

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales Escuela de Ciencias Biológicas

Informe Escrito Final


Evaluación de la actividad larvicida de la actinoporina nigrelisina (Ng) proveniente de la anemona de mar *Anthopleura nigrescens* sobre larvas de la familia Culicidae, clase Insecta, como un posible uso de control biológico de vectores de enfermedades

Trabajo Final de Graduación para optar al grado de Licenciatura en Biotecnología


B. Sc. Edwin David González Hernández

Campus Omar Dengo
Heredia, 2024

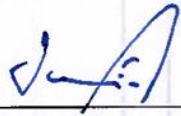
Este trabajo de graduación fue Aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.



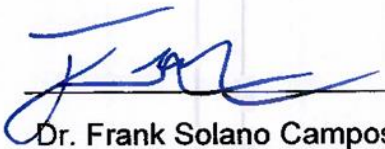
MBA & MPM. Jorengeth Abad Rodríguez Rodríguez
Representante, Decano, quién preside




Dra. Silvia Mau Incháustegui
Representante de la Dirección de la (ECB)



Dr. Javier Alvarado Mesén
Tutor



Dr. Frank Solano Campos
Asesor



Dr. Meyer Guevara Mora
Asesor

Dra. Martha Orozco Aceves
Invitada especial

Agradecimientos

Inicialmente quiero agradecer de forma sincera a la Universidad Nacional de Costa Rica por el financiamiento y apoyo brindado a este proyecto. En especial, a los laboratorios: Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Proteínas (LBBP) y al Laboratorio de Biotecnología de Plantas (LBP) por su valiosa colaboración.

Así como el reconocimiento al Dr. Javier Alvarado por su guía y recomendaciones durante todos los bioensayos y el uso de las proteínas, y al Dr. Frank Solano por su soporte a lo largo del proceso de producción de la proteína.

De igual manera quiero expresar mi sincero agradecimiento a Lic. Camila Conejo Arias del Laboratorio de Entomología en el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) por su valiosa contribución al proyecto mediante la donación de huevos de mosquitos *Aedes aegypti*.

Finalmente, agradezco a todas las personas que estuvieron presentes de diferentes formas a lo largo de la elaboración de esta tesis.

Dedicatoria

A mi madre Virgita por su apoyo incondicional y fuerza de empuje en todo momento, a mi padre Eduardo por ser un ejemplo de que con sacrificio y trabajo constante se logran grandes éxitos. Siendo ambos quienes generosamente y con mucho empeño me han dado las herramientas para poder costear mis estudios, donde me mostraron que la honradez es valentía y necesaria en toda la vida.

A mi hermano Joaquín por ser el mejor ejemplo que conozco de que con esfuerzo y trabajo duro aun cuando las condiciones o circunstancias están en contra no significa que no se puede, solo es un proceso que requiere un poco más de paciencia y una suma de coraje adicional. Quien me ha impulsado con el “rendirse no es opción”.

A mi hermana Vanessa y mi sobrino Andrés, que me han acompañado dándome un espacio en su rincón y que podamos compartirlo para pasar el mal rato.

A mi mejor amiga Karolina por estar siempre dispuesta a escuchar y ayudar, quien ha sido indispensable para continuar esforzándome, quien ha sido me ha impulsado para confiar en mí mismo.

A todas las personas que a lo largo de la etapa universitaria han estado presentes y me han brindado su apoyo en distintas áreas.

Índice

Miembros del Tribunal	II
Agradecimientos	III
Dedicatoria	IV
Índice.....	V
Índice de cuadros	VII
Índice de figuras	VIII
Índice de anexos.....	X
Abreviaturas o acrónimos	XI
Resumen.....	XIII
1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Justificación	5
1.3. Planteamiento del Problema	7
1.4. Objetivos.....	7
1.4.1. Objetivo General	7
1.4.2. Objetivos específicos	7
2. Marco teórico.....	8
2.1. Control biológico de vectores de enfermedades	8
2.1.1. Toxinología y ecotoxicología.....	8
2.1.2. Vectores de enfermedades: Culicidae (Díptera)	9
2.1.4. Distribución de mosquitos picadores	10
2.2. Proteínas formadoras de poros en membranas, Actinoporinas.....	11
2.2.1. Organismos productores de actinoporinas y su función básica.....	11
2.2.3. Producción de nigrelisina recombinante	13
2.2.4 Caracterización de la nigrelisina	13
3. Materiales y métodos.....	14
3.1. Objeto de estudio	14
3.2. Diseño de investigación y descripción de las variables.....	14

3.3.	Producción de la Ng recombinante.....	15
3.3.1.	Expresión proteica	15
3.3.2.	Purificación de la proteína	17
3.4.	Obtención de larvas de especímenes de la familia Culicidae	19
3.4.1.	Bioensayo de exposición de mosquitos culícidos ante Ng.....	19
3.5.	Comparación bioinformática entre nigrelisina y esticolisina I	21
3.5.1.	Alineamiento de secuencias de aminoácidos	21
3.5.2.	Superposición de proteínas	21
4.	Resultados.....	21
4.1.	Obtención de nigrelisina	21
4.1.1.	Producción y extracción.....	21
4.1.2.	Purificación	22
4.1.3.	Verificación de actividad hemolítica	24
4.2.	Bioensayos.....	25
4.2.1.	Establecimiento concentración mínima de proteína activa y letalidad contra larvas de mosquitos.....	25
4.2.2.	Bioensayos con nigrelisina.....	25
4.3.	Análisis bioinformático de proteínas Ng y StI.....	26
4.3.1.	Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas Ng y StI	26
4.3.2.	Superposición de estructuras de proteínas Ng y StI.....	27
5.	Discusión	27
5.1.	Expresión y purificación de Ng	27
5.2.	Actividad hemolítica.....	28
5.3.	Relación de actinoporinas y células.....	28
6.	Conclusiones.....	32
7.	Recomendaciones	33
8.	Fuentes de Financiamiento	34
9.	Conflictos de intereses.....	34
10.	Referencias bibliográficas	34
11.	Anexos	48

Índice de cuadros

Cuadro 1. Composición de soluciones y medios de cultivo	15
Cuadro 2. Valores de DO a 600 nm obtenidos para las células transformadas en medio de crecimiento (MDG) y medio de expresión (ZYB) y cantidad de agua agregada al pellet de bacteria para realizar la SDS-PAGE.	22

Índice de figuras

- Figura 1.** SDS-PAGE de evaluación de la expresión de nigrelisina. Carril: 1 Fracción cromatográfica activa de Ng; carril 2: Marcador de peso molecular; carril 3: proteínas del cultivo en medio de inducción ZYB; carril 4: proteínas del cultivo en medio de crecimiento MDG. Las flechas color rojo señalan las bandas de Ng.22
- Figura 2.** Perfil cromatográfico de la purificación de nigrelisina por intercambio catiónico. Perfil general de la purificación, donde la línea de color azul representa la absorbancia a 280 nm, y la línea de color rojo la fuerza iónica. El pico pequeño de la línea azul con tiempo de retención de 187.45 min corresponde a la elución de Ng.23
- Figura 3.** Ajuste de escala del perfil cromatográfico de la purificación de nigrelisina por intercambio catiónico. La línea de color azul indica la absorbancia a 280 nm y la línea color rojo indica el gradiente de fuerza iónica, se puede apreciar la elución de Ng a los 187.45 min contenida en las eluciones 9-22.23
- Figura 4.** SDS-PAGE de evaluación de la pureza de las fracciones de interés luego de la cromatografía por intercambio catiónico. Carril: 1 marcador de peso molecular; carril 2: mezcla de fracciones conteniendo Ng; carril 3: extracto crudo de *E. coli* en medio de inducción ZYB; carril 4: extracto crudo de *E. coli* en medio de crecimiento MDG.....24
- Figura 5.** Evaluación de la pureza de nigrelisina mediante RP-HPLC. Se observa un pico de Ng con un tiempo de retención en 24.25 min.24
- Figura 6.** Actividad hemolítica de Ng en eritrocitos humanos. La pérdida de turbidez en el pozo A1 inició con una concentración de 74 nM de Ng y se realizaron diluciones dobles seriadas finalizando en el pozo A12 con 0.035 nM, con apreciación de actividad aun en el pozo A9 con concentración de 0.29 nM.....25
- Figura 7.** Ensayo de letalidad de StI y Ng sobre larvas de *A. aegypti*. La letalidad se graficó en función de la concentración de toxina. El parámetro CL₅₀ se calculó a partir del mejor ajuste sigmoidal de Hill (líneas continuas). Los puntos mostrados son el promedio de cinco

repeticiones \pm SD.....26

Figura 8. Alineamiento de las secuencias de Ng y StI. Las áreas resaltadas en verde indican regiones de idéntica coincidencia entre las secuencias. Los residuos resaltados con colores representan aquellos que muestran concordancia en ambas secuencias, mientras que los no sombreados señalan diferencias. Las similitudes entre estas toxinas alcanzan un 79.1%, con una identidad del 63.3%. La comparación se efectuó mediante un alineamiento utilizando el software Geneious R9 y la matriz BLOSUM 62.26

Figura 9. Comparación de los modelos de estructuras 3D de Ng y StI. La superposición de las estructuras arrojó un valor RMSD de 0.418 angstroms, indicando una gran similitud en sus estructuras tridimensionales.27

Índice de anexos

Anexo 1. Medición de huevos de culícidos (A y B), caracterizados por su pequeño tamaño, con un rango aproximado de 0.5 – 1 mm de longitud, alargados y generalmente de color oscuro o negro. Su forma es ovalada, y su superficie suele presentar una apariencia rugosa ©, características que son esenciales para su identificación y estudio en el contexto de la investigación (fotografía obtenida utilizando un Microscopio Olympus SZX7).....	48
Anexo 2. Medición de larvas: en la imagen se observan larvas que se encuentran entre las fases instar 1 y 2, que se caracterizan por tener una longitud que oscila entre aproximadamente 1 y 2 mm. Durante estas etapas, ya se pueden observar algunas de sus características anatómicas clave, lo que es fundamental para el estudio y comprensión de la biología de estos mosquitos (fotografía obtenida utilizando un Microscopio Olympus SZX7).....	49
Anexo 3. Descripción anatómica y estructurales de las larvas de culícidos, esto incluye una cabeza con órganos sensoriales y apéndices, un tórax con setas y sifones, un abdomen que alberga el tracto digestivo y otros órganos internos, y sifones respiratorios. Esta descripción tiene como objetivo proporcionar una comprensión fundamental de la estructura corporal de las larvas de Culicidae en el contexto de la investigación y su relevancia para la ecología y el ciclo de vida de estos mosquitos (fotografía obtenida utilizando un Microscopio Olympus SZX7).	50

Abreviaturas o acrónimos

Å	Ångströms
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitro
µM	Micro molar
µm	Micrómetro
BLOSUM 62	Blocks Substitution Matrix 62
BnpI	Bandaporina I
C ₅₀	Concentración del ligando que produce el 50% de la respuesta máxima
CL ₅₀	Concentración Letal media
CL _{max}	Concentración Letal 100%
cm	Centímetro
DO _{600nm}	Densidad óptica a 600 nanómetros
EC	Extracto crudo
EqTII	Equinatoxina II
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (Cromatografía líquida rápida de proteínas)
FraC	Fragaceatoxina C
g	Gravedades
g	Gramos
HA	Actividad hemolítica
HC ₅₀	Concentración Hemolítica media
kDa	Kilo Dalton
kHz	Kilo Hertz
M	Molar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Ng	Nigrelisina
nM	Nano molar
nm	Nanómetro
OILB	Organización Internacional de Lucha Biológica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PFT	Toxinas Formadoras de Poro
PM	Peso Molecular
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa
SM	Esfingomiolina

StI	Esticolisina I
StII	Esticolisina II
TBS	Tris-Buffered Saline

Resumen

Las actinoporinas, como la Ng, se unen a la esfingomielina de la membrana celular y presentan actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos, también propiedades antibacterianas y antifúngicas. Aunque no se ha investigado la interacción de actinoporinas con membranas de insectos, se presume su efectividad debido a los esfingolípidos presentes. Estudios en insectos, especialmente el género *Aedes*, vectores de enfermedades, son vitales para entender y controlar enfermedades transmitidas por picaduras. La producción de Ng conllevó clonación, expresión y purificación. Se utilizaron células de *Escherichia coli* transformadas con el vector Ng-pET-21a (+) y se evaluó la expresión proteica en *E. coli* mediante SDS-PAGE con muestras no reductoras, registrándose un peso molecular 20 kDa. La proteína recombinante se purificó por FPLC en un solo paso de intercambio catiónico. La evaluación de la pureza por medio de RP-HPLC indicó una pureza de un 92% y un tiempo de retención de 24.5 min. La concentración máxima usada de esta toxina (74 nM), mostró una alta hemólisis evidenciada por pérdida de turbidez, la cual se mantuvo hasta una concentración de 0.29 nM. Los huevos de *A. aegypti* se desarrollaron a larvas en estadio instar 1-2 y se expusieron a concentraciones de Ng desde 0.000375 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ hasta 0.07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Además, las larvas se sometieron a StI con cantidades estándar de 0.001875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La exposición a Ng hasta 0.07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no mostró letalidad, mientras que StI presentó una CL_{50} de 0.0098 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, evidenciando un efecto letal a concentraciones menores con StI. Aunque los protocolos de obtención recombinante de Ng son eficientes y permiten obtener la proteína pura y activa, Ng no mostró letalidad en larvas de *A. aegypti*, mientras que StI sí lo fue. Este estudio sugiere investigar más sobre el mecanismo molecular de las actinoporinas para entender la divergencia en su acción larvicida.

1. Introducción

Las actinoporinas son toxinas formadoras de poro (*Pore Forming Toxins*; PFT), que son proteínas de carácter básico (puntos isoeléctricos por lo general superiores a pH 9), que muestran alta actividad citolítica y afinidad por membranas que contienen esfingomiélin (SM) en su estructura (Alvarado-Mesén et al., 2019; Álvarez et al., 2009; Anderluh & Maček, 2002; Kem & Dunn, 1988; Mancheño et al., 2003). Estas toxinas, son producidas por anémonas de mar, comúnmente tienen funciones de defensa ante crustáceos, insectos y vertebrados (Frazão et al., 2012; García-Linares et al., 2016; Palacios-Ortega et al., 2016; Paul M. Muchinsky, 2012). La SM es un componente esencial de las membranas celulares en los mamíferos, destacándose por su grupo fosfolípido, que juega un papel clave en la estructura y señalización celular. La relación de la SM en las membranas celulares y la actividad citolítica de las actinoporinas, indica que puede existir un potencial desarrollo de herramientas toxinológicas para el control de plagas, ya que la SM es ubicua en todo el reino animal (Hanada, 2013), con excepción de las anémonas marinas (Meinardi et al., 1995). Esta afinidad por la SM ha sido estudiada por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y marcaje de una actinoporina con flúor-19 (^{19}F -RMN) en micelas, en donde se ha demostrado la producción de cambios químicos por la interacción de SM-actinoporina (Anderluh et al., 2005; Pentón et al., 2011).

El control biológico de ciertas plagas ha sido un problema a lo largo de la historia, abarcando ámbitos como la producción agrícola, conservación e incluso la salud humana, debido a la transmisión de enfermedades por vectores; por eso, la investigación y aplicación de nuevas tecnologías permiten solventar esta problemática, partiendo de este punto se ha visto de manera positiva la implementación de bio-agentes como métodos sustentables (Nava-Pérez et al., 2012; Paredes et al., 2013). Un ejemplo de lo mencionado previamente puede ser el hongo *Beauveria bassiana* y la secreción de proteínas de la familia “aegerolysinas”. Esta familia de proteínas es comúnmente encontrada en el reino fúngico, y tienen la capacidad de unirse a lípidos de membrana (como SM) y participar en diversos procesos biológicos, incluyendo tanto el ataque como la defensa contra otros organismos. Las aegerolisinas pueden formar poros transmembrana que resultan en la lisis celular. Además, desempeñan un papel

importante en la promoción de la acción entomopatógena (Kraševc et al., 2021).

1.1. Antecedentes

Según DeBach (1964) citado por Hernandez-Ortega. (2019), la definición de “Control Biológico” está enfocada como “El uso de organismos para suprimir la densidad de población o el impacto de un organismo plaga específico, haciéndolo menos abundante de lo que sería si no se usaran dichos organismos” (p 8). Este concepto es similar al ofrecido por la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB), quien lo define como: “La utilización de organismos vivos, o de sus productos, para evitar o reducir las pérdidas o daños causados por los organismos nocivos” (p 53). El riesgo ambiental presentado por el uso de algún agente biológico para control de un vector se basa en la posibilidad de un daño colateral al ambiente, principalmente por el déficit de planificación y evaluación de objetivos naturales previo a su uso. Desde otro punto de vista, se puede determinar el éxito de aplicación con base a la disminución del organismo blanco hasta el punto de ser escaso el uso de insecticidas; el control del organismo y uso ocasional (Guédez et al., 2008).

Anteriormente se han obtenido toxinas con potencial insecticida provenientes de organismos marinos, por ejemplo, la nereistoxina proveniente del poliqueto *Lumbriconereis heteropoda* actúa bloqueando de manera selectiva ciertos receptores de acetilcolina en el sistema nervioso de los insectos a diferencia de los productos comerciales que inhiben las colinesterasas y el bloqueo de la señalización neuronal. No obstante, los estudios señalan relaciones de las toxinas del veneno como fuente insecticida que actúan principalmente sobre los canales de Na⁺ con voltaje (Nav) (Bosmans & Tytgat, 2007; Hernandez López & Hernandez López, 2005). Por otro lado, la alta cantidad de toxinas producidas por las anémonas de mar generan gran cantidad de posibilidades, aunque en comparación con muchos otros organismos, estas toxinas son menos estudiadas. Muchas actinoporinas han reportado tener un efecto muy tóxico en crustáceos al ser catalogados como presas naturales de las anémonas de mar (Bosmans & Tytgat, 2007), y por la estrecha relación evolutiva entre los crustáceos e insectos (Zrzavý & Štys, 1997), podría existir la posibilidad de que los insectos muestren algún tipo de afectación debido a las actinoporinas.

Actualmente el control de vectores de enfermedades (como Paludismo, Chagas, etc.) en

humanos se fundamenta en insecticidas químicos, lo que a su vez ha conllevado al aumento de la resistencia de estos organismos a los químicos como piretroides, por lo que el emplear nuevas herramientas con bases de control biológico ha sido un desafío para solventar esta constante problemática (Strode et al., 2014; Thomas, 2018). Históricamente se ha combatido la plaga de mosquitos atacando principalmente los huevos, larvas y las pupas con sustancias organofosforados, reguladores del crecimiento de insectos, agentes microbianos, rociadores residuales e insecticidas, pero esto induce a efectos negativos en la salud humana y el medio ambiente, así como resistencia en varias especies (Benelli, 2015; Id et al., 2019). También se han visto estudios que muestran la presencia de alelos de resistencia a organofosforados como el temefós en poblaciones de campo de *A. aegypti* puede haber surgido debido a la exposición continua al temefós y otros xenobióticos presentes en los sitios de cría de larvas (Muthusamy & Shivakumar, 2015). En países como la India se han encontrado que poblaciones de *A. aegypti* son resistentes al DDT, y de forma generalizada contra los carbamatos (Sumitha et al., 2023).

Los mosquitos son capaces de transmitir enfermedades a humanos como la malaria, la filariasis linfática y algunos arbovirus (del inglés arthropod-borne virus) como Dengue y Zika. Aunque aún no hay vacunas o medicamentos disponibles para la mayoría los casos, se busca como alternativa controlar los vectores para la prevención (Benelli et al., 2016; Huang et al., 2017). Dentro de los mosquitos picadores transmisores de enfermedades destaca *Aedes aegypti*, pues es una especie altamente antropofílica y vector de múltiples arbovirus (Benedict et al., 2007; Gould et al., 2017; Newman, 2010; Reiter et al., 2006; Souza-neto et al., 2019).

En la prevención de enfermedades zoonóticas se contempla el uso de metabolitos generados de distintos organismos. Amer & Mehlhorn (2006) comprobaron el efecto larvicida evaluando 13 aceites esenciales contra géneros de *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* (Díptera, Culicidae), donde se probó su toxicidad ante el estado larval. De 41 sustancias probadas (aceites) sobre larvas de *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* y *Culex quinquefasciatus*, 13 de estos extractos (alcanfor, tomillo, amyris, limón, cedro, incienso, eneldo, mirto, enebro, pimienta negra, verbena, helichrysum y sándalo) mostraron potencial, oscilando los valores de CL₅₀ de los extractos entre 1-101.3 µg/mL ante *A. aegypti*, 9.7-101.4 µg/mL para *A. stephensi* y 1-50.2 µg/mL para *C. quinquefasciatus*, con una letalidad del 100% a las 24 h posteriores.

En el caso de las actinoporinas, como su nombre lo indica, son toxinas producidas por

anémonas de mar de la familia de las porinas, ya que forman poros en membranas biológicas. Se ha evidenciado que estas toxinas son dependientes de SM (Rojko et al., 2013). Cuando la membrana tiene una alta disponibilidad de SM (>30 molar %), aumenta el reconocimiento y unión de las toxinas esticolisinas, que son dos actinoporinas obtenidas de la anémona marina *Stichodactyla helianthus* (Álvarez et al., 2009). Este incremento en el reconocimiento y unión conlleva a un incremento de la actividad citolítica, lo que muestra el potencial de estas toxinas para desarrollo de aplicaciones en biotecnología y biomedicina, como producción de inmunotoxinas dirigidas para tratar células tumorales (Tejuca et al., 2009). Previamente se ha estudiado el papel de la SM como el fosfolípido de membrana que actúa como receptor, un ejemplo de esto es la esticolisina I (StI), de acuerdo con su comportamiento como actinoporina se une y penetra con alta movilidad lateral en la membrana (Donato et al., 2021; Pedrera et al., 2014).

Aunque no se ha visto un estudio donde se muestre la comparación o efecto directo de la interacción de una actinoporina y membranas celulares de insectos, se podría especular sobre un potencial efecto insecticida ya que las células de los insectos no están exentas a la capacidad de las actinoporinas de perturbar las membranas celulares puesto que también tienen esfingolípidos como la SM. La SM cumple funciones estructurales de membrana aportando a su integridad y fluidez; a la formación de microdominios y a la señalización celular, por ejemplo, a través de la metabolización de SM en ceramidas que se relacionan con estrés, muerte celular programada e incluso proliferación celular (Hannun & Obeid, 2008). Estudios realizados por Perera et al. (2012) han señalado que la composición del lipidoma de las células de *A. albopictus* (cepa C6/36) está representado entre el 6 al 13% por lípidos como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, SM, ceramida, lisofosfolípidos y fosfoetanolamina, donde de estos, aproximadamente un 18.5% corresponde a SM.

Alvarado et al. (2014) obtuvieron fracciones cromatográficas con actividad hemolítica (HA) inhibible por SM a partir del extracto crudo de la anémona de mar *A. nigrescens*, lo cual sugería la presencia de al menos una actinoporina en esta anémona. Más adelante se analizó la actividad antimicrobiana y antifúngica de extractos de esta misma especie y se determinó la inhibición contra las bacterias *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*, al igual que en las especies fúngicas como *Botrytis cinerea*, *Trichoderma harzianum* y *Rhizopus oryzae* (Borbón

et al., 2016). Posteriormente se logró clonar, expresar y purificar una actinoporina a partir de esta anémoma. Además, se logró su caracterización molecular y funcional; dicha toxina permeabiliza fácilmente eritrocitos humanos, así como a la línea linfoblástica de ratón L1210. Así mismo, se determinó su contenido de estructura secundaria mediante el uso de la técnica espectroscópica de dicroísmo circular. Al igual que otras actinoporinas, se demostró que la nigrelisina (Ng) tiene una alta afinidad por membranas que contienen SM (Alvarado-Mesén et al., 2019). Estas características hacen que Ng sea una molécula potencial para uso biotecnológico en el control de organismos transmisores de enfermedades tales como el *A. aegypti*.

1.2. Justificación

La familia de insectos Culicidae incluye el grupo de los mosquitos picadores, los cuales se caracterizan por ser vectores de transmisión de enfermedades. Un ejemplo muy conocido es *Aedes aegypti*, quien es vector de arbovirus que producen enfermedades como dengue, zika y chikungunya, las cuales son capaces de provocar serios problemas de salud y en ocasiones hasta la muerte. De igual manera *Aedes albopictus* actúa como vector de transmisión para dichas enfermedades. Ambos especímenes realizan la puesta de huevos en depósitos de agua tanto naturales como en artificiales (tipo llantas, botellas, agua estancada, etc.) (Lambrechts et al., 2010; Martínez-Torres, 2008; Rey & Lounibos, 2015).

El control biológico de vectores de enfermedades en salud humana, producción agrícola y ganadera ha generado mayor interés por su potencial para controlar organismos patógenos. En el caso de los padecimientos humanos implica directamente la salud pública, involucrando enfermedades como Chagas, Malaria, entre otras (Okamoto & Amarasekare, 2012). En relación con esto se han observado datos de la Región de las Américas de la OMS en los que se mencionan que entre las fechas de 1 de enero y 11 de diciembre del año 2023 se informaron 4, millones de casos sospechosos de dengue (incidencia de 419 casos por cada 100 000 habitantes), contabilizando 2049 muertes (Organización Mundial de Salud, 2023).

En el caso de Costa Rica para 2024, se han contabilizado para la semana 18 8051 casos de dengue, 16 de chikungunya y 13 de zika (Ministerio de Salud Costa Rica, 2024). Con base en los datos recopilados se establece la necesidad de disminuir la cantidad de personas

infectadas por causa de vectores como los mencionados, entre otros existentes, creándose nuevas alternativas con potencial para desarrollar sistemas y/o metodologías novedosas capaces de combatir la expansión de enfermedades transmitidas por insectos pertenecientes a esta familia.

Asimismo, algunos animales tienen la capacidad de producir toxinas, las cuales les permiten iniciar el proceso de digestión de sus presas, de igual manera les confieren la habilidad de defenderse de sus depredadores. En este sentido las anémonas de mar, organismos de naturaleza sedentarias y de cuerpo blando, utilizan sus mecanismos de producción de toxinas como ventaja ecológica de supervivencia (Burks & Lodge, 2002; Sher et al., 2005). La producción de estas sustancias puede tener un alto potencial biotecnológico en el uso de estos metabolitos ya que pueden permitir la generación de nuevos productos que permitan controlar enfermedades por medio del control de vectores que las transmiten.

En las anémonas de mar se ha logrado determinar un grupo de proteínas conocidas como actinoporinas; estas son toxinas que se caracterizan por presentar actividad hemolítica, asimismo se catalogan como proteínas alcalinas con ausencia de cisteína en su mayoría, y un peso molecular ~20 kDa (Alvarado et al., 2014; Álvarez et al., 2009; Kohno et al., 2009). Alvarado et al. (2014) detectaron la presencia de una actinoporina en la anemona *Anthopleura nigrescens*. Igualmente, Alvarado-Mesén et al. (2019) clonaron, caracterizaron y purificaron dicha actinoporina, a la cual llamaron nigrelisina (Ng).

De acuerdo con la problemática generada por la necesidad de tener un mejor control sobre las enfermedades transmitidas por insectos vectores y tomando en cuenta las características Ng, el propósito de esta investigación es la evaluación del efecto toxicológico de la proteína al exponerla ante larvas de insectos culícidos, con el fin de encontrar efectos larvicida que pueda potenciar a Ng como una posible molécula a utilizar en el control de estos vectores de enfermedades.

1.3. Planteamiento del Problema

¿Cuál es el efecto toxinológico de diferentes concentraciones de nigrelisina recombinante sobre larvas de culícidos?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General:

Evaluar el efecto toxinológico de nigrelisina recombinante sobre larvas de culícidos, mediante exposición directa *in vitro*, para la determinación de su potencial uso como agente larvicida sobre vectores que transmiten enfermedades, como potencial uso en el control biológico.

1.4.2. Objetivos específicos:

- 1- Estimar el grado de pureza de fracciones cromatográficas obtenidas mediante intercambio iónico a partir del lisado de *E. coli* BL21 en la producción de nigrelisina recombinante.
- 2- Determinar el efecto toxinológico de la nigrelisina a diferentes concentraciones sobre larvas de culícidos.
- 3- Establecer la concentración letal media (CL₅₀) de nigrelisina sobre larvas de mosquito en pozos de microplacas.

2. Marco teórico

2.1. Control biológico de vectores de enfermedades

La diversificación de estrategias de control biológico sobre vectores transmisores de enfermedades reduce las cargas en la salud pública, no obstante, bajo la definición de control biológico se ha excluido el uso de tecnologías transgénicas y modificación del vector para la supresión/remplazo de la población al no haber antagonista natural que se involucre, y se desecha la inducción de insectos estériles por razones similares (Huang et al., 2017; Thomas, 2018).

2.1.1. Toxinología y ecotoxicología

En el desarrollo de bioensayos existe un efecto ecotoxicológico, donde su alcance toxicológico incluye “organismos, poblaciones, comunidades y ecosistemas”, es decir, al utilizar reactivos sintéticos en la biosfera y sus efectos sobre los componentes de la biosfera, incluido el ser humano (Newman, 2010). La toxinología, por su parte, se destaca como la ciencia que estudia las sustancias producidas por algún ser vivo como plantas, microorganismos y animales venenosos, donde estas accionan fuera de los organismos productores tras su liberación, sin provocar la muerte o descomposición en el productor, pero sus efectos recaen sobre una presa u organismo externo blanco (Barraviera, 1997; Capó Martí, 2007).

El control de mosquitos vectores de enfermedades clásicamente se ha basado en dos fundamentos, el primero constituye en la eliminación de los sitios de cría y puesta de huevos, que son lugares donde se puede estancar el agua, y en segundo lugar eliminando el mosquito en algún punto de su ciclo de vida por medio de alguna sustancia u otro organismo (Martínez-Torres, 2008). Convencionalmente se ha dado un control de plagas por medio de pesticidas, no obstante, estos tienen repercusiones en el medio ambiente y en la población, pues se generan residuos tóxicos, intoxicaciones crónicas, resistencia por parte de la plaga, y daño ambiental por la destrucción de la fauna silvestre no asociada, de igual manera, se produce contaminación de aguas superficiales y subterráneas (Strode et al., 2014; Wilson et al., 2020).

Existen sustancias extraíbles de ciertos organismos, con propiedades favorables para el control insecticida (Droby et al., 2016). Uno de estos ejemplos son extractos de *Azadirachta*

indica que contienen actividad larvicida (compuestos bioactivos, de los cuales azadiractina, nimbina, nimbidina y nimbólidos, con funciones ovicidas, supresión de la fecundidad, etc.) ante mosquitos vectores de enfermedades como filariasis, dengue, malaria y chikungunya (Dua et al., 2009). Por otro lado, el efecto toxinológico de *A. indica* se ha calificado como biocida seguro y fuente barata de compuestos altamente efectivos contra el vector de malaria rural *Anopheles culicifacies* (Chandramohan et al., 2016).

2.1.2. Vectores de enfermedades: Culicidae (Díptera)

Diversos estudios científicos han demostrado una asociación entre mosquitos dípteros (por ej. *A. albopictus*, *A. aegypti* y otros) con distintos arbovirus donde destacan algunos como Cache Valley, Encefalitis Equina Oriental, West Nile, Dengue, Chikungunya y Zika (Farajollahi & Nelder, 2009). Por lo anterior, se ha impulsado el estudio del comportamiento de estos insectos, con el fin de mejorar la comprensión en aspectos relacionados al estado del mosquito vector ante ciertas condiciones, como la reacción ante sustancias o proteínas de interés, de tal forma que se podrían implementar métodos de control.

Los organismos vectores muestran una capacidad o eficiencia para algún arbovirus específico, esto principalmente por asociaciones ecológicas de los arbovirus selváticos entre sí, el clima y la abundancia de mosquitos (Althouse et al., 2015; Weaver & Reisen, 2010). Se ha determinado la existencia de una relación entre la biología del organismo vector, la disponibilidad de potenciales huéspedes, la distribución espacial y el patógeno que hospeden (Althouse et al., 2015). Por otra parte, hay una correlación de vectores culícidos con enfermedades como Malaria, Filariosis y Encefalitis principalmente en áreas rurales y selváticas, lo que difiere a otras como dengue, chikungunya y zika que se transmiten en su mayoría en las áreas urbanas por la amplia cantidad de personas y condiciones adecuadas para el desarrollo de especies vectores como *A. aegypti* (Ruiz et al., 2018).

Dentro de la familia Culicidae existen numerosas especies que son capaces de ser infectadas con agentes etiológicos y cumplir un rol de vectores. Principalmente en esta familia se ha visto que, dependiendo del patógeno, los virus pueden internarse a lo largo del cuerpo del mosquito vector, y se ha detectado, por ejemplo, para el virus del dengue, que el antígeno viral puede encontrarse en tejidos de la cabeza, las glándulas salivales y/o secreciones salivales.

Además, el comportamiento alimenticio zoofílico de *A. albopictus* y *A. aegypti* ha mostrado una preferencia hacia la sangre humana lo que ha desempeñado un factor de transmisión de enfermedades (Lambrechts et al., 2010).

La capacidad vectorial depende de factores ecológicos, ambientales, moleculares y conductuales que influyen en los mosquitos como transmisores de patógenos, de igual manera, la competencia vectorial se distingue como capacidad vectorial, característica intrínseca del vector para infectarse, permitir la replicación y consecuentemente la transmisión del patógeno al huésped susceptible (Kramer & Ebel, 2003). Además, los mosquitos hembra conllevan mayor riesgo de infectar a la población humana debido a que se alimentan de la sangre para desarrollar su ciclo reproductivo y puesta de huevos (Goindin et al., 2015).

2.1.3. Ciclo de vida de *A. aegypti*

La reproducción de uno de los ejemplares más característicos de la familia de culícidos, *A. aegypti*, se basa en un ciclo dependiente de depósitos de agua (Malta Varejão et al., 2005). Igualmente, su desarrollo se ve influenciado por una serie de factores como temperatura, sedimentos, pH, entre otros, asociados para su supervivencia a lo largo de sus diferentes etapas del desarrollo. Se ha visto que la duración de los estados es de 4.1 a 4.7 días para que el huevo eclosione, 6.6 a 10.2 días para la salida de la larva (con condiciones de pH cercanas a valores neutros) y la pupa tarda de 2.1 a 2.7 hasta su estado adulto en el que vive alrededor de 10 a 35 días (Beserra et al., 2009).

Una temperatura adecuada para el ciclo de vida de *A. aegypti* se encuentra entre los 21 y 29 °C, para la longevidad y la fecundidad está entre 22 y 30 °C y los huevos emergen en temperaturas que oscilan entre 24 y 25 °C (Beserra et al., 2006; Goindin et al., 2015). También, temperaturas cercanas a los 35 °C favorecen que las hembras se alimenten de sangre y tengan medias de puesta de huevos cercanas a 25.5 huevos/hembra, mientras que las bajas temperaturas (~16 °C) afectan negativamente la reproducción (Carrington et al., 2013).

2.1.4. Distribución de mosquitos picadores

La distribución de la familia de mosquitos picadores Culicidae presenta importancia e interés en el área de salud pública por los problemas que estos vectores generan en la población,

donde se han logrado determinar ciertas características sobre su ubicación, siendo principalmente en zonas tropicales y subtropicales húmedas (Kantor, 2016). Asimismo, la familia Culicidae como vectores transmisores de estas enfermedades se han encontrado a lo largo del continente americano en 39 países diferentes entre América del Norte, Centro, Sur y el Caribe (Caridad-Moros et al., 2016).

Estudios de dípteros de la familia Culicidae en Venezuela han logrado determinar su presencia en ecosistemas montañosos, se encontraron 19 géneros y 254 especies debidamente georreferenciadas, con una altitud máxima por encima de los 2 000 msnm. Igualmente, un elemento de relevancia por tomar en cuenta con respecto a la fauna de culícidos, es la asociación de las especies con reservorios naturales que funcionan como criaderos, tal como lo son las fitotelmatas, destacando las especie *Aedes eurus* a una máxima altitud 3 133 msnm y *Anopheles pholidotus* a 2 680 msnm (Navarro et al., 2010). De igual forma, se sabe que para países neotropicales las áreas metropolitanas se encuentran en alturas aptas para el desarrollo de especies como *A. aegypti*, al estar a alturas alrededor de los 2 200 msnm (Ruiz et al., 2018).

En Costa Rica *A. aegypti* es el vector de arbovirus más reconocido, Zardkoohi et al. (2019) localizaron a esta especie en las provincias de Puntarenas y Limón, Costa Rica. Además, en la región Huetar Atlántica de Costa Rica se encontró la presencia de 14 especies de mosquitos durante la estación lluviosa, evidenciando entre las más abundante las especies *A. aegypti* y *Limatus durhami*, igualmente se reportó la presencia de *A. albopictus* (Marín-Rodríguez et al., 2009).

2.2. Proteínas formadoras de poros en membranas, Actinoporinas

2.2.1. Organismos productores de actinoporinas y su función básica

Algunas de las especies productoras de actinoporinas más estudiadas son las anémonas de mar *Stichodactyla helianthus* (anemona sol) que es productora de las esticolisinas StI, StII y StIII y muestran potencial altamente hemolítico (Rivera-de-Torre et al., 2020); *Actinia equina* (tomate de mar) que produce la equinatoxina II (EqTII) (Hinds et al., 2002); *Actinia fragacea* (anemona de fresa) que produce la fragaceatoxina C (FraC) (Mechaly et al., 2011; Tanaka et al., 2015); *Anthopleura asiática* que sintetiza la bandaporina I (BnpI) (Kohno et al., 2009); y *Anthopleura nigrescens* que produce la nigrelisina (Ng) (Alvarado-Mesén et al., 2019). Estas

toxinas son producidas por el organismo como monómeros solubles que se insertan por oligomerización en la membrana plasmática del organismo blanco, lo que conlleva a la formación de poros, los cuales producen la citólisis. Sus masas moleculares oscilan entre 18-20 kDa y tienen alta afinidad por SM (Anderluh & Maček, 2002; Iacovache et al., 2010).

El proceso de penetración en la membrana por parte de las actinoporinas se puede describir de manera general por un proceso que inicia con la unión de la toxina a la membrana blanco, en la que seguidamente se produce una difusión lateral y la oligomerización de monómeros sobre la membrana, y como último paso se inserta el segmento N-terminal conformado por una hélice α en la membrana lipídica permitiendo la formación del poro (Antonini et al., 2014; Mesa-Gallosó et al., 2017; Rojko et al., 2013). También, estudios utilizando cristalografía de rayos X y microscopía electrónica han indicado que, al penetrar la membrana, la parte anfifílica de la hélice α en la región N-terminal de las actinoporinas se separa de la estructura principal y se introduce en la membrana objetivo, formando poros de 1 a 3 nm de diámetro (Glasser et al., 2014; Tanaka et al., 2017).

Por otro lado, es importante indicar que StI y StII, al ser isoformas, exhiben una gran similitud (99%) e identidad (93%), sin embargo, esa similitud no necesariamente coincide con su actividad hemolítica, puesto que StII tiende a ser alrededor de seis veces más activa que StI contra los glóbulos rojos humanos (Álvarez et al., 2009). Aunque las actinoporinas diferentes producidas por la misma especie de anémona marina actúan en sinergia, probablemente interactuando para formar poros funcionales compuestos por las distintas isoformas de la proteína. Esta interacción tiene importantes consecuencias en cuanto a la funcionalidad biológica de las actinoporinas y sugiere que podría representar una estrategia más general empleada por otras proteínas formadoras de poros, entendiéndose como respuestas de defensa y/o ataques más versátiles en su entorno natural (Rivera-de-Torre et al., 2016).

2.2.2. Descripción general de *Anthopleura nigrescens*

Las anemonas de mar son conocidas por ser animales sésiles que se caracterizan por la producción de toxinas para establecer mecanismos de defensa ante sus predadores, así como con funciones de alimentación en la captura de sus presas. Estas toxinas actúan sobre los canales de sodio y potasio, con funciones de excitabilidad cardíaca y neuronal. Además, otras toxinas

actúan a nivel de membrana produciéndole daño y conllevando a la lisis celular (Álvarez et al., 2009).

Se conocen alrededor de 46 especies pertenecientes al género *Anthopleura*, entre ellas a la especie *A. nigrescens*, la cual se ha visto que es una anémona polífaga oportunista, que se alimenta según la disponibilidad del entonto, destacando organismos bentónicos (Fautin, 2011; Quesada et al., 2014). *A. nigrescens* se encuentra principalmente en hábitats intermareales rocosos inferiores, pero igualmente pueden ubicarse en zonas medias y superiores. En Costa Rica se ha reportado su presencia en Mata Limón, Puntarenas (Acuña et al., 2012).

Como descripción general de esta anémona, se conoce que su cuerpo presenta verrugas adhesivas de tamaños muy similares, pero con distintos números de filas, con un número de 32 a 80 tentáculos organizados en 4 ciclos, además, su disco oral es plano y puede poseer un diámetro que se encuentre entre 12 a 21 mm, lo que representa un tamaño análogo al del disco basal y una altura aproximada de 9 a 20 mm (Acuña et al., 2012).

2.2.3. Producción de nigrelisina recombinante

Una investigación realizada por (Alvarado et al., 2014), reportó por primera vez la detección de actividad biológica en el extracto crudo y fracciones cromatográficas de *A. nigrescens*. En dicha investigación se reportaba propiamente actividad hemolítica inhibible por SM. Además, se logró demostrar que en las fracciones cromatográficas que presentaban dicha actividad se presentaban bandas con movilidad electroforética de alrededor de 20 kDa. Más tarde ese mismo grupo utilizando técnicas de biología molecular, logró obtener la secuencia codificante para una actinoporina a partir del ARNm de *A. nigrescens*. Dicha secuencia fue clonada y expresada en células de *E. coli* BL21 para posteriormente purificar y caracterizar molecular y funcionalmente, a la actinoporina obtenida. La misma fue denominada como nigrelisina (Alvarado-Mesén et al., 2019).

2.2.4 Caracterización de la nigrelisina

Esta actinoporina representa una de las PFT más potentes conocidas hoy en día, comparada en distintos aspectos con la StII por su alta homología. La secuenciación con MALDI-TOF/TOF MS de péptidos generados mediante digestión con tripsina y quimotripsina de Ng identificó un 82.7% de su secuencia y elucidó un peso molecular de $19\ 661 \pm 3$ Da,

además, su punto isoeléctrico teórico se estimó en 9.7. Ng, contiene un dominio conservado de la superfamilia de proteínas citotóxicas de anémonas de mar, el cl05718, con un 58% de contenido de estructura secundaria formada por la lámina β y 5.5% en forma de hélice- α según datos experimentales obtenidos por difracción circular. Además, tiene una alta identidad (72.8%) con BnpI, una actinoporina detectada en *Anthopleura asiática* (Alvarado-Mesén et al., 2019).

Según experimentos realizados de permeabilización de liposomas formados por dioleilfosfatidilcolina:SM (DOPC:SM; 1:1), Ng es más activa que StII con una C_{50} sobre estas vesículas de 0.25 y 0.37 nM, respectivamente, en un lapso de ensayo de 15 min. Con respecto a la citotoxicidad de Ng en células nucleadas linfoblásticas murinas (L1210), Ng muestra una potente actividad de permeabilización a los 30 min, con valores de C_{50} alrededor de 2 nM (Alvarado- Mesén *et al.*, 2019).

3. Materiales y métodos

3.1. Objeto de estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Proteínas con apoyo del Laboratorio de Biotecnología de Plantas. Esta investigación tuvo como objeto de estudio evaluar el efecto de letalidad presentada por la toxina formadora de poros Ng sobre larvas de mosquitos pertenecientes a la familia Culicidae y debido a la colaboración del Laboratorio de Entomología en el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud se utilizó la especie *Aedes aegypti* cepa New Orleans.

3.2. Diseño de investigación y descripción de las variables

Se produjo la nigrelisina recombinante con el objetivo de evaluar su efecto sobre larvas de mosquitos a diferentes concentraciones. Por lo tanto, las variables a analizar son la concentración de la toxina (variable independiente), efecto de la toxina sobre las larvas (variable dependiente) y larvas sin toxina (variables de control). El tipo de investigación es experimental.

3.3. Producción de la Ng recombinante

La producción de la proteína en evaluación conllevó un proceso de clonación, expresión y purificación. Debido al reciente descubrimiento de la Ng, este estudio se basó en la metodología establecida por la literatura que determina una forma efectiva para poder obtenerla (Alvarado-Mesén et al., 2019). Esta metodología consiste en emplear un vector de expresión que contiene la secuencia de Ng (número de accesoión MH204651), cuya expresión es inducida en *Escherichia coli* BL21 Star (DE3), y finalmente Ng es extraída y purificada por medio de cromatografía de intercambio catiónico en columnas de CM Sephadex C- 25.

3.3.1. Expresión proteica

Como método de expresión de la proteína Ng se utilizó el protocolo de autoinducción (Studier, 2005). Las soluciones 50xM, 5052, Glucosa (40%), MgSO₄ (1 M) y FeCl₃ (0.1 M; en HCl 0.1 M) se esterilizaron por autoclave (15 min a 121 °C), mientras que la solución L-Aspártico (5%; en NaOH 1M, con ajuste a pH 8) se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 µm. Una vez las soluciones estuvieron listas se procedió con la preparación de los medios LB 2X, MDG y ZYB 2X, estos se esterilizaron a través de autoclave por 20 min a 121 °C. Estas soluciones y medios se prepararon como se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1. Composición de soluciones y medios de cultivo

	Reactivos	Cantidad (g)	Cantidad (mL)	Volumen final (mL)
Solución 50xM	KH ₂ PO ₄	8.87		
	NH ₄ CL	6.31		
	NaSO ₄	1.78	NA	50
	Na ₂ HPO ₄	8.88		
Solución 5052	Glicerol	12.5		
	Glucosa	1.25	NA	50
	Lactosa	5		
Glucosa	Glucosa	4	NA	10
Mg SO₄	MgSO ₄	2.4	NA	20
HCl	HCl (37%)	NA	0.1	10
FeCl₃	FeCl ₃	0.612	NA	10 (en HCl)
L-Aspártico	L-Aspártico	0.5	NA	10 (en NaOH 1M)

Medio caldo lisogénico (LB)	Peptona 2%	2.5		
	Extracto de Levadura (1%)	1.25	NA	150
	NaCl (1%)	1.25		
Medio de crecimiento MDG	Agua destilada estéril		38.57	
	50xM		0.8	
	MgSO ₄ (1 M)	NA	0.08	40
	FeCl ₃ (0.1 M)		0.04	
	Glucosa (40%)		0.5	
	Ampicilina (100 mg/mL)		0.01	
Medio de inducción ZYB	Agua destilada estéril		136.8	
	Medio LB		150	
	Solución 50xM		6	
	Solución 5052	NA	6	150
	MgSO ₄ (1 M)		0.6	
	FeCl ₃ (0.1 M)		0.3	
	Ampicilina (100 mg/mL)		0.3	

A partir de una placa con bacterias transformadas con el vector de expresión Ng-pET-21a (+) con la secuencia codificante para la proteína Ng (número de acceso GenBank MH204651) se tomó una colonia para iniciar 3 precultivos con 5 mL de medio de crecimiento MDG en tubos cónicos de 50 mL, de igual forma se tomó una alícuota de 5 mL de los medios MDG y ZYB para usar como blanco para la lectura de densidad óptica (DO_{600nm}). Los precultivos se incubaron a una temperatura de 37 °C con agitación constante a 150 rpm durante 14 horas y luego se refrigeraron (aproximadamente a 4 °C) alrededor de 4 horas. Después del periodo de incubación en medio MDG, se tomaron 300 µL de cada precultivo para inocular 150 mL de medio ZYB (correspondiente al medio de expresión) y crecer durante 14 horas, con agitación de 150 rpm y temperatura de 37 °C.

Posteriormente se realizaron lecturas a DO_{600nm} para los cultivos MDG y ZYB, así como sus respectivos blancos (MDG y ZYB sin bacterias) utilizando alícuotas de 2 µL y un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, USA). Luego, se tomó 1 mL de cada cultivo y se centrifugó a 8800 x g con una centrífuga (Eppendorf 5418 R) por un tiempo de 10 min en microtubos de

polipropileno de 1.5 mL y se descartó el sobrenadante. La biomasa se resuspendió en agua destilada con un volumen que permitiera contener una biomasa igualada a un valor de DO_{600nm} de 7, para ello, el volumen necesario de resuspensión para la biomasa de cada cultivo se obtuvo empleando la fórmula 1:

$$(DO_{600nm} * 1mL)/7 = V (1)$$

la cual se compone de la lectura del valor DO a 600 nm de cada suspensión celular, el volumen correspondiente al medio que se centrifugó (1 mL) y el volumen de agua necesario para la equivalencia de concentración de células (V).

Para evaluar la expresión de Ng en las células se tomó de la resuspensión igualada a un valor de DO₆₀₀ 7 mencionada en el párrafo anterior y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE), utilizando geles con un gradiente del 4-12 % de acrilamida, donde se tomaron alícuotas de 30 µL de las muestras y se mezclaron con 10 µL de buffer muestra (Laemmli 4x) en condiciones no reductoras. Estas muestras se centrifugaron brevemente, y se les realizó un tratamiento térmico de 99.9 °C por 10 min. Seguidamente se volvió a centrifugar de forma breve para que todo el líquido quedase en el fondo del tubo y se cargaron 35 µL en cada pocillo. Se utilizó también un control positivo de una muestra de Ng ya pura y el marcador de peso molecular pre-teñido SeeBlue Plus2 (Thermo Fisher, USA). Las condiciones de la corrida fueron con un potencial de 200 V en un periodo de 35 min. Consecutivamente se le realizó una tinción al gel con el reactivo Coomassie blue G-250 al 0.05% (p/v) durante un periodo aproximado de 16 h.

3.3.2. Purificación de la proteína

Las células del cultivo autoinducido se recolectaron por centrifugación (Eppendorf 5418 R) a 8800 × g por 10 min y fueron resuspendidas en una relación de 20 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM (pH 7.0) por cada gramo de peso fresco de células y se lisaron por medio de un procesador ultrasónico (QSONICA Q700, USA) con una frecuencia de 30 kHz en intervalos de 10 s on y 50 s off en un lapso de 2 min en hielo. La muestra se clarificó por centrifugado a 16600 × g durante 40 min a una temperatura de 4 °C.

Ya con el clarificado, se procedió a purificar la proteína basándose en su punto isoeléctrico (aprox. 9) utilizando para ello una columna (0.8×3.0 cm radio x altura) de intercambio catiónico CM-Sephadex C-25 (Sigma-Aldrich, USA.), equilibrada con tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7.2) y realizándose una elución con un gradiente lineal (0 – 1.0 M) de NaCl en el mismo tampón de fosfato a un flujo de 1.0 mL/min y colectando fracciones de 2 mL, esto bajo un volumen de inyección de muestra de 25 mL empleando un sistema de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) ÄKTAprime Plus (GE, Suecia), con monitoreo de los picos proteicos a 280 nm y midiendo también la AH en eritrocitos humanos. Las fracciones de interés se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior uso.

A las fracciones de interés (con absorbancia a 280 nm y AH) se les evaluó la homogeneidad proteica por medio de SDS-PAGE según lo descrito en el apartado 3.3.1 y se determinó su grado de pureza por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). La evaluación RP-HPLC se hizo con la mezcla de fracciones de interés obtenidas por el intercambio catiónico y se inyectó 50 μL en una columna SUPELCO C4 (4.6 mm x 100 mm con tamaño de partícula de 3.4 μm), donde se usó agua-ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% como solvente “A” y como solvente “B” acetonitrilo-TFA al 0.1%, y un gradiente desde 0 – 60% en solvente B con 30 min de tiempo a un flujo de 1.0 mL por min, monitoreando la absorbancia a 215 nm. Se determinó el tiempo de retención del pico de Ng y el porcentaje de pureza (porcentaje de área). El equipo utilizado fue un cromatógrafo con arreglo de iodos MD-4010 (JASCO, Japón).

Por medio de un lector de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, USA) se registraron medidas para verificar la AH, determinándose de acuerdo con la pérdida de turbidez de una suspensión eritrocitaria a una $\lambda=595$ nm en un tiempo de lectura de 30 minutos (Alvarado-Mesén et al., 2019). Las placas empleadas para este ensayo fueron de 96 pozos de fondo plano, en las cuales se efectuaron diluciones dobles seriadas de la proteína Ng (del pico de elución obtenido por la cromatografía de intercambio catiónico) en TBS en un volumen total de 100 μL . Iniciando la reacción de hemólisis por la adición de 100 μL del estándar eritrocitario para un volumen final de 200 μL .

Para calcular la concentración de proteína se midió la absorbancia a 280 nm en un

espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japón) de la muestra de Ng en una cubeta de 1 cm de longitud de paso y se dividió entre un valor de 1.3; donde 1.3 es la absorbancia determinada para Ng a una concentración de 1 mg/mL a 280 nm en una cubeta de 1 cm de longitud de paso de la luz (Alvarado-Mesén et al., 2019).

3.4. Obtención de larvas de especímenes de la familia Culicidae

Por medio de la colaboración entre el Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Proteína de la Universidad Nacional de Costa Rica e Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) se pudo acceder al uso de huevos de especímenes de la cepa *A. aegypti* – New Orleans, Guatemala.

3.4.1. Bioensayo de exposición de mosquitos culícidos ante Ng

Inicialmente para poder realizar una prueba de límite y tener un punto de referencia para los ensayos con Ng se contó con disposición de StI [0.08 µg/µl], la actinoporina de *Stichodactyla helianthus* (anémona del caribe cubano) por lo que se utilizó para realizar esta prueba, ya que la StI es homóloga a la StII, pero con menor actividad hemolítica (Hinds et al., 2002; Huerta et al., 2001; Lanio et al., 2001). Relacionado a esto, se ha observado que la concentración hemolítica media (HC₅₀) entre Ng y StII son muy similares (0.09 ± 0.01 nM; 0.13 ± 0.02 nM respectivamente) según (Alvarado-Mesén et al., 2019). Basados en esto y la disponibilidad de la StI se buscó la relación de la mínima concentración de esta toxina que presentara actividad letal sobre las larvas de culícidos para tomar un punto aproximado para ensayos posteriores con Ng.

Esta prueba se realizó con un número bajo de larvas y de proteína StI (facilitada por el LBBP). El desarrollo del ensayo en etapa de larva fue por triplicado con 3 larvas por cada tubo (vidrio borosilicato de 4 mL con undiámetro de 10 mm) y con 200 µL de medio de cultivo de las larvas) y proteína, calculando las concentraciones de StI de 0.08 µg/µL, 0.04 µg/µL, 0.02 µg/µL y el ensayo control negativo de 0 µg/µL.

Basado en los resultados de la prueba mencionada en el párrafo anterior se estandarizó el método de cultivo de las larvas, utilizando como medio de crecimiento 2 g de comida para gato (gati[®]) mezclada en 250 mL de agua destilada autoclavada. Y dejándolo en reposo

aproximadamente 19 h antes del uso para introducir los huevos de *A. aegypti*. El tiempo de incubación para las larvas fue de alrededor de 19 h. De este modo se manipularon larvas en estado instar entre 1 y 2 (anexos 1, 2 y 3; imágenes tomadas con un Microscopio Olympus SZX7). Además, como método estándar se realizaron con 5 concentraciones de toxina con diluciones dobles seriadas (concentraciones especificadas para cada ensayo), 5 réplicas y 5 larvas por tubo. Los crecimientos de las larvas se realizaron en vasos de precipitados de 25 mL con aproximadamente 80 huevos cada uno (3 vasos para bioensayo 1; 4 vasos para bioensayo 2; 5 vasos para bioensayo 3), que luego se cambiaron al momento de realizar la exposición a la proteína para evitar saturación del medio por crecimiento de agentes microbianos a las condiciones iniciales.

Basados en los datos obtenidos de la prueba de límite a pequeña escala, se generó el primer bioensayo, equiparando aproximadamente la cantidad de proteína usada en la mínima respuesta para StI, utilizando la secuencia de concentraciones de Ng de 0.006 µg/µL, 0.003 µg/µL, 0.0015 µg/µL, 0.00075 µg/µL, 0.000375 µg/µL, un control positivo de StI 0.02 µg/µL, ya que esta toxina mostró letalidad anteriormente, y un control negativo sin exposición a proteína.

Para fines de una exposición a mayor cantidad de Ng, en el bioensayo 2 se utilizó proteína sin desalar, exponiendo las larvas a las siguientes concentraciones de Ng y de StI (0.02 µg/µL): 0.075 µg/µL, 0.035 µg/µL, 0.02 µg/µL, 0.015 µg/µL, 0.01 µg/µL, 0.0075 µg/µL, 0.00375 µg/µL, 0.00187 µg/µL, 0.00125 µg/µL y 0 µg/µL. Además, se realizó un tercer bioensayo considerando dos concentraciones iniciales diferentes aplicadas a ambas proteínas, siendo la primera desde 0.02 µg/µL, hasta 0.00125 µg/µL y la segunda desde 0.03 µg/µL hasta 0.001875 µg/µL para ambas proteínas con sus respectivos controles negativos. La letalidad se graficó en función de la concentración de toxina, utilizando como valor de letalidad el promedio obtenido de las cinco repeticiones ± la desviación estándar. Las curvas obtenidas de dependencia de la letalidad en función a la concentración de toxina se ajustaron a una función de Hill (Hill, 1910), utilizando para ello el software OriginPro (OriginLab 2015) según la siguiente ecuación:

$$CL_{50} = CL_{max} * \frac{x^n}{k^n + x^n}$$

Donde: CL representa la letalidad de las toxinas sobre las larvas del mosquito; CL_{max} es el 100% de muerte de las larvas en el ensayo, x la concentración de proteínas; k la concentración de proteínas donde se alcanza la muerte del 50% de las larvas y n el índice de Hill en el proceso letal.

3.5. Comparación bioinformática entre nigrelisina y esticolisina I

Para el análisis bioinformático se hizo un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de Ng y StI, así como una superposición de las estructuras tridimensionales. La comparación bioinformática se enfocó en la evaluación de concordancia y diferencias, similitudes e identidad de las toxinas. De igual manera, la medición de similitud tridimensional de las estructuras proteicas superpuestas se realizó mediante la obtención de la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD; Root-Mean-Square Deviation).

3.5.1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos

Para alinear las secuencias de aminoácidos entre ambas actinoporinas se utilizó el software para bioinformática Geneious R9 y la matriz de sustitución BLOSUM 62 (Blocks Substitution Matrix 62).

3.5.2. Superposición de proteínas

Se generaron modelos de estructura 3D de las proteínas Ng y StI, esta comparación y superposición de las toxinas se llevó a cabo por medio del uso del software UCSF ChimeraX, versión 1.4 (Pettersen et al., 2021). Así mismo, en el entorno de Google Colaboratory (Google, 2023) y a través del programa informático AlphaFold2 (Jumper et al., 2021).

4. Resultados

4.1. Obtención de nigrelisina

4.1.1. Producción y extracción

De acuerdo con el protocolo para la expresión de la proteína, se obtuvieron las lecturas de DO a 600 nm para medir el crecimiento de las bacterias dentro de los cultivos (cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de DO a 600 nm obtenidos para las células transformadas en medio de crecimiento (MDG) y medio de expresión (ZYB) y cantidad de agua agregada al pellet de bacteria para realizar la SDS-PAGE.

Medio	Valor obtenido de DO _{600nm} de la suspensión celular	Volumen de agua destilada agregada (µL)
MDG	2.80	400
ZYB	3.03	430

Una vez resuspendidas las células en los volúmenes de agua indicados en el cuadro 2 se procedió a tomar 30 µL de cada muestra y a mezclarlos con buffer muestra y se corrió el ensayo SDS-PAGE (4-12% de acrilamida) y los resultados se pueden apreciar en la figura 1.

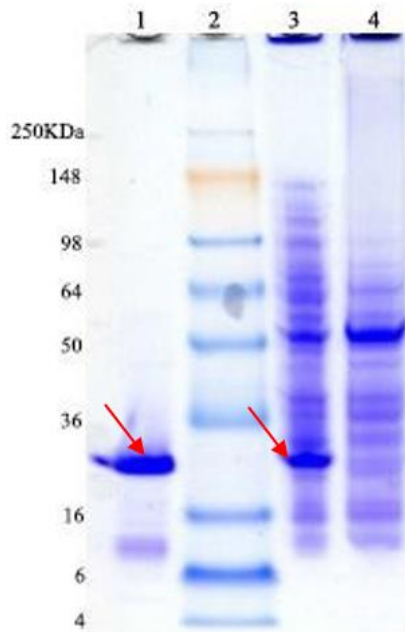


Figura 1. SDS-PAGE de evaluación de la expresión de nigrelisina. Carril: 1 Fracción cromatográfica activa de Ng; carril 2: Marcador de peso molecular; carril 3: proteínas del cultivo en medio de inducción ZYB; carril 4: proteínas del cultivo en medio de crecimiento MDG. Las flechas color rojo señalan las bandas de Ng.

4.1.2. Purificación

Con respecto a la purificación de la proteína Ng, se obtuvo un perfil cromatográfico por intercambio catiónico donde se observa la elución de proteínas de *E. coli* en el lavado con un tiempo de retención de 29.37 min, así como el pico de elución de la Ng en el gradiente con un tiempo de retención de 187.45 min (figura 2).



Figura 2. Perfil cromatográfico de la purificación de nigelisina por intercambio catiónico. Perfil general de la purificación, donde la línea de color azul representa la absorbancia a 280 nm, y la línea de color rojo la fuerza iónica. El pico pequeño de la línea azul con tiempo de retención de 187.45 min corresponde a la elución de Ng.

Para visualizar mejor el pico de elución de la Ng, se realizó el ajuste de escala del cromatograma, dicho pico se ubicó en las fracciones desde la 9 hasta la 22, como se puede apreciar en la figura 3.

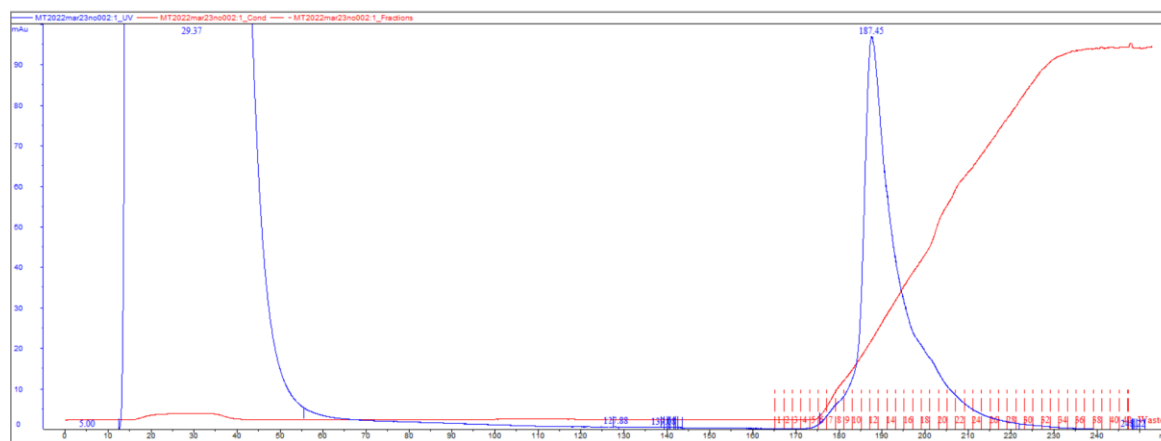


Figura 3. Ajuste de escala del perfil cromatográfico de la purificación de nigelisina por intercambio catiónico. La línea de color azul indica la absorbancia a 280 nm y la línea color rojo indica el gradiente de fuerza iónica, se puede apreciar la elución de Ng a los 187.45 min contenida en las eluciones 9-22.

La evaluación de la pureza de la mezcla de las fracciones de interés (9-22) se puede apreciar en la SDS-PAGE de la figura 4.

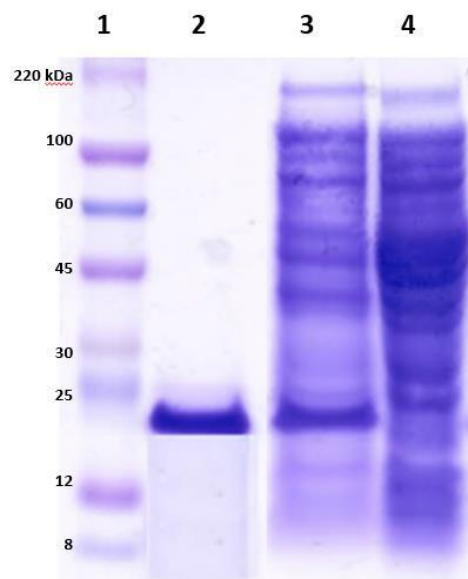


Figura 4. SDS-PAGE de evaluación de la pureza de las fracciones de interés luego de la cromatografía por intercambio catiónico. Carril: 1 marcador de peso molecular; carril 2: mezcla de fracciones conteniendo Ng; carril 3: extracto crudo de *E. coli* en medio de inducción ZYB; carril 4: extracto crudo de *E. coli* en medio de crecimiento MDG.

La evaluación de la pureza de nigrelisina también se hizo por medio de RP-HPLC, la cual tuvo un tiempo de retención de 24.25 min, así como un porcentaje de pureza (porcentaje de área) de un 92% (figura 5).

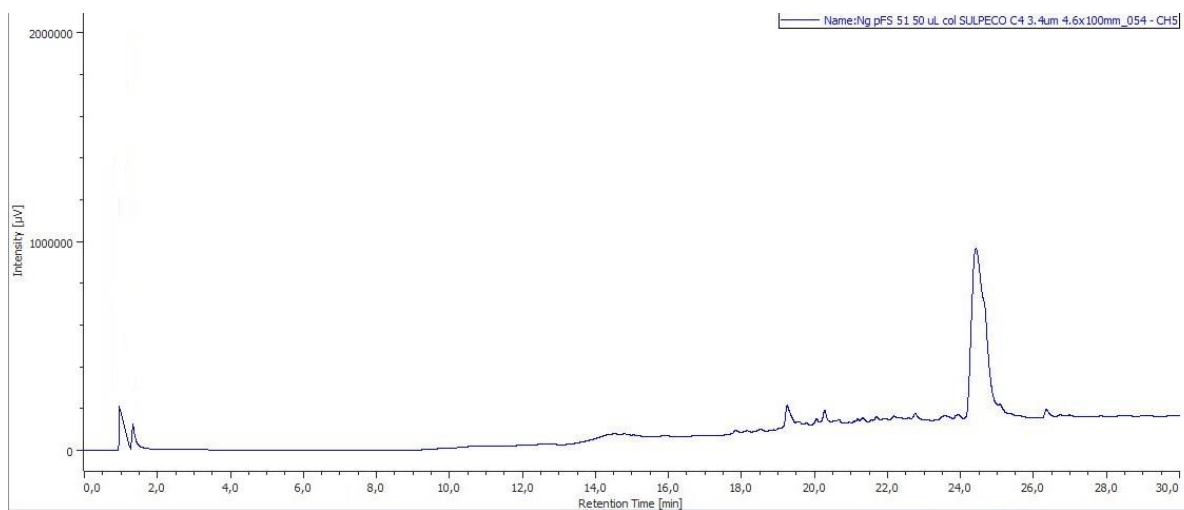


Figura 5. Evaluación de la pureza de nigrelisina mediante RP-HPLC. Se observa un pico de Ng con un tiempo de retención en 24.25 min.

4.1.3. Verificación de actividad hemolítica

La evaluación de la AH de Ng sobre eritrocitos humanos se puede apreciar en la figura

6. En la misma se puede observar que en el pozo A1, que corresponde a la máxima concentración de toxina aplicada (74 nM), la pérdida de turbidez fue total casi desde el inicio del tiempo de lectura, mientras que conforme se disminuyó la concentración de toxina la turbidez se mantuvo por más tiempo, apreciándose este efecto claramente a partir del pozo A5 al A9. La AH se mantuvo hasta una concentración de toxina de 0.29 nM (pozo A9). A partir del pozo A10 y hasta el A12 ya no se detectó AH.

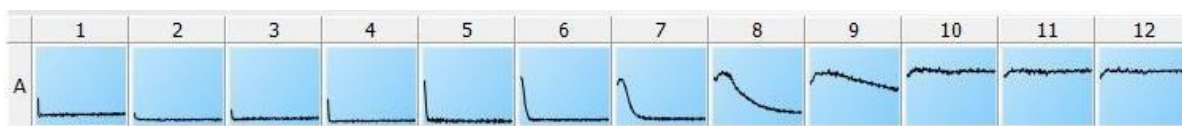


Figura 6. Actividad hemolítica de Ng en eritrocitos humanos. La pérdida de turbidez en el pozo A1 inició con una concentración de 74 nM de Ng y se realizaron diluciones dobles seriadas finalizando en el pozo A12 con 0.035 nM, con apreciación de actividad aun en el pozo A9 con concentración de 0.29 nM.

4.2. Bioensayos

4.2.1. Establecimiento concentración mínima de proteína activa y letalidad contra larvas de mosquitos

Aunque la actividad biológica de una actinoporina ante especímenes Culícidos no ha sido estudiada, se determinó que una concentración de 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ tuvo un 100% de letalidad de larvas *A. aegypti*.

4.2.2. Bioensayos con nigrelisina

Los ensayos de letalidad de ambas toxinas sobre larvas de *A. aegypti* permitieron determinar una CL_{50} para StI de 0.0098 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mientras que para Ng no se obtuvo efecto alguno sobre las larvas (figura 7).

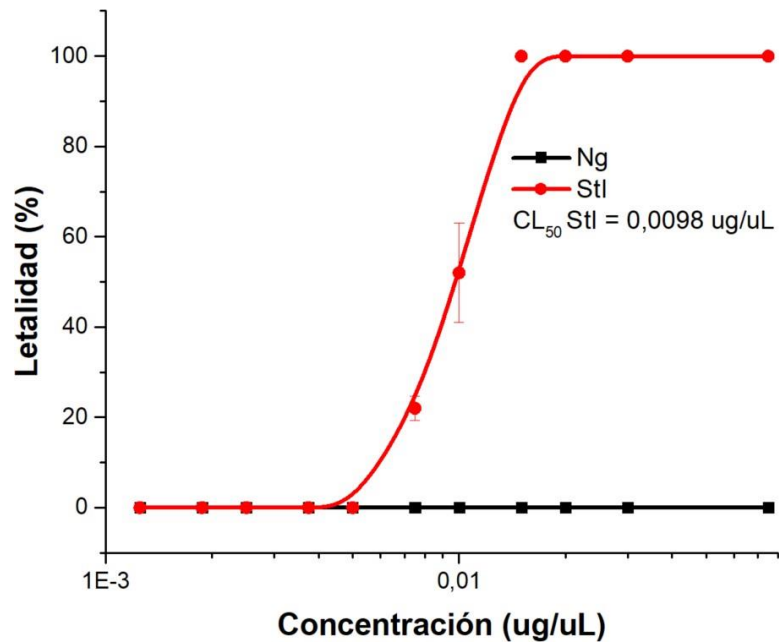


Figura 7. Ensayo de letalidad de StI y Ng sobre larvas de *A. aegypti*. La letalidad se graficó en función de la concentración de toxina. El parámetro CL_{50} se calculó a partir del mejor ajuste sigmoïdal de Hill (líneas continuas). Los puntos mostrados son el promedio de cinco repeticiones \pm SD.

4.3. Análisis bioinformático de proteínas Ng y StI

4.3.1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas Ng y StI

Como se puede observar en la figura 8, las secuencias de Ng y StI tienen una alta similitud, alcanzando valores del 79.1%. No obstante, el valor de la identidad es menor, representando un 63.3% de coincidencia en las mismas posiciones de las secuencias.



Figura 8. Alineamiento de las secuencias de Ng y StI. Las áreas resaltadas en verde indican regiones de idéntica coincidencia entre las secuencias. Los residuos resaltados con colores representan aquellos que muestran concordancia en ambas secuencias, mientras que los no sombreados señalan diferencias. Las similitudes entre estas toxinas alcanzan un 79.1%, con una identidad del 63.3%. La comparación se efectuó mediante un alineamiento utilizando el software Geneious R9 y la matriz BLOSUM 62.

4.3.2. Superposición de estructuras de proteínas Ng y StI

Adicionalmente, la evaluación de la similitud tridimensional de las estructuras de las proteínas presentó un RMSD de 0.418 angstroms, lo que indica una muy importante similitud entre las estructuras superpuestas, dicha superposición se puede observar en la figura 9.

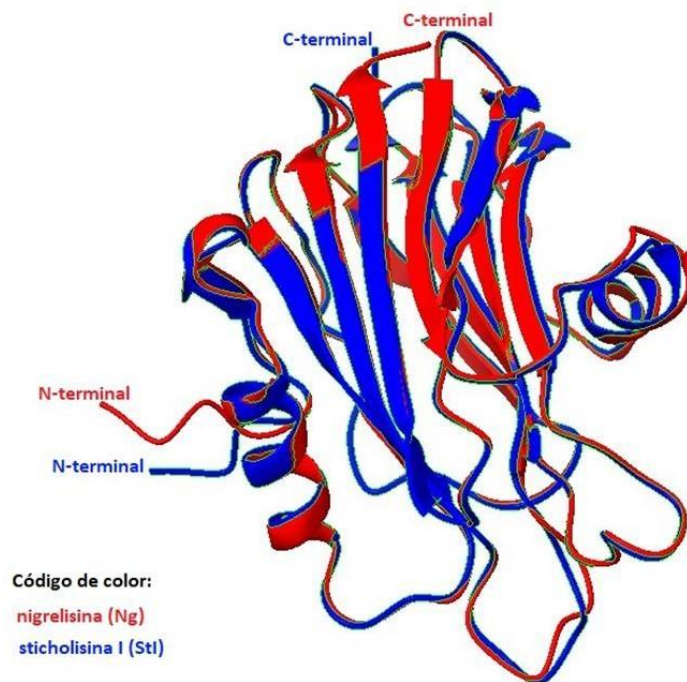


Figura 9. Comparación de los modelos de estructuras 3D de Ng y StI. La superposición de las estructuras arrojó un valor RMSD de 0.418 Å, indicando una gran similitud en sus estructuras tridimensionales.

5. Discusión

5.1. Expresión y purificación de Ng

En la evaluación mediante SDS-PAGE del peso molecular de la Ng expresada y purificada se obtuvo un valor cercano a los 20 kDa (figura 1), lo que coincide con valores encontrados para actinoporinas y específicamente para Ng como lo demostró Alvarado-Mesén et al. (2019).

Las cromatografías por intercambio catiónico han sido un método comúnmente usado para la purificación de diferentes tipos de moléculas, entre estas, en la purificación de proteínas como las actinoporinas. Para la purificación de actinoporinas se ha utilizado este método por su eficiencia, ya que estas proteínas por lo general son básicas, ya que tienen puntos isoeléctricos superiores a 9. Por ejemplo, Alegre-Cebollada et al. (2007) y Lanio et al. (2001), utilizaron un intercambiador catiónico para purificar a StI y StII en un estudio de su producción, de igual manera Bellomio et al. (2009), utilizaron esta técnica para la purificación de FraC a partir de la anémona marina *Actinia fragacea* lográndose su caracterización. Por su parte, Alvarado-Mesén et al. (2019) utilizaron un intercambio catiónico en la purificación de Ng. Razón por la cual en la purificación realizada de Ng para esta investigación de trabajo final de graduación se utilizó nuevamente el protocolo empleado por Alvarado-Mesén et al. (2019), obteniéndose nuevamente la proteína pura con un peso molecular de aproximadamente 20 kDa (figura 4), en las fracciones (9-22) del intercambio catiónico (figura 3).

5.2. Actividad hemolítica

La exposición de una suspensión eritrocitaria a diferentes concentraciones de Ng da como resultado la pérdida de turbidez del medio en función a la concentración de la toxina tal y como sucedió en esta investigación (figura 6). Esta pérdida de turbidez ocurre porque la toxina forma poros en la membrana de las células (eritrocitos), lo cual permite la entrada del agua y por consiguiente el incremento del volumen celular hasta un volumen crítico que hace que la célula sucumba ante un choque coloidsmótico (Alvarado-Mesén et al., 2019; Álvarez et al., 2009; Álvarez Valcárcel et al., 2022; Ros & García-Sáez, 2015).

5.3. Relación de actinoporinas y células

La comparación de la actividad de las diferentes actinoporinas permite conocer su mecanismo de acción básico. Sin embargo, el modo de acción de cada una puede variar según el entorno o las condiciones que le rodean (Ramírez-Carretero et al., 2020; Rojko et al., 2016). Debido a esto, se debe resaltar el hecho de que para una respuesta de letalidad influyen tanto la fisiología y anatomía de la anémona como del organismo atacado, es decir, aunque la proteína presente un alto poder de citólisis, en el caso de la reacción frente a un organismo como las larvas en estudio, al no ser organismos propios del ambiente marino, la respuesta podría no ser

letal (Basulto et al., 2006).

Se ha determinado que ciertas características de las membranas tienen un impacto importante sobre la unión y permeabilización de las actinoporinas, entre estas se pueden mencionar la composición lipídica y la coexistencia de la fase lipídica, así como la fluidez de la membrana (Alvarez Valcarcel et al., 2001; Palacios-Ortega et al., 2016, 2017; Pedrera et al., 2015).

Además, se ha considerado el hecho de que la actividad de esta familia de proteínas no se explique únicamente por la formación de poros, sino que podría existir relación con la generación de una red de señales bioquímicas que concluyen en ya sea muerte o supervivencia celular (Soto et al., 2017, 2018).

En porinas se han visto los mecanismos de respuesta necroptosis (Soto et al., 2018) y apoptosis (Fedorov et al., 2010) las cuales se consideran como una respuesta inmune adaptativa reclutada para asegurar la eliminación de las células dañadas y proteger el bienestar de todo el organismo (Arora et al., 2017). En el caso de la muerte celular por necroptosis se activa de forma programada de forma similar a la apoptosis, pero muestra morfológicamente las características de la necrosis (Festjens et al., 2006; Seo et al., 2021).

Normalmente los ensayos con actinoporinas son en cantidades sublétales, donde se ha observado que StII logra estimular la expresión de quinasa 1, la cual puede interactuar con receptores como (RIP1) que se relacionan con muertes reguladas de las células como necroptosis y apoptosis (Soto et al., 2018). Por otro lado, en proteínas formadoras de poros se han observado mecanismos de respuesta que no necesariamente conllevan muerte celular, Etxaniz et al., (2018), mencionan sobre la reparación de la membrana plasmática por procesos activos, dependientes de la energía, influenciados por eventos específicos de tráfico de membrana y que consideran aspectos como el tamaño del poro (pequeños de menos de 1,0 nm de diámetro hasta poros oligoméricos más de 30 nm) y la estructura secundaria del poro formado en la membrana lipídica (α -hélice/ β -barril), que puede determinar el mecanismo de reparación que se activará, o su eficiencia, en términos de velocidad. Uno de estos mecanismos es la “ectocitosis” (efectivo para poros mayores de 100 nm de diámetro), el cual consiste en el desprendimiento o expulsión de la región dañada a través de ectosomas. Primeramente, se

produce una obstrucción que aísla el área dañada de la membrana, se forma una ampolla que luego se desprende para restaurar la integridad de las membranas. En el caso de la "endocitosis" conlleva una serie de pasos secuenciales de exocitosis y endocitosis, en esta los lisosomas se fusionan con la membrana plasmática, y libera su contenido al medio extracelular, donde se encuentra la enzima lipolítica ácido esfingomielinasa (ASM), esta enzima convierte la esfingomielina de la membrana en ceramida. Este lípido parece crear una plataforma de ceramida, que en un segundo paso induce una invaginación de la membrana que promueve su ingestión.

Pedrerá et al. (2023), señalan que en la fluidez de la membrana puede desempeñar un papel crucial en la etapa de oligomerización y la penetración de la región N-terminal de la toxina en la membrana lipídica, ya que ambos procesos requieren el desplazamiento lateral y el reordenamiento de los componentes lipídicos. La capacidad de los lípidos para moverse lateralmente dentro de la bicapa permite la formación de oligómeros de la toxina y su inserción en la membrana, facilitando así la creación de poros necesarios para su función. La formación de poros por StI, cuando la fluidez de una membrana es alta (bajo contenido en: colesterol o ausencia del mismo, balsas lipídicas, y/o presencia de fosfolípidos insaturados) podría considerarse una estrategia eficiente para reducir el área de difusión, facilitar la oligomerización y, por lo tanto, existir una permeabilización de forma gradual. De forma contraria, si las membranas tienden a ser rígidas y menos fluidas muestran que pueden o no estar permeabilizadas (mecanismo de "todo o nada"), ya que la eficacia es menor en eventos de unión y difusión, pero la eficiencia aumenta ya que estabiliza el estado abierto de los pocos poros que se forman, contrario a membranas de alta fluidez que favorecen tanto la formación como la disrupción dinámica de estructuras oligoméricas y la prevalencia de poros de corta duración.

Ya es conocido que al menos la SM es requerida para que las actinoporinas puedan interactuar con una membrana. Por esta razón se ha visto interacción con membranas modelo que carecen de componentes no lipídicos y el hecho de que la incubación con SM, o la eliminación de SM de los eritrocitos con esfingomielinasa, es capaz de inhibir su acción. No obstante, la unión de la actinoporina y la bicapa no garantiza la permeabilización aun con la presencia de SM en la membrana puesto que también hay otros factores a considerar. Entre estos factores están la presencia de colesterol puede ayudar a la actividad de permeabilización,

modificando la fluidez y compacidad de la bicapa, además la red interfacial, con las interacciones moleculares en la interfaz entre la actinoporina y la bicapa lipídica de la membrana celular, donde concierne a la estabilización de los poros formados relacionado SM, los enlaces de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals (Álvarez Valcárcel et al., 2022; Palacios-Ortega et al., 2016, 2019, 2021).

La detección de actividad larvicida en StI y no en Ng, según los resultados de este estudio, nos demuestra que leves cambios en la estructura de una proteína (en este caso estructura primaria) puede tener efectos importantes en la función de la misma. Esta premisa se puede desprender de la comparación entre las actividades citolíticas de StI y StII, dos isoformas de una actinoporina de la anémona *Stichodactyla helianthus* donde, aunque teniendo una alta similitud (99%) y una identidad de 93%, StII es alrededor de seis veces más potente que StI sobre eritrocitos humanos (Álvarez et al., 2009).

En el caso de Ng y StI, un alineamiento de secuencias permitió determinar que tienen una similitud de 79.1% y una identidad de 63.3% (figura 8). A pesar de lo anterior, la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de la superposición de las estructuras de modelos tridimensionales (3D) de estas dos toxinas (figura 9) es de 0.418 angstroms, siendo estructuras muy similares. Los análisis de actinoporinas, como Eqt II, Fra C, St I y St II, revelan estructuras primarias y terciarias altamente conservadas. En su estructura terciaria, presentan un dominio único compuesto por un β -sandwich, con dos hojas β formadas por cinco hebras β cada una, conectadas por bucles, y flanqueadas por dos α -hélices, una de ellas próxima a la región N-terminal. Además, se han realizado comparaciones estructurales utilizando FraC como referencia. Los valores RMSD muestran variaciones en la superposición estructural; por ejemplo, Stn I exhibe un RMSD de 1.208 Å, Stn II de 0.483 Å, Eqt II de 0.401 Å y GigIV de 0.422 Å, en comparación con FraC. Estas diferencias sutiles sugieren que, a pesar de las similitudes, las actinoporinas pueden presentar variaciones relevantes para sus funciones biológicas específicas (Ramírez-Carretero et al., 2020).

6. Conclusiones

La orientación selectiva de las actinoporinas por componentes específicos de las membranas tales como la SM y la dependencia de la actividad de estas toxinas en función de las propiedades fisicoquímicas de la bicapa lipídica es un factor determinante principalmente para su potente actividad citolítica tanto ante células diana (como eritrocitos, leucocitos y varios tipos de células nucleadas) como ante las presas de las anemonas de mar. Sin embargo, no necesariamente la respuesta de todas actinoporinas es de letalidad ante un mismo organismo, tal y como se demostró en el estudio actual en el cual StI tiene un efecto letal sobre larvas de Culícidos, pero Ng no lo tiene.

La capacidad de reproducir metodologías de extracción, purificación y cuantificación de nigrelisina confirma la efectividad de estos procedimientos, ya que se obtuvieron resultados coherentes y una actividad muy similar a ensayos previos.

Los ensayos realizados con la actinoporina nigrelisina bajo condiciones específicas no mostraron un efecto de letalidad. Sin embargo, el uso en paralelo de una segunda actinoporina (en este caso esticolisina I) comprobó la posibilidad de letalidad sobre las larvas de la familia Culicidae y por ende permitió conocer la dosis letal media de esta toxina sobre estas larvas.

La determinación de actividad larvicida de StI sobre larvas de Culicidae y ausencia de esta actividad en Ng requiere de una investigación profunda que sobrepasa la investigación realizada para este Trabajo Final de Graduación, pues se requiere determinar a nivel molecular (estudios estructurales y funcionales) por qué se da esta diferencia en la acción de estas toxinas sobre estas larvas.

7. Recomendaciones

En la actualidad, persiste una falta de comprensión sobre el mecanismo subyacente o la razón específica que desencadena una respuesta activa de la proteína en los individuos. Sin embargo, considerando la existencia del fenómeno de letalidad, se sugiere la exploración mediante el empleo de proteínas con características similares, en las cuales se puedan establecer parámetros de control más precisos, basados en diferencias previamente estudiadas. Un ejemplo de esto podría ser la utilización de isoformas de esticolisinas (StI, StII) o de Ng. No obstante, la comparación entre diversas actinoporinas podría contribuir a esclarecer o distinguir patrones específicos dentro del espectro de reacción.

Evaluar la Ng contra larvas de otra especie dentro del género *Aedes*, o en otros géneros dentro de la familia Culicidae, para determinar si su inactividad sobre *A. aegypti* también se mantiene para otras especies de mosquitos.

Dada la presencia de resultados positivos en este estudio con respecto al empleo de actinoporinas como agente letal contra larvas del género *Aedes*, se abre la posibilidad de explorar diversas áreas de aplicación. Estas áreas abarcan desde su utilización como bioinsecticidas en la agricultura hasta su aplicación como método de control de plagas en salud pública, ofreciendo un efecto garantizado bajo condiciones controladas, hasta aplicaciones biomédicas en prevención de infecciones en implantes. A pesar de la eficacia encontrada en estas proteínas, es imperativo destacar la importancia de comprender el mecanismo de reacción subyacente y definir las condiciones mínimas para su funcionalidad. Este enfoque permitiría evaluar la rentabilidad y eficacia de las actinoporinas para futuras implicaciones o aplicaciones prácticas.

En el contexto de consideraciones prácticas, resulta crucial examinar las regulaciones pertinentes a los agentes biológicos cuando se contempla la integración de actinoporinas como herramienta de control de plagas. Este proceso asegura no solo la eficacia de dichos agentes, sino también la seguridad ambiental, y requiere una revisión detallada de los protocolos regulatorios existentes para su implementación adecuada.

8. Fuentes de Financiamiento

Esta investigación contó con el financiamiento y apoyo por parte del LBBP y LBP de la Universidad Nacional de Costa Rica.

9. Conflictos de intereses

Los participantes de esta investigación declaran que no existe conflicto de intereses en desarrollo de esta investigación.

10. Referencias bibliográficas

- Acuña, F. H., Alvarado, J., Garese, A., & Cortés, J. (2012). First record of the sea anemone *Anthopleura nigrescens* (Cnidaria: Actiniaria: Actiniidae) on the Pacific coast of Central America. *ANZIAM Journal*, 5(3), 5–7. <https://doi.org/10.1017/S175526721200022X>
- Alegre-Cebollada, J., Clementi, G., Cunietti, M., Porres, C., Oñaderra, M., Gavilanes, J. G., & Pozo, Á. M. del. (2007). Silent mutations at the 5'-end of the cDNA of actinoporins from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* allow their heterologous overproduction in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 127(2), 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.006>
- Althouse, B. M., Hanley, K. A., Diallo, M., Sall, A. A., Ba, Y., Faye, O., Diallo, D., Watts, D. M., Weaver, S. C., & Cummings, D. A. T. (2015). Impact of climate and mosquito vector abundance on sylvatic arbovirus circulation dynamics in senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(1), 88–97. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0617>
- Alvarado-Mesén, J., Solano-Campos, F., Canet, L., Pedrera, L., Hervis, Y. P., Soto, C., Borbón, H., Lanio, M. E., Lomonte, B., Valle, A., & Alvarez, C. (2019). Cloning, purification and characterization of nigrelysin, a novel actinoporin from the sea anemone *Anthopleura nigrescens*. *Biochimie*, 156, 206–223. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.013>
- Alvarado, J., Álvarez, Y., Pedrera, L., Ros, U., Lanio, M. E., Valle, A., & Álvarez, C. (2014).

- Isolation and partial purification of a hemolytic sphingomyelin-inhibitable fraction from the sea anemone *Anthopleura nigrescens*. *Biotechnologia Aplicada*, 31(1), 53–56.
- Álvarez, C., Mancheño, J. M., Martínez, D., Tejuca, M., Pazos, F., & Lanio, M. E. (2009). Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: Their interaction with membranes. *Toxicon*, 54(8), 1135–1147. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.022>
- Alvarez Valcarcel, C., Dalla Serra, M., Potrich, C., Bernhart, I., Tejuca, M., Martinez, D., Pazos, F., Lanio, M. E., & Menestrina, G. (2001). Effects of lipid composition on membrane permeabilization by Sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophysical Journal*, 80(6), 2761–2774. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(01\)76244-3](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(01)76244-3)
- Álvarez Valcárcel, C., Pedrera Puentes, L., Soto Febles, C., Alvarado Mesén, J., Ros Quincoces, U., Lanio Ruíz, M., Valle Garay, A., Fanani, M., Pazos Santos, F., Valiente Flores, P., Hernández Vázquez, A., & Hervis Valdés, Y. (2022). La unión y formación de poros de las actinoporinas están determinadas por las propiedades fisicoquímicas de la membrana. *Anales de La Academia de Ciencias de Cuba*, 12(2).
- Amer, A., & Mehlhorn, H. (2006). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research*, 99(4), 466–472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00436-006-0182-3>
- Anderluh, G., & Maček, P. (2002). Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon*, 40, 111–124. <https://doi.org/10.2514/1.38440>
- Anderluh, G., Razpotnik, A., Podlesek, Z., Maček, P., Separovic, F., & Norton, R. S. (2005). Interaction of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II with model membranes: 19F NMR studies. *Journal of Molecular Biology*, 347(1), 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.058>
- Antonini, V., Pérez-Barzaga, V., Bampi, S., Pentón, D., Martínez, D., Serra, M. D., & Tejuca, M. (2014). Functional characterization of sticholysin I and W111C mutant reveals the sequence of the actinoporin's pore assembly. *PLoS ONE*, 9(10), e110824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110824>
- Arora, D., Sharma, P. K., Siddiqui, M. H., & Shukla, Y. (2017). Necroptosis: Modules and molecular switches with therapeutic implications. *Biochimie*, 137, 35–45.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.02.015>

- Barraviera, B. (1997). Artigo de Opinião Artigo de Opinião. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(5), 417–420. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0037-86821997000500014>
- Basulto, P., PEREZ, V., Noa, Y., Varela, C., Otero, A. J., & Pico, M. C. (2006). Immunohistochemical Targeting of Sea Anemone Cytolysins on Tentacles, Mesenteric Filaments and Isolated Nematocysts of *Stichodactyla helianthus*. *Journal of Experimental Zoology Part A-Comparative Experimental Biology*, 305A(10), 883–889. <https://doi.org/10.1002/jez.a>
- Bellomio, A., Morante, K., Barlič, A., Gutiérrez-Aguirre, I., Viguera, A. R., & González-Mañas, J. M. (2009). Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*. *Toxicon*, 54(6), 869–880. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.022>
- Benedict, M. Q., Levine, R. S., Hawley, W. A., & Lounibos, L. P. (2007). Spread of the tiger: Global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(1), 76–85. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0562>
- Benelli, G. (2015). Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review. *Parasitology Research*, 114(9), 3201–3212. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4656-z>
- Benelli, G., Jeffries, C. L., & Walker, T. (2016). Biological control of mosquito vectors: Past, present, and future. *Insects*, 7(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/insects7040052>
- Beserra, E. B., Castro Jr., F. P. de, Santos, J. W. dos, Santos, T. da S., & Fernandes, C. R. M. (2006). Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*, 35(6), 853–860. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2006000600021>
- Beserra, E. B., de Freitas, E. M., de Souza, J. T., Fernandes, C. R. M., & Santos, K. D. (2009). Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia, Sér. Zool.*, 99(3), 281–285. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/s0073-47212009000300008>
- Borbón, H., Váldez, S., Alvarado-Mesén, J., Soto, R., & Vega, I. (2016). Antimicrobial properties of sea anemone *Anthopleura nigrescens* from Pacific coast of Costa Rica. *Asian*

- Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(5), 418–421.
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.01.014>
- Bosmans, F., & Tytgat, J. (2007). Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na⁺ channels. *Toxicon*, 49(4), 550–560.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.029>
- Burks, R. L., & Lodge, D. M. (2002). Cued in: Advances and opportunities in freshwater chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 28(10), 1901–1917.
<https://doi.org/10.1023/A:1020785525081>
- Capó Martí, M. A. (2007). Toxinología clínica, alimentaria y ambiental - Miguel Andrés Capó Martí - Google Libros. In *Toxinología clínica, alimentaria y ambiental* (1ra ed., p. 7). Editorial Complutense.
https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=dbgX6q6pQjUC&oi=fnd&pg=PA7&dq=toxinologia&ots=uwRbMwvzFt&sig=0kcR4KIHgq7idTE_Wja0ecP5ss4#v=onepage&q=toxinologia&f=false
- Caridad-Moros, Z., Ferdinando, L., & Helene-Pujol, F. (2016). Emergencia del Zika en tiempos de dengue y chikungunya. *TRIBUNA DEL INVESTIGADOR*, 17(2), 27–42.
https://www.researchgate.net/profile/Leidi_Herrera/publication/317007770_tribuna_del_Investigador/links/591e0cd445851540595d9487/tribuna-del-Investigador.pdf#page=42
- Carrington, L. B., Seifert, S. N., Willits, N. H., Lambrechts, L., & Scott, T. W. (2013). Large Diurnal Temperature Fluctuations Negatively Influence *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Life-History Traits . *Journal of Medical Entomology*, 50(1), 43–51.
<https://doi.org/10.1603/me11242>
- Chandramohan, B., Murugan, K., Madhiyazhagan, P., Kovendan, K., Kumar, P. M., Panneerselvam, C., Dinesh, D., Subramaniam, J., Rajaganesh, R., Nicoletti, M., Canale, A., & Benelli, G. (2016). Neem by-products in the fight against mosquito-borne diseases: Biototoxicity of neem cake fractions towards the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(6), 472–476.
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.11.013>
- Donato, M., Soto, C., Eliana, M., Itri, R., & Alvarez, C. (2021). *Toxicon* The pore-forming activity of sticholysin I is enhanced by the presence of a phospholipid hydroperoxide in membrane. 204(September), 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.10.012>

- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., & Jijakli, M. H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, *122*(2015), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>
- Dua, V. K., Pandey, A. C., Raghavendra, K., Gupta, A., Sharma, T., & Dash, A. P. (2009). Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria Journal*, *8*(1), 2–7. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-124>
- Etxaniz, A., González-Bullón, D., Martín, C., & Ostolaza, H. (2018). Membrane repair mechanisms against permeabilization by pore-forming toxins. *Toxins*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/toxins10060234>
- Farajollahi, A., & Nelder, M. P. (2009). Changes in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations in New Jersey and Implications for Arbovirus Transmission. *Journal of Medical Entomology*, *46*(5), 1220–1224. <https://doi.org/10.1603/033.046.0533>
- Fautin, D. G. (2011). Hexacorallians of the World. *OBIS-USA*, 1.
- Fedorov, S., Dyshlovoy, S., Monastyrnaya, M., Shubina, L., Leychenko, E., Kozlovskaya, E., Jin, J. O., Kwak, J. Y., Bode, A. M., Dong, Z., & Stonik, V. (2010). The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (= *Radianthus macrodactylus*). *Toxicon*, *55*(4), 811–817. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.016>
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1757*(9–10), 1371–1387. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.06.014>
- Frazão, B., Vasconcelos, V., & Antunes, A. (2012). Sea anemone (cnidaria, anthozoa, actiniaria) toxins: An overview. *Marine Drugs*, *10*(8), 1812–1851. <https://doi.org/10.3390/md10081812>
- García-Linares, S., Rivera-De-Torre, E., Morante, K., Tsumoto, K., Caaveiro, J. M. M., Gavilanes, J. G., Slotte, J. P., & Martínez-Del-Pozo, Á. (2016). Differential Effect of Membrane Composition on the Pore-Forming Ability of Four Different Sea Anemone Actinoporins. *Biochemistry*, *55*(48), 6630–6641. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01007>
- Glasser, E., Rachamim, T., Aharonovich, D., & Sher, D. (2014). Hydra actinoporin-like toxin-

- 1, an unusual hemolysin from the nematocyst venom of *Hydra magnipapillata* which belongs to an extended gene family. *Toxicon*, *91*, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.004>
- Goindin, D., Delannay, C., Ramdini, C., Gustave, J., & Fouque, F. (2015). Parity and longevity of *Aedes aegypti* according to temperatures in controlled conditions and consequences on dengue transmission risks. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135489>
- Google. (2023). *Google Colaboratory*. <https://colab.research.google.com/>
- Gould, E., Pettersson, J., Higgs, S., Charrel, R., & Lamballerie, X. De. (2017). *Emerging arboviruses : Why today ?* 4(June), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., Olivar, R., & Coronado, A. (2008). Control Biológico: Una Herramienta Para El Desarrollo Sustentable Y Sostenible. *Control Biológico - ACADEMIA – Trujillo – Venezuela*, *13*(13), 2008–2050.
- Hanada, K. (2013). Biochimica et Biophysica Acta Co-evolution of sphingomyelin and the ceramide transport protein CERT ☆. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.06.006>
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(2), 139–150. <https://doi.org/10.1038/nrm2329>
- Hernandez-Ortega. (2019). MANEJO DE LA BIODIVERSIDAD PARA LA MEJORA DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA TRABAJO. *UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE*, 1–53. [http://dspace.umh.es/bitstream/11000/5409/1/TFM Hernández Ortega%2C Inmaculada.pdf](http://dspace.umh.es/bitstream/11000/5409/1/TFM_Hernández_Ortega%2C_Inmaculada.pdf)
- Hernandez López, M. V., & Hernandez López, M. M. (2005). Redalyc.BIOACTIVOS MARINOS EN VENEZUELA: UNA REVISIÓN. *Revista Multidisciplinaria Del Consejo de Investigación de La Universidad de Oriente*, *17*(2), 188–194. <https://www.redalyc.org/pdf/4277/427739427013.pdf>
- Hinds, M. G., Zhang, W., Anderluh, G., Hansen, P. E., & Norton, R. S. (2002). Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II: Implications for pore

- formation. *Journal of Molecular Biology*, 315(5), 1219–1229. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5321>
- Huang, Y. J. S., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2017). Biological control strategies for mosquito vectors of arboviruses. *Insects*, 8(1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/insects8010021>
- Huerta, V., Morera, V., Guanche, Y., China, G., González, L. J., Betancourt, L., Martínez, D., Alvarez, C., Lanio, M. E., & Besada, V. (2001). Primary structure of two cytolysin isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity. *Toxicon*, 39(8), 1253–1256. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00247-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00247-6)
- Iacovache, I., Bischofberger, M., & van der Goot, F. G. (2010). Structure and assembly of pore-forming proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(2), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.01.013>
- Id, I. D., Vontas, J., David, J., Weetman, D., Fonseca, M., Corbel, V., Raghavendra, K., Coulibaly, M. B., Martins, J., Kasai, S., & Id, F. C. (2019). *Management of insecticide resistance in the major Aedes vectors of arboviruses: Advances and challenges*. 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007615>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohli, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kantor, I. N. (2016). Dengue, zika, chikungunya and the development of vaccines. *Medicina*, 78(1), 23–28.
- Kem, W. R., & Dunn, B. M. (1988). Separation and characterization of four different amino acid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolysin. *Toxicon*, 26(11), 997–1008. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90198-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90198-5)
- Kohno, Y., Satoh, H., Iguchi, A., & Nagai, H. (2009). Characterization of a new hemolytic protein toxin from the sea anemone *Anthopleura asiatica*. *Fisheries Science*, 75(4), 1049–1054. <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0112-2>

- Kramer, L. D., & Ebel, G. D. (2003). Dynamics of Flavivirus Infection in Mosquitoes. *Advances in Virus Research*, *60*, 187–232. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)60006-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)60006-0)
- Kraševac, N., Panevska, A., Lemež, Š., Razinger, J., Sepčić, K., Anderluh, G., Podobnik, M. (2021). Lipid-Binding Aegerolysin from Biocontrol Fungus *Beauveria bassiana*. *Toxins*, *13*(11), 820.
- Lambrechts, L., Scott, T. W., & Gubler, D. J. (2010). Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *4*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000646>
- Lanio, M. E., Morera, V., Alvarez, C., Tejuca, M., Gómez, T., Pazos, F., Besada, V., Martínez, D., Huerta, V., Padrón, G., & Chávez, M. D. L. A. (2001). Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, *39*(2–3), 187–194. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00106-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00106-9)
- Malta Varejão, J. B., Biral Dos Santos, C., Ricas Rezende, H., Carlos Bevilacqua, L. C., & Falqueto, A. (2005). Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na Cidade de Vitória, ES. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *38*(3), 238–240. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822005000300006>
- Mancheño, J. M., Martín-Benito, J., Martínez-Ripoll, M., Gavilanes, J. G., & Hermoso, J. A. (2003). Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure*, *11*(11), 1319–1328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.str.2003.09.019>
- Marín-Rodríguez, R., Marquetti-Fernández, M., Álvarez, Y., Gutiérrez-Alvarado, M., & González, R. (2009). Especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) y sus sitios de cría en la Región Huetaar Atlántica, Costa Rica. *Revista Biomédica*, *20*(1), 15–23. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v20i1.524>
- Martínez-Torres, E. (2008). The viruses of dengue and the host's response. *Estudios Avanzados*, *22*(64), 33–52.
- Mechaly, A. E., Bellomio, A., Gil-Cartón, D., Morante, K., Valle, M., González-Mañas, J. M., & Guérin, D. M. A. (2011). Structural insights into the oligomerization and architecture of eukaryotic membrane pore-forming toxins. *Structure*, *19*(2), 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.11.013>
- Meinardi, E., Florin-Christensen, M., Paratcha, G., Azcurra, J. M., y Florin-Christensen, J.

- (1995). *The molecular basis of the self/Non-self selectivity of a coelenterate toxin*. (Vol. 216, pp. 348–354). Biochemical and Biophysical Research Communications.
- Mesa-Galoso, H., Delgado-Magnero, K. H., Cabezas, S., López-Castilla, A., Hernández-González, J. E., Pedrera, L., Alvarez, C., Peter Tieleman, D., García-Sáez, A. J., Lanio, M. E., Ros, U., & Valiente, P. A. (2017). Disrupting a key hydrophobic pair in the oligomerization interface of the actinoporins impairs their pore-forming activity. *Protein Science*, 26(3), 550–565. <https://doi.org/10.1002/pro.3104>
- Ministerio de Salud Costa Rica. (17 de mayo del 2024). *Boletín Epidemiológico N°18 de 2024*. Recuperado el 10 de junio del 2024 de <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos-left/documentos-ministerio-de-salud/material-informativo/material-publicado/boletines/boletines-vigilancia-vs-enfermedades-de-transmision-vectorial/boletines-epidemiologicos-2024>
- Muthusamy, R., & Shivakumar, M. S. (2019). *Susceptibility status of Aedes aegypti (L .) (Diptera : Culicidae) to temephos from three districts of Tamil Nadu , India*. November. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.159502>
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., & Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: Una Opción Para El Control Biológico De Plagas Biopesticides: an Option for the Biological Pest Control. *Ra Ximhai*, 8(3), 17–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e2.2012.03.en>
- Navarro, J. C., del Ventura, F., Zorrilla, A., & Liria, J. (2010). Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 58(1), 245–254. <https://doi.org/10.15517/rbt.v58i1.5206>
- Newman, M. C. (2010). *Fundamentals of Ecotoxicology* (3 °Ed). CRC Press. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=sg_SBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=ecotoxicology&ots=B33YcFUfVy&sig=voVBhX_6PKtuyC6F-2q9to3c-Vk#v=onepage&q=ecotoxicology&f=false
- Okamoto, K. W., & Amarasekare, P. (2012). The biological control of disease vectors. *Journal of Theoretical Biology*, 309, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.05.020>
- Organización Mundial de Salud. (21 de diciembre de 2023). *Dengue – Situación mundial*. Recuperado el 10 de junio del 2024 de <https://www.who.int/es/emergencias/disease-outbreak-news/item/2023-DON498>

- Palacios-Ortega, J., García-Linares, S., Åstrand, M., Al Sazzad, M. A., Gavilanes, J. G., Martínez-Del-Pozo, Á., & Slotte, J. P. (2016). Regulation of Sticholysin II-Induced Pore Formation by Lipid Bilayer Composition, Phase State, and Interfacial Properties. *Langmuir*, 32(14), 3476–3484. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00082>
- Palacios-Ortega, J., García-Linares, S., Rivera-de-Torre, E., Gavilanes, J. G., Martínez-del-Pozo, Á., & Slotte, J. P. (2019). Sticholysin, Sphingomyelin, and Cholesterol: A Closer Look at a Tripartite Interaction. *Biophysical Journal*, 116(12), 2253–2265. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.05.010>
- Palacios-Ortega, J., García-Linares, S., Rivera-De-Torre, E., Gavilanes, J. G., Martínez-Del-Pozo, Á., & Slotte, J. P. (2017). Differential Effect of Bilayer Thickness on Sticholysin Activity. *Langmuir*, 33(41), 11018–11027. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01765>
- Palacios-Ortega, J., García-Linares, S., Rivera-de-Torre, E., Heras-Márquez, D., Gavilanes, J. G., Slotte, J. P., & Martínez-del-Pozo, Á. (2021). Structural foundations of sticholysin functionality. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1869(10). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140696>
- Paredes, D., Campos, M., & Cayuela, L. (2013). El control biológico de plagas de artrópodos por conservación: técnicas y estado del arte. *Ecosistemas*, 22(1), 56–61. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2013.22-1.10>
- Paul M. Muchinsky. (2012). Sea Anemone Toxins Affecting Potassium Channels. In S. Diochot & M. Lazdunski (Eds.), *Psychology Applied to Work: An Introduction to Industrial and Organizational Psychology, Tenth Edition Paul* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-540-87895-7>
- Pedrerá, L., Fanani, M. L., Ros, U., Lanio, M. E., Maggio, B., & Álvarez, C. (2014). Sticholysin I-membrane interaction: An interplay between the presence of sphingomyelin and membrane fluidity. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(7), 1752–1759. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.03.011>
- Pedrerá, L., Gomide, A. B., Sánchez, R. E., Ros, U., Wilke, N., Pazos, F., Lanio, M. E., Itri, R., Fanani, M. L., & Alvarez, C. (2015). The Presence of Sterols Favors Sticholysin I-Membrane Association and Pore Formation Regardless of Their Ability to Form Laterally Segregated Domains. *Langmuir*, 31(36), 9911–9923. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01687>

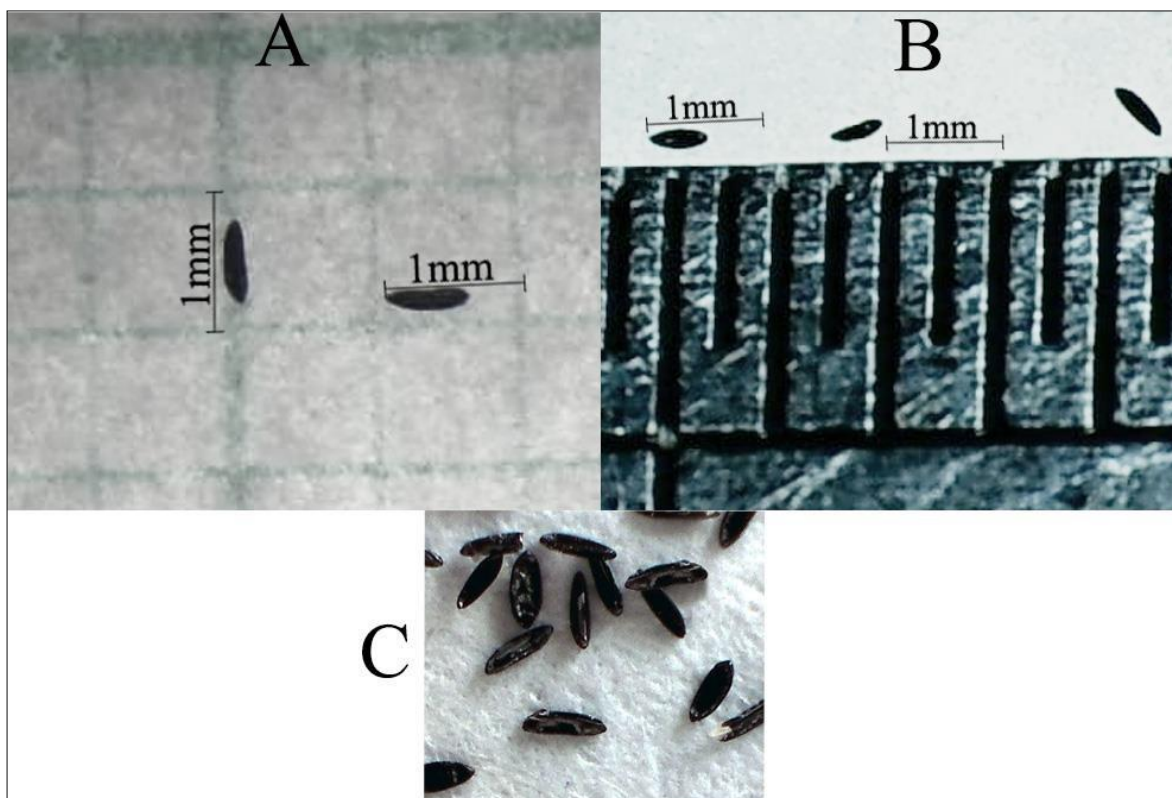
- Pedreira, L., Ros, U., Fanani, M. L., Lanio, M. E., Epand, R. M., García-Sáez, A. J., & Álvarez, C. (2023). The Important Role of Membrane Fluidity on the Lytic Mechanism of the α -Pore-Forming Toxin Sticholysin I. *Toxins*, *15*(1). <https://doi.org/10.3390/toxins15010080>
- Pentón, D., Pérez-Barzaga, V., Díaz, I., Reytor, M. L., Campos, J., Fando, R., Calvo, L., Cilli, E. M., Morera, V., Castellanos-Serra, L. R., Pazos, F., Lanio, M. E., Álvarez, C., Pons, T., & Tejuca, M. (2011). Validation of a mutant of the pore-forming toxin sticholysin-I for the construction of proteinase-activated immunotoxins. *Protein Engineering, Design and Selection*, *24*(6), 485–493. <https://doi.org/10.1093/protein/gzr002>
- Perera, R., Riley, C., Isaac, G., Hopf-Jannasch, A. S., Moore, R. J., Weitz, K. W., Pasa-Tolic, L., Metz, T. O., Adamec, J., & Kuhn, R. J. (2012). Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells. *PLoS Pathogens*, *8*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002584>
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, *30*(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
- Quesada, A. J., Acuña, F. H., & Cortés, J. (2014). Diet of the sea anemone *Anthopleura nigrescens*: composition and variation between daytime and nighttime high tides. *Zoological Studies*, *53*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40555-014-0026-2>
- Ramírez-Carretero, S., Miranda-Zaragoza, B., & Rodríguez-Almazán, C. (2020). Actinoporins: From the structure and function to the generation of biotechnological and therapeutic tools. *Biomolecules*, *10*(4). <https://doi.org/10.3390/biom10040539>
- Reiter, P., Fontenille, D., & Paupy, C. (2006). *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? *Lancet Infectious Diseases*, *6*(8), 463–464. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70531-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70531-X)
- Rey, J. R., & Lounibos, P. (2015). Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión de enfermedades. *Biomédica*, *35*, 177–185. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2514>
- Rivera-de-Torre, E., García-Linares, S., Alegre-Cebollada, J., Lacadena, J., Gavilanes, J. G., & Martínez-del-Pozo, Á. (2016). Synergistic action of actinoporin isoforms from the same sea anemone species assembled into functionally active heteropores. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(27), 14109–14119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.710491>

- Rivera-de-Torre, E., Palacios-Ortega, J., Garb, J. E., Slotte, J. P., Gavilanes, J. G., & Martínez-del-Pozo, Á. (2020). Structural and functional characterization of sticholysin III: A newly discovered actinoporin within the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 689(April), 108435. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108435>
- Rojko, N., Dalla Serra, M., Maček, P., & Anderluh, G. (2016). Pore formation by actinoporins, cytolysins from sea anemones. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(3), 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.09.007>
- Rojko, N., Kristan, K. Č., Viero, G., Žerovnik, E., Maček, P., Dalla Serra, M., & Anderluh, G. (2013). Membrane damage by an α -helical pore-forming protein, equinatoxin II, proceeds through a succession of ordered steps. *Journal of Biological Chemistry*, 288(33), 23704–23715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.481572>
- Ros, U., & García-Sáez, A. J. (2015). More Than a Pore: The Interplay of Pore-Forming Proteins and Lipid Membranes. *Journal of Membrane Biology*, 248(3), 545–561. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9820-y>
- Ruiz, N., Rincón, G. A., Julio Parra, H., & Edward Duque, J. (2018). Dinámica de oviposición de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae), estado gonadotrófico y coexistencia con otros culícidos en el área Metropolitana de Bucaramanga, Colombia. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 50(4), 308–319. <https://doi.org/10.18273/revsal.v50n4-2018004>
- Seo, J., Nam, Y. W., Kim, S., Oh, D. B., & Song, J. (2021). Necroptosis molecular mechanisms: Recent findings regarding novel necroptosis regulators. *Experimental and Molecular Medicine*, 53(6), 1007–1017. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00634-7>
- Sher, D., Knebel, A., Bsor, T., Neshor, N., Tal, T., Morgenstern, D., Cohen, E., Fishman, Y., & Zlotkin, E. (2005). Toxic polypeptides of the hydra - A bioinformatic approach to cnidarian allomones. *Toxicon*, 45(7), 865–879. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.004>
- Soto, C., Bergado, G., Blanco, R., Griñán, T., Rodríguez, H., Ros, U., Pazos, F., Lanio, M. E., Hernández, A. M., & Álvarez, C. (2018). Sticholysin II-mediated cytotoxicity involves the activation of regulated intracellular responses that anticipates cell death. *Biochimie*, 148, 18–35. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.02.006>
- Soto, C., del Valle, A., Valiente, P. A., Ros, U., Lanio, M. E., Hernández, A. M., & Alvarez, C.

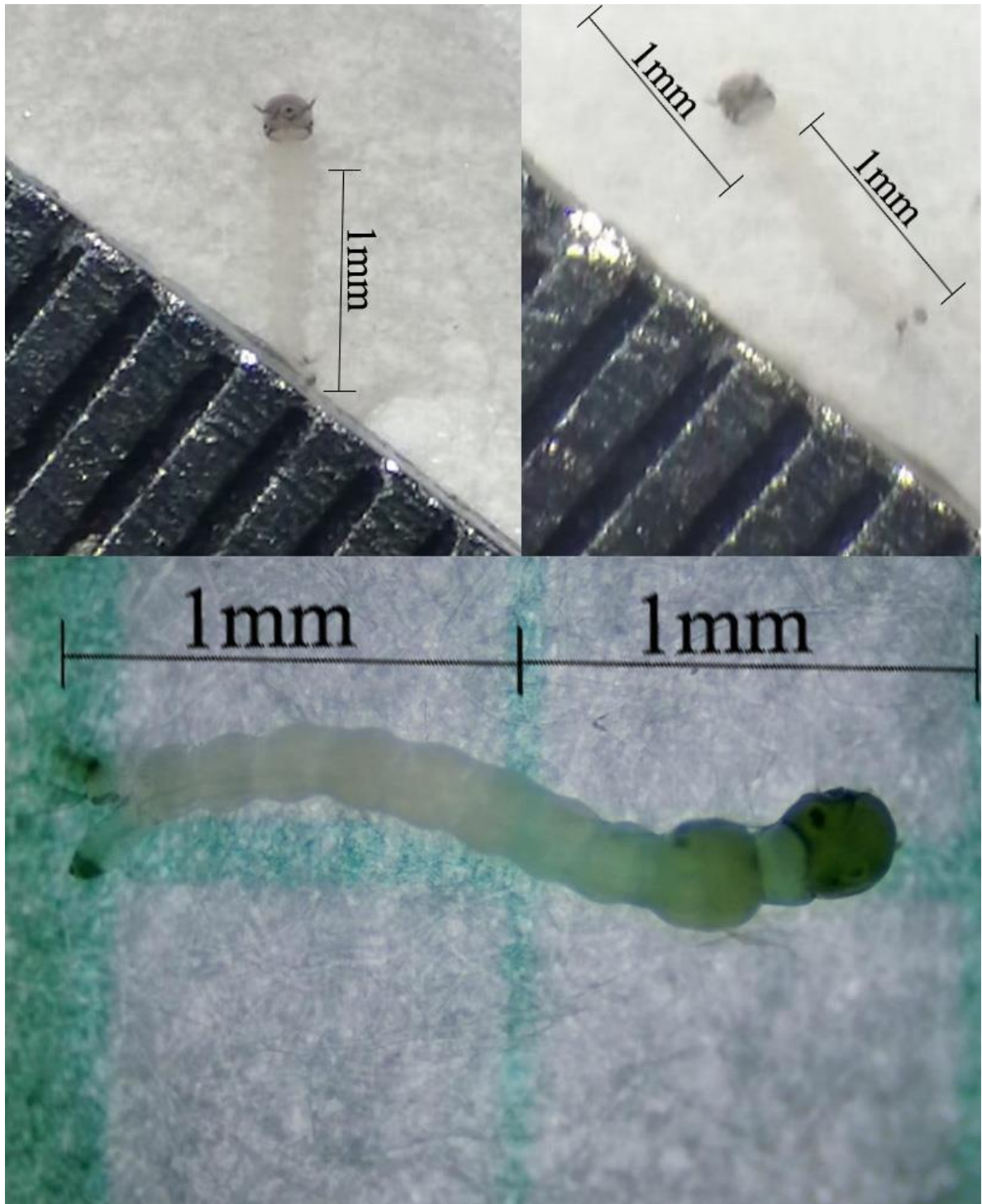
- (2017). Differential binding and activity of the pore-forming toxin sticholysin II in model membranes containing diverse ceramide-derived lipids. *Biochimie*, 138, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.04.003>
- Souza-neto, J. A., Powell, J. R., & Bonizzoni, M. (2019). Infection , Genetics and Evolution *Aedes aegypti* vector competence studies : A review. *Infection, Genetics and Evolution*, 67(September 2018), 191–209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>
- Strode, C., Donegan, S., Garner, P., Enayati, A. A., & Hemingway, J. (2014). The Impact of Pyrethroid Resistance on the Efficacy of Insecticide-Treated Bed Nets against African Anopheline Mosquitoes : Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS Medicine*. 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001619>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Sumitha, M. K., Kalimuthu, M., Senthil, M. K., Paramasivan, R., Kumar, A., & Gupta, B. (2023). Status of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in India : A review. June, 116–124.
- Tanaka, K., Caaveiro, J. M. M., Morante, K., González-Manãs, J. M., & Tsumoto, K. (2015). Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nature Communications*, 6, 4–6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7337>
- Tanaka, K., Caaveiro, J. M. M., Morante, K., & Tsumoto, K. (2017). Haemolytic actinoporins interact with carbohydrates using their lipid-binding module. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1726). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0216>
- Tejuca, M., Pazos, F., Álvarez, C., & Lanio, M. E. (2009). Construction of sea anemone cytolsin-based immunotoxins for selective killing of cancer cells. *Revista Cubana de Física*. 26(1), 15–22.
- Thomas, M. B. (2018). Biological control of human disease vectors: a perspective on challenges and opportunities. *BioControl*, 63(1), 61–69. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9815-y>
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2), 328–345. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
- Wilson, A. L., Courtenay, O., Kelly-Hope, L. A., Scott, T. W., Takken, W., Torr, S. J., &

- Lindsay, S. W. (2020). The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007831>
- Zardkoohi, A., Castañeda, D., Castillo, C., Lol, J. C., Lopez, F., Rodriguez, R. M., & Padilla, N. (2019). Co-occurrence of kdr mutations V1016I and F1534C in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Costa Rica. *BioRxiv*, 5–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/704767>
- Zrzavý, J., & Štys, P. (1997). The basic body plan of arthropods: Insights from evolutionary morphology and developmental biology. *Journal of Evolutionary Biology*, *10*(3), 353–367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1997.10030353.x>

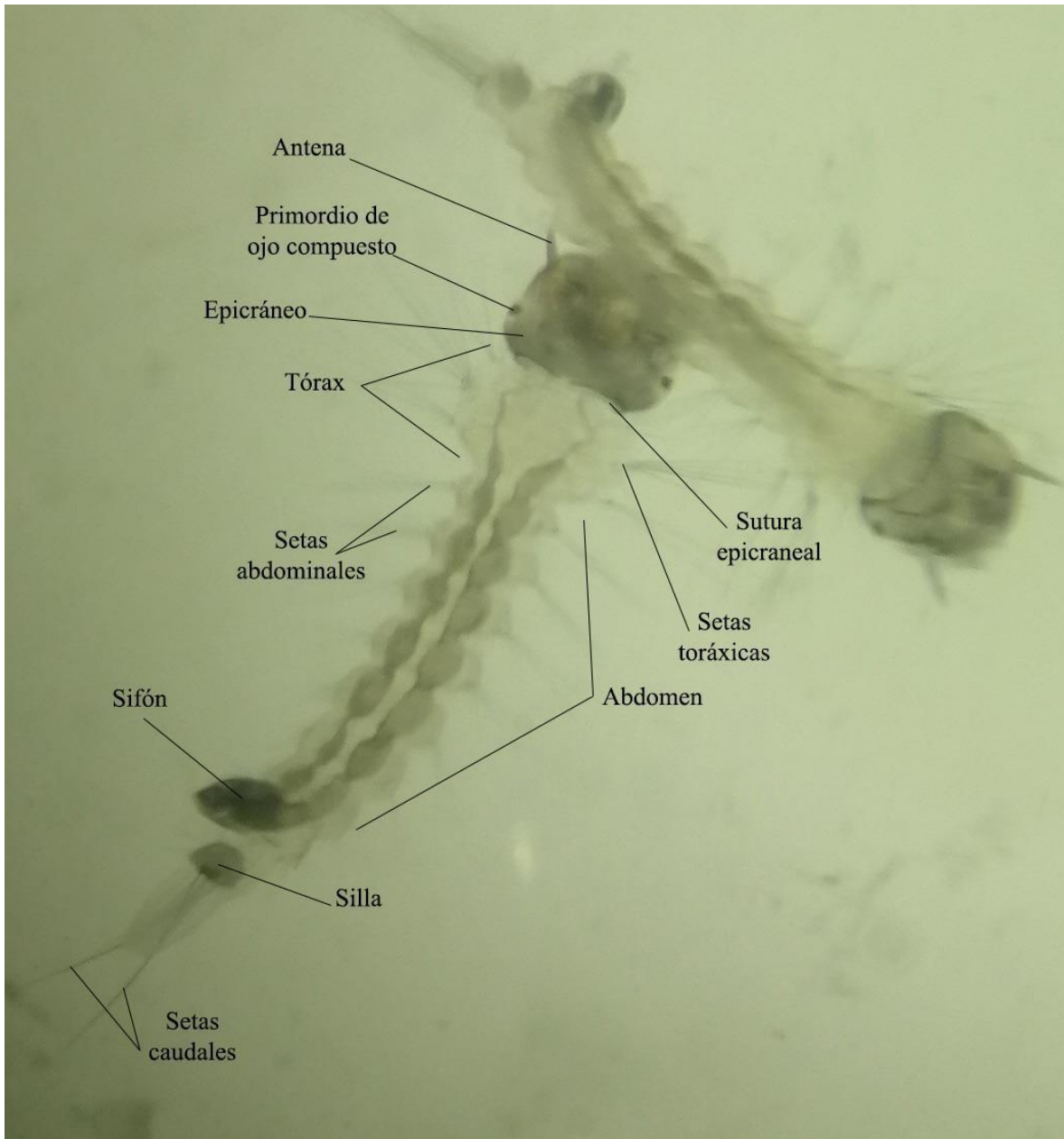
11. Anexos



Anexo 1. Medición de huevos de culícidos (A y B), caracterizados por su pequeño tamaño, con un rango aproximado de 0.5 – 1 mm de longitud, alargados y generalmente de color oscuro o negro. Su forma es ovalada, y su superficie suele presentar una apariencia rugosa ©, características que son esenciales para su identificación y estudio en el contexto de la investigación (fotografía obtenida utilizando un Microscopio Olympus SZX7).



Anexo 2. Medición de larvas: en la imagen se observan larvas que se encuentran entre las fases instar 1 y 2, que se caracterizan por tener una longitud que oscila entre aproximadamente 1 y 2 mm. Durante estas etapas, ya se pueden observar algunas de sus características anatómicas clave, lo que es fundamental para el estudio y comprensión de la biología de estos mosquitos (fotografía obtenida utilizando un Microscopio Olympus SZX7).



Anexo 3. Descripción anatómica y estructurales de las larvas de culícidos, esto incluye una cabeza con órganos sensoriales y apéndices, un tórax con setas y sifones, un abdomen que alberga el tracto digestivo y otros órganos internos, y sifones respiratorios. Esta descripción tiene como objetivo proporcionar una comprensión fundamental de la estructura corporal de las larvas de Culicidae en el contexto de la investigación y su relevancia para la ecología y el ciclo de vida de estos mosquitos (fotografía obtenida utilizando un Microscopio Olympus SZX7).