



UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

Modelamiento *in silico* de la proteína fluorescente GFP activada post blanqueamiento en el género *Acropora*.

TRABAJO PRÁCTICO

Previo a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

AUTOR:

NICOLLE ALEJANDRA BAUTISTA RAMOS

TUTOR:

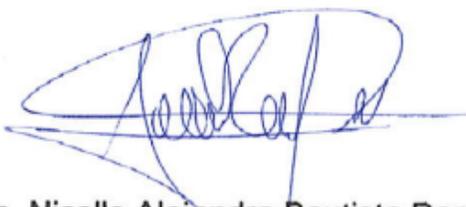
BLGA. JANETH GALARZA TIPÁN PhD.

La Libertad – Ecuador

2022

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los datos, ideas y resultados expresados en este trabajo de investigación le corresponde exclusivamente al autor y el patrimonio intelectual a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Nicolle Alejandra Bautista Ramos', written over a horizontal line.

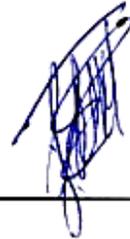
Srta. Nicolle Alejandra Bautista Ramos

C.I. 1724640279

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Blgo. Richard Duque Marín, Mgt.
DECANO DE LA FACULTAD
CIENCIAS DEL MAR

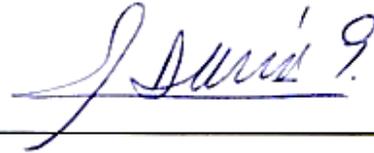


Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.
DIRECTOR DE LA CARRERA DE
BIOLOGÍA



Firmado electrónicamente por:
**ISABEL JANETH
GALARZA TIPAN**

Blga. Janeth Galarza Tipán, PH.D.
DOCENTE TUTOR



Blga. Erika Salavarría Palma, PH.D.
DOCENTE DE ÁREA

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	i
DEDICATORIA.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. OBJETIVOS	3
3.1. Objetivo General	3
3.2. Objetivos Específicos.....	3
4. METODOLOGÍA	4
4.1. Obtención de secuencia de la proteína GFP	4
4.2. Análisis de composición aminoacídica.....	4
4.3. Alineamiento de secuencias de la proteína GFP presente en diferentes especies del género <i>Acropora</i>	4
4.4. Modelamiento <i>in silico</i> de proteína GFP	5
4.5. Cascada de señalización.....	5
5. MARCO TEÓRICO.....	7
5.1. Rangos medio circundante en arrecifes coralinos	7
5.2. Relación simbiótica coral anfitrión – dinoflagelado	7
5.3. Fisiología del coral anfitrión ante eventos estresantes.....	8
5.4. Superfamilia GFP	9
5.5. Proteína GFP	10
6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	11
6.1. Análisis de composición aminoacídica de la proteína GFP del género <i>Acropora</i>	11
6.2. Similitud de secuencias entre diferentes especies del género <i>Acropora</i>	12
6.3. Modelamiento <i>in silico</i> de la proteína GFP	14
6.4. Cascadas de señalización	17
7. CONCLUSIONES.....	21
8. BIBLIOGRAFÍA.....	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Descripción de composición aminoacídica contenida en la secuencia de la proteína GFP.....	17
---	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Histograma de aminoácidos hallados en proteína GFP.....	19
Gráfico 2: Porcentaje de coberturas GFP en diferentes especies de Acropora.....	19
Gráfico 3: Porcentaje de identidad GFP en diferentes especies de Acropora	20
Gráfico 4: Construcción del modelamiento <i>in silico</i> de proteína GFP	21
Gráfico 5: Alineamiento de la secuencia molde con la plantilla de la proteína GFP.	22
Gráfico 6: Modelamiento <i>in silico</i> de la proteína GFP en el género Acropora	23
Gráfico 7: Dominio de la proteína GFP	23
Gráfico 8: Estructura química cromóforo proteína GFP	24
Gráfico 9: Fenómeno de blanqueamiento de corales	25
Gráfico 10: Análisis proteómico de la respuesta de Acropora palmata al blanqueamiento	25
Gráfico 11: Cascada de señalización de la proteína GFP en Acropora sp	27

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por sus infinitas bendiciones y sabiduría en mi travesía a lo largo de estos 5 años de desarrollo profesional, ético y humano.

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena por brindarme una excelente formación profesional, técnica y científica a través de sus docentes altamente calificados; agradezco de manera especial sus loables enseñanzas y labor humana.

A mi querida Facultad Ciencias del Mar que, más allá de brindar un espacio educativo representa para muchos estudiantes de provincia como yo, un hogar.

A la Blga. Jeaneth Galarza por impulsar mis intereses académicos al campo biotecnológico y acompañar el desarrollo de este trabajo con su compromiso profesional y humano.

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado especialmente a mi madre, Marilin Ramos mujer ejemplar, incondicional en cada batalla y confort en cada caída, madrecita la culminación de mi formación académica es nuestra victoria más deseada desde el día que salí de casa. A mi padre, mi hermana y mi sobrina por ser mi pilar fundamental y aliento en todo momento, sus enseñanzas me han impulsado desde el primer día a dar mi mejor esfuerzo.

A mis mujeres eternas María A. Guerrero (+), Beatriz Ramos (+), Angela Ramos (+), Ximena Egas (+) sus infinitas bendiciones las llevé siempre en mi corazón, elevo mi felicidad al cielo al culminar esta etapa y las abrazo con mi alma.

A los amigos que se convirtieron en mi pequeña familia foránea en la península, con quienes compartí tantas aventuras, alegrías y tristezas, lo logramos muchachos que orgullo llamarnos finalmente Biólogos Marinos.

RESUMEN

En nuestro país son escasos los estudios bioinformáticos dedicados a la descripción funcional de proteínas de interés en procesos ecológicos importantes para el equilibrio ecosistémico. El presente estudio fue esencialmente una revisión bibliográfica de carácter aplicativo donde caracterizamos la proteína fluorescente GFP mediante simulación de distintos software bioinformáticos dada su activación organismos del género *Acropora* obteniendo así mayor entendimiento del fenómeno fluorescente. Los estudios moleculares basados en modelamientos *in silico* pueden acercarnos a resultados reales esperados en experimentaciones *in vivo* al simular con gran exactitud diversos mecanismos moleculares a celulares de señalización biológica. En este estudio se obtuvo la secuencia codificante para la proteína GFP en el género *Acropora* desde el GenBank, así como la similitud y cobertura de la misma por medio de la herramienta BLAST. El análisis de aminoácidos se realizó en BioEdit, para su modelamiento se ingresó dicha secuencia en el servidor Swiss Model obteniendo una estructura en 3D que fue analizada en el software RasWin. A partir del análisis bibliográfico adicional a la información recabada con los softwares bioinformáticos se realizó una cascada de señalización biológica de los mecanismos llevados a cabo en el organismo incidentes para la activación de la proteína. Identificamos una alta similitud entre los organismos seleccionados para alineamiento y cobertura con relación directa al único dominio de fluorescencia presentado en la proteína GFP que representa un 90% de su secuencia de aminoácidos. El modelamiento arrojó datos de identidad secuencial de 97,05%, con una resolución de 1,80 Å, GMQE de 0.95 y QMEANDisCo de 0.91; indicios de alta calidad y confianza del modelo. A partir de su estructura en la cascada de señalización biológica se logró comparar lo descrito por varios autores donde dicho fenómeno activa su función fotoprotectora y antioxidante suplementario siendo un indicador clave del estrés oxidativo desencadenado a nivel molecular en los tejidos del organismo por alteraciones en los rangos aceptables de las condiciones físico – químicas de su medio circundante.

Palabras clave: Bioinformática, Modelamiento *in silico*, Proteína GFP, Blanqueamiento.

ABSTRACT

In our country there are few bioinformatic studies dedicated to the functional description of proteins of interest in important ecological processes for ecosystem balance. The present study was essentially a bibliographic review of an applicative nature where we characterized the fluorescent protein GFP by means of simulation of different bioinformatic software given its activation by organisms of the genus *Acropora*, thus obtaining a greater understanding of the fluorescent phenomenon. Molecular studies based on *in silico* modeling can bring us closer to the real results expected in *in vivo* experiments by simulating with great accuracy various molecular and cellular mechanisms of biological signaling. In this study, the coding sequence for the GFP protein in the genus *Acropora* was obtained from GenBank, as well as its similarity and coverage using the BLAST tool. The amino acid analysis was performed in BioEdit, for its modeling said sequence was entered in the Swiss Model server, obtaining a 3D structure that was analyzed in the RasWin software. From the bibliographical analysis additional to the information collected with the bioinformatic software, a biological signaling cascade of the mechanisms carried out in the incident organism for the activation of the protein was carried out. We identified a high similarity between the selected organisms for alignment and coverage in direct relation to the only fluorescence domain presented in the GFP protein that represents 90% of its amino acid sequence. The modeling yielded sequence identity data of 97.05%, with a resolution of 1.80 Å, GMQE of 0.95 and QMEANDisCo of 0.91; indications of high quality and confidence of the model. Based on its structure in the biological signaling cascade, it was possible to compare what was described by several authors where said phenomenon activates its photoprotective and supplementary antioxidant function, being a key indicator of oxidative stress triggered at the molecular level in the body's tissues by alterations in the ranges acceptable physical-chemical conditions of its surrounding environment.

Keywords: Bioinformatics, *In silico* modeling, GFP protein, Bleaching.

1. INTRODUCCIÓN

La Bioinformática es un campo de las ciencias computacionales que se encarga de procesar información acerca de secuencias moleculares biológicas aplicada a genes, ADN, ARN, o proteínas. Es eficiente en la comparación de patrones en secuencias génicas y proteicas de diferentes organismos, de este modo se puede establecer relaciones filogenéticas y descripciones de la funcionalidad de dichos genes y proteínas, (National Human Genome Research Institute, 2021).

El modelamiento *in silico* presenta ante el investigador una gran ventaja al incluir una variedad casi ilimitada de evaluación de parámetros al organismo de interés (Colquit et al., 2011). Logrando así que sus resultados sean mayormente aplicables al reducir los costes de un estudio en laboratorio, así como las implicaciones éticas que conllevarían el control de las variables; en el campo ecológico podemos estudiar diversos fenómenos biológicos ante la exposición de escenarios desafiantes como los que vivimos actualmente.

El cambio climático afecta la dinámica de los océanos de diversas maneras, principalmente la sinergia entre los parámetros del medio y los organismos que allí habitan, así como a los servicios ecosistémicos que proporcionan a la humanidad. Uno de los ecosistemas afectados son los arrecifes de coral que, están sufriendo pérdidas en su abundancia debido a la frecuencia y extensión de eventos de blanqueamiento. En los cuales, debido al aumento de la temperatura del agua de mar, incluso ligeramente por encima de los máximos a largo plazo, se da una ruptura de la relación simbiótica entre los corales hospedadores y sus dinoflagelados fotosintéticos intracelulares de la familia Symbiodiniaceae. Debido a que estos simbioses proporcionan la mayor parte de la energía requerida por el coral anfitrión, períodos prolongados de blanqueamiento pueden eventualmente conducir a la muerte de la colonia, (Fuller et al., 2020). La fluorescencia de los organismos autótrofos es utilizada para medir la eficiencia de un organismo fotosintético con el estrés ambiental o artificial que se genere en su entorno, GFP es una proteína de respuesta al estrés en los corales puede usarse como un marcador sensible del estrés por calor dado que la disminución de la expresión génica precede al daño del fotosistema II de los simbioses de algas.

2. JUSTIFICACIÓN

La alteración de los rangos establecidos de parámetros físico – químicos en el medio marino por el cambio climático representan una gran amenaza para el equilibrio sobre el cual se basa el funcionamiento, la productividad y la biodiversidad de los ecosistemas coralinos; los eventos de desprendimiento de zooxantelas y blanqueamiento del coral crean altas tasas de mortalidad y pérdida de numerosas áreas de arrecifes coralinos de gran importancia a nivel ecológico en los ecosistemas marino costeros. Diversos autores describen un fenómeno fluorescente presentado en corales del género *Acropora* a nivel mundial post blanqueamiento en el cual se activan pigmentos fotoprotectores del huésped dada la pérdida del simbiote. Una descripción minuciosa de los mecanismos moleculares a celulares originados en el tejido del huésped nos brinda grandes oportunidades en la conservación (tomando en cuenta la importancia del tiempo de recuperación) de estos ecosistemas esenciales en el equilibrio biótico del medio marino.

Los estudios moleculares basados en modelamientos *in silico* pueden acercarnos a resultados reales esperados en experimentaciones *in vivo* por lo cual reducen costes de personal, reactivos, equipos especializados y tiempo en laboratorio al brindarnos un acercamiento a procesos de alta complejidad dados naturalmente a nivel molecular en nuestro organismo de interés.

En nuestro estudio se tomó en consideración al género *Acropora* por su gran importancia ecológica como organismo formador de arrecife, así como su presencia en parches coralinos de las costas ecuatorianas y adicional al ser identificado dentro de los géneros que han presentado este fenómeno fluorescente de acuerdo a los estudios realizados por diversos autores en los últimos 10 años

Mediante diversas herramientas bioinformáticas especializadas podemos obtener un claro entendimiento de la proteína verde fluorescente (GFP); particularidades de su secuencia, con su modelamiento las propiedades de la estructura plegada y el mecanismo llevado a cabo para su activación con resultado en el fenómeno observable; así también cómo el medio circundante puede influir en la repoblación del simbiote a los tejidos del anfitrión o la muerte celular por inanición.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

Caracterizar la proteína fluorescente GFP mediante simulación de software bioinformáticos frente su respuesta al blanqueamiento en organismos del género Acropora obteniendo así mayor entendimiento del fenómeno fluorescente.

3.2. Objetivos Específicos:

- ✓ Obtener la secuencia codificante a la proteína GFP presente en el género Acropora hallada en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para análisis de su composición y similitud de aminoácidos.
- ✓ Realizar un modelamiento de la estructura proteica GFP, con el servidor Swiss-Model para contextualizar su funcionalidad en base a su estructura.
- ✓ Expresar la activación de la proteína fluorescente GFP en el género Acropora incidente al evento fluorescente post blanqueamiento mediante una cascada de señalización.

4. METODOLOGÍA

Esta investigación será de índole formativa, teórica y aplicable al contextualizar el estado actual de las comunidades arrecifales; relacionando las acotaciones de diversos autores con los procesos genéticos. Esto, plasmado en el procesamiento de información génica llevado a cabo por diferentes softwares bioinformáticos; los cuales pueden ser aplicados y comprobados bajo condiciones de laboratorio.

La información bioinformática será desarrollada en una Laptop Acer con procesador Intel Core i5 8va generación en el navegador de Google Chrome. Se trabajará con la información obtenida en la plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information) y el servidor Swiss model.

Dentro de los diferentes software a utilizar podemos identificar diferentes etapas del proceso investigativo con la información a recabar.

4.1. Obtención de secuencia de la proteína GFP

Desde la base de datos de la plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information) se seleccionó la secuencia codificante para la proteína GFP en el género *Acropora* con ID: XP_029213387.1.

4.2. Análisis de composición aminoacídica

Con el ID: XP_029213387.1 descargamos la secuencia en formato FASTA para realizar un análisis con la ayuda del programa BioEdit donde hallamos datos del peso molecular que tiene nuestra proteína, así como la composición de aminoácidos; con este último podemos clasificarlos y tener una mejor comprensión de su funcionalidad.

4.3. Alineamiento de secuencias de la proteína GFP presente en diferentes especies del género *Acropora*.

Con la herramienta BLAST de la plataforma NCBI realizaremos el alineamiento de las secuencias con código de acceso (ID) XM_029357552.2 (*Acropora millepora*), XM_015895658.1 (*Acropora digitifera*), AB626608.1 (*Acropora tenuis*), AY646066.1 (*Acropora aculeus*), EU498722.1 (*Acropora eurystoma*), AY646068.1 (*Acropora robusta*), EU709806.1 (*Acropora pulchra*), AB128822.1 (*Acropora sp.*), por similitud y porcentaje

de alineación de aminoácidos de la proteína GFP presente en organismos del Phylum Cnidaria, con interés en el género *Acropora*.

4.4. Modelamiento *in silico* de proteína GFP

La construcción de nuestro modelo por homología en modo automatizado donde únicamente se requiere la secuencia de aminoácidos del servidor Swiss Model constó de las siguientes etapas:

1. Identificación de la(s) plantilla(s) estructural(es).
2. Alineación de la secuencia objetivo y la(s) estructura(s) de la plantilla.
3. Construcción del modelo en el servidor Swiss Model a través de plantillas adecuadas basadas en BLAST (Camacho et al., 2009) y HHblits (Steinegger et al., 2019). Las plantillas resultantes se clasifican según la calidad esperada de los modelos resultantes
4. Evaluación de la calidad del modelo.

Estos pasos integran bases de datos actualizadas de secuencias y estructuras de proteínas. Cada uno de los pasos anteriores se puede repetir de forma interactiva hasta que se logre un resultado de modelado satisfactorio, (Swiss Model, 2018).

En el servidor Swiss model se realizó el modelamiento por homología de la proteína de interés al buscar plantillas de alta similitud con la secuencia obtenida previamente en la base de datos NCBI. La plantilla a ser escogida para nuestro modelo por cristalografía de rayos X fueron aquellas con identidad secuencial mayor a 90 entre las secuencias identificadas de las diferentes especies del género *Acropora*; con los datos desplegados en el servidor pudimos evaluar su identidad, oligo estado, diámetro y altura (Å), alojamiento del cromóforo, hojas, barriles dominios y residuos para comprender la funcionalidad de la estructura en el espectro visible de fluorescencia.

4.5. Cascada de señalización

Mediante la aplicación online BioRender creamos una demostración gráfica de los procesos moleculares en la activación de la proteína GFP; en la cual pudimos observar distintas interacciones de respuesta en un micro sistema de Disfunción inmune y metabólica; donde el estrés térmico – lumínico activa a través de una ruta metabólica un

mecanismo de defensa donde GFP emite fluorescencia cuando se excita a longitudes de onda de 550 – 600nm para convertirlas en longitudes de onda más largas, nuestro anfitrión posee un conjunto defensivo de enzimas antioxidantes endógenas como la superóxido dismutasa que cataliza la conversión del anión superóxido en agua y H₂O₂, catalasa que cataliza la descomposición de H₂O₂ al agua y al oxígeno y peroxidasas que son proteínas oxidantes que consumen H₂O₂. Antioxidantes exógenos, como pigmentos carotenoides de simbiosis pueden verse abrumados durante el estrés por temperatura extrema. Esto implica que estos antioxidantes bien caracterizados tienen una limitación fisiológica, por lo que requieren una actividad depuradora suplementaria de las proteínas locales, (Halliwell & Gutteridge, 1999; Sugumaran & Kanost 1993; Dunlap et al., 2003; Mydlarz & Harvell, 2007). Es allí donde la proteína GFP también actúa como extintores de radicales de oxígeno; esto es particularmente útil debido a su estabilidad y al hecho de que su cromóforo se forma en una ciclación autocatalítica que no requiere un cofactor sino oxígeno que puede tomar de los radicales libres.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Rangos medio circundante en arrecifes coralinos

La alteración de los rangos establecidos de parámetros físico – químicos en el medio marino por el cambio climático representan una gran amenaza para el equilibrio sobre el cual se basa el funcionamiento, la productividad y la biodiversidad; los corales, para crecer y desarrollar colonias, requieren temperatura media superior a los 20°C, al sobrepasar este rango (30-35°C), provocará el blanqueamiento de los organismos. Asimismo, son sensibles a salinidades bajas, cuyos valores se acercan a 32 y pH del agua entre 8,1 y 8,4. Los corales hermatípicos son clave en la construcción de los ecosistemas arrecifales, gracias a la aportación de carbonato cálcico de sus esqueletos, (Ribau, 2011).

5.2. Relación simbiótica coral anfitrión – dinoflagelado

Dada su endosimbiosis el coral anfitrión proporciona un entorno protegido a las zooxantelas que, son integradas por ingestión directa; a través de la fotosíntesis se multiplican a continuación en los tejidos del anfitrión, proveen más del 95% de los requerimientos nutricionales a la colonia hospedera mediante la translocación intracelular de los productos resultantes de la fotosíntesis, como hidratos de carbono y lípidos, sumado a la eliminación de desechos metabólicos y asimilación - conservación del nitrógeno, nutriente limitante en estos ambientes. De esta manera los corales dirigen recursos hacia el crecimiento y construcción de su esqueleto como compensación en aguas oligotróficas, aunque limita su distribución a la zona fótica de la columna de agua. Sin embargo, estos parecen preferir niveles bajos de luz o luz indirecta. (Bikerland, 1997; Muller & Parker, 1997; Oppen, 2007).

Algunas especies de coral suelen adquirir sus simbioses por transmisión del progenitor al ovocito. Sin embargo, más del 70% de las especies de coral adquieren su simbiote del medio ambiente al ser liberados los propágulos, (Baird, Guest & Willis, 2009).

Estos dinoflagelados pertenecientes a la familia Symbiodiniaceae, se encuentran en el endodermo del coral anfitrión, en densidades altas (superiores a 10^6 cél/cm²). Su anfitrión puede contener más de una de las 16 especies existentes, otorgándoles cierta flexibilidad en la ocurrencia de cambios ambientales, como generar un patrón

distinto de zooxantelas cuando estos se ubican a diferentes profundidades, (Ribau, 2011).

Presentan una serie de “sustancias fluorescentes”, de las cuales podemos mencionar la clorofila que, aporta una fluorescencia roja, con picos cercanos a los 685 y 735 nm, en células gastrodérmicas, (Salih et al., 2000; Oppen, 2007). Otros pigmentos emiten fluorescencia a longitudes de onda más cortas, generalmente están contenidos en las células epiteliales del coral anfitrión (Kawaguti 1944; Logan et al. 1990; Mazel 1995).

5.3. Fisiología del coral anfitrión ante eventos estresantes

En un ambiente cambiante, los corales tienen la capacidad de aclimatación y fotoprotección en base a diversos mecanismos que incluyen estrategias de adaptación a largo plazo y respuestas a corto plazo, (Iglesias et al., 2004; McCabe et al., 2008).

A una luminosidad superior a su rango habitual tienen la capacidad de seleccionar el tipo y cantidad entre sus simbioses autótrofos; contenido de pigmentos, ajuste de complemento de filtros UV, aminoácidos similares a micosporinas (MAA) y moléculas antioxidantes (Falkowski & Dubinsky 1981, Hoegh, Guldborg & Smith 1989, Iglesias, Prieto & Trench 1994, Richier et al. 2005). Incluso después de eventos estresantes que interrumpen la simbiosis, los dinoflagelados pueden volver a insertarse al mismo huésped o a uno nuevo, permaneciendo fotoquímicamente funcionales (Soffer et al., 2008; Yellowlees et al., 2008).

El fenómeno de blanqueamiento del coral es un notable indicio de estrés en relación a los parámetros que está proveyendo el medio circundante provocando daño en las membranas simbióticas que, a su vez, conducen al colapso de la simbiosis que culmina en la expulsión de los simbioses dándole el aspecto totalmente blanquecino al anfitrión; originada por estrés oxidativo severo en el aparato fotosintético de los dinoflagelados y provocando un daño colateral, (Venn et al., 2008).

Es posible la absorción de simbioses nuevamente a los tejidos del anfitrión por parte de los corales adultos, particularmente después de un periodo corto de estrés, como el blanqueamiento, (Baker, 2001; Berkelmans & Oppen, 2006).

5.4. Superfamilia GFP

Los homólogos de la proteína fluorescente verde son un grupo predominante de pigmentos fluorescentes (FP) hospedadores responsables del espectro visible verde (GFP), rojo (RFP) y cian (CFP) de varias especies de corales formadores de arrecifes con la regulación al alza de los FP determinada por su secuencia de aminoácidos; se han identificado como una barrera protectora entre la dañina radiación ultravioleta (UV) de la exposición solar y reflejan la luz visible infrarroja por lo cual disipan el exceso de energía en longitudes de onda; al cambiar el entorno de luz en el tejido del coral, resultando en la adecuación lumínica óptima para la fotosíntesis; protección de la maquinaria fotosintética logrando una función fotoprotectora de la esencial simbiosis, (Takahashi et al., 2016; Palmer, Modi & Myldarz, 2009).

Estos FP se podrían diferenciar en dos grupos por su regulación dependiente de la luz siendo que, el grupo de umbral bajo contiene principalmente proteínas fluorescentes cian expresadas en cantidades considerables a muy bajas intensidades de luz. En cambio que, el grupo de umbral alto incluye proteínas fluorescentes verdes y rojas, así como cromoproteínas no fluorescentes, por lo cual se pueden detectar fácilmente al contribuir como marcadores ópticos intrínsecos en una evaluación no invasiva de la condición fisiológica de estos organismos en respuesta a diversas problemáticas como heridas e infestaciones con epibiontes/parásitos, estrés originado por cambios en su entorno y demás patologías al tener un claro entendimiento de los determinantes que controlan su expresión, (D' Angelo et al., 2008; D' Angelo et al., 2012; Roth & Deheyn, 2013).

Han sido agrupadas como superfamilia ya que tienen la misma forma y alta similitud en su secuencia dado que, el ancestro de las proteínas fluorescentes era verde dentro de la superfamilia de proteínas similares a GFP se presume que, tienen un ancestro en común más cercano, señalando una evolución convergente de un sistema molecular complejo a través de pequeñas transiciones incrementales; dadas por una acumulación gradual de mejoras. Múltiples eventos de esta diversificación de color rojo/verde en *Montastraea cavernosa* refleja una evolución convergente de los diferentes pigmentos en el espectro visible (Ugalde, Chang & Matz, 2014).

Es imprescindible recalcar que presentan altos niveles de expresión en el tejido de coral, siendo excelentes indicadores de la salud de los arrecifes, agregando vital importancia al conocimiento profundo de la regulación de los pigmentos a partir de sus genes a proteínas codificantes, (Oswald et al. 2007).

5.5. Proteína GFP

GFP es un representante de las proteínas fluorescentes antes mencionadas, en el año 1995 fue clonada y expresada exógenamente por primera vez en la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*; puede usarse como un marcador sensible del estrés por calor dada la disminución de la expresión génica al daño del fotosistema II de los simbioses de algas. Consta de 238 aminoácidos; una estructura terciaria con diámetro de 24 Å y una altura de 42 Å de 11 β-hebras (cintas) con bucles de interconexión del β-barril; un cromóforo suspendido de un α-hélice en el centro del barril (constituido por los aminoácidos 65, 66 y 67), un grupo químico que absorbe y emite luz. Al hallarse contenido puede protegerse de la inactivación por oxígeno del ambiente externo, (Zimmer, 2002). Se encuentra entre las proteínas reguladas positivamente del factor de transcripción de choque térmico con un alto costo metabólico durante el blanqueo, (Ricaurte et al., 2016)

6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

6.1. Análisis de composición aminoacídica de la proteína GFP del género *Acropora*

La secuencia de aminoácidos de estudio a ser modelada bajo el código de acceso en la base de datos NCBI No. XP_029213387.1 está conformada por 221 aminoácidos; 33.03% son hidrófilos, 39.8% hidrófobos, 11.8% ácidos y 14.9% básicos, identificamos a glicina (10.4%) y lisina (8.6%) los más abundantes en la secuencia. Nuestra secuencia de aminoácidos tiene un peso de 25848,36 kD. (Tabla 1) (Gráfico 1).

Aminoácido	Abreviatura	Letra	Clasificación	Número	Porcentaje molecular
Cisteína	Cys	C	Polares o hidrófilos	3	1.30%
Glicina	Gly	G	Polares o hidrófilos	24	10.4%
Asparagina	Asn	N	Polares o hidrófilos	7	3.03%
Glutamina	Gln	Q	Polares o hidrófilos	8	3.46%
Serina	Ser	S	Polares o hidrófilos	13	5.63%
Treonina	Thr	T	Polares o hidrófilos	14	6.06%
Tirosina	Tyr	Y	Polares o hidrófilos, aromático	7	3.03%
Alanina	Ala	A	Apolares o hidrófobos	11	4.76%
Fenilalanina	Phe	F	Apolares o hidrófobos	17	7.36%
Isoleucina	Ile	I	Apolares o hidrófobos	12	5.19%
Leucina	Leu	L	Apolares o hidrófobos	12	5.19%
Metionina	Met	M	Apolares o hidrófobos	10	4.33%
Prolina	Pro	P	Apolares o hidrófobos	12	5.19%
Valina	Val	V	Apolares o hidrófobos	16	6.93%
Triptófano	Trp	W	Apolares o hidrófobos, aromático	2	0.87%
Ácido aspártico	Asp	D	Ácidos	11	4.76%
Ácido glutámico	Glu	E	Ácidos	16	6.93%
Histidina	His	H	Básicos	10	4.33%
Lisina	Lys	K	Básicos	20	8.66%
Arginina	Arg	R	Básicos	6	2.60%

Tabla 1. Descripción de composición aminoacídica contenida en la secuencia de la proteína GFP.
Autor: Bautista, N. (2022).

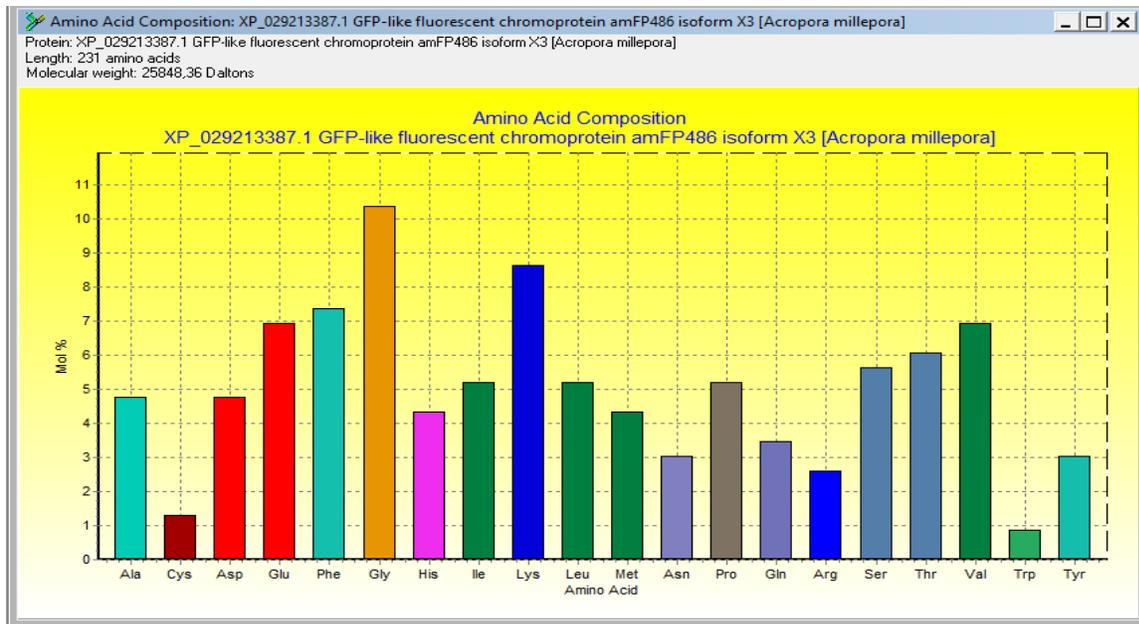


Gráfico 1. Histograma de aminoácidos hallados en proteína GFP
Autor: BioEdit, 2022.

6.2. Similitud de secuencias entre diferentes especies del género *Acropora*.

Nuestra secuencia de interés con ID: XM_029357554.2 está compuesta por 849 nucleótidos, (Zimmer, 2002); el porcentaje de cobertura entre secuencias nos brinda información acerca de la cantidad de nucleótidos que presentan. En el gráfico 2 podemos observar que, de las diferentes especies del género *Acropora* halladas en la base de datos NCBI, la secuencia XM_044307739.1 perteneciente a *Acropora millepora* compuesta de 837 nucleótidos se acerca mayormente a nuestra secuencia de interés.

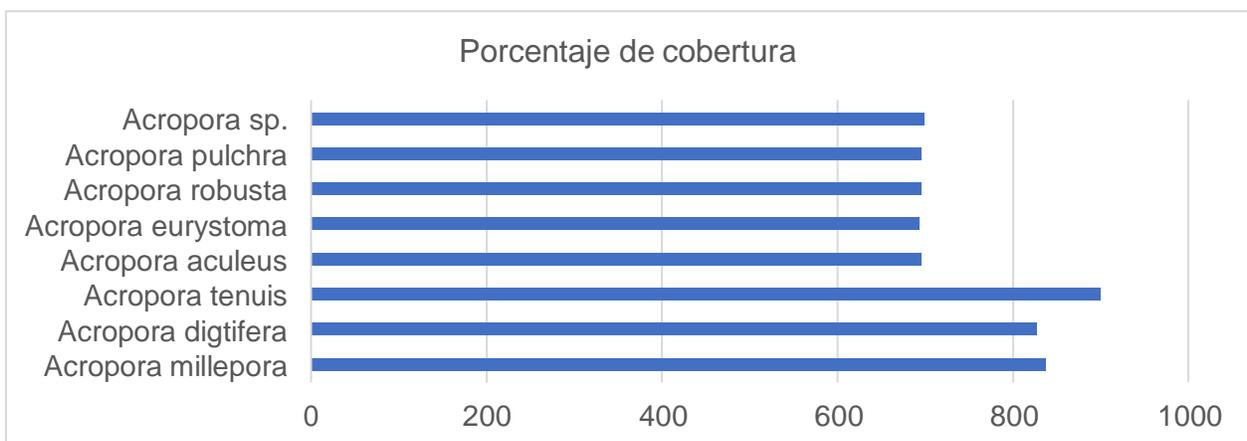


Gráfico 2. Porcentaje de cobertura GFP en diferentes especies de *Acropora*.
Autor: Bautista, N. (2022).

De la misma manera, al comparar el porcentaje de similitud de identidad resultante del alineamiento de nuestra secuencia de interés con diferentes especies del género *Acropora* podemos observar que, la secuencia perteneciente a *Acropora millepora* presenta un 99,87% de similitud. Cabe destacar que, en todas las especies observamos un acoplamiento de identidad mayor a 90% que nos indica la funcionalidad compartida de GFP en diferentes especies aludiendo que, dentro de la superfamilia de proteínas similares a GFP presentan más de un origen, apuntando una evolución convergente de un sistema molecular complejo a través de pequeñas transiciones incrementales; dadas por una acumulación gradual de mejoras, (Ugalde, Chang & Matz, 2014) (Gráfico 3).

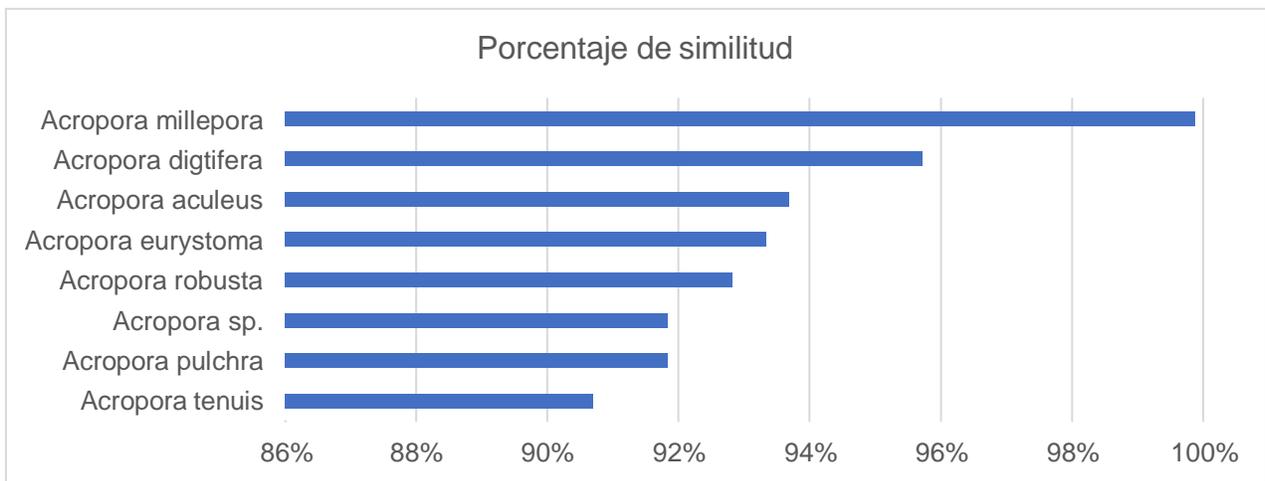


Gráfico 3. Porcentaje de identidad GFP en diferentes especies de *Acropora*.

Autor: Bautista, N. (2022).

6.3. Modelamiento *in silico* de la proteína GFP

De los modelos desplegados en el servidor Swiss Model se eligió el modelo con ID: 1qyo.1.A correspondiente a la proteína GFP en *Acropora* sp., obtenido bajo cristalografía de rayos X con una resolución de 1,80 Å, GMQE de 0.95 y QMEANDisCo de 0.91; estos 2 últimos brindan una medición general de la calidad del modelo entre 0 y 1, donde los números más altos indican una mayor calidad esperada. Asimismo, obtuvimos una identidad secuencial de 97,05%, oligo estado monómero (subunidad), diámetro de 24 Å y una altura de 42 Å, (Zimmer, 2002; González, 2016) (Gráfico 4).

Modelos

Se construyeron los siguientes modelos (ver Materiales y métodos "Construcción de modelos"):

Modelo #02	Expediente	construido con	Oligo-Estado	ligandos	GMQE	QMEANDisCo Global
	AP	ProMod3 3.2.1	monómero	Ninguna	0,95	0.91 ± 0,05

Modelo	identidad secuencial	Oligo-estado	QSQE	Encontrado por	Método	Resolución	Similitud secuencial	Rango	Cobertura	Descripción
1qyo.1.A	97.05	monómero	0.00	EXPLOSIÓN	radiografía	1,80 Å	0,61	1 - 236	0.97	proteína verde fluorescente

Gráfico 4. Construcción del modelamiento *in silico* de proteína GFP

Autor: Swiss Model, 2022.

Como mencionamos anteriormente la identidad secuencial de 97,05% descrita en el gráfico 5 el análisis que nos refleja el servidor en cuanto a la secuencia de aminoácidos ingresada para la construcción del modelamiento; se registra una confianza alta según los esquemas de color establecidos por el servidor Swiss Model; color naranja indica baja confianza y color azul indica alta confianza de la alineación de cada aminoácido contenido en la secuencia del modelo en creación en base a las plantillas de las diferentes bases de datos indicadas anteriormente.

Alineación modelo-plantilla

Model_01	SKGEELFTGVVITLVELDGDVNGHKFSVSGELEGDATYGKLT LKF	45
6aa6.1.A	SKGEELFTGVVPIVLVLDGDVNGHRFSVSGELEGDATYGKLT LKI	50
Model_01	ICTTGKLPVWPPTLVTTLYGVQCFSPYPDHMKRHDFFKSAMPEG	90
6aa6.1.A	ICTTGKLPVWPPTLVTTLX--VQCFAPYPDHMKQHDFFKSAMPEG	93
Model_01	YVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGLTLVNRIELKGI DFKEDGNI	135
6aa6.1.A	YVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGLTLVNRIELKGI DFKEDGNI	138
Model_01	LGHKDEYN-YNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHND EDG SVQLAD	179
6aa6.1.A	LGHKDEYNGWSAHNEYITADKQKNGIKANFKIRHND EDG SVQLAD	183
Model_01	HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH MVLLFVTI	224
6aa6.1.A	HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYCSALS KDPNEKRDH MVLLFVTI	228
Model_01	ADGITHGMDELYKHHHHHHH	244
6aa6.1.A	ADGITLGMDELYK-----	241

Gráfico 5. Alineamiento de la secuencia molde con la plantilla de la proteína GFP.

Autor: Swiss Model, 2022.

En el gráfico 6 podemos observar la estructura 3D que nos arroja el servidor Swiss Model, el software RasWin nos permitió interactuar a profundidad con la proteína, la cual identificamos como terciaria dadas las atracciones presentes entre hélices alfa y hojas plegadas (conformación β), en base a lo anterior podemos diferenciar los componentes de la proteína: Láminas plegadas β (color amarillo), hélices α (color púrpura), residuos (color blanco), cromóforo con estructura química globular. Al girarla 90° la vemos así (B), allí resaltamos los residuos que forman el cromóforo. En cuanto a la funcionalidad de la proteína en base a dicha estructura; se ha reportado que, GFP solo emite fluorescencia al formarse el cromóforo y una vez que la hebra 11 un-barril se establece, producto del propio plegamiento, (Zimmer, 200).

En este sentido, acoplado los resultados del gráfico 7 con lo descrito por Zimmer (2002) en cuánto a la estructura de la proteína GFP determinamos que, nuestra proteína de interés tiene un solo dominio correspondiente al fenómeno de fluorescencia al igual que los otros organismos de la superfamilia GFP.

La geometría cilíndrica de la GFP protege el cromóforo, haciéndolo notablemente fotoestable y brillante, resistente al oxígeno reactivo, la luz, el pH y muchos agentes desnaturizantes (Tsien 1998).

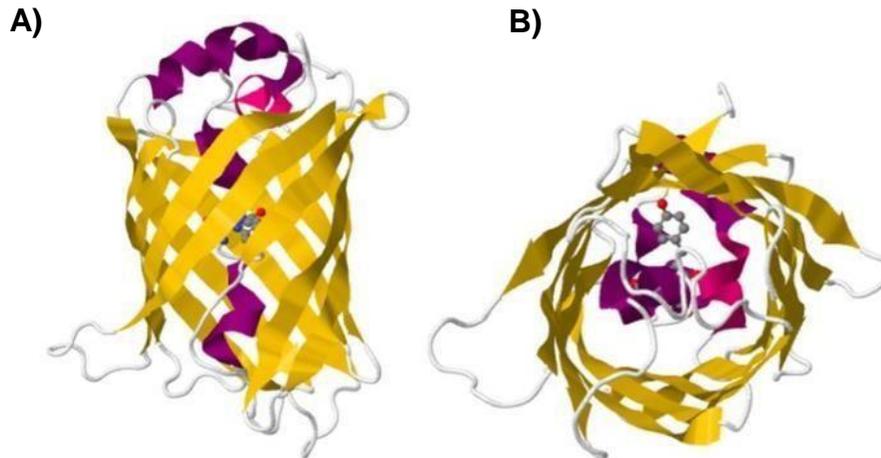


Gráfico 6. Modelamiento *in silico* de la proteína GFP en el género *Acropora*

A) Plano general de la estructura terciaria de la proteína.

B) Vista interna de la estructura; destaca cromóforo suspendido.

Autor: Bautista, (2022).

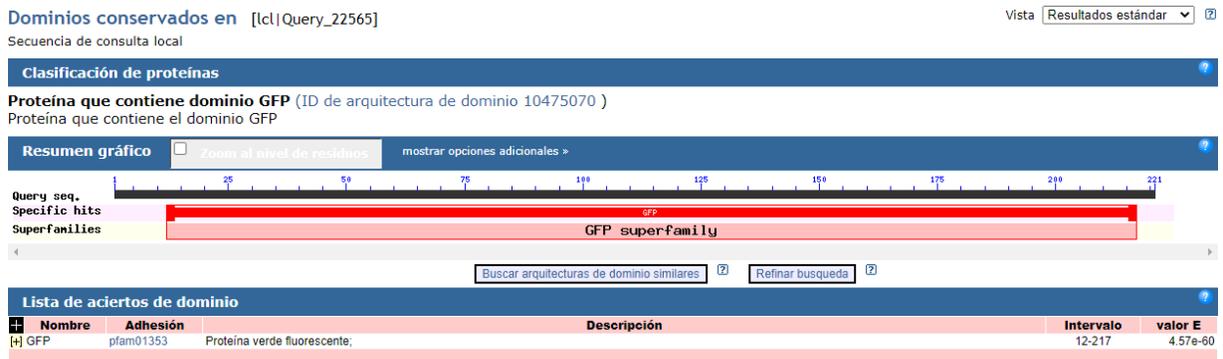


Gráfico 7. Dominio de la proteína GFP

Autor: Swiss Model, 2022.

Un aspecto esencial a destacar es la estructura central contenida en la cavidad del barril denominada cromóforo, esencial en el espectro fluorescente característico de la proteína. (Gráfico 8).

El cromóforo se crea espontáneamente a partir de los residuos Ser 65, Tyr 66 y Gly 67, su espectro de excitación muestra picos tanto a 396 como a 475 nm. La cavidad que lo rodea tiene una gran influencia en sus características espectrales.

En la estructura terciaria GFP los aminoácidos ubicados en los alrededores del cromóforo median su fluorescencia; el despliegue de la proteína da como resultado la pérdida completa de la emisión de fluorescencia del cromóforo, (Bartkiewicz et al., 2018).

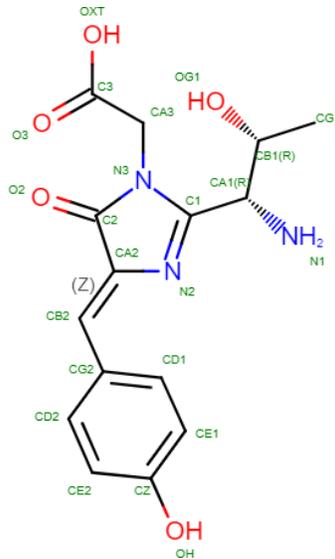


Gráfico 8. Estructura química cromóforo proteína GFP

Autor: Protein Data Bank (PDB), 2022.

6.4. Cascadas de señalización

Tras obtener nuestro modelamiento de la proteína GFP y develar sus estructuras podemos esquematizarla en el desencadenamiento del espectro fluorescente desde el mecanismo de endosimbiosis, cómo su factor estresante térmico – lumínico dispone al organismo a la activación de mecanismos fotoprotectores y con ello el entendimiento de todos los factores asociados. (Gráfico 9, 10, 11).

La coloración del anfitrión no está determinada por su simbiote, más bien por pigmentos protectores anti-UV que segregan los corales para protegerse de las intensas radiaciones fuera de sus rangos de tolerancia. Las zooxantelas tienen una coloración parda propia de su clado, por tanto, sus altas densidades favorecen la coloración marrón de los corales y viceversa, (Grilli, 2005).

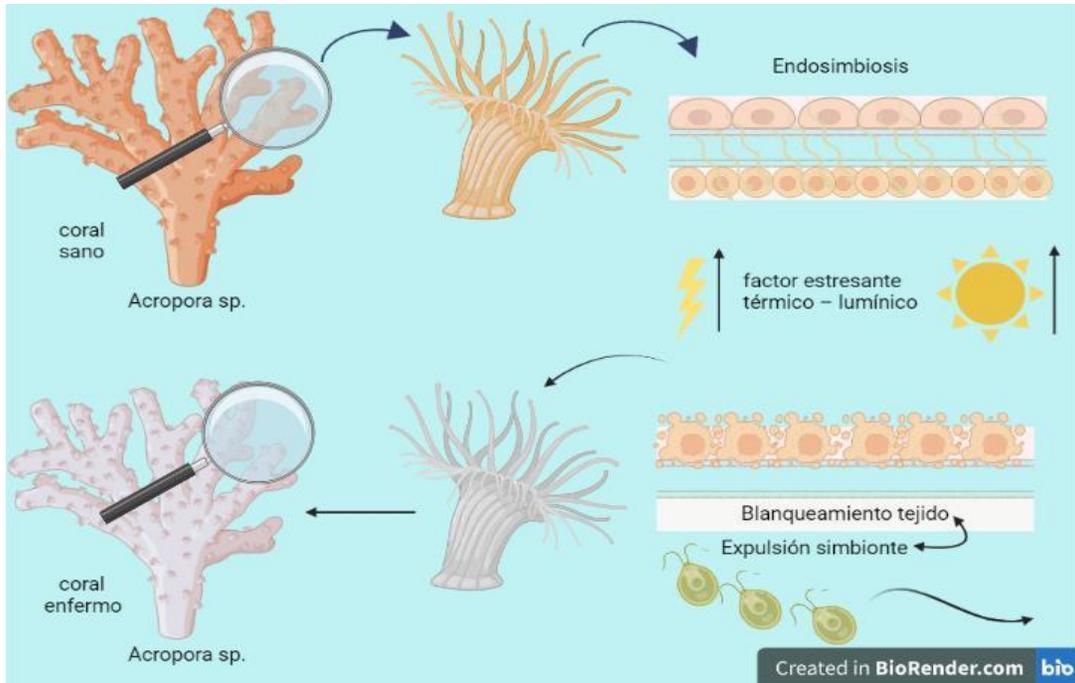


Gráfico 9: Fenómeno de blanqueamiento de corales

Autor: Bautista, N. 2022.

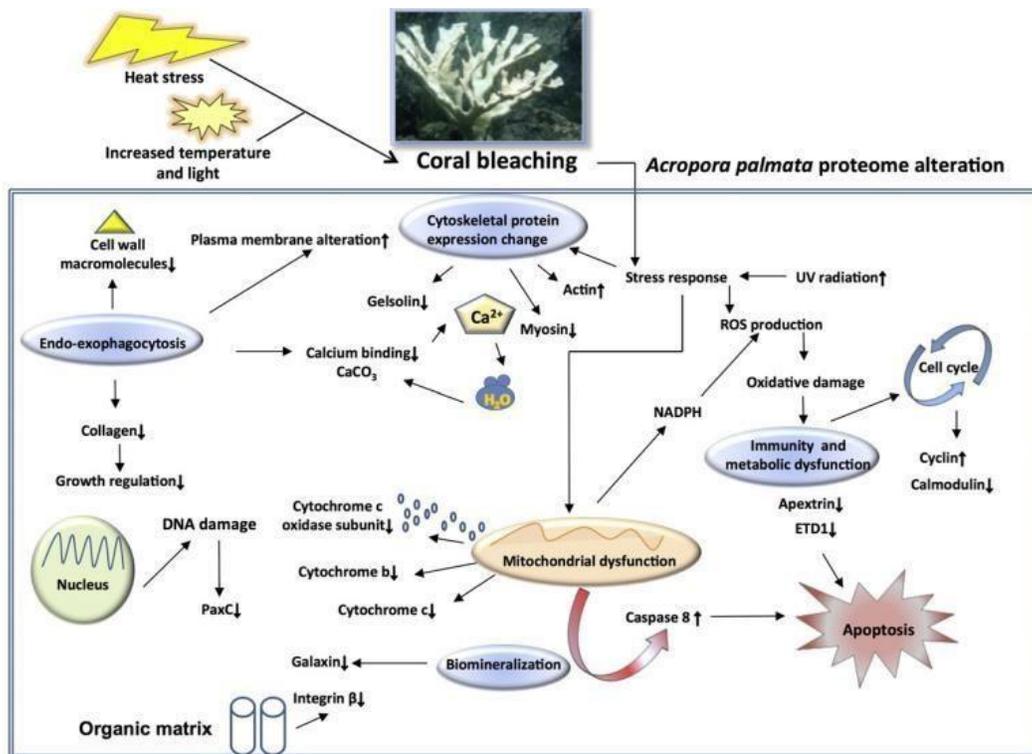


Gráfico 10. Análisis proteómico de la respuesta de *Acropora palmata* al blanqueamiento

Autor: Ricuarte et al., 2016.

Los radicales de oxígeno se producen fácilmente por una serie de vías y mecanismos, incluidos los simbioses de algas haciendo esencial la regulación del estado redox de los tejidos (capacidad de eliminar del organismo de sustancias nocivas). De las ROS (especies reactivas de oxígeno), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se atribuye particularmente a la inducción del estrés oxidativo, ya que es la especie de oxígeno más estable y se difunde fácilmente a través de las membranas biológicas, (Downs et al., 2002; Smith, Suggett & Barker, 2005; Leutenegger et al., 2007).

Para mitigar y regular la citotoxicidad de las ROS, los antozoos poseen un conjunto defensivo de enzimas antioxidantes endógenas como la superóxido dismutasa que cataliza la conversión del anión superóxido en agua y H₂O₂, catalasa que cataliza la descomposición de H₂O₂ al agua y al oxígeno y peroxidasas que son proteínas oxidantes que consumen H₂O₂. Antioxidantes exógenos, como pigmentos carotenoides de simbioses pueden verse abrumados durante el estrés por temperatura extrema. Esto implica que estos antioxidantes bien caracterizados tienen una limitación fisiológica, por lo que requieren una actividad depuradora suplementaria de las proteínas locales, (Halliwell & Gutteridge, 1999; Sugumaran & Kanost 1993; Dunlap et al., 2003; Mydlarz & Harvell, 2007).

Los antioxidantes son vitales para evitar peroxidación de lípidos, la oxidación de proteínas, el daño al ciclo celular del coral, la inhibición de enzimas, el daño a los ácidos nucleicos y la activación de la vía de la apoptosis. En condiciones extremas, como estrés térmico prolongado las vías antioxidantes bien caracterizadas y conservadas, incluidas la catalasa y la superóxido dismutasa, pueden verse abrumadas. Los pigmentos fotoprotectores actúan adicionalmente como antioxidantes suplementarios al eliminar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para prevenir/ayudar frente al estrés oxidativo en el tejido de coral, (Kültz, 2005; Cornet, Biard & Moret, 2007; DeSalvo et al., 2008; Voolstra et al., 2009).

En base al análisis planteado en el gráfico 10, identificamos la ubicación de nuestra proteína en la respuesta de Disfunción inmune y metabólica; donde el estrés térmico – lumínico activa a través de una ruta metabólica un mecanismo de defensa donde GFP emite fluorescencia cuando se excita a longitudes de onda de 550 – 600nm para

convertirlas en longitudes de onda más largas, así como también actúan como extintores de radicales de oxígeno. Es particularmente útil debido a su estabilidad y al hecho de que su cromóforo se forma en una ciclación autocatalítica que no requiere un cofactor sino oxígeno que puede tomar de los radicales libres. Sin embargo, requiere un proceso de maduración que puede extenderse durante varios días. (Gráfico 11)

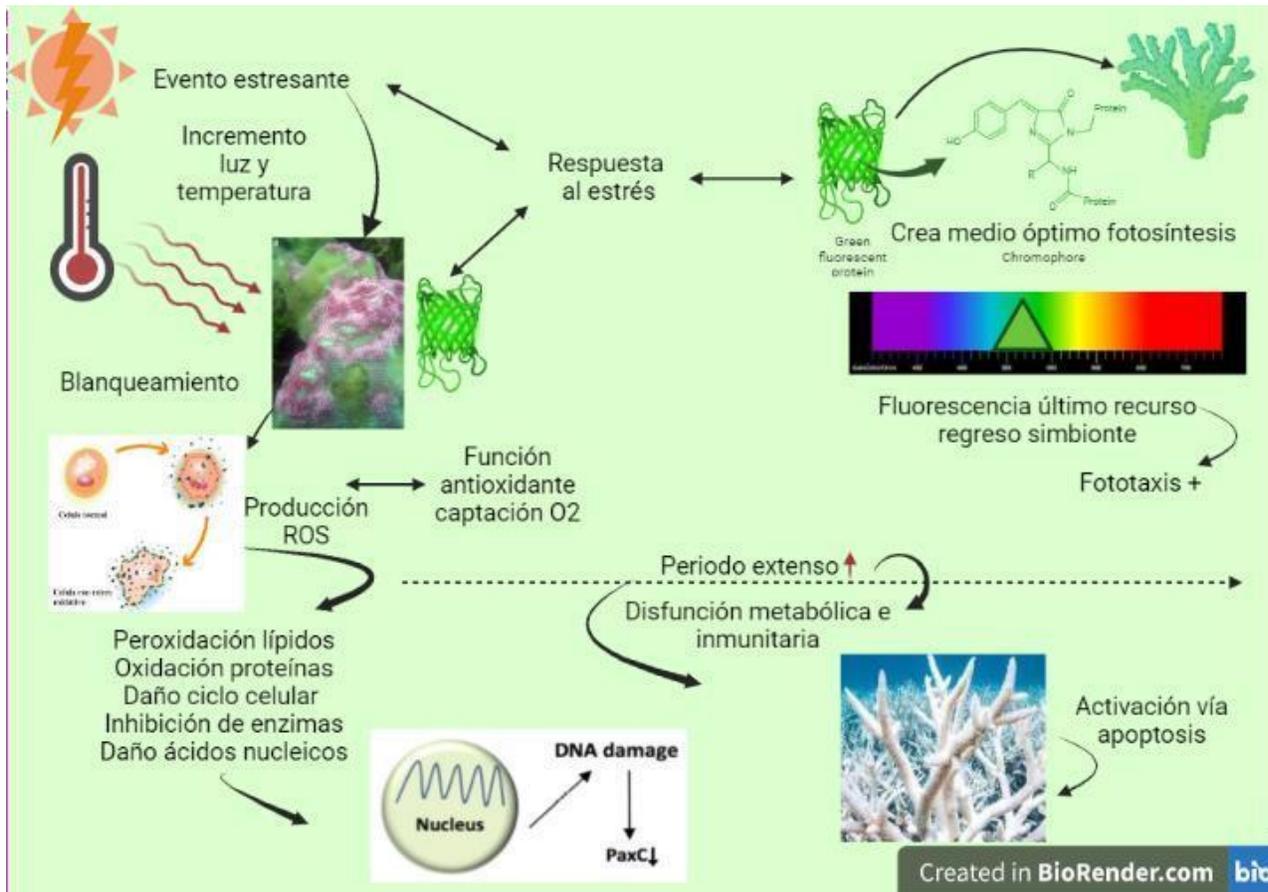


Gráfico 11: Cascada de señalización de la proteína GFP en *Acropora* sp.

Autor: Bautista, N. 2022.

7. CONCLUSIONES

La secuencia codificante a la proteína GFP en el género *Acropora* con ID: XP_029213387.1 en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) contiene 849 nucleótidos con un peso de 25848,36 kD, presenta una similitud mayor al 90% respecto a identidad con *A. aculeus*, *A. digitifera*, *A. eurystoma*, *A. millepora*, *A. pulchra*, *A. robusta*, *A. sp.* y *A. tenuis*, adicional dicha secuencia codifica un total de 221 aminoácidos lo cual nos indica la funcionalidad compartida en distintos organismos representantes del género *Acropora*.

En el modelamiento de nuestra proteína de interés en el servidor Swiss Model se eligió el modelo con ID: 1qyo.1.A correspondiente a la proteína GFP en *Acropora sp.*, por presentar una identidad secuencial de 97,05%, con una resolución de 1,80 Å, GMQEd de 0.95 y QMEANDisCo de 0.91; estos 2 últimos valores son indicios de la calidad del modelo al hallarse en un rango entre 0 y 1, donde los números más cercanos a 1 indican una mayor calidad esperada. En el software RasWin identificamos su estructura como terciaria dadas las atracciones presentes entre hélices alfa y hojas plegadas (conformación β); diferenciamos láminas plegadas β , hélices α , residuos y una estructura contenida en el centro de la estructura formada a partir de residuos denominada cromóforo; esencial en el espectro fluorescente característico de la proteína, dada específicamente por el dominio de fluorescencia característico de las proteínas de la superfamilia GFP la cual evolutivamente se ha visto adaptada a las necesidades y desafíos del ambiente.

Podemos esquematizar a nuestra proteína de interés mediante la representación online en el programa BioRender del desencadenamiento del espectro fluorescente desde el mecanismo de endosimbiosis donde los organismos se ven expulsados de su anfitrión al dejar su forma globular y tomando su forma de vida libre original, en todas nuestras representaciones observamos cómo el factor estresante térmico – lumínico dispone al organismo a la activación de diversos micro sistemas deliberados por diversas proteínas de las cuales GFP actúa primordialmente como fotoprotector al emite fluorescencia cuando se excita a longitudes de onda de 550 – 600nm para convertirlas en longitudes

de onda más largas para mantener la fundamental relación con su endosimbionte. También actúa como antioxidante suplementario al captar los radicales libres de O₂ hacia su cromóforo y ayudar a los demás sistemas a estabilizarse; si el periodo de estrés se ve alargado más allá de la capacidad de recuperación del organismo se activará la vía de la apoptosis por lo cual el futuro de los arrecifes de coral depende en gran medida de estrategias de gestión que puedan promover su recuperación y resiliencia.

9. RECOMENDACIONES

Las herramientas bioinformáticas nos ofrecen una cantidad considerable de comandos a ser aplicados y ajustados a nuestra molécula de interés; una correcta identificación y entendimiento de la base de los parámetros que rigen dichos comandos es esencial, dependiendo de cada herramienta o software a ser utilizado guiado a nuestras necesidades.

Adicional a esto, son altamente confiables por ser comprobadas en numerosos estudios de alto impacto; por lo cual para un correcto direccionamiento en la comprensión del fenómeno a ser descrito en el organismo, un escenario gráfico nos brinda la oportunidad de aludir a la actividad molecular; destacando una cascada de señalización.

10. BIBLIOGRAFÍA:

Aihara, Y., Maruyama, S., Baird, AH, Iguchi, A., Takahashi, S. y Minagawa, J. (2019). La fluorescencia verde de los cnidarios atrae a las algas simbióticas. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, 116 (6), 2118-2123.

Baidal, A. (2021). Estudio In silico de la proteína fotosintética PsbO en la babosa de mar *Elysia* sp. Risso, 1818 (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2021.).

Baird AH, Guest JR, Willis BL (2009) Patrones sistemáticos y biogeográficos en la biología reproductiva de los corales escleractinios. *Annu Rev Ecol Evol Syst*40:551–571.

Baker AC (2001) Los corales de arrecife se blanquean para sobrevivir al cambio. *Naturaleza* 411:765–766.

Bartkiewicz, M., Kazazić, S., Krasowska, J., Clark, PL, Wielgus-Kutrowska, B. y Bzowska, A. (2018). El mutante no fluorescente de la proteína fluorescente verde arroja luz sobre el mecanismo de formación de cromóforos. *Cartas FEBS*, 592 (9), 1516-1523.

Batista, G., Ceballos, J., Urriola, R. & López, O. (2020). Atlas de las macroalgas del caribe panameño, su auto fluorescencia y usos. Nomos Impresores, Bogotá, Colombia.

Berkelmans R, van Oppen MJH (2006) El papel de las zooxantelas en la tolerancia térmica de los corales: una 'pepita de esperanza' para los arrecifes de coral en una era de cambio climático. *Proc Biol Sci*273:2305–2312.

Birkeland, Charles (1997). *Life and Death of Coral Reefs*. Springer Science & Business Media. pp. 98-99. ISBN 978-0-412-03541-8.

Bollati, E., D'Angelo, C., Alderdice, R., Pratchett, M., Ziegler, M. y Wiedenmann, J. (2020). El bucle de retroalimentación óptica que involucra al simbiote dinoflagelado y alhuésped escleractiniano impulsa el blanqueamiento colorido de los corales. *Biología actual*, 30 (13), 2433-2445.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. y Madden, TL (2009) BLAST+: arquitectura y aplicaciones. *BMC Bioinformática*, 10, 421-430.

Colquitt, RB, Colquhoun, DA y Thiele, RH (2011). Modelado in silico de sistemas fisiológicos. *Mejores prácticas e investigación Anestesiología clínica*, 25 (4), 499-510.

Cornet S, Biard C, Moret Y (2007). ¿Los carotenoides antioxidantes desempeñan un papel en la limitación de la respuesta inmunitaria autodestructiva en los invertebrados? *Biol Lett* 3: 284–288.

D'Angelo, C., Denzel, A., Vogt, A., Matz, MV, Oswald, F., Salih, A. & Wiedenmann, J. (2008). Regulación de la luz azul del pigmento huésped en corales formadores de arrecifes. *Serie Progreso de la Ecología Marina*, 364, 97-106.

D'Angelo, C., Smith, E. G., Oswald, F., Burt, J., Tchernov, D., & Wiedenmann, J. (2012). Locally accelerated growth is part of the innate immune response and repair mechanisms in reef-building corals as detected by green fluorescent protein (GFP)-like pigments. *Coral reefs*, 31(4), 1045-1056.

D'Salvo, MK, Sunagawa, S., Voolstra, CR, Medina, M., (2010). Respuestas transcriptómicas a estrés por calor y blanqueamiento en el coral cuerno de alce *Acropora palmata*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 402, 97-113.

Dove, SG, Hoegh-Guldberg, O. y Ranganathan, S. (2001). Los principales patrones de color de los corales formadores de arrecifes se deben a una familia de proteínas similares a las GFP. *Arrecifes de coral*, 19 (3), 197-204.

Downs CA, Fauth JE, Halas JC, Dustan P, Bemiss J, et al. (2002) Estrés oxidativo y blanqueamiento coralino estacional. *Biología y medicina de radicales libres* 33: 533–543.

Dunlap W, Llewellyn L, Doyle J, Yamamoto Y (2003) Un ensayo de placa de microtitulación para detectar actividad antioxidante en extractos de organismos marinos. *Mar Biotechnol* 5: 294–301.

Falkowski PG, Dubinsky Z (1981) Adaptación luz-sombra de *Stylophora pistillata*, un coral hermatípico del golfo de Eilat. *Naturaleza* 289:172–174

Fuller, ZL, Mocellin, VJ, Morris, LA, Cantin, N., Shepherd, J., Sarre, L., ... y Przeworski, M. (2020). Genética poblacional del coral *Acropora millepora*: Hacia la predicción genómica del blanqueamiento. *Science*, 369 (6501).

González, J. (2016). Bioquímica y Biología Molecular | Curso de Biomoléculas. Universidad del País Vasco. Recuperado de: <https://www.ehu.es/biomoleculas/proteinas/prot4.htm#:~:text=La%20conformaci%C3%B3n%20espacial%20de%20una,organizaci%C3%B3n%20la%20llamada%20estructura%20cuaternaria>. (15/07/2022).

Greg, A. & Leduff, C. (2018). Ecuador: los corales en Galápagos prosperan en las islas más remotas. Recuperado el 16 de mayo de 2022, de <https://es.mongabay.com/2018/02/ecuador-corales-en-galapagos/>

Grilli, M. (2005). Des couleurs plein les yeux T3 - Des pigments coralliens, mais pour quoi faire?. Recuperado el 20 de julio de 2022, de <http://www.recifs.org/modules.91.html>

Guex, N., Diemand, A. y Peitsch, MC (1999). Modelado de proteínas para todos. Tendencias en ciencias bioquímicas, 24 (9), 364-367.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Los radicales libres en biología y medicina. Oxford: Prensa de la Universidad de Oxford. 936 pág.

Hoegh-Guldberg O, Smith GJ (1989) El efecto de la repentina cambios de temperatura, luz y salinidad en la densidad de población y exportación de zooxantelas de los corales de arrecife *Stylophora pistillata* y *Seriatopora hystrix* Exp Mar Biol Ecol 129:279–303.

Iglesias-Prieto R, Trench RK (1994) Aclimatación y adaptación a la irradiación en dinoflagelados simbióticos. I. Respuestas de la unidad fotosintética a cambios en la densidad de flujo de fotones. Mar Ecol Prog Ser 113: 163–175.

Jing Jiang, Hao Zhang, Yisheng Kang, David Bina, Cynthia S. Lo y Robert E. Blankenship, (2012). "Caracterización de la peridinina - clorofila a-proteína compleja en el dinoflagelado *Symbiodinium* ", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergética , vol. 1817 No 7, p. 983-989.

Jones, RJ, Hoegh-Guldberg, O., Larkum, AWD, Schreiber, U., (1998). Temperatura inducida el blanqueamiento de los corales comienza con el deterioro del CO2 mecanismo

de fijación en zooxantelas. Entorno de células vegetales. 21, 1219-1230.<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00345.x>

Kawaguti, S. (1944). Sobre la fisiología de los corales de arrecife VI. Estudios los pigmentos Tropa Palao. Biol. Est. Semental.2:617–674. 1969.

Kültz, D., (2005). Bases moleculares y evolutivas de la respuesta celular al estrés. Annu. Rev. Physiol. 67, 225-257.<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635>.

Leutenegger A, Kredel S, Gundel S, D'Angelo C, Salih A, et al. (2007) Análisis de anémonas de mar fluorescentes y no fluorescentes del Mar Mediterráneo durante un evento de blanqueamiento. Revista de Biología y Ecología Marina Experimental 353: 221–234.

Logan, A., Halcrow, K. & Omascik, T. (1990). Excitación UV fluorescencia en tejido de pólipos de ciertos corales escleractinios de Barbados y Bermudas. Toro. Ciencia de marzo.46:807–813.

Marshall, PA, Schuttenberg, HZ y West, JM (2006). Una guía para el administrador de arrecifes sobre el blanqueamiento de corales.

Matz, MV, Marshall, NJ y Vorobyev, M. (2006). Simposio impreso: Proteína fluorescente verde y homólogos. Fotoquímica y Fotobiología, 82 (2), 345-350.

Mazel, CH, Lesser, MP, Gorbunov, MY, Barry, TM, Farrell, JH, Wyman, KD y Falkowski, PG (2003). Proteínas fluorescentes verdes en corales del Caribe. Limnología y Oceanografía, 48 (1 parte 2), 402-411.

McCabe Reynolds J, Bruns BU, Fitt WK, Schmidt GW (2008). Vías de fotoprotección mejoradas en dinoflagelados simbióticos de corales de aguas poco profundas y otros cnidarios. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 105: 13674–13678

Muller-Parker, G. y D'Elia, C. F. (1997). Interactions between corals and their symbiotic algae. En C. Birkeland (Ed.), Life and death of coral reefs (pp.96–113). Berlín: Elsevier.

Mydlarz LD, Harvell CD (2007) Actividad e inducibilidad de la peroxidasa en el coral abanico de mar expuesto a un patógeno fúngico. Comp Biochem Physiol A 146: 54–62.

National Human Genome Research Institute (2021). Talking Glossary of Genomic and Genetic Terms – Bioinformática. Recuperado de: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bioinformatica#:~:text=La%20Bioinform%C3%A1tica%20usa%20programas%20inform%C3%A1ticos,conformaci%C3%B3n%20tridimensional%20de%20las%20prote%C3%ADnas> (29/06/2022).

Oppen, M. J. H. (2007). Perspective: hidden diversity in coral endosymbionts unveiled. *Molecular Ecology*, 16, 1125–1126.

Oswald F, Schmitt F, Leutenegger A, Ivanchenko S. (2007). Contribuciones de pigmentos anfitriones y simbiontes a la coloración de los corales de arrecife. *FEBRERO J 274:1102 - 1109*

Palmer, CV, Modi, CK y Mydlarz, LD (2009). Proteínas fluorescentes de coral como antioxidantes. *PloS uno*, 4 (10), e7298.

Reol, E. M. (2003). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*, 12(1).

Ribau, N. A. D. O. (2011). Fotobiología de *Discosoma* sp.: efeito de diferentes regimes luminosos na actividade fotossintética dos seus dinoflagelados endosimbiontes *Symbiodinium* sp (Doctoral dissertation).

Ricaurte, M., Schizas, NV, Ciborowski, P. y Boukli, NM (2016). Análisis proteómico de *Acropora palmata* blanqueada y sin blanquear, una especie de coral amenazada del Caribe. *Boletín de contaminación marina*, 107 (1), 224-232.

Richier S, Furla P, Plantivaux A, Merle PL, Allemand D (2005). Adaptación inducida por simbiosis al estrés oxidativo. *J Exp Biol* 208: 277–285

Roth, MS y Deheyn, DD (2013). Efectos del estrés por frío y estrés por calor en la fluorescencia de los corales formadores de arrecifes. *Informes científicos*, 3 (1), 1-8.

Salih, A. (2012). Control de fluorescencia en estructuras fotónicas basadas en proteína verde fluorescente natural (GFP) de corales de arrecife. En *Optical Biomimetics* (págs. 199-235e). Woodhead Publishing.

Salih, A., Hoegh, O. Gramouldberg, Y., & Buey, G. (2000). Fotoprotección de dinoflagelados simbióticos por pigmentos fluorescentes en corales de arrecife, p. 217–230. Greenwood y NJ Hall [eds.], *Proc. de la Conferencia del 75 Aniversario de la Sociedad Australiana de Arrecifes de Coral*.

Smith, EG, D'Angelo, C., Salih, A. y Wiedenmann, J. (2013). La detección mediante cromoproteínas similares a la proteína fluorescente verde coralina (GFP) respalda un papel en la fotoprotección de las zooxantelas. *Arrecifes de coral*, 32 (2), 463-474.

Soffer, N.; Gibbs, PDL; Panadero, CA (2008). Aplicaciones prácticas de cultivos *Symbiodinium* libres de contaminantes cultivados en medios sólidos. *Simposio Internacional de Arrecifes de Coral*, Sesión número 5.85, p. 159-163.

Steinegger, M., Meier, M., Mirdita, M., Vöhringer, H., Haunsberger, SJ, Söding, J. (2019). "HH-suite3 para detección rápida de homología remota y anotación profunda de proteínas", *BMC Bioinformatics* 20, 473.

Sugumaran M, Kanost MR, eds (1993). *Regulación de las fenoloxidasas de hemolinfa de insectos*. San Diego: Academic Press Inc. págs. 317–342.55.

SWISS-MODEL Workspace/ GMQE Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, FT, de Beer, TAP, Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: modelado de homología de estructuras y complejos de proteínas. *Ácidos Nucleicos Res.* 46, W296-W303.

Takahashi-Kariyazono, S., Gojobori, J., Satta, Y., Sakai, K. y Terai, Y. (2016). *Acropora digitifera* codifica la familia más grande conocida de proteínas fluorescentes que ha persistido durante la evolución de las especies de *Acropora*. *Biología y evolución del genoma*, 8 (11), 3271-3283.

Tsien RY (1998), *Proteína verde fluorescente: revisión*, *Ann Rev Biochem*, 67,509–544.

Ugalde, J. A., Chang, B. S., & Matz, M. V. (2004). Evolution of coral pigments recreated. *Science*, 305(5689), 1433-1433.

Venn, A.; Loram, J.; Douglas, A. (2008). Simbiosis fotosintéticas en animales. *Revista de Botánica Experimental*, Nº 10, pág. 1-12.

Voolstra, CR, Schnetzer, J., Peshkin, L., Randall, CJ, Szmant, AM, Medina, M., (2009). Efectos de la temperatura sobre la expresión génica en embriones de coral. *Montastraea faveolata*. *BMC Genomics* 10, 627.

Yellowlee D.; Rees, TAV; Leggat, W. (2008). Interacciones metabólicas entre algas simbiotes e invertebrados huéspedes. *Planta, Célula y Medio Ambiente*, nº 31, p. 679–694.

Yuyama, I., Harii, S. y Hidaka, M. (2012). El tipo simbiote de algas afecta la expresión génica en juveniles del coral *Acropora tenuis* expuestos a estrés térmico. *Investigación ambiental marina*, 76, 41-47.

Zacharias, DA (2002). Advertencias pegajosas en un informe brillante: oligomerización de proteínas fluorescentes y su uso en biología celular. *STKE de Science*, 2002 (131), pe23-pe23.

Zimmer, M. (2002). Proteína fluorescente verde (GFP): aplicaciones, estructura y comportamiento fotofísico relacionado. *Revisiones químicas*, 102 (3), 759-78.