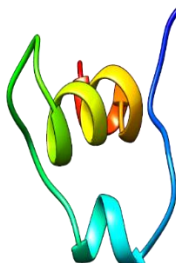
9A (*Orbicella faveolata*)



10A (*Pocillopora damicornis*)



11A (*Stylophora pistillata*)



12A (*Cassiopea xamachana*)

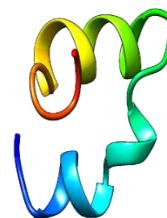


Figura 4. Estructura 3D de 12 péptidos con potencial antimicrobiano modelados en 11 especies de cnidarios. Se muestran las dos caras de cada estructura en un giro de 180°

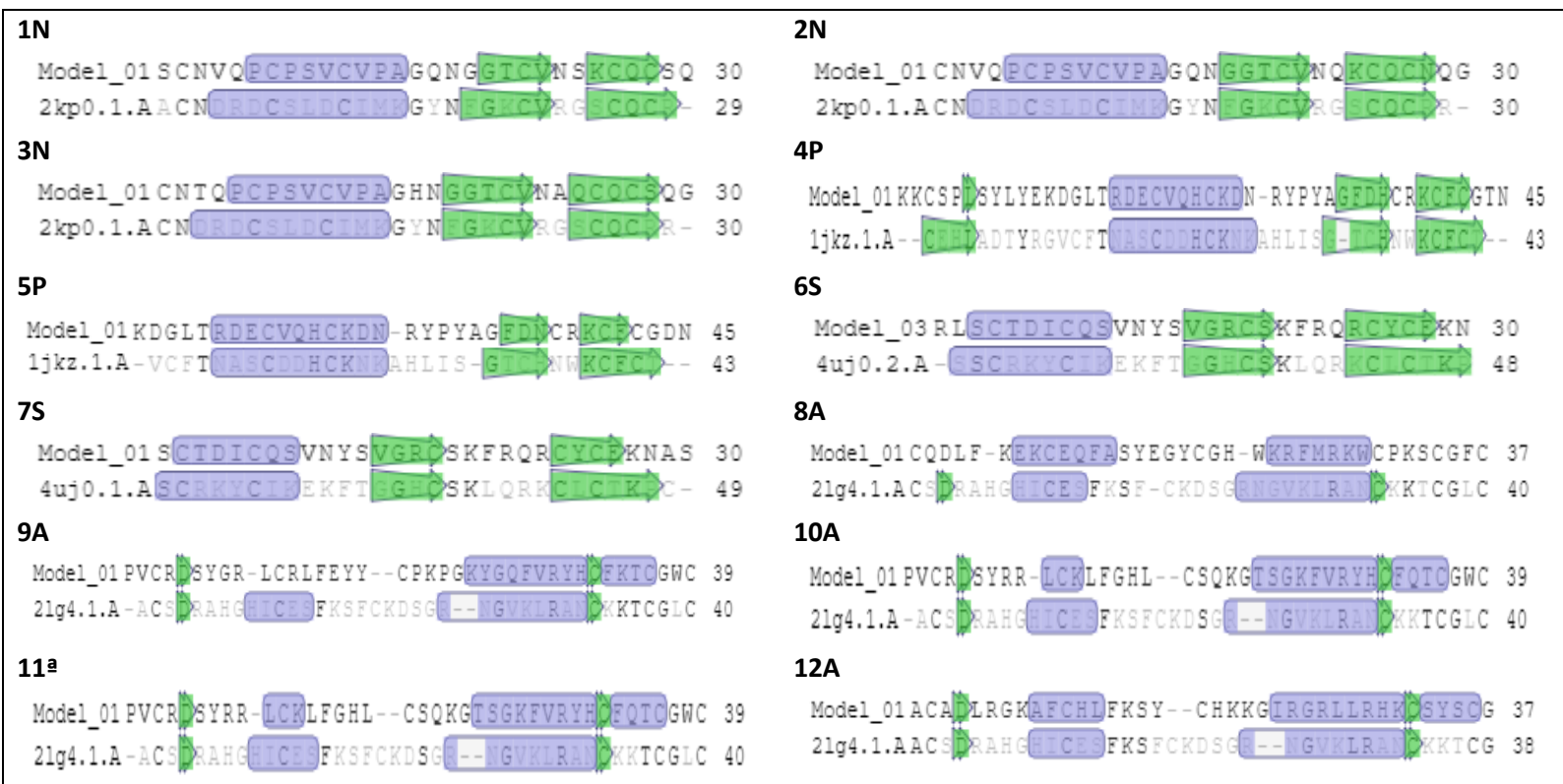


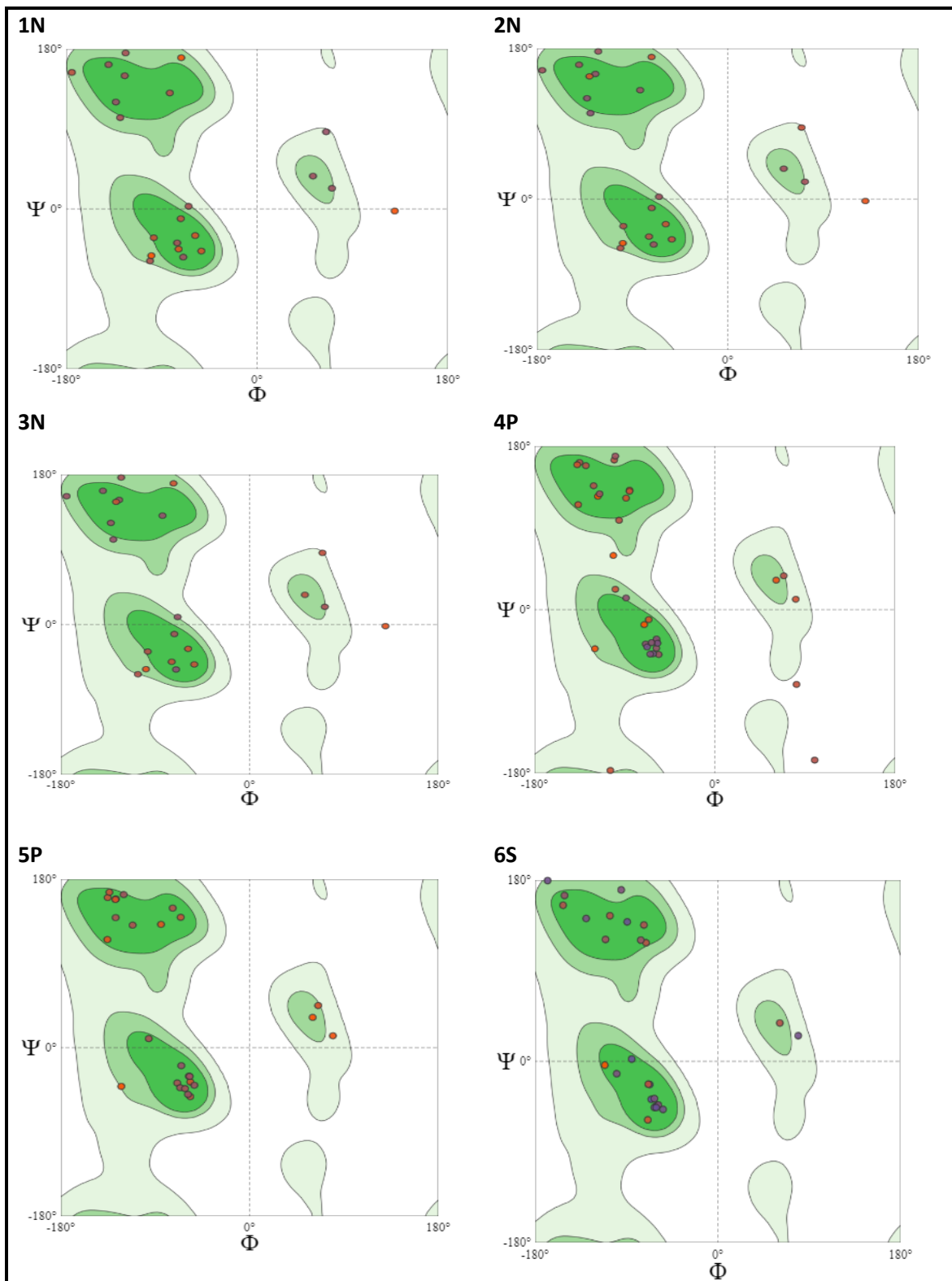
Figura 5: Alineación de secuencias de los diferentes modelos estructurales obtenidos en Cnidaria, con las secuencias de defensinas utilizadas como plantilla. Los péptidos con la letra N en su código fueron modelados a través de la defensina nasonin-1, descrita en *Nasonia vitripennis*. Los péptidos con la letra P en su código, fueron modelados a través de la defensina Psd1 descrita en *Pisum sativum*. Los péptidos con la letra S en su código, fueron modelados a través de la defensina TPP3 descrita en *Solanum lycopersicum*. Por último, los péptidos con la letra A en su código, fueron modelados a través de la defensina Aurelin, descrita en *Aurelia aurita*. Model: hace referencia a la secuencia perteneciente al péptido modelado en Cnidaria, las secuencias de las defensinas se encuentran alineadas en la parte inferior identificadas con su respectivo templado. El sombreado azul sobre las secuencias hace referencia a los aminoácidos que se encuentran formando estructuras hélice α , y el sombreado verde hace referencia a los aminoácidos que forman la estructura de hoja β .

9.2. Evaluación de la calidad de los modelos

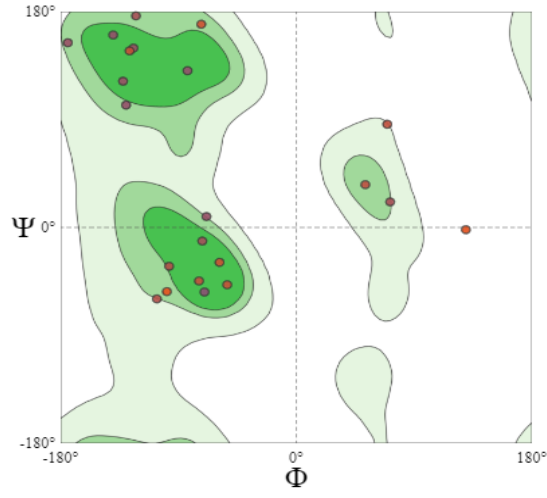
Los diagramas de Ramachandran permitieron visualizar aminoácidos presentes en regiones energéticamente favorecidas para ángulos diedros, y así mismo, aminoácidos en regiones cuestionables para cada uno de los modelos (Fig. 6). La estructura que presentó el mayor número de aminoácidos con ángulos diedros no permitidos fue la del péptido 8A descrito en la especie *Discosoma sp*, con 5 aminoácidos. Por otro lado, el péptido 5P descrito en *Goniastrea aspera*, mostró que todos sus aminoácidos presentan conformaciones de ángulos diedros preferibles para la formación de estructuras hélice α y de hoja β . Los péptidos que mostraron los valores más favorables para este análisis, fueron los descritos en las especies *Goniastrea aspera* (5P), *Montipora cactus*, (6S), *Montipora efflorescens* (7S) y *Cassiopea xamachana* (12A), con valores Ramachandran favorables de 96.55%, 92.59%, 92.59% y 93.33%, respectivamente (Tabla 3).

Mediante los estimadores GMQE y QMEANDisCo, se obtuvo una medición general de la calidad de los modelos entre 0 y 1. Estos estimadores se basan en diferentes propiedades geométricas donde se evalúa la similitud esperada del modelo con la estructura nativa; por lo general, puntuaciones por debajo de 0.5 indica un modelo de baja calidad. Los péptidos con valores más favorables para

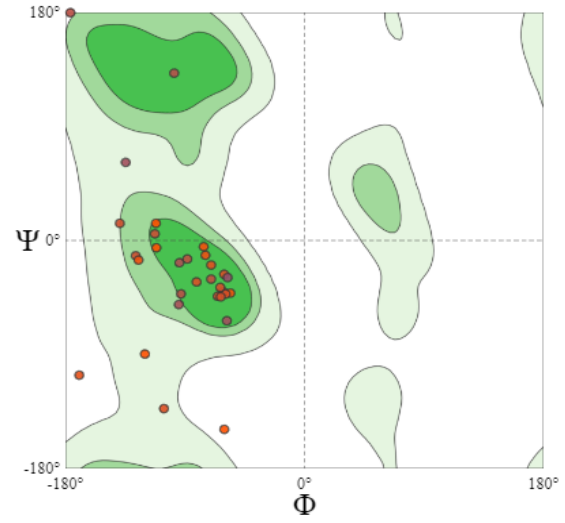
este análisis fueron 3N (*Goniastrea aspera*), 6s (*Montipora cactus*), 7S (*Montipora efflorescens*) y 12A (*Cassiopea xamachana*). Por otro lado, los péptidos que mostraron valores de baja calidad fueron: 8A (*Discosoma sp.*), 9A (*Orbicella faveolata*) y 10A (*Pocillopora damicornis*) (Tabla 3).



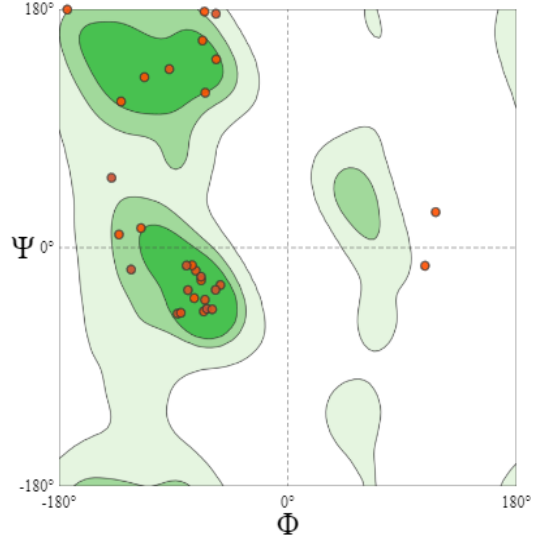
7S



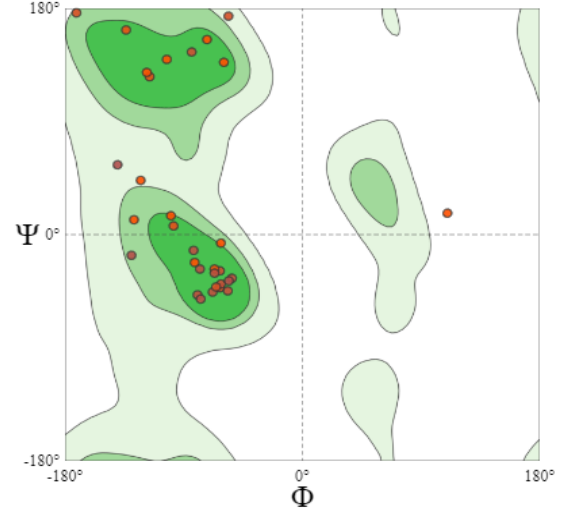
8A



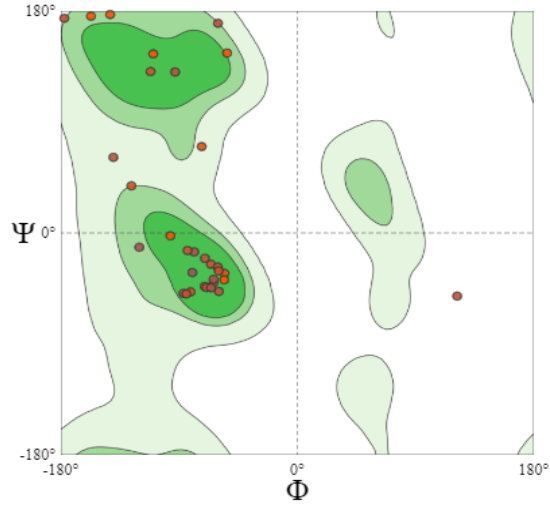
9A



10A



11A



12A

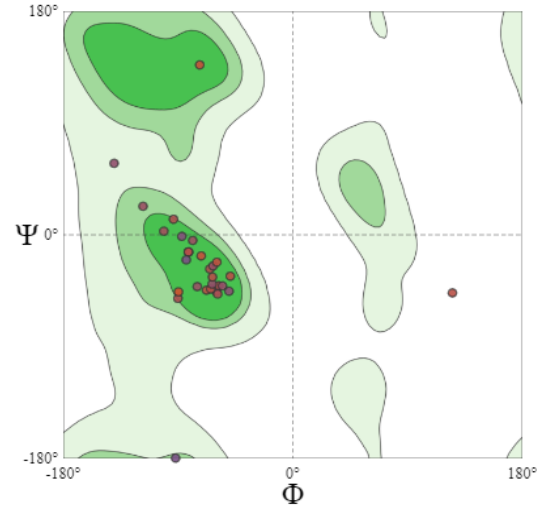


Figura 6. Diagramas de Ramachandran para cada uno de los modelos descritos en Cnidaria. Las regiones verde oscuro y verde claro representan ángulos diedros permitidos para la formación de estructuras hélice α y de hoja β . Las regiones verde pálido y blanco dentro del diagrama representan regiones estéricamente no permitidas para todos los aminoácidos, excepto para la glicina, aminoácido que carece de cadena lateral. Por tal motivo la glicina no se muestra dentro de los diagramas.

Tabla 3

Evaluación de la calidad de los modelos

Cod. Peptido	template	Ramachandran favoured	QMEANDisCo Global	GMQE
1N	2kp0.1.A	81.48%	0.57	0.58
2N	2kp0.1.A	81.48%	0.56	0.59
3N	2kp0.1.A	81.48%	0.58	0.61
4P	1jkz.1.A	87.18%	0.55	0.59
5P	1jkz.1.A	96.55%	0.56	0.55
6S	4uj0.1.A	92.59%	0.65	0.65
7S	4uj0.1.A	92.59%	0.67	0.66
8A	2lg4.1.A	80.00%	0.49	0.47
9A	2lg4.1.A	83.33%	0.43	0.43
10A	2lg4.1.A	86.11%	0.48	0.47
11A	2lg4.1.A	85.71%	0.50	0.61
12A	2lg4.1.A	93.33%	0.64	0.60

Nota: valores favorables de cada modelo para el análisis de Ramachandran, GMQE (Estimación de la calidad del modelo global), estimador que combina las propiedades de la alineación de la plantilla de destino y la estructura de la plantilla. QMEANDisCo Global muestra el promedio global de la similitud esperada de los residuos con la estructura nativa.

9.3. Caracterización fisicoquímica de péptidos

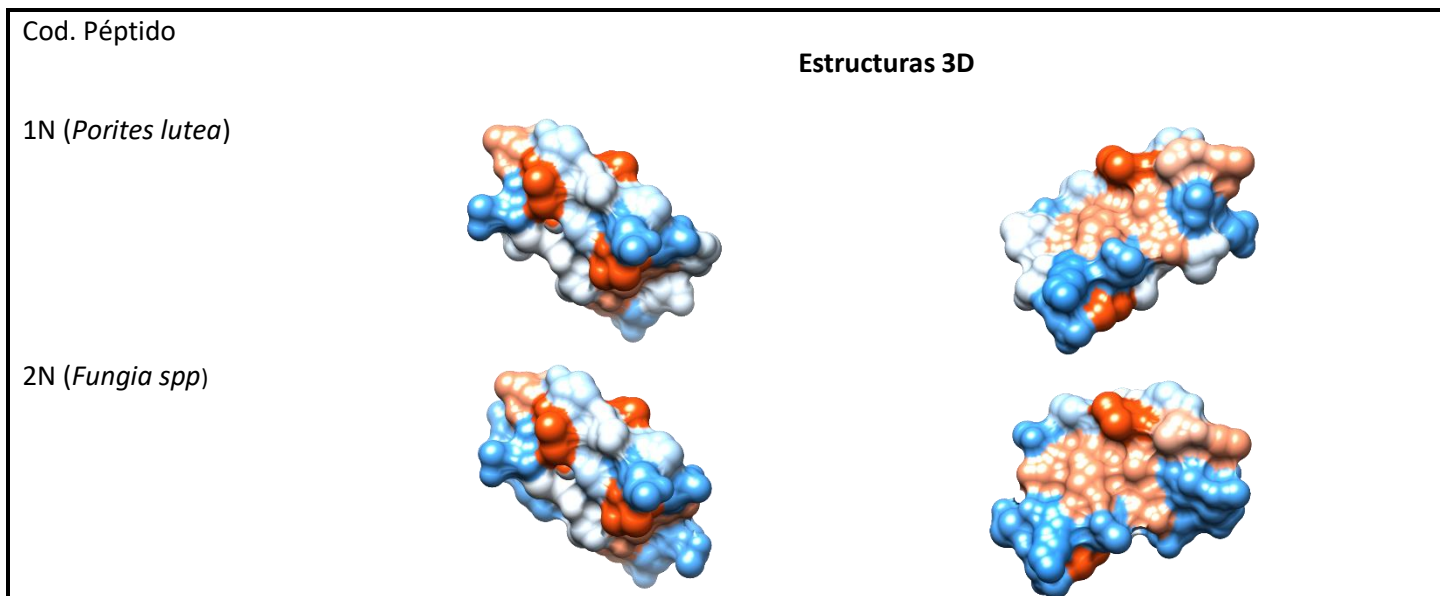
Se obtuvieron diferentes propiedades fisicoquímicas en los 12 péptidos modelados estructuralmente (Tabla 4). La obtención de los perfiles de hidrofobicidad fue realizada mediante la escala de Wimley - White (1998), la cual otorga valores de hidrofobicidad con variaciones entre -3 y 5. Para el momento hidrofóbico se obtuvieron valores que oscilaron entre 0.01 y 0.63, con valores más altos en los péptidos 12A, 9A y 8A. Para la hidrofobicidad general del péptido se obtuvieron valores entre 0.39 y 1.02, siendo los péptidos 7S, 8A, 11A y 12A los más favorecidos para esta característica. La carga neta para todos los péptidos fue positiva con valores que oscilaron entre 1 y 8. Los valores del punto isoeléctrico oscilaron entre 6.61 y 10.27, con valores más altos en los péptidos 9A, 10A, 11A y 12A. También, se estimó el índice de anfifilia con valores comprendidos entre 0.21 y 1.49, siendo los péptidos 4P, 11A, 9A y 8A los que mostraron valores más altos para esta propiedad, donde valores superiores a cero indican anfifilia (Mitaku et al., 2002). En la Fig. 7

están representadas las superficies hidrofóbicas e hidrofílicas de los 12 péptidos caracterizados estructuralmente.

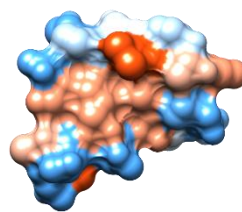
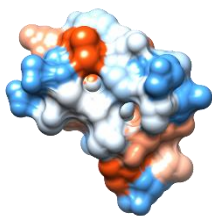
Tabla 4

Características fisicoquímicas de potenciales AMP en cnidarios

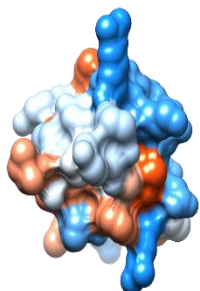
Cod. Péptido	Momento hidrófobo normalizado	Hidrofobicidad normalizada	Carga neta	Punto isoelectrico	Índice de anfifilia	Peso
1N	0.01	0.39	1.00	7.35	0.29	3045.48
2N	0.06	0.44	1.00	7.36	0.33	3083.53
3N	0.13	0.42	1.00	6.61	0.21	3010.39
4P	0.31	0.15	1.00	7.46	1.17	4822.43
5P	0.33	0.13	1.00	7.53	1.01	3615.02
6S	0.22	0.67	4.00	8.57	1.03	3548.06
7S	0.30	0.68	3.00	8.26	0.95	3436.87
8A	0.63	0.72	3.00	8.13	1.49	4531.28
9A	0.42	0.45	5.00	8.72	1.46	4731.54
10A	0.36	0.48	6.00	9.26	1.11	4572.36
11A	0.37	0.76	8.00	10.16	1.15	4215.02
12A	0.60	0.85	7.00	10.27	1.07	4403.14



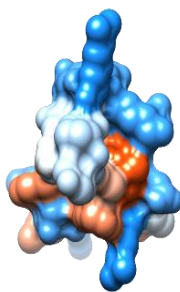
3N (*Goniastrea aspera*)



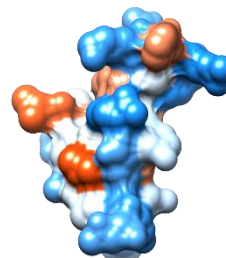
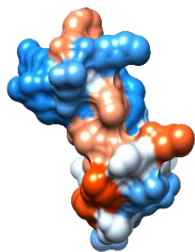
4P (*Orbicella faveolata*)



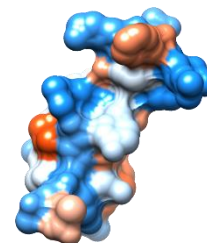
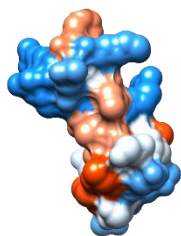
5P (*Goniastrea aspera*)



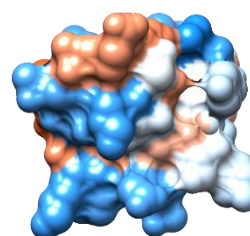
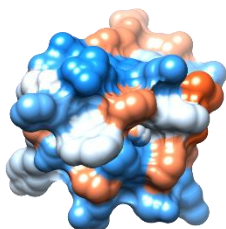
6S (*Montipora cactus2*)



7S (*Montipora efflorescens*)



8A (*Discosoma sp*)



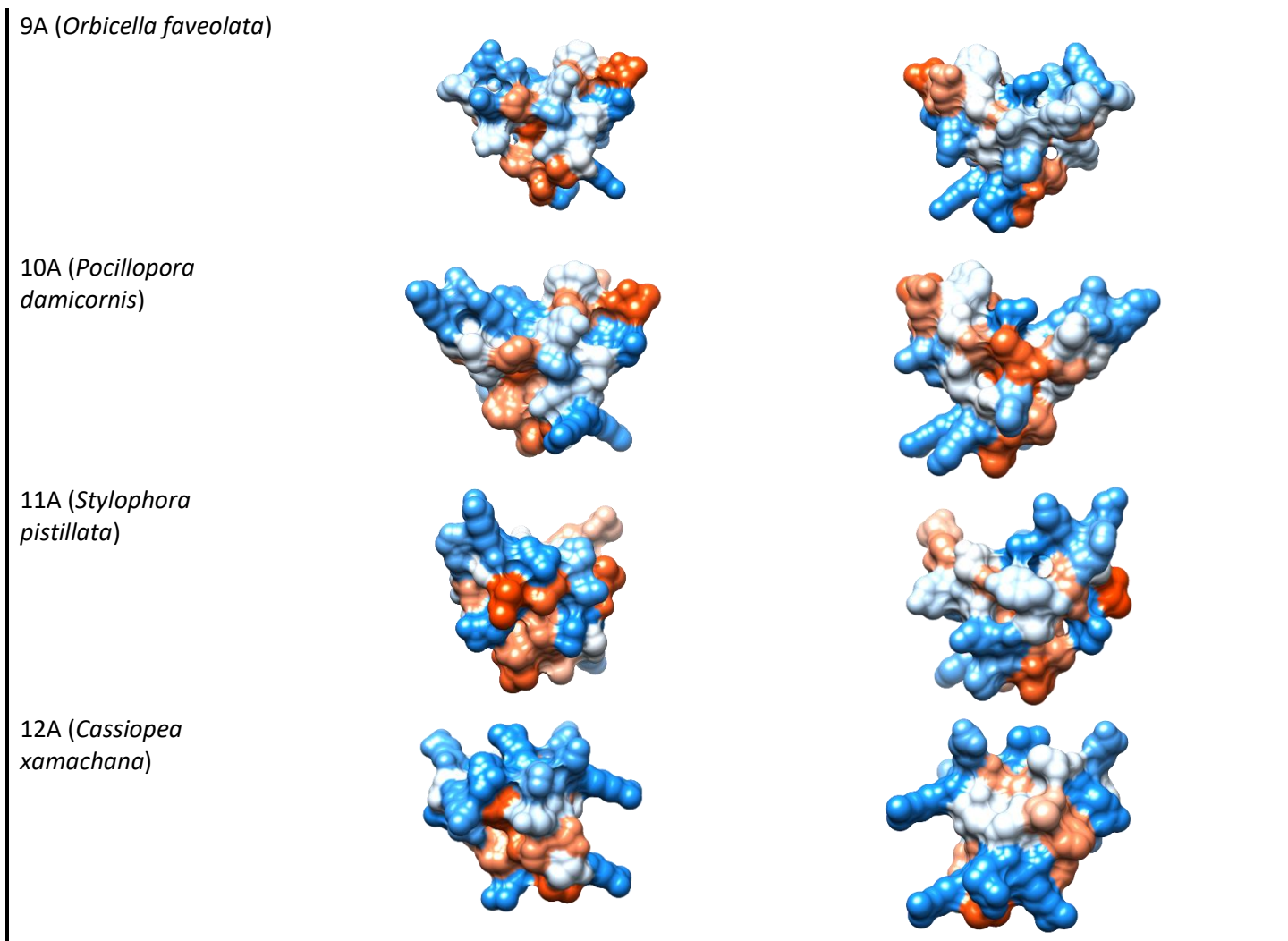


Figura 7. Estructura 3D de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de 12 péptidos con potencial antimicrobiano modelados en 11 especies de cnidarios. Se muestran las dos caras de cada estructura en un giro de 180°. El color Azul representa regiones hidrofílicas y el naranja regiones hidrofóbicas.

9.4. Predicción de actividad contra especies microbianas específicas

Mediante la herramienta PAASS se analizó el potencial de acción de los 51 péptidos contra especies microbianas específicas. Tras el análisis, 20 péptidos mostraron potencial de acción contra especies como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 5). Once péptidos mostraron potencial de acción contra *Klebsiella pneumoniae*; 3 contra *Pseudomonas aeruginosa*; 1 contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; y 5 contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Además, se muestra la actividad contra eritrocitos humanos, donde solo el péptido de la especie *Porites lutea se manifesta* como activo. Estos péptidos fueron obtenidos por homología a través de las defensinas Aurelin descrita en el cnidario *Aurelia aurita*, y la Beta-defensin 7 (mBD-7) descrita en *Mus musculus*. Esta herramienta está desarrollada bajo un enfoque de aprendizaje automático donde se utilizan características físicoquímicas como momento hidrofóbico,

hidrofobicidad normalizada, carga, punto isoeléctrico, profundidad de penetración, Angulo de inclinación, propensión al desorden, momento lineal y agregación in vitro, para predecir actividad bactericida (Pirtskhalava et al., 2021).

Tabla 5

Predicción de actividad contra especies microbianas

Péptido	Código de acceso	Organismo	Escherichia coli ATCC 25922	Pseudomonas aeruginosa ATCC27853 (VPP)	Klebsiella pneumoniae	Eritrocitos Humanos
PACYDRYPHTCKQFDYCIKPGRNGRFIRYHCFNSCGRC	jgi_Nemve1_206031/	<i>Nematostella vectensis</i>		0,57 (VPP)	0,85 (VPP)	NA
PRCMDAYTRLCRLFTLPDFNYCSKPGKEGRFVRYNCFQSCGWC	XP_029192340 *	<i>Acropora millepora</i>			0,85 (VPP)	NA
PFCKDRYPHACKQFGHRFWCLGKFPFRPFLLSHYCFRQCFC	evm.utg2858/	<i>Actinia equina</i>			0,85 (VPP)	NA
CQDLFKEKECEQFASVEGYCGHWKRFMRKWCWKSCGFC	evm.model.scaffold_3.183/	<i>Discosoma sp</i>			0,85 (VPP)	NA
PVCRDSYGRCLCFEYCPKPGKYQGFVRYHCFKTCGWC	XP_020632384 *	<i>Orbicella faveolata</i>		0,54 (VPP)	0,85 (VPP)	NA
PVCRDSYRRLCKLFGHLCSQKGTSGKVFVRYHCFQTCGWC	XP_027037007*	<i>Pocillopora damicornis</i>		0,50 (VPP)	0,85 (VPP)	NA
PRCKDFYDRLCRLFTPEPFNYCMRPGNKGKGFIRYCNCFKSCGWC	plut2.m8.2713/	<i>Porites lutea</i>		0,52 (VPP)	0,85 (VPP)	0,55 (VPP)
ACADLRGKAFCHLFKSYCHKKGIRGLLRHKCSYSCG	Spis3445/	<i>Stylophora pistillata</i>		0,52 (VPP)	0,85 (VPP)	NA
PRCMDAYTRLCRLFTLPDFNYCSKPGKEGRFVRYNCFQSCGWC	aawi_s0050.g103.t1_	<i>Acropora awi</i>			0,85 (VPP)	NA
PRCMDAYTRLCRLFTLPDFNYCSKPGKEGRFVRYNCFQSCGWC	aech_s0011.g351.t1_	<i>Acropora echinata</i>			0,85 (VPP)	NA
CKDFSRLVLCRRFSAFCTRESKNGRVMRHYCKRTCEQ	jgi Casxa1 20619 +	<i>Cassiopea xamachana</i>			0,85 (VPP)	NA
SKRGCSEIEINERLQYCLMVLHKLK	Hma2.232062 //	<i>Hydra magnipapillata</i>			0,85 (VPP)	NA
TSQGCTSEMTERLRYCKRVMKKV	astr_s0028.g54.t1_	<i>Astreopora myriophthalma</i>	0,50 (VPP)	0,61 (VPP)		NA
NSQGCTTEMNERLRYCKRVLKVV	gfas1.m1.15458/	<i>Galaxea fascicularis</i>		0,58 (VPP)		NA
SKRGCSEIEISERLQYCLMVLHKLK	scaffold199.g23.t1_	<i>Hydra viridissima</i>			0,85 (VPP)	NA
SKRGCNEIEITERLQYCKMVLQKL	scaffold530.g12.t1_	<i>Morbakka virulenta</i>			0,85 (VPP)	NA
NSQGCTTEMTERLRYCKRVLKVV	pspe_0.1.m1.35861/	<i>Pachyseris speciosa</i>		0,63 (VPP)		NA
QGCASELIERLRYCKRVLKVV	pdam_00005914/	<i>Pocillopora damicornis</i>			0,85 (VPP)	NA
QGCTEEMIERLRYCKRVLNKV	plut2.m8.15892/	<i>Porites lutea</i>			0,85 (VPP)	NA
NKQGCASELIERLRYCKRVLKVV	Spis7258/	<i>Stylophora pistillata</i>		0,59 (VPP)		NA

Nota. Actividad contra especies microbianas. En la parte superior se encuentran los péptidos obtenidos por homología a través de la defensina Aurelin (*Aurelia aurita*); en la parte inferior están los péptidos obtenidos por homología a través de la defensina mBD-7 (*Mus musculus*). El péptido activo exhibe MIC < 25 µg/ml. PPV es el valor predictivo positivo para los péptidos previstos como activos. También se describe la actividad contra eritrocitos humanos. NA: no activo para eritrocitos humanos. Los códigos de acceso con el símbolo / pertenecen a la base de datos REEFGENOMICS, * NCBI, _ OIST Marine Genomics Unit, // NHGRI y + CassiopeaBase. Las secuencias peptídicas resaltadas en negrita hacen referencia a los péptidos 8A, 9A, 10A, 11A y 12A, a los cuales se les predijo su estructura utilizando como plantilla el AMP Aurelin.

9.5. Análisis de relaciones filogenéticas

Un total de 33 secuencias, entre péptidos caracterizados estructuralmente y funcionalmente como AMP, y diferentes defensinas utilizadas como plantilla para su caracterización, además de una defensina de *Homo sapiens*, se analizaron para hallar una relación filogenética entre las proteínas de los grupos taxonómicos.

Los análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud mostraron que algunas proteínas con potencial antimicrobiano caracterizadas en Cnidaria están estrechamente relacionadas con AMP descritos en otros organismos, de tal modo que se denotan nodos que permiten agrupar diferentes especies (Fig. 8). Se puede apreciar un nodo con un soporte de remuestreo de 43%, que agrupa a diferentes péptidos caracterizados en cnidarios con las defensas Aurelin y Neutrophil. Este porcentaje de remuestreo aleatorio se acerca al ideal (≥ 50) para la validación de nodos en un árbol. También se puede apreciar una relación estrecha entre el péptido caracterizado en *Nematostella vectensis* (Tabla 5) y el AMP Neutrophil descrito en *Homo sapiens* con un soporte de remuestreo del 29%. En otro nodo, con un soporte de remuestreo del 31%, se encuentran las defensas Psd1 descrita en *Pisum Sativum*, TPP3 descrita *Solanum lycopersicum* y Beta-defensin 7 (mBD-7) descrita en *Mus musculus*. Se puede apreciar que los péptidos descritos en *Montipora cactus* y *Montipora efflorescens* comparten un ancestro común cercano con las defensas Psd1 y TPP3.

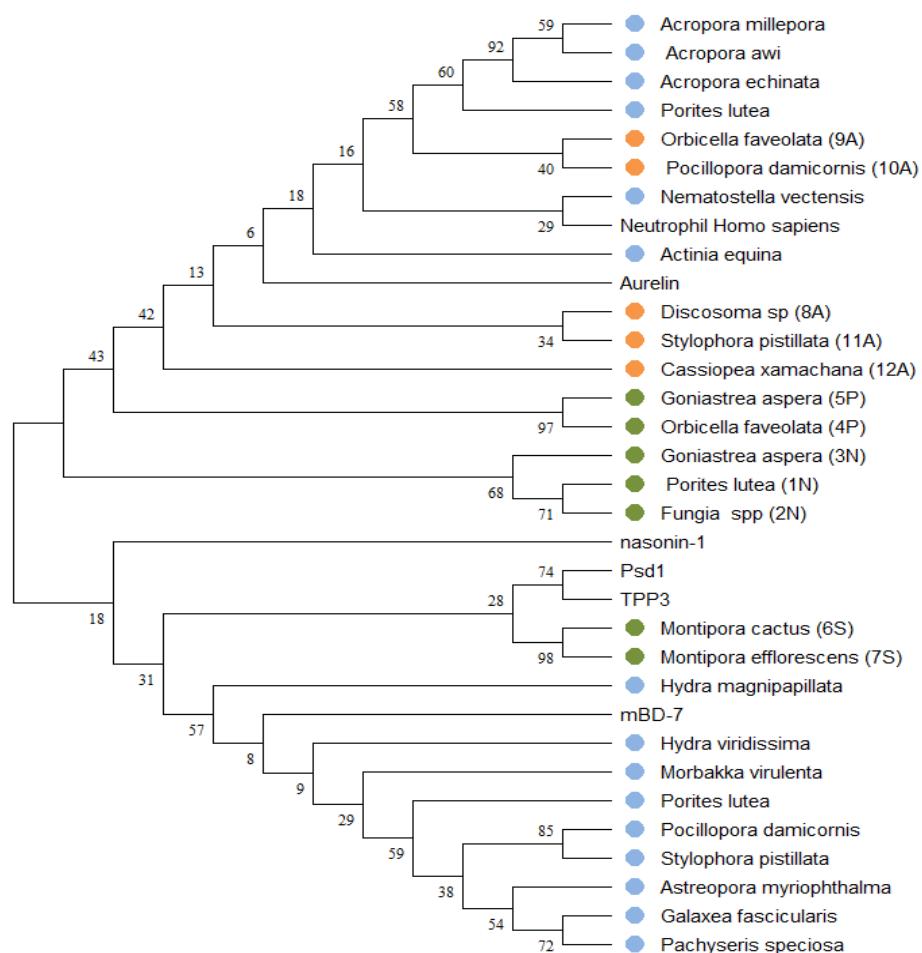


Figura 8: Árbol filogenético de potenciales AMP identificados en Cnidaria y defensas descritas en diferentes organismos. Los círculos de color azul representan péptidos que mostraron potencial de acción contra bacterias multirresistentes, los

círculos de color naranja representan péptidos que mostraron potencial de acción y que fueron caracterizados estructuralmente, los círculos verdes representan péptidos que solo fueron caracterizados estructuralmente. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo basado en la matriz de Dayhoff (Schwarz & Dayhoff, 1979). Se muestra el árbol con la probabilidad logarítmica más alta (-1637,54). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas mediante el modelo de Dayhoff, y luego seleccionando la topología con un valor logarítmico de verosimilitud superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre sitios (5 categorías (+G, parámetro = 5,6968)). Este análisis involucró 33 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 56 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11 (Tamura et al., 2021).

10. Discusión

10.1. Modelamiento estructural de péptidos

Se obtuvieron modelos tridimensionales (3D) de doce péptidos con potencial antimicrobiano mediante modelado comparativo. Los tres modelos obtenidos a partir de la defensina nasonin-1 mostraron valores para el análisis de Ramachandran que estuvieron alejados del porcentaje ideal para esta medida (> 98%) (Tabla 3); sin embargo, los estimadores GMQE y QMEANDisCo mostraron valores favorables que indican similitud estructural entre el péptido modelado y la estructura nativa, lo cual permite tener una aproximación de la posible estructura secundaria en estos péptidos. Tras el modelado se confirmó el plegamiento típico CS $\alpha\beta$ (pliegue $\alpha\beta$ estabilizado con cisteínas) en los tres péptidos (Fig. 4), característico de las defensinas de insectos (Kovaleva et al., 2020), el cual está conformado por una hélice α y una hoja β de dos cadenas. De igual forma los tres péptidos obtenidos presentaron los 6 residuos de cisteína típicos en defensinas de insectos y mamíferos encargados de formar enlaces disulfuro y darle estabilidad a la estructura hélice α y de hoja β (Rivas et al., 2006). En este caso los tres péptidos mostraron un patrón conservado de cisteínas idéntico al presente en la defensina nasonin-1 (Fig. 5). La similitud en la secuencia y el parecido estructural de estos péptidos con la defensina nasonin-1, además de la presencia de residuos de cisteína conservados, son indicios de que posiblemente estos péptidos tengan propiedades antimicrobianas similares a los mostrados por esta defensina. Estudios han demostrado que nasonin-1, es un AMP que muestra actividad bactericida contra dos especies de bacterias gramnegativas con concentraciones letales de 1.52 μM para *Stenotrophomonas sp.* LZ-1 y de 15,4 μM para *Escherichia coli* ATCC 25922 (Tian et al., 2010).

Los modelos a partir de defensinas descritas en plantas, específicamente en las especies *Pisum sativum* (Psd1) y *Solanum lycopersicum* (TPP3), mostraron lo siguiente: Todos los péptidos mostraron una estructura con un plegamiento CS $\alpha\beta$ (Fig. 4) y valores para los estimadores GMQE y QMEANDisCo que indican similitud estructural entre el péptido modelado y la estructura nativa. Para el péptido 5P se obtuvo el valor más favorable para el análisis de Ramachandran, con 96.55%, siendo de esta forma el modelo que más se acercó al valor ideal para su validación. En cuanto a la similitud en la secuencia, a diferencia de las defensinas descritas en plantas las cuales presentan 8 residuos de cisteínas que estabilizan la estructura CS $\alpha\beta$, los péptidos modelados a partir de estas defensinas mostraron de 5 a 6 residuos; sin embargo, se observa la alineación de algunos de estos

residuos dentro de las estructuras hélice α y de hoja β (Fig. 5), los cuales podrían estar involucrados en el establecimiento de enlaces disulfuro. Otra diferencia a nivel de estructural con las defensinas utilizadas como modelo es la presencia de tres cadenas beta antiparalelas típicas en defensinas de plantas (Kovaleva et al., 2020); ya que las estructuras peptídicas obtenidas en los cnidarios solo mostraron dos hojas beta antiparalelas. A pesar de que los péptidos modelados a través de defensinas de plantas no mostraron el número típico de residuos de cisteína conservadas, los análisis de Ramachandran y los indicadores GMQE y QMEANDisCo muestran valores aproximados a los ideales, que permite predecir la posible estructura secundaria de estos péptidos.

Las defensinas con la estructura CS $\alpha\beta$ se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes especies de insectos y muestran actividad principalmente contra bacterias Grampositivas (Manniello et al., 2005); tal es el caso del AMP Sapecina descrito en *Sarcophaga peregrina*, el cual tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria Grampositiva *Staphylococcus aureus*, a través de la permeabilización de la membrana plasmática (Takeuchi et al., 2004). En el caso de las plantas se ha registrado que defensinas con este plegamiento son activas contra especies fúngicas como *Fusarium Oxysporum*, *Fusarium Graminearum* y *Botrytis Cinerea* (Kovaleva et al., 2020). Este tipo de estructura también está presente en péptidos inhibidores de serina proteasa, inhibidores de amilasa y en las toxinas del escorpión, lo cual sugiere que el motivo CS $\alpha\beta$ ha surgido durante la evolución como una estructura polivalente que se ha utilizado en péptidos con diferentes funciones (Dimarcq et al., 1998).

Todos los péptidos modelados a partir de la defensina Aurelin mostraron un dominio de 6 cisteínas y una estructura compuesta por regiones α hélice (Fig. 4). El péptido 12A descrito en *Cassiopea xamachana* fue el que mostro mayor similitud estructural con el AMP Aurelin. Se ha determinado que Aurelin es un AMP con características de defensina, ya que presenta una estructura secundaria compuesta por dos regiones hélice α entrecruzadas por tres enlaces disulfuro, formados a partir de 6 residuos de cisteína ((Ovchinnikova et al., 2006). Este péptido antimicrobiano ha mostrado actividad contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas como *Listeria monocytogenes*, con concentración mínima inhibitoria (MIC) de 22.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}$ y *Escherichia coli* con MIC de 7.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}$ (Ovchinnikova et al., 2006). Cabe resaltar que los todos los péptidos de cnidarios obtenidos a partir del AMP Aurelin, mostraron potencial de acción contra 3 especies microbianas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 5), lo cual aumenta el perfilamiento de estos péptidos como posibles agentes bactericidas, y además evidencia que AMP pertenecientes a la familia de las defensinas podrían estar ampliamente distribuidos en este filo.

10.2. Propiedades fisicoquímicas

Se determinaron características fisicoquímicas como momento hidrofóbico, hidrofobicidad, carga neta, índice de anfifilia y punto isoeléctrico para todos los péptidos modelados estructuralmente en diferentes especies de Cnidaria. Estas propiedades son específicas en los AMP y son fundamentales para sus mecanismos de acción. En cuanto a la carga neta, todos los péptidos mostraron una carga positiva (Tabla 4). Se ha determinado que la unión inicial del AMP con las membranas bacterianas y fúngicas, se basa en la interacción electrostática entre la carga catiónica de los péptidos y diferentes componentes de la membrana celular del patógeno cargados negativamente (Smith et al., 2010).

También, se ha informado que la variación en la carga de los péptidos muestra una correlación con la actividad antimicrobiana (Kumar et al., 2018). Esto se evidencio en un estudio realizado al AMP magainin II, donde el aumento de la carga de +3 a +5 mejoro la actividad y la selectividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, además de una actividad hemolítica reducida; así mismo, una carga mayor a +5 condujo a un aumento de la actividad hemolítica y perdida de actividad antimicrobiana (Dathe et al., 2001). En esta investigación los péptidos 6S, 7S, 8A y 9A presentaron cargas que oscilaron entre +3 y +5, indicando mayor selectividad y actividad antimicrobiana. La hidrofobicidad normalizada (Hidrofobicidad general del péptido) mostro valores por encima de cero en todos los péptidos (Tabla 4). Esta escala representa la energía libre de transferencia de los aminoácidos desde el agua hacia la interface de una bicapa lipídica (Wimley & White, 1998), lo cual implica la interacción de la parte hidrofóbica de los péptidos con las partes hidrofóbicas de la membrana. Se ha planteado que el aumento de la hidrofobicidad del péptido favorece su inserción en la membrana; sin embargo, niveles excesivos de hidrofobicidad pueden provocar perdida de selectividad microbiana (Chen et al., 2007). Para esta propiedad se obtuvieron valores que oscilaron entre 0.13 y 0.85, los cuales podrían ser óptimos para una buena actividad antimicrobiana. Para el momento hidrofóbico también se obtuvieron valores favorables, esta propiedad se refiere a la hidrofobicidad del péptido en la aproximación de hélice α (Pirtskhalava et al., 2020), y es un indicativo de la formación de una estructura hélice α anfipática (Vélez et al., 2021). De igual forma, para el índice de anfifilia se obtuvieron valores positivos, esta característica es común en todos los péptidos con regiones hélice α , ya que permite la formación de dos caras, la cara polar y no polar que facilitan la interacción con la membrana bacteriana (Kumar et al., 2018). Los valores obtenidos para estas características fisicoquímicas y la estructura de los péptidos obtenidos, reflejan capacidad de contacto y adherencia a la membrana celular de bacterias, proceso que es crucial en los mecanismos de acción de los AMP. Otra propiedad que se evaluó fue el punto isoeléctrico, esto con el fin de medir el comportamiento de estos péptidos en pH fisiológico, ya que esta medida permite inferir el pH al que una molécula tiene carga cero, con lo cual valores entre 8 y 9 garantizan el carácter catiónico en condiciones de pH fisiológico (Kumar et al., 2018). En esta investigación se obtuvieron 7 péptidos con valores que oscilaron en este rango (Tabla 4).

10.3. Predicción de actividad contra especies microbianas específicas

Se analizó el potencial de acción contra especies microbianas específicas en las 51 secuencias obtenidas en Cnidaria que mostraron similitud con defensinas descritas en diferentes organismos. En total, 20 péptidos obtenidos a partir de las defensinas Aurelin y la β -defensin 7 (mBD-7) mostraron potencial de acción contra las bacterias Gramnegativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 5). En su mayoría, los péptidos mostraron potencial bactericida contra la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, microorganismo de interés farmacéutico causante de una amplia gama de infecciones, incluidas neumonías, infecciones del trato urinario, bacteriemias y abscesos hepáticos (Paczosa & Meccas, 2016). De igual forma, un número importante de péptidos mostro potencial de acción contra la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, la cual es responsable de un alto número de infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Zarza et al., 2018). Solo un péptido mostro potencial de acción contra *Escherichia coli*, microorganismo que se considera de la flora normal; sin embargo, hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño

produciendo diferentes cuadros clínicos (Rodríguez, 2002). Estos microorganismos son oportunistas y están relacionados con infecciones nosocomiales, con una característica en común, su alta resistencia a los antibióticos, circunstancia que resulta preocupante debido al aumento de infecciones graves causadas por estos patógeno (Rodríguez, 2002; Zarza et al., 2018; Paczosa & Mecsas, 2016). Aunado a su potencial bactericida contra bacterias multirresistentes, estos péptidos mostraron inactividad contra eritrocitos humanos, propiedad que aumenta su valor para la realización de estudios de bioprospección. Otro tipo de péptidos hallados en Cnidaria han mostrado estas características mediante pruebas *in vitro*; por ejemplo, el AMP Arminin 1a descrito en *Hydra magnipapillata* exhibe actividad potente contra la bacteria multirresistente *Staphylococcus aureus* sin afectar las membranas de los eritrocitos humanos (Augustin et al., 2009). Así mismos péptidos sintéticos predichos del transcriptoma de *Hydractinia symbiolongicarpus* mostraron actividad contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacter aerogenes*, sin producir efectos hemolíticos sobre células animales (Martínez et al., 2019).

Las secuencias péptidas obtenidas en Cnidaria a partir del AMP β -defensin 7 (mBD-7) no mostraron homología estructural, ya que solo presentaron dos residuos de cisteína en su secuencia, aunque su potencial de acción los perfila como posibles AMP. Por otro lado, todos los péptidos obtenidos a partir del AMP Aurelin mostraron los 6 residuos típicos de cisteína presentes en las defensinas de mamíferos e insectos, además, 5 de los 11 péptidos con potencial de acción mostraron homología estructural, lo cual permitió predecir su estructura.

10.4. Análisis de relaciones filogenéticas

Los análisis filogenéticos realizados entre los potenciales AMP encontrados en Cnidaria y diferentes defensinas indican una relación estrecha con diferentes defensinas. Se puede observar que el péptido descrito en *Nematostella vectensis*, el cual mostro potencial de acción contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, está estrechamente relacionados con el AMP Neutrophil descrito en *Homo sapiens*, al cual se le ha determinado potencial bactericida contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Xie et al., 2022). La ancestría común entre estos dos péptidos, los seis residuos de cisteína conservados y la similitud funcional, podría ser indicio de homología entre estas dos proteínas. El árbol filogenético también muestra que las defensinas Aurelin y Nuetrophil comparten un ancestro común cercano con diferentes péptidos descritos en especies de cnidarios; además, muchas de las secuencias halladas comparten una alta similitud, lo cual indica que la diversificación de estos péptidos posiblemente se debe a eventos de duplicación de genes. La defensina nasonin-1 no mostro una relación filogenética estrecha con los péptidos descritos en cnidaria. Los péptidos modelados a partir de esta defensina (1N, 2N, 3N) se agruparon en nodos distantes, lo cual podría indicar un caso de evolución convergente. También se encontró una relación filogenética estrecha entre las defensinas Psd1 y TPP3 con los péptidos caracterizados estructuralmente en *Montipora cactus* y *Montipora efflorescens*. A pesar de que estos péptidos no presentan los 8 residuos de cisteínas típicos en defensinas de plantas, mostraron un plegamiento típico CS $\alpha\beta$, además de propiedades fisicoquímicas que los perfila como AMP. Por último, los péptidos predichos a partir de la defensina mBD-7 (Tabla 5) se encuentran agrupados con este AMP,

sin compartir un ancestro común próximo, lo cual puede deberse a la ausencia de los 6 residuos típicos de cisteínas presentes en defensinas de mamíferos.

Los resultados evidencian que Cnidaria presenta AMP con características estructurales y fisicoquímicas similares a las defensinas presentes en insectos, mamíferos y plantas, indicando que este tipo de AMP se encuentran ampliamente distribuidos en este filo. Además, es posible que estos péptidos hayan experimentado cambios a través de la historia evolutiva que implicaron modificaciones en sus dominios de cisteínas produciendo la aparición de nuevos genes con propiedades antimicrobianas.

En la Fig. 9 se resumen los hallazgos realizados en esta investigación. Se obtuvieron péptidos con características de defensinas en diferentes especies de cnidarios con propiedades fisicoquímicas y estructurales deseables en péptidos antimicrobianos. Veinte de estos péptidos mostraron potencial de acción contra diferentes bacterias patógenas multirresistentes de interés farmacéutico, e inactividad contra eritrocitos humanos, lo cual los perfila como buenos candidatos para aplicaciones terapéuticas. Estos péptidos con posibles propiedades antibióticas también pueden ser usados para tratamientos de intervención en corales que enfrentan amenazas de carácter infeccioso, como la enfermedad de la banda blanca que afecta a los corales acroporidos constructores de arrecifes (Aronson & Precht, 2001). Este tipo de método fue probado en la especie *Montastraea cavernosa*, donde se utilizaron diferentes antibióticos para tratar corales enfermos (Shilling et al., 2021). Los resultados mostraron que la Base 2B más amoxicilina tuvo una tasa de éxito del 95 % en la curación de las lesiones individuales causadas por la enfermedad (Shilling et al., 2021). Es posible que el tratamiento de enfermedades en corales con AMPs obtenidos de diferentes cnidarios muestre mayor eficiencia, ya que se evitarían problemas de citotoxicidad.

Dada la importancia de los resultados obtenidos, es pertinente realizar futuras investigaciones mediante ensayos *in vitro* que permitan validarlos. En este sentido, se evidencia que la metodología aquí propuesta es eficaz para la caracterización *in silico* de péptidos antimicrobianos con fines terapéuticos. Por otra parte, los análisis filogenéticos indican que las defensinas muy probablemente son una familia primitiva de AMPs que se han conservado a lo largo de la evolución, lo cual perfila a estas moléculas como candidatos importantes para estudios sobre la evolución inmune innata.

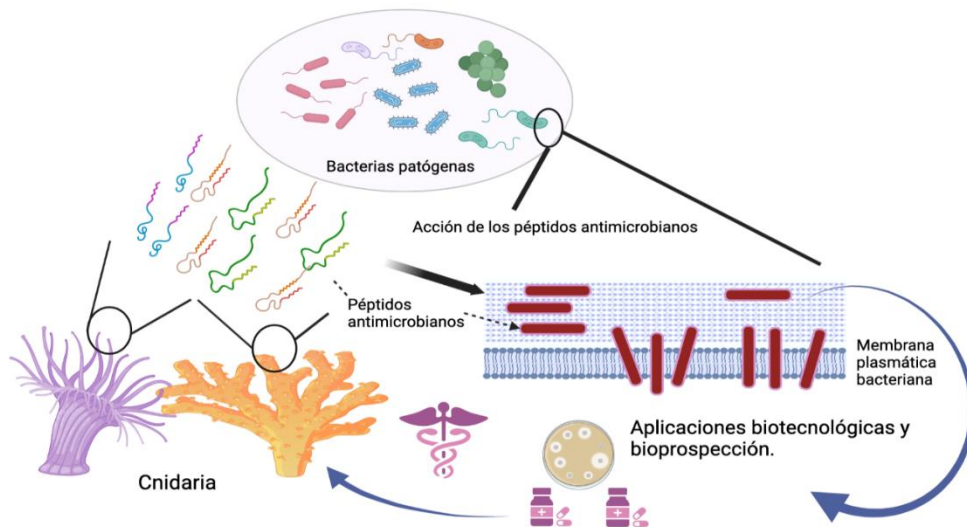


Figura 9: Graphical Abstract. Se obtuvieron péptidos con características de defensinas en diferentes especies de cnidarios, con propiedades fisicoquímicas y estructurales deseables en AMPs. Diferentes péptidos mostraron potencial de acción contra bacterias multirresistentes, lo cual los perfila como buenos candidatos para estudios de bioprospección.

11. Conclusiones

Uno de los principales mecanismos efectores de la inmunidad innata son los AMP. En esta investigación se pudo evidenciar que diferentes especies de cnidarios presentan potenciales AMP con características estructurales de defensinas descritas en insectos, plantas y mamíferos.

Los análisis filogenéticos reflejan una relación estrecha entre la defensina Nuetrophil, descrita en *Homo sapiens*, con diferentes péptidos encontrados en Cnidaria, esto podría indicar que las defensinas son una familia de AMP con un alto grado de conservación a través de la historia evolutiva.

Un número importante de péptidos hallados en Cnidaria mostraron potencial de acción contra bacterias patógenas multirresistentes, además de características fisicoquímicas, que permite perfilarlos como plantillas prometedoras para el hallazgo de nuevos antibióticos.

12. Referencias

- Allemand, D., Furla, P., & Bénazet-Tambutté S. (1998). Mechanisms of carbon acquisition for endosymbiont photosynthesis in Anthozoa. *Journal of Botany*, 76, 925-941.
- Arenas Gómez, C. M., Sabin, K. Z., & Echeverri, K. (2020). Wound healing across the animal kingdom: Crosstalk between the immune system and the extracellular matrix. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 249(7), 834–846. <https://doi.org/10.1002/dvdy.178>
- Aronson, R. B., & Precht, W. F. (2001). White-band disease and the changing face of Caribbean coral reefs. In *The ecology and etiology of newly emerging marine diseases* (pp. 25-38). Springer, Dordrecht.
- Arruda, G., Vigerelli, H., Bufalo, M. C., Longato, G. B., Veloso, R. V., Zambelli, V. O., Picolo, G., Cury, Y., Morandini, A. C., Marques, A. C., & Sciani J. M. (2021). Box Jellyfish (Cnidaria, Cubozoa) Extract Increases Neuron's Connection: A Possible Neuroprotector Effect. *BioMed research international*, 2021, 8855248. <https://doi.org/10.1155/2021/885524>
- Ashton-Rickardt, P. G. (2013). An emerging role for Serine Protease Inhibitors in T lymphocyte immunity and beyond. *Immunology letters*, 152(1), 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.04.004>
- Augustin, R., Anton-Erxleben, F., Jungnickel, S., Hemmrich, G., Spudy, B., Podschun, R., & Bosch, T. C. (2009). Activity of the novel peptide arminin against multiresistant human pathogens shows the considerable potential of phylogenetically ancient organisms as drug sources. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(12), 5245–5250. <https://doi.org/10.1128/AAC.00826-09>
- Augustin, R., Fraune, S., & Bosch, T. C. (2010). How Hydra senses and destroys microbes. *Seminars in immunology*, 22(1), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.11.002>
- Alvarez-Filip, L., Estrada-Saldívar, N., Pérez-Cervantes, E., Molina-Hernández, A., and González-Barrios, F. J. (2019). A rapid spread of the stony coral tissue loss disease outbreak in the Mexican Caribbean. *PeerJ* 7:e8069. doi: 10.7717/peerj.8069
- Bauer, F., Schweimer, K., Klüver, E., Conejo-Garcia, J. R., Forssmann, W. G., Rösch, P., Adermann, K., & Sticht, H. (2001). Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 10(12), 2470–2479. <https://doi.org/10.1110/ps.24401>
- Bechinger, B., & Gorr, S. U. (2017). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of dental research*, 96(3), 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- Beisel, H. G., Kawabata, S., Iwanaga, S., Huber, R., & Bode, W. (1999). Tachylectin-2: crystal structure of a specific GlcNAc/GalNAc-binding lectin involved in the innate immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. *The EMBO journal*, 18(9), 2313–2322. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.9.2313>

- Boman, H. G., Agerberth, B., & Boman, A. (1993). Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and immunity*, 61(7), 2978–2984. <https://doi.org/10.1128/iai.61.7.2978-2984.1993>
- Bosch, T. C., Augustin, R., Anton-Erxleben, F., et al. (2009). Uncovering the evolutionary history of innate immunity: the simple metazoan *Hydra* uses epithelial cells for host defence. *Developmental and comparative immunology*, 33(4), 559–569. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.10.004>
- Braffman, N. R., Piscotta, F. J., Hauver, J., Campbell, E. A., Link, A. J., & Darst, S. A. (2019). Structural mechanism of transcription inhibition by lasso peptides microcin J25 and capistrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(4), 1273–1278.
- Brennan, J. J., Messerschmidt, J. L., Williams, L. M., Matthews, B. J., Reynoso, M., & Gilmore T. D. (2017). Sea anemone model has a single Toll-like receptor that can function in pathogen detection, NF- κ B signal transduction, and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (47). <https://doi.org/10.1073/pnas.1711530114>
- Buchmann, K. (2014). Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Frontiers in immunology*, 5, 459. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00459>
- Burge, C. A, Mouchka, M. E., Harvell C. D., & Roberts, S. (2013). Immune response of the Caribbean sea fan, *Gorgonia ventalina*, exposed to an *Aplanochytrium* parasite as revealed by transcriptome sequencing. *Frontiers in physiology*, 4, 180. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00180>
- Cadavid, L. F. (2016). Resolución de conflictos al interior del organismo: el papel del sistema inmune. *Acta Biológica Colombiana*, 21(1Supl), 287–295. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n1Supl.50973>
- Cardoso, M. H., Meneguetti, B. T., Costa, B. O., Buccini, D. F., Oshiro, K., Preza, S., Carvalho, C., Migliolo, L., & Franco, O. L. (2019). Non-Lytic Antibacterial Peptides That Translocate Through Bacterial Membranes to Act on Intracellular Targets. *International journal of molecular sciences*, 20(19), 4877. <https://doi.org/10.3390/ijms20194877>
- Cerenius, L., Kawabata, S., Lee, B. L., Nonaka, M., & Söderhäll, K. (2010). Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends in biochemical sciences*, 35(10), 575–583. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.006>
- Chen, X., Hirt, H., Li, Y., Gorr, S. U., & Aparicio, C. (2014). Antimicrobial GL13K peptide coatings killed and ruptured the wall of *Streptococcus gordonii* and prevented formation and growth of biofilms. *PloS one*, 9(11), e111579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111579>
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., & Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS letters*, 501(2-3), 146–150. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02648-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02648-5)
- Davy, S. K., Allemand, D., & Weis V. M. (2012). Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 76(2), 229–261. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05014-11>

- Detournay, O., Schnitzler C. E., Poole, A., & Weis V. M. (2012). Regulation of cnidarian-dinoflagellate mutualisms: Evidence that activation of a host TGF β innate immune pathway promotes tolerance of the symbiont. *Developmental and comparative immunology*, 38(4), 525–537. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.08.008>
- Dimarcq, J. L., Bulet, P., Hetru, C., & Hoffmann, J. (1998). Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers*, 47(6), 465–477. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1998\)47:6<465::AID-BIP5>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<465::AID-BIP5>3.0.CO;2-#)
- Dishaw, L. J., Smith, S.L., & Bigger, C.H. (2005). Characterization of a C3-like cDNA in a coral: phylogenetic implications. *Immunogenetics*, 57(7), 535–548. <https://doi.org/10.1007/s00251-005-0005-1>
- Dixit, E., & Kagan J. C. (2013). Intracellular pathogen detection by RIG-I-like receptors. *Advances in immunology*, 117, 99–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410524-9.00004-9>
- Dong, H., Lv, Y., Zhao, D., Barrow, P., & Zhou, X. (2016). Defensins: The Case for Their Use against Mycobacterial Infections. *Journal of immunology research*, 2016, 7515687. <https://doi.org/10.1155/2016/7515687>
- Dunn, S. R. (2009). Immunorecognition and immunoreceptors in the Cnidaria. *Invertebrate Survival Journal* 6 (1) 7-14.
- Emery, M. A., Dimos, B. A., & Mydlarz, L. D. (2021). Cnidarian Pattern Recognition Receptor Repertoires Reflect Both Phylogeny and Life History Traits. *Frontiers in immunology*, 12, 689463. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.689463>
- Endo, Y., Nonaka, M., Saiga, H., Kakinuma, Y., Matsushita, A., Takahashi, M., Matsushita, M., & Fujita, T. (2003). Origin of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and MASP-3 involved in the lectin complement pathway traced back to the invertebrate, amphioxus. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(9), 4701–4707. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4701>
- Endo, Y., Takahashi, M., & Fujita, T. (2006). Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*, 211(4), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.01.003>
- Esposito, R., D'Aniello, S., Squarzone, P., Pezzotti, M. R., Ristoratore, F., y Spagnuolo, A. (2012). Nuevos conocimientos sobre la evolución de la familia de genes metazoos tirosinasa. *PloS uno*, 7 (4), e35731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035731>
- Estrada-Saldívar, N., Molina-Hernández, A., Pérez-Cervantes, E., Medellín-Maldonado, F., González-Barríos, F. J., and Alvarez-Filip, L. (2020). Reef-scale impacts of the stony coral tissue loss disease outbreak. *Coral Reefs* 39, 861–866. doi: 10.1007/s00338-020-01949-z
- Fan, J., Zhuang, Y., & Li, B. (2013). Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish umbrella on histological and immunity changes of mice photoaging. *Nutrients*, 5(1), 223–233. <https://doi.org/10.3390/nu5010223>
- Franzenburg, S., Walter, J., Künzel, S., Wang, J., Baines, J. F., Bosch T. C., & Fraune, S. (2013). Distinct antimicrobial peptide expression determines host species-specific bacterial associations.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(39), E3730–E3738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304960110>

Fraune, S., Augustin, R., Anton-Erxleben, F., et al. (2010). In an early branching metazoan, bacterial colonization of the embryo is controlled by maternal antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (42). <http://www.pnas.org/content/107/42/18067>

Fujito, N. T., Sugimoto, S., & Nonaka M. (2010). Evolution of thioester-containing proteins revealed by cloning and characterization of their genes from a cnidarian sea anemone, *Haliplanella lineate*. *Developmental and comparative immunology*, 34(7), 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.02.011>

Galeano, E., Gomez, D.I., Navas, R. Alonso, D., Zarza- González, E., Cano-Correa, M., Ward Bolivar, V., Posada-Osorio, L.S., Bolaños, N., Payan, L.F., Aponte, C. (2016). Reporte del estado de los arrecifes coralinos y pastos marinos en Colombia (2014-2015). Proyecto COL75241, PIMS # 3997, Diseño e implementación de un Subsistema Nacional de Áreas Marinas Protegidas (SAMP) en Colombia. Invemar, MADS, GEF y PNUD. Serie de publicaciones Generales del Invemar # 86, Santa Marta. 44 p.

Gasca, Rebeca., & Loman-Ramos, Lucio. (2014). Biodiversidad de Medusozoa (Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85(Supl. ene), S154-S163. <https://doi.org/10.7550/rmb.32513>

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research*, 31(13), 3784–3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>

GCRMN. (2020). El sexto estado de los corales del mundo: Informe 2020. <https://gcrmn.net/2020-report/>

Genzano, G., y Schiariti, A. (2016). CNIDARIA . Calcagno J (Ed). *Los Invertebrados Marinos* (pp.67 - 85). Vazquez Mazzini Editores.

Gil Agudelo, D. L., Navas Camacho, R., Rodríguez Ramírez, A., Reyes Nivia, M. C., Bejarano, S., Garzón Ferreira, J., & Smith, G. W. (2016). ENFERMEDADES CORALINAS Y SU INVESTIGACIÓN EN LOS ARRECIFES COLOMBIANOS. *Boletín De Investigaciones Marinas Y Costeras*, 38(2). <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2009.38.2.178>

Gladkikh, I., Monastyrnaya, M., Leychenko, E., Zelepuga, E., Chausova, V., Isaeva, M., Anastyuk, S., Andreev, Y., Peigneur, S., Tytgat, J., & Kozlovkaya, E. (2012). Atypical reactive center Kunitz-type inhibitor from the sea anemone *Heteractis crispa*. *Marine drugs*, 10(7), 1545–1565. <https://doi.org/10.3390/md10071545>

González, Y., Gil, D., Alonso del Rivero, M., Pascual, I., et al. (2013). Inhibidores de serino proteasas de naturaleza proteica aislados de invertebrados marinos / Proteic serine-proteases inhibitor isolated from marine invertebrates. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 2(1), 5-13. Recuperado de <http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/view/14>

- Hamada, M., Shoguchi, E., Shinzato, C., Kawashima, T., Miller, D. J., & Satoh, N. (2013). The complex NOD-like receptor repertoire of the coral *Acropora digitifera* includes novel domain combinations. *Molecular biology and evolution*, 30(1), 167–176.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mss213>
- Hasper, H. E., Kramer, N. E., Smith, J. L., Hillman, J. D., Zachariah, C., Kuipers, O. P., de Kruijff, B., & Breukink, E. (2006). An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793), 1636–1637.
<https://doi.org/10.1126/science.1129818>
- Hassan, H. M., Khanfar, M. A., Elnagar, A. Y., Mohammed, R., Shaala, L. A., Youssef, D. T., Hifnawy, M. S., & El Sayed, K. A. (2010). Pachycladins A-E, prostate cancer invasion and migration inhibitory Eunicellin-based diterpenoids from the red sea soft coral *Cladiella pachyclados*. *Journal of natural products*, 73(5), 848–853. <https://doi.org/10.1021/np900787p>
- Hawkridge, J., Pipe, R., & Brown, B. (2000). Localisation of antioxidant enzymes in the cnidarians *Anemonia viridis* and *Goniopora stokesi*. *Marine Biology*, 137, 1-9.
- Hayes, M. L., Eytan, R. I., & Hellberg, M. E. (2010). High amino acid diversity and positive selection at a putative coral immunity gene (tachylectin-2). *BMC evolutionary biology*, 10, 150.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-150>
- He, S. W., Zhang, J., Li, N. Q., Zhou, S., Yue, B., & Zhang, M. (2017). A TFPI-1 peptide that induces degradation of bacterial nucleic acids, and inhibits bacterial and viral infection in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Fish & shellfish immunology*, 60, 466–473.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.029>
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., & Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418), 1313–1318.
<https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1313>
- Hsieh, Y. H. P. (2005). inventor Use of jellyfish Collagen (type II) in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. U.S. Patent No. 6,894,029. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in microbiology*, 11, 582779.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Jatkar, A. A., Brown, B. E., Bythell, J. C., Guppy, R., Morris, N. J., & Pearson, J. P. (2010). Coral mucus: the properties of its constituent mucins. *Biomacromolecules*, 11(4), 883–888.
<https://doi.org/10.1021/bm9012106>
- Jensen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 491–511. <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jouiaei, M., Casewell, N. R., Yanagihara, A. A., Nouwens, A., Cribb, B. W., Whitehead, D., Jackson, T. N., Ali, S. A., Wagstaff, S. C., Koludarov, I., Alewood, P., Hansen, J., & Fry, B. G. (2015). 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>

- Kolkenbroc, H., & Tschesche, H. (1987). A new inhibitor of elastase from the sea anemone (*Anemonia sulcata*). *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 368(2), 93–99. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1987.368.1.93>
- Kovaleva, V., Bukhteeva, I., Kit, O. Y., & Nesmelova, I. V. (2020). Plant Defensins from a Structural Perspective. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5307. <https://doi.org/10.3390/ijms21155307>
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547–1549.
- Kvennefors EC, Leggat W, Hoegh-Guldberg O, Degnan, BM, & Barnes AC. 2008. An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. *Developmental and comparative immunology*, 32(12), 1582–1592. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.05.010>
- Kvennefors, E. C., Leggat, W., Hoegh-Guldberg, O., Degnan, B. M., & Barnes, A. C. (2008). An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. *Developmental and comparative immunology*, 32(12), 1582–1592. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.05.010>
- Lantz, M. S. (1997). Are bacterial proteases important virulence factors?. *Journal of periodontal research*, 32(1 Pt 2), 126–132. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1997.tb01393.x>
- Lazcano-Pérez, F., Castro, H., Arenas, I., García, D. E., González-Muñoz, R., & Arreguín-Espinosa R. (2016). Activity of *Palythoa caribaeorum* Venom on Voltage-Gated Ion Channels in Mammalian Superior Cervical Ganglion Neurons. *Toxins*, 8(5), 135. <https://doi.org/10.3390/toxins8050135>
- Leclère, L., & Röttinger, E. (2017). Diversity of Cnidarian Muscles: Function, Anatomy, Development and Regeneration. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 157. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00157>.
- Lee, T. H., Hall, K. N., & Aguilar, M. I. (2016). Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current topics in medicinal chemistry*, 16(1), 25–39. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>
- Leone, A., Lecci, R. M., Durante, M., Meli, F., & Piraino S. (2015). The Bright Side of Gelatinous Blooms: Nutraceutical Value and Antioxidant Properties of Three Mediterranean Jellyfish (Scyphozoa). *Marine drugs*, 13(8), 4654–4681. <https://doi.org/10.3390/md13084654>
- Lewies, A., Wentzel, J. F., Jacobs, G., & Du Plessis, L. H. (2015). The Potential Use of Natural and Structural Analogues of Antimicrobial Peptides in the Fight against Neglected Tropical Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(8), 15392–15433. <https://doi.org/10.3390/molecules200815392>

Lin, K., Wang, J., & Fang L. (2000). Participation of Glycoproteins on Zooxanthellal Cell Walls in the Establishment of a Symbiotic Relationship with the Sea Anemone, *Aiptasia Pulchella*. *Zoological Studies*, 39, 172-178.

Lin, W. Y., Lu, Y., Su, J. H., Wen, Z. H., Dai, C. F., Kuo, Y. H., & Sheu, J. H. (2011). Bioactive cembranoids from the dongsha atoll soft coral *Sarcophyton crassocaule*. *Marine drugs*, 9(6), 994–1006. <https://doi.org/10.3390/md9060994>

Liu, C. I., Chen, C. C., Chen, J. C., Su, J. H., Huang, H. H., Chen, J. Y., & Wu, Y. J. (2011). Proteomic analysis of anti-tumor effects of 11-dehydrosinulariolide on CAL-27 cells. *Marine drugs*, 9(7), 1254–1272. <https://doi.org/10.3390/md9071254>

Loo, Y. M., & Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*, 34(5), 680–692. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003>

Manniello, M. D., Moretta, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Lucchetti, D., Vogel, H., Sgambato, A., & Falabella, P. (2021). Insect antimicrobial peptides: potential weapons to counteract the antibiotic resistance. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 78(9), 4259–4282. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03784-z>

Mansfield, K. M., Carter, N. M., Nguyen, L., Cleves, P. A., Alshanbayeva, A., Williams, L. M., Crowder, C., Penvose, A. R., Finnerty, J. R., Weis, V. M., Siggers, T. W., & Gilmore, T. D. (2017). Transcription factor NF- κ B is modulated by symbiotic status in a sea anemone model of cnidarian bleaching. *Scientific reports*, 7(1), 16025. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16168-w>

Martínez, S. B., Cadavid, L. F., & Vives, M. (2019). Actividad bactericida de péptidos antimicrobianos sintetizados a partir del transcriptoma del cnidario *Hydractinia symbiolongicarpus*. Repositorio Universidad de los Andes. Recuperado el 06 de octubre de 2021, de <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/45807/u828114.pdf?sequence=1>

Merquiol, L., Romano, G., Ianora, A., & D'Ambra, I. (2019). Biotechnological Applications of Scyphomedusae. *Marine drugs*, 17(11), 604. <https://doi.org/10.3390/md17110604>

Miller, D. J., Hemmrich, G., Ball, E. E., Hayward, D. C., Khalturin, K., Funayama, N., Agata, K., & Bosch, T. C. (2007). The innate immune repertoire in cnidaria--ancestral complexity and stochastic gene loss. *Genome biology*, 8(4), R59. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-4-r59>

Mullen, K. M., Peters, E. C., Harvell, C. D. (2004). Coral Resistance to Disease. In: Rosenberg E., Loya Y. (eds) *Coral Health and Disease*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06414-6_22

Mydlarz, L. D., Fuess, L., Mann, W., Pinzón, J. H., & Gochfeld, D. J. (2016). Cnidarian Immunity: From Genomes to Phenomes. In: Goffredo S., Dubinsky Z. (eds) *The Cnidaria, Past, Present and Future*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_28

Mydlarz, L. D., Houthouse, S. F., Peters, E. C., & Harvell, C. D. (2008). Cellular responses in sea fan corals: granular amoebocytes react to pathogen and climate stressors. *PloS one*, 3(3), e1811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001811>

- Navarro Garcia, F., Sonnested, M., & Teter, K. (2010). Host-Toxin Interactions Involving EspC and Pet, Two Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae. *Toxins*, 2(5), 1134–1147. <https://doi.org/10.3390/toxins2051134>
- Neubauer, E. F., Poole, A. Z., Neubauer, P., Detournay, O., Tan, K., Davy, S. K., & Weis, V. M. (2017). A diverse host thrombospondin-type-1 repeat protein repertoire promotes symbiont colonization during establishment of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *eLife*, 6, e24494. <https://doi.org/10.7554/eLife.24494>
- O'Neill, L. A., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 13(6), 453–460. <https://doi.org/10.1038/nri3446>.
- Ortiz López, C. (2019). Diseño, síntesis, caracterización y evaluación in vitro de la actividad de los péptidos antimicrobianos contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos. *RACCEFYN*, 43(169), 614–627. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.864>
- Otero-González, A. J., Magalhães, B. S., Garcia-Villarino, M., López-Abarrategui, C., Sousa, D. A., Dias, S. C., & Franco O. L. (2010). Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(5), 1320–1334. <https://doi.org/10.1096/fj.09-143388>
- Ovchinnikova, T. V., Balandin, S. V., Aleshina, G. M., Tagaev, A. A., Leonova, Y. F., Krasnodembsky, E. D., Men'shenin, A. V., & Kokryakov, V. N. (2006). Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(2), 514–523. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.078>
- Ovchinnikova, T. V., Balandin, S. V., Aleshina, G. M., Tagaev, A. A., Leonova, Y. F., Krasnodembsky, E. D., Men'shenin, A. V., & Kokryakov, V. N. (2006). Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(2), 514–523. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.078>
- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
- Parisi, M. G., Parrinello, D., Stabili, L., & Cammarata, M. (2020). Cnidarian Immunity and the Repertoire of Defense Mechanisms in Anthozoans. *Biology*, 9(9), 283. <https://doi.org/10.3390/biology9090283>
- Patrzykat, A., Friedrich, C. L., Zhang, L., Mendoza, V., & Hancock, R. E. (2002). Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(3), 605–614. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.605-614.2002>
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, 36(2), 180-189.

- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pinzón, J. H., Kamel, B., Burge, C. A., Harvell, C. D., Medina, M., Weil, E., & Mydlarz, L. D. (2015). Whole transcriptome analysis reveals changes in expression of immune-related genes during and after bleaching in a reef-building coral. *Royal Society open science*, 2(4), 140214. <https://doi.org/10.1098/rsos.140214>
- Pirtskhalava, M., Armstrong, A. A., Grigolava, M., Chubinidze, M., Alimbarashvili, E., Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., & Tartakovsky, M. (2021). DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic acids research*, 49(D1), D288–D297. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>
- Rashid, R., Veleba, M., & Kline, K. A. (2016). Focal Targeting of the Bacterial Envelope by Antimicrobial Peptides. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 55. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00055>
- Rashid, R., Veleba, M., & Kline, K. A. (2016). Focal Targeting of the Bacterial Envelope by Antimicrobial Peptides. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 55. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00055>
- Raymundo, L., Couch, C., Bruckner, A., Harvell, D., Weil, E., Woodley, C., Work, T., Jordan-Dahlgren, E., Willis, B., Aeby, G. and Sato, Y. (2008). *Coral Disease Handbook: Guidelines for Assessment, Monitoring & Management*. Melbourne, Australia: Currie Communications.
- Rivas, S., Bruno, S., Hernández-Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*, 48(1), 62-71. Recuperado el 06 de octubre de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342006000100010&lng=es&tlng=es.
- Rivera Ortega Jacqueline. (2018). "Actividad antimicrobiana del mucus de cnidarios simbióticos". (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/161231>
- Roesel, C. L., & Vollmer, S. V. (2019). Differential gene expression analysis of symbiotic and aposymbiotic *Exaiptasia anemones* under immune challenge with *Vibrio coralliilyticus*. *Ecology and evolution*, 9(14), 8279–8293. <https://doi.org/10.1002/ece3.5403>
- Roy, R. N., Lomakin, I. B., Gagnon, M. G., & Steitz, T. A. (2015). The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin. *Nature structural & molecular biology*, 22(6), 466–469. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3031>
- Ruppert, E. E., & Barnes, R. D. (1996). *Zoología de los invertebrados* (No. QL 362. B3718 1996).
- Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell and tissue research*, 343(1), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>

- Satoh, D., Horii, A., Ochiai, M., & Ashida, M. (1999). Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *The Journal of biological chemistry*, 274(11), 7441–7453. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.7441>
- Schwarz, J. A., Brokstein, P. B., Voolstra, C., Terry, A. Y., Manohar, C. F., Miller, D. J., Szmant, A. M., Coffroth, M. A., & Medina, M. (2008). Coral life history and symbiosis: functional genomic resources for two reef building Caribbean corals, *Acropora palmata* and *Montastraea faveolata*. *BMC genomics*, 9, 97. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-97>
- Schwarz R. and Dayhoff M. (1979). Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff M., editor, *Atlas of protein sequences*, pages 353-58. National Biomedical Research Foundation.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*, 31(13), 3381–3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>
- Seneca, F., Davtian, D., Boyer, L., & Czerucka, D. (2020). Gene expression kinetics of *Exaiptasia pallida* innate immune response to *Vibrio parahaemolyticus* infection. *BMC genomics*, 21(1), 768. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07140-6>
- Shenkarev, Z. O., Panteleev, P. V., Balandin, S. V., Gizatullina, A. K., Altukhov, D. A., Finkina, E. I., Kokryakov, V. N., Arseniev, A. S., & Ovchinnikova, T. V. (2012). Recombinant expression and solution structure of antimicrobial peptide aurelin from jellyfish *Aurelia aurita*. *Biochemical and biophysical research communications*, 429(1-2), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.092>
- Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., Hamada, M., Hisata, K., Tanaka, M., Fujie, M., Fujiwara M., Koyanagi, R., Ikuta, T., Fujiyama, A., Miller, D. J., & Satoh, N. (2011). Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature*, 476(7360), 320–323. <https://doi.org/10.1038/nature10249>
- Shilling, E. N., Combs, I. R., & Voss, J. D. (2021). Assessing the effectiveness of two intervention methods for stony coral tissue loss disease on *Montastraea cavernosa*. *Scientific reports*, 11(1), 8566. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86926-4>
- Smith, V. J., Desbois, A. P., & Dyrinda, E. A. (2010). Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Marine drugs*, 8(4), 1213–1262. <https://doi.org/10.3390/md8041213>
- Stabili, L., Parisi, M. G., Parrinello, D., & 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>
- Stabili, L., Schirosi, R., Parisi, M. G., Piraino, S., & Cammarata, M. (2015). The Mucus of *Actinia equina* (Anthozoa, Cnidaria): An Unexplored Resource for Potential Applicative Purposes. *Marine drugs*, 13(8), 5276–5296. <https://doi.org/10.3390/md13085276>
- Sugahara, T., Ueno, M., Goto, Y., Shiraishi, R., Doi, M., Akiyama, K., & Yamauchi, S. (2006). Immunostimulation effect of jellyfish collagen. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(9), 2131–2137. <https://doi.org/10.1271/bbb.60076>

- Takeuchi, K., Takahashi, H., Sugai, M., Iwai, H., Kohno, T., Sekimizu, K., Natori, S., & Shimada, I. (2004). Channel-forming membrane permeabilization by an antibacterial protein, sapecin: determination of membrane-buried and oligomerization surfaces by NMR. *The Journal of biological chemistry*, 279(6), 4981–4987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307815200>
- Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in lipid research*, 51(2), 149–177. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in lipid research*, 51(2), 149–177. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Terrón, A., Peñalver, P., y León, D. (2018). Estudio de los cnidocistos del coral solitario *Leptopsammia pruvoti* (Lacaze-Duthiers 1897) (Scleractinia: Dendrophylliidae) para avanzar conocimiento del cnidoma como carácter taxonómico. *Chronica naturae*, 7: 18-26. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6339564>
- Tian, C., Gao, B., Fang, Q., Ye, G., & Zhu, S. (2010). Antimicrobial peptide-like genes in *Nasonia vitripennis*: a genomic perspective. *BMC genomics*, 11, 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-187>
- Tortorelli, G., Rautengarten, C., Bacic, A., Segal, G., Ebert, B., Davy, S. K., van Oppen, M., & McFadden, G. I. (2021). Cell surface carbohydrates of symbiotic dinoflagellates and their role in the establishment of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *The ISME journal*, 1–10. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01059-w>
- Tracy, A. M., Weil, E., & Burge, C. A. (2021). Ecological Factors Mediate Immunity and Parasitic Co-Infection in Sea Fan Octocorals. *Frontiers in immunology*, 11, 608066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608066>
- Upadhye, V., Majumdar, A., Gomashe, A., Joshi, D., Gangane, N., Thamke, D., Mendiratta, D., & Harinath, B. C. (2009). Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* secretory serine protease blocks bacterial multiplication both in axenic culture and in human macrophages. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 41(8), 569–576. <https://doi.org/10.1080/00365540903015109>
- Vélez, A., Mera, C., Orduz, S., & Branch, J. W. (2021). Synthetic antimicrobial peptides generation using recurrent neural networks. *Dyna*, 88(216), 210-219.
- Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Roger, E., Foure, L., Duval, D., Mone, Y., Ferrier-Pages, C., Tambutte, E., Tambutte, S., Zoccola, D., Allemand, D., & Mitta, G. (2009). Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms. *BMC physiology*, 9, 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-9-14>
- Vidal-Dupiol, J., Dheilly, N. M., Rondon, R., Grunau, C., Cosseau, C., Smith, K. M., Freitag, M., Adjeroud, M., & Mitta, G. (2014). Thermal stress triggers broad *Pocillopora damicornis*

transcriptomic remodeling, while *Vibrio coralliilyticus* infection induces a more targeted immunosuppression response. *PloS one*, 9(9), e107672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107672>

Vidal-Dupiol, J., Ladrière, O., Destoumieux-Garzón, D., Sautière, P. E., Meistertzheim, A. L., Tambutté, E., Tambutté, S., Duval, D., Fouré, L., Adjeroud, M., & Mitta, G. (2011). Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. *The Journal of biological chemistry*, 286(25), 22688–22698. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216358>

Weil, E., Smith, G., & Gil-Agudelo, D. L. (2006). Status and progress in coral reef disease research. *Diseases of aquatic organisms*, 69(1), 1–7. <https://doi.org/10.3354/dao069001>

Wenger, Y., Buzgariu, W., Reiter, S., & Galliot, B. (2014). Injury-induced immune responses in Hydra. *Seminars in immunology*, 26(4), 277–294. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.06.004>

White SH, Wimley WC. Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1376(3):339-52.

Wood-Charlson, E. M., & Weis, V. M. (2009). The diversity of C-type lectins in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*. *Developmental and comparative immunology*, 33(8), 881–889. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.01.008>

Wunderer, G., Béress, L., Machleidt, W., & Fritz, H. (1976). Broad-specificity inhibitors from sea anemones. *Methods in enzymology*, 45, 881–888. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(76\)45082-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(76)45082-6)

Xie, Q., Wang, Y., Zhang, M., Wu, S., Wei, W., Xiao, W., Wang, Y., Zhao, J., Liu, N., Jin, Y., Wu, J., & Xu, P. (2022). Recombinant HNP-1 Produced by *Escherichia coli* Triggers Bacterial Apoptosis and Exhibits Antibacterial Activity against Drug-Resistant Bacteria. *Microbiology spectrum*, 10(1), e0086021. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00860-21>

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo Y. M., Gale, M., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., & Fujita, T. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950), 175(5), 2851–2858. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2851>

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>

Zhang, Q. Y., Yan, Z. B., Meng, Y. M., Hong, X. Y., Shao, G., Ma, J. J., Cheng, X. R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C. Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>

Zhang, SK., Song, Jw., Gong, F. (2016). Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. *Sci Rep* 6, 27394 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep27394>

Zhuang, Y., Sun, L., Zhang, Y., & Liu, G. (2012). Antihypertensive effect of long-term oral administration of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) collagen peptides on renovascular hypertension. *Marine drugs*, 10(2), 417–426. <https://doi.org/10.3390/md10020417>

Zou, J., Chang, M., Nie, P., & Secombes, C. J. (2009). Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family. *BMC evolutionary biology*, 9, 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-85>

13. Datos suplementarios

En la siguiente Tabla se presentan todas las secuencias halladas en los proteomas de Cnidaria que presentaron una similitud superior del 25% con defensinas descritas en distintos organismos.

Tabla suplementaria 1

Secuencias peptídicas de cnidarios similares a defensinas

defensina	Organismo	código de acceso	Péptido cnidario	Organismo	código de acceso
defensin PHLDU	Phlebotomus duboscqi	sp P83404.3 /	SHPLDTLFDDEDMDLESDLEPGSDRELLGLFFPELASQPSRDSVAL CDICQTSVPVLSRHMRSCHPGCGGNC SRHGYR	Amplexidiscus fenestrafer	evm.model.scaffold_78 .23/
			PVEPEIEYLDTEDEPEIESTQKPPRELLQYANRALELNAEYSTSKRYM SQAVECLTQCQVMGLRQGYRDIICAAAR	Acropora yongei	ayon_s0007.g197.t1_
			SARATGESDVEVVDIDLDDSDFEPGADESELLGLFFPELASHSSRVST ARCDICQTDVQNLRSRHMRSHPGCGGNC SRHGYR	Montipora efflorescens	meff_s0226.g6.t1_
defensin ARD1	Archaeoprepona demophon	1OZZ*	GNCIDGINNYTDCDCQAGYIGQHCG	Fungia spp	ffun1.m4.8753.m1/
			GSCVDGVNNYSCNCVSVGYTG DHC	Pachyseris speciosa	pspe_0.1.m1.16392.m1 /
			SNCEQSKSRNGYRNGDCGYVAELNKW	Porites lutea	plut2.m8.36.m1/
Defensin PYRAP	Pyrrhocoris apterus	sp P37364.1 /	CDVFKRSIQEKWVTAKKGLCYRCLCDNHLGGECKLSRVCNIVGCR	Goniastrea aspera	gasp1.m3.26450.m1/
Royalisin	Pyrrhocoris apterus	sp P37364.1 /	PLGTYQDLEKHTNTSCVSPSKMSTKSGATNKSACISFCDSL CEGGECKEAGNRFVCMC	Nematostella vectensis	jgi_Nemve1_202195/
nasonin-1M	Nasonia vitripennis	2KOZ*	ILVIGLIFISLAVPSICQDPTPLGLICSPQCANGGSCVEGKIC	Actinia tenebrosa	XP_031552103.1*
			CETSKCSPDCMNGGRCVEGACQC	Aiptasia CC7	AIPCC7_1233.t1/
			CNVQPCPSVCPAGQNGGTCVNQKQCQCNQG	Fungia spp	ffun1.m4.1645.m1/
			CETSDCKPDCLNGGTCNNGTCEC	Galaxea fascicularis	gfas1.m1.303.m1/
			CNTQPCPSVCPAGHNGGTCVNAQCQCSQG	Goniastrea aspera	gasp1.m3.12137.m1/
			SCNVQPCPSVCPAGQNGGTCVNSKQCQSQ	Porites lutea	plut2.m8.894.m1/
Defensin Psd1	Pisum sativum	1JKZ*	TEACCDYHRCSAAMLIGNYCYNLICFKRGC	Amplexidiscus fenestrafer	evm.model.scaffold_14 6.21/
			CTPMPYLYEKKGITTECVQHCKEKRYSYAGFDHCEKCFCGDN	Galaxea fascicularis	gfas1.m1.17029.m1/
			KKCSMPSYLYEKDGLTRDECVQHCKDNRYPYAGFDNCRKCFCGDN	Goniastrea aspera	gasp1.m3.2313.m1/
			KKCSPLSYLYEKDGLTRDECVQHCKDNRYPYAGFDHCRKCFCGTN	Orbicella faveolata	XP_020616187.1/
Defensin Psd2	Pisum sativum	6NOM*	KACQNIILNFSIPFLPKNACRKNPCKNNATCQAGFTDRNYQCLCVD	Pocillopora damicornis	pdam_00000501-RA/
Defensin Hs-AFP1	Heuchera sanguinea	AAB34974.1/	PSGTWTNRPSVPCDDGNPCTHKDIDNGKCVGQQYSCQ SSYPSASCIKTSQC	Aiptasia CC7	AIPGENE21411/
			KTCENLADTFRGPCTFDGSCDDHCKNKEHLIKRRCRDFRCWCTRNC	Pachyrhizus erosus	AAT80338.1*
			KTCEVDSRPCASNPCFFNGNCTNKGSDFECKCPNDLSGKRCEHG FHC	Nematostella vectensis	jgi_Nemve1_20161_gw .67/
Defensin Lc	Lens culinari	2LJ7*	TCENLPDSYTCSCPEGSSGLNCEVKNHCQSSPCRNDGTC	Fungia spp	ffun1.m4.10929.m1/
Defensin RS-AFP1	Raphanus sativus	1AYJ*	PTISWSPCDEGNPFCNNQCLNISQVQSARANYVCTA	Acropora digitifera	adig_s0104.g8.t1_
Defensin_1	Dahlia merckii	sp POC8Y4.1 /	EACAKGEDISVVNLGPGCAGANLKRQHAHCEVKDGKAQCVC	Acropora florida	aflo_s0200.g58.t1_

Defensin TPP3	Solanum lycopersicum	4UJ0*	RLSCTDICQSVNYSVGRCSKFRQRCYCEKN	Montipora cactus	mcac_s0259.g27.t1_
			SCTDICQSVNYSVGRCSKFRQRCYCEKNAS	Montipora efflorescens	meff_s0541.g2.t1_
Aurelin	Aurelia aurita	2LG4*	PACYDRYPHTCKQFDDYCIKPGRNGRFIRYHCFNSCGRC	Nematostella vectensis	jgi_Nemve1_206031_fg enesh1_pg/
			PRCMDAYTRLCRLFTLPDFNYCSKPGKEGRFVRYNCFQSCGWC	Acropora millepora	XP_029192340.2*
			PFCKDRYPHACKQFGHRFWCLGKFPFRFFLSHYCFQCGFC	Actinia equina	evm.utg2858.31/
			CQDLFKEKCEQFASYEGYCGHWKRFMRKWCPCSKGFC	Discosoma sp	evm.model.scaffold_3. 183/
			PVCRDSYGRCLRLEFYCPKPGKYGQFVRYHCFKTCGWC	Orbicella faveolata	XP_020632384*
			PVCRDSYRRLCKLFGHLCSQKGTSGKFVRYHCFQTCGWC	Pocillopora damicornis	XP_027037007.1*
			PRCKDFYDRLCRLTEPDFNYCMRPGNKGKFIYRNCFKSCGWC	Porites lutea	plut2.m8.2713/
			ACADLRGKAFCHLFSYCHKKGIRGRLLRHKSYSYCG	Stylophora pistillata	Spis3445/
			PRCMDAYTRLCQLFTLPDFNYCSKPGKEGRFVRYNCFQSCGWC	Acropora awi	aawi_s0050.g103.t1_
			PRCMDAYTRLCRLFTLPDFDYCSKPGKEGRFVRYNCFQSCGWC	Acropora echinata	aech_s0011.g351.t1_
			CKDFSRLCRRFSAFCTRESKNGRVMRHYCKRTCEQ	Cassiopea xamachana	jgi Casxa1 20619 +
Defensin mBD-7	Mus musculus	1E4T*	SKRGCSEEINERLQYCLMVLHKLK	Hydra magnipapillata	Hma2.232062//
			TSQGCTSEMTERLRYCKRVMKKV	Astreopora myriophthalma	astr_s0028.g54.t1_
			NSQGCTTEMNERLRYCKRVLKVV	Galaxea fascicularis	gfas1.m1.15458.m1/
			SKRGCSEEISERLQYCLMVLHKLK	Hydra viridissima	scaffold199.g23.t1_
			SKRGCNEEITERLQYCKMVLQKL	Morbakka virulenta	scaffold530.g12.t1_
			NSQGCTTEMTERLRYCKRVLKVV	Pachyseris speciosa	pspe_0.1.m1.35861.m1 /
			QGCASELIERLRYCKRVLKVV	Pocillopora damicornis	pdam_00005914-RA/
			QGCTEEMIERLRYCKRVLNKV	Porites lutea	plut2.m8.15892.m1/
			NKQGCASELIERLRYCKRVLKVV	Stylophora pistillata	Spis7258:631-653/
Defensin beta 136	Homo sapiens	sp Q30KP8.1 /	YKQDEKDIKLCRIQDCKSPSPNCPDFDYLYLCHRVDVDFSCPQGTTFQ	Aiptasia CC7	AIPCC7_15485.t1/
			KCMFSPDDKKVSCSADKTVKVVWVSCEDGTEYVNFTHADIVRCC	Pocillopora damicornis	pdam_00004549-RA/
Beta defensin 11	Homo sapiens	sp Q30KQ9.1 /	ECRVNDGGCEFCNNTSEASYCMCRSGYLAADRHCC	Acropora selago	asel_s0072.g87.t1_

Nota: Los códigos de acceso de las defensinas con el símbolo / pertenecen a la base datos NCBI, * base de datos Protein Data Bank. Los códigos de acceso para las secuencias de cnidarios con el símbolo / pertenecen a la base datos REEFGENOMICS, * NCBI, _ OIST Marine Genomics Unit, // NHGRI y + CassiopeaBase.