



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Actividad de fenoloxidasa de *Exaiptasia diaphana* como
respuesta inmune a ciclos biológicos.**

Tesis para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Presenta:

MIEL ARELI RODRÍGUEZ JIMÉNEZ

Directora: Dra. Patricia E. Thomé Ortiz
Codirectora: M. en C. Jacqueline Rivera Ortega



DICIEMBRE 2024

Este trabajo se realizó en las instalaciones de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, ICML, UNAM, con sede en Puerto Morelos, Quintana Roo. En marco del programa UNAM-PAPIIT (IN201323).

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio 8, aquel que confió tanto en nosotras que nos dejó ser dentro y fuera del gabinete y la experimentación. Doctora Paty, gracias por seguir buscando y aprendiendo a nuestro lado, su cariño y preocupación los recordaré alegremente. Jacky, tu esfuerzo nos ha llevado hasta este punto, gracias por recibirnos y ser una guía en este camino. Gali y Lupita, ustedes inyectaron alegría y sabiduría al laboratorio y a mi vida.

A todos aquellos que me cobijaron en la ciencia, especialmente a la bonita comunidad de la UASA, Puerto Morelos, del ICML UNAM; ustedes me reafirman mi pensar: la ciencia es para compartir.

Agradezco al doctor Ernesto Maldonado por permitirme usar su equipo, así como a Vivi por sus consejos y enseñanzas útiles.

A mis maestros y a la información con acceso libre, ustedes también hicieron posible esta tesis. También les agradezco su tiempo y sus comentarios Dr. Sandoval y Dra. Norma Santibañez.

A ustedes amigos foráneos, las risas, desveladas, comidas en familia, paseos en bici y el fraternalismo los tendré siempre en mí. Especialmente a Karlita, Lupita, Gali, Monse, Zuñiga, Yas, Eli y Cyn gracias por no dejarme rendir y enseñarme que hay vida fuera del laboratorio. Que el mar nos siga uniendo en un futuro.

A la doctora Cristina Pascual, por darme esperanza y confort cuando creía que no era capaz.

Gracias porque desde la lejanía me ayudaron: Héctor, Vik, Aitza, Erick, Rola, Diana y Naxu.

Agradezco a mis hermanos biólogos, aquellos que calmaron mis nervios y nunca me soltaron para continuar en la carrera, siempre los tengo presente: Xenia, Diana, Abraham, Ni, Jayro y Aldo, lo logramos.

Agradezco infinitamente la puerta que tocaste, sin ti no hubiera sido posible, gracias, Diana.

Al naranjoso, por creer en mí, por no soltarme, por sumarme, por ser un respiro de aire fresco.

Al que me deja pelos en mi ropa, Malis, sigue calentándome y ronroneando eternamente.

A mi hermana por elección, por tener siempre las palabras y el abrazo correcto. Por enseñarme a querer y a sanar. Karen, eres un curita para mi alma.

A mis sobrinos, porque han sido una razón más para aprender y continuar en este camino.

A mi mamá y mis hermanas, por apoyar mi sueño, por brindarme seguridad y confianza al lograr mis objetivos. Por no dudar y creer en mí. Son salvavidas en mi mar inestable. Ustedes son mi holobionte, mi estabilidad. Las amo.

A ti Trini, tu bebé está cumpliendo sus sueños.

Todos pueden hacer ciencia.

PREFACIO

La presente tesis está basada en los siguientes trabajos:

Artículo publicado:

Rodríguez-Jiménez, M. A., Rivera-Ortega, J., & Thomé, P. E. (2024). Fluctuations in immune response (phenol oxidase activity) related to circadian and lunar cycles in the symbiotic anemone *Exaiptasia diaphana* (Actinaria: Aiptasiidae). *Ciencias Marinas*, 50(1B). <https://doi.org/10.7773/cm.y2024.3505>

Trabajos presentados en congresos:

- Rodríguez-Jiménez, M. A., Rivera-Ortega, J., & Thomé, P. E. Caracterización de la vía de la profenoloxidasas (PO) en el organismo modelo *Exaiptasia diaphana* enfocado en el ciclo circadiano. *7ª semana de la Inmunología, Facultad de Medicina de la UNAM*. Ciudad de México, 12 al 14 de junio de 2023.
- Rodríguez-Jiménez, M. A., Rivera-Ortega, J., & Thomé, P. E. Fluctuaciones de la actividad de fenoloxidasas a lo largo del día en el organismo modelo *Exaiptasia diaphana*. *XII Congreso Mexicano de Arrecifes Coralinos y III Congreso Panamericano de Arrecifes Coralinos*, Ensenada, Baja California, 22 al 26 de abril de 2024.
- Rodríguez-Jiménez, M. A., Rivera-Ortega, J., & Thomé, P. E. Basal immunological variability (Phenol Oxidase activity) of the anemone *Exaiptasia diaphana*. *1er Congreso Internacional ENVIRO-EpiHEALTH (MEX)*, Puebla, Puebla, 05 al 07 de junio de 2024.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. MARCO TEÓRICO	15
2.1 Un organismo modelo	15
2.2 Generalidades del sistema inmune	15
2.3 Inmunidad de invertebrados	16
2.4 Fenoloxidasas: una enzima de defensa	18
2.5 Mucus, una capa protectora	20
2.6 Ritmos biológicos: reloj circadiano y fases lunares	21
3. ANTECEDENTES	22
3.1 Defensa inmune en cnidarios.....	22
3.2 El mucus, una herramienta en la inmunidad.....	26
3.3 Cnidaria y sus ciclos biológicos	27
3.4 <i>E. diaphana</i> y su respuesta inmune	29
4. JUSTIFICACIÓN	37
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN GENERAL.....	38
6. HIPÓTESIS GENERAL.....	38
7. OBJETIVO GENERAL	38
8. OBJETIVOS PARTICULARES	38
9. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN PARTICULARES E HIPÓTESIS	39
10. MÉTODOS.....	39

10.1	Características de <i>E. diaphana</i>	39
10.2	Diseño experimental	40
10.3	Mantenimiento de los organismos	43
10.4	Registro de temperatura y luz	44
10.5	Extracción de mucus	45
10.6	Cuantificación de la actividad de fenoloxidasa.	46
10.7	Densidad de simbioses	47
10.8	Determinación de proteína	49
10.9	Análisis estadístico	50
11.	RESULTADOS	52
11.1	Registro de temperatura y luz	52
11.2	Actividad de fenoloxidasa	53
11.3	Volumen de mucus	57
11.4	Densidad de simbioses	58
11.5	Proteína total	62
12.	DISCUSIÓN	66
12.1	Variabilidad de PO acoplada al ciclo circadiano	67
12.2	Variabilidad de PO sincronizada al ciclo lunar	68
12.3	Producción de mucus	68
12.4	El rol del simbiote	69
12.5	Cuantificación de proteína	70
12.6	Perspectivas futuras	71
13.	CONCLUSIONES	72
14.	LITERATURA CITADA	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de antecedentes	30
Tabla 2. Fechas de experimentación para cada fase lunar realizadas en 2023.	40
Tabla 3. Fechas de experimentación para el experimento de densidad de simbioses.	42
Tabla 4. Composición de los reactivos utilizados para la extracción de proteínas.	50
Tabla 5. Librerías y funciones utilizadas para cada prueba del análisis de datos en el software RStudio.	51
Tabla 6. Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para las distintas variables de respuesta mediadas por la luna (llena y nueva) y el estado simbiótico de la anémona (aposimbióticas y simbióticas).....	55
Tabla 7. Prueba post-hoc de Mann Whitney Wilcoxon para encontrar las diferencias entre los grupos resultantes de la combinación de la luna y el estado de simbiosis de las anémonas.	56
Tabla 8. Prueba de Kruskal Wallis para la densidad de simbioses en luna llena, luna nueva y sin importar la fase lunar a lo largo de las horas del día (20:00, 2:00, 8:00 y 14:00).	60
Tabla 9. Prueba post-hoc de Mann Withney Wilcoxon para encontrar los grupos que difieren de la densidad de simbioses entre las diferentes horas del día.....	60
Tabla 10. Valores estadísticos sobre la correlación de Spearman entre la densidad de simbioses y la actividad de fenoloxidasa en las anémonas <i>E. diaphana</i> simbióticas.	61
Tabla 11. Valores recopilados sobre la actividad de fenoloxidasa, proteína y mucus en dos repeticiones experimentales en <i>E. diaphana</i> (n = seis)	64
Tabla 12. Resumen de resultados	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema sobre el proceso de activación de fenoloxidasa en <i>Holotrichia diomphalia</i>	20
Figura 2. <i>E. diaphana</i> de 20 mm vistas en un estereoscopio.	40
Figura 3. Representación gráfica del diseño experimental en el que se basaron las dos repeticiones en luna llena y luna nueva.	41
Figura 4. Diagrama de flujo sobre la sección de métodos.	42
Figura 5. Ubicación de las anémonas <i>E. diaphana</i>	43
Figura 6. Primera aclimatación en contenedores de cuatro litros, posteriormente la segunda aclimatación en placas de seis pozos.	44
Figura 7. Anémonas en placas de seis pozos con agua de mar.	45
Figura 8. De izquierda a derecha <i>E. diaphana</i> aposimbiótica y simbiótica relajadas.	46
Figura 9. Lectura de absorbancia de la actividad de fenoloxidasa en el lector de placas.	47
Figura 10. Anémona simbiótica en tubo de plástico de 2.5 mL con 500 µL de agua de mar previo a la homogenización.....	48
Figura 11. Cuantificación de densidad de simbioses.	48
Figura 12. Ejemplo de una curva control para la determinación de proteína.	49
Figura 13. Gráfica de temperatura y luz durante las horas de muestreo en dos fases lunares.	52
Figura 14. Actividad de fenoloxidasa normalizada a volumen de mucus a lo largo del día en <i>E. diaphana</i> aposimbiótica y simbiótica en dos fases lunares (llena y nueva).	53
Figura 15. Actividad de fenoloxidasa respecto al estado simbiótico y la fase lunar.....	54

Figura 16. Actividad de fenoloxidasa en el organismo modelo <i>E. diaphana</i> entre la interacción de los grupos de luna (llena y nueva) y el estado simbiótico (aposimbióticas y simbióticas).	56
Figura 17. Volumen de mucus expulsado por anémonas simbióticas y aposimbióticas a lo largo del día en dos fases lunares (luna nueva y llena).	57
Figura 18. Volumen de mucus expulsado respecto al estado simbiótico y la fase lunar.	58
Figura 19. Densidad de simbioses a lo largo del día en las anémonas simbióticas <i>E. diaphana</i>	59
Figura 20. Relación negativa entre la densidad de simbioses y la actividad de PO en <i>E. diaphana</i> simbióticas aparentemente sanas.	61
Figura 21. Cantidad de proteína total en <i>E. diaphana</i> simbiótica y aposimbiótica en luna nueva y luna llena a lo largo del día.	62
Figura 22. Cantidad de proteína total en <i>E. diaphana</i> respecto al estado simbiótico y la fase lunar.	63

RESUMEN

La respuesta inmune en cnidarios es una herramienta que proporciona información para complementar el entendimiento de problemáticas actuales. Algunos ejemplos son la hipótesis de umbral de daño utilizada para comprender el blanqueamiento. Además, al describir las enfermedades, la respuesta inmune potencialmente podría proporcionarnos una mejor interpretación de niveles basales. Asimismo, el seguimiento de la inmunidad constitutiva puede también ser empleado en la restauración coralina.

Los cnidarios emplean la enzima fenoloxidasa en su defensa inmune que se activa en presencia de patógenos, generando compuestos reactivos y tóxicos para su eliminación. La anémona *Exaiptasia diaphana* sirve como un organismo modelo para diversos estudios biológicos en cnidarios. Esta anémona mantiene una simbiosis facultativa con microalgas de la familia Symbiodiniaceae, como los corales y también puede existir en un estado aposimbiótico. Por lo tanto, representa un modelo adecuado para estudiar el sistema inmune de los cnidarios. El sistema inmune se ha relacionado con los ritmos biológicos en varios organismos, sin embargo, la información en cnidarios es limitada. Caracterizar la respuesta inmune en condiciones basales en cualquier organismo es vital, ya que los procesos biológicos no son constantes.

Para establecer información inmune básica para esta anémona, se exploró la variabilidad de la actividad inmune a lo largo del día considerando dos fases lunares (luna llena y luna nueva). Se tomó muestras de mucus de anémonas simbióticas y aposimbióticas bajo condiciones de luz natural, midiendo la actividad de fenoloxidasa cada 6 horas, para un total de 48 horas. Cada fase lunar tuvo dos repeticiones (384 anémonas en total). La actividad de fenoloxidasa mostró altas fluctuaciones durante el día, mientras que la actividad nocturna fue baja. La fase de luna llena influyó en la actividad de la enzima en las anémonas aposimbióticas, mostrando una alta actividad ($H = 17.47$, $gl = 3$, $P = 0.0005$). Se encontró una relación negativa entre la densidad de simbiosis y la actividad de fenoloxidasa. Estos resultados sugieren que las anémonas mantienen una inmunidad constitutiva constante en condiciones de cautiverio que responden a ciclos biológicos como los circadianos y lunares.

Palabras clave: inmunidad constitutiva, mucus, ritmos biológicos, fases lunares, simbiosis, ciclo circadiano

ABSTRACT

Immune response in cnidarians is a tool that provides information to complement the understanding of current problems. Examples are the damage threshold hypothesis used to understand bleaching. In addition, in describing diseases, the immune response could potentially provide a better interpretation of basal levels. Likewise, the monitoring of constitutive immunity can also be employed in coral restoration.

Cnidarians employ the enzyme phenol oxidase in their immune defense, activated in the presence of pathogens, producing reactive and toxic compounds for their elimination. The anemone *Exaiptasia diaphana* is a model organism for diverse biological studies in cnidarians. This anemone maintains facultative symbiosis with microalgae of the Symbiodiniaceae family, like corals and it can also exist in an aposymbiotic state. Therefore, it represents a suitable model for studying the Cnidarian immune system. The immune system has been associated with biological rhythms in several organisms, however, the information in cnidarians is limited. Characterizing the immune response in basal conditions in any organism is vital, as biological processes are not constant.

To establish basic immune information for this anemone, the variability of immune activity throughout the day was explored considering two lunar phases (full moon and new moon). Mucus samples were taken from symbiotic and aposymbiotic anemones under natural light conditions, measuring phenol oxidase activity every 6 hours, for 48 hours. Each moon phase had two repetitions (384 anemones total). Phenol oxidase activity showed high fluctuations during daylight hours, while the nocturnal activity was low. The full moon influenced enzyme activity in aposymbiotic anemones, showing a high activity ($H = 17.47$, $df = 3$, $P = 0.0005$). A negative relationship was found between symbiotic density and phenol oxidase activity. These results suggest that anemones maintain a constant constitutive immunity under captive conditions that respond to biological cycles such as circadian and moon cycles.

Keywords: constitutive immunity, mucus, biological rhythms, lunar phases, symbiosis, circadian cycle.

1. INTRODUCCIÓN

Los arrecifes de coral son ecosistemas marinos que ofrecen refugio a una gran variedad de especies de peces e invertebrados (Souter & Lindén, 2000). Los organismos que sirven de base en los arrecifes de coral son los corales escleractinios, siendo soportes de la biodiversidad proveyendo servicios ecosistémicos a miles de organismos y personas (Spalding & Brown, 2015). Actualmente, factores de estrés amenazan no solo a los corales, sino a todos los organismos que conforman este ecosistema (Angiolillo & Fortibuoni, 2020). El aumento de la temperatura del mar, el desarrollo costero, la sobrepesca, los contaminantes sólidos y microplásticos son algunos factores que aportan a la degradación y disminución de la salud de estos invertebrados (Hughes et al. 2017; van Oppen et al. 2015).

Para comprender el proceso de respuesta ante este panorama y proponer estrategias que contrarresten cambios adversos, se han estudiado diversos cnidarios simbióticos. *Exaiptasia diaphana* es un organismo modelo fundamental para el entendimiento de diversos procesos en los cnidarios simbióticos, como la simbiosis, la nutrición y la inmunidad (Lehnert et al. 2012; Matthews et al. 2017; Rådecker et al. 2018; Mansfield & Gilmore, 2019; Dungan et al. 2020). Los organismos modelo se utilizan ampliamente para indagar procesos en los que la experimentación en el sistema de interés tiene viabilidad limitada o restricción ética (Dungan et al. 2020). Asimismo, son lo bastante similares a los corales (ambos antozoos simbióticos) como para que los hallazgos pueden ser extrapolados significativamente (Puntin et al. 2022).

En general los cnidarios son descritos como holobiontes complejos que se definen como el animal y su conjunto de microorganismos internos y externos (Bourne et al. 2009), es decir, el holobionte se conforma por el cnidario, la microalga endosimbiótica y la microbiota. Dentro de esta microbiota encontramos arqueas, bacterias, hongos y protistas. Así como miles de cnidarios, *E. diaphana* presenta simbiosis con microalgas de la familia Symbiodiniaceae (Weis et al. 2008).

En condiciones normales el holobionte se mantiene en equilibrio mediante su sistema inmune, promoviendo la salud y protegiendo sus asociaciones para un funcionamiento óptimo (Palmer, 2018). Sin embargo, algunos estresores pueden contribuir a aumentar la incidencia de enfermedades (Bruno et al. 2007), para lo cual los cnidarios presentan algunas alternativas para

protegerse, a través de un sistema inmunológico. Además, el sistema inmune es en extremo sensible a cambios ambientales modulados por la estacionalidad, la temperatura y responde a todo lo que desestabiliza el bienestar del organismo (Martin et al. 2008).

El sistema inmunológico de los cnidarios se clasifica en tres funciones principales: el reconocimiento inmunológico, vías de señalización y respuesta efectora (Mydlarz et al. 2016). En general, la capacidad de detectar patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP) y patrones moleculares asociados a daño (DAMP), se logra mediante receptores codificados en la línea germinal conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Bosch, 2008; Augustin et al. 2010), que activan vías de señalización para producir respuestas inmunes (Cerenius et al. 2008).

Entre las respuestas inmunes innatas en cnidarios, se encuentra la vía de síntesis de la melanina. Esta vía es activada mediante la proteólisis de algunos zimógenos, profenoloxidasas a fenoloxidasas activas (PO) (Cerenius et al. 2003), lo que comúnmente conduce a la síntesis del pigmento melanina. La melanina encapsula microorganismos invasores, potencialmente patógenos. La activación de la fenoloxidasa es un sistema clave para la defensa inmune de los invertebrados en contra de los ataques de patógenos, ya que, en el proceso de síntesis, produce una variedad de compuestos altamente reactivos y tóxicos, como radicales libres citotóxicos, agentes aglutinantes y opsoninas (Cerenius et al. 2008; Cerenius & Soderhäll 2021) capaces de eliminar a microorganismos invasores. La actividad de PO se usa como una métrica de salud, en la que se observa una relación positiva entre su actividad y la resistencia a la infección de varios invertebrados (Mydlarz & Palmer, 2011).

La participación de diversos procesos fisiológicos en los cnidarios influye en su inmunidad y por ende en la salud del organismo. Los procesos biológicos alternan periodos de alta actividad y periodos de escasa o nula actividad (Cardinali, 2005). Por ejemplo, la relación simbiótica con microalgas en un animal con comportamiento nocturno representa un reto para el estudio de los parámetros basales, ya que ambos se rigen por ritmos biológicos distintos.

Los ritmos biológicos permiten a los organismos generar una respuesta anticipada y adaptarse a los cambios ambientales diarios (Roenneberg & Merrow, 2005). Además, la integración de los procesos fisiológicos y metabólicos con el reloj biológico conservan en un estado óptimo al organismo (Bednářová et al. 2013). Los cnidarios muestran comportamientos

distintivos en el día y la noche; por ejemplo, muchas investigaciones han caracterizado patrones de comportamiento sobre los tentáculos, describiendo una extensión por la noche que es útil para su alimentación, mientras que el día se contraen (Sweeney, 1976; Sebens & DeRiemer, 1977). Además, el ciclo lunar influye en las actividades periódicas de los cnidarios, mostrando cambios en el comportamiento especialmente en su reproducción (Sakai et al. 2020). En los corales, los ciclos lunares regulan el desove (Harrison et al. 1984); y en conjunto con factores como la temperatura, pueden variar sus patrones reproductivos (Lin & Nozawa, 2023). Por lo tanto, los ritmos biológicos, tanto el circadiano como el lunar, rigen diversos procesos en los organismos en condiciones basales.

El reloj biológico desempeña un papel fundamental en el control de las funciones fisiológicas, regulando varias vías de señalización como es la respuesta inmune (Fagiani et al. 2022). Estudios en mamíferos, han encontrado que el ciclo circadiano está relacionado con la migración de células del sistema inmune innato, así como con cambios en la expresión de moléculas inmunitarias (Scheiermann et al. 2013, 2018). Desde las plantas hasta los ratones, se ha visto que cuando los organismos enfrentan un desafío inmunológico (por ejemplo, una infección), estos responden mejor en su fase activa (Westwood et al. 2019). En el caso de los cnidarios aún no se ha estudiado la relación entre los ritmos biológicos y el sistema inmune.

Tanto en corales constructores de arrecifes como en el organismo modelo *E. diaphana* se han reportado investigaciones con fenoloxidasa como medida de salud, ante la exposición de enfermedades (Mydlarz et al. 2009; Palmer et al. 2010; Rivera-Ortega & Thomé, 2018). No obstante, el estudio de la respuesta inmune basal y su relación con los ritmos biológicos ha sido limitada. Estudiar la respuesta inmune en condiciones basales es importante ya que los procesos biológicos en cualquier organismo no son constantes (Cardinali, 2005). En el presente trabajo se caracterizó la variación de la actividad de fenoloxidasa en las anémonas *E. diaphana* sanas, tanto simbióticas como aposimbióticas a lo largo del día, en las fases lunares de luna llena y luna nueva.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Un organismo modelo

Las anémonas de mar de la familia Aiptasiidea son organismos de aguas tropicales y subtropicales poco profundas, compartiendo la misma distribución que los corales escleractinios (Grajales & Rodríguez, 2016). Se encuentran en costas tropicales del Atlántico, Pacífico y el Mar Caribe (Carlisle et al. 2016). *E. diaphana* mide menos de 60 milímetros (mm) de largo y es un antozoo que mantiene simbiosis con microalgas de la familia Symbionidaceae (Bellis & Denver 2017; Dungan et al. 2020).

Durante más de 30 años se ha convertido en excelente modelo de laboratorio debido a características como la rápida tasa de crecimiento, reproducción asexual mediante laceración de pedal, el mantenimiento en una etapa libre de simbiosis, entre otras (Grajales & Rodríguez, 2016; Rådecker et al. 2018). Sin embargo, esta anémona de mar fue formalmente propuesta por Weis et al. (2008) como un sistema útil para plantear cuestiones biológicas de relevancia para estudiar los sistemas de arrecifes de coral en temas como la simbiosis, reproducción, desarrollo de dinoflagelados, el reconocimiento y especificidad, logrando el uso generalizado y exitoso en trabajos de laboratorio.

2.2 Generalidades del sistema inmune

El sistema inmunológico surgió y evolucionó para la protección de los organismos multicelulares de un gran repertorio de patógenos, mediante una red compleja de células, moléculas y vías capaces de eliminarlos de forma eficaz. Referirnos a un sistema inmunológico es comprender que se compone por dos sistemas interconectados: innato y adaptativo (Punt et al. 2020).

La inmunidad innata se define como la primera línea de defensa de los organismos y representan una respuesta inmediata en contra de patógenos y otras amenazas (Moser & Leo, 2010). Además, cuenta con mecanismos moleculares y celulares, así como con la presencia de barreras físicas y químicas (piel, membranas mucosas, saliva, lágrimas), con el objetivo de prevenir y eliminar la mayoría de las infecciones en cuestión de horas. Sus elementos de

reconocimiento son rápidos, produciéndose segundos después de una ruptura en la barrera, pero no son específicos para reconocer cambios a nivel aminoácidos (Punt et al. 2020).

Mientras que la inmunidad adaptativa, o también conocida como adquirida, normalmente actúa días después de la infección. Elimina a todos los patógenos que evaden o persisten después de las respuestas innatas. Posterior a la eliminación del patógeno, establece una memoria que se distingue por la capacidad de proteger al organismo de una reinfección por el mismo agente (Moser & Leo, 2010). Las cuatro características fundamentales del sistema inmunológico adaptativo son la especificidad, diversidad, memoria y reconocimiento de lo propio/no propio (Oldham, 2009; Reed et al. 2010; Abbas et al. 2022).

2.3 Inmunidad de invertebrados

El sistema inmunológico de los invertebrados presenta un sistema inmune innato y su inmunidad se limita a una diversa gama de respuestas inflamatorias que están mediadas directa o indirectamente por células circulantes (Smith, 2010). La inmunidad en invertebrados es diversa, para aquellos que cuentan con un sistema circulatorio abierto está dirigida por celomocitos, desarrollados en el mesodermo y fluyen a través del fluido celómico. En los moluscos las células de defensa son los hemocitos que derivan del hemocele y se encuentran en la hemolinfa. Por otro lado, en los invertebrados acelomados, las células responsables son los amebocitos y fluyen por la mesoglea (Smith, 2010). Dentro de los diferentes roles funcionales de las células inmunes está el reconocimiento de lo propio y no propio, fagocitosis, encapsulación, citotoxicidad, entre otros (Smith, 2010).

Además, también existen mecanismos humorales en la inmunidad innata de los invertebrados que comparten el objetivo con otros mecanismos de responder ante patógenos potenciales, asegurando la homeostasis del organismo (Palmer, 2018). Parte de inmunidad humoral en invertebrados son PRR, las cascadas proteolíticas y los péptidos antimicrobianos (Sánchez-Salgado et al. 2021).

En los animales invertebrados se consideran tres aspectos: reconocimiento, vías de señalización y respuesta efectora; el primero involucra el reconocimiento de patrones de moléculas asociados a microorganismos (MAMP) que se encuentran altamente conservados dentro de dichos microorganismos y ausentes en el huésped, además de los patrones de

reconocimiento asociados al daño (DAMP). Esta unión significa el inicio del proceso de una respuesta efectora mediante una señalización intracelular para desarrollar una respuesta inmune diversa (Beutler, 2004; Ellis et al. 2011).

Los responsables de detectar la presencia de microorganismos, como se mencionó anteriormente, son los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) codificados por la línea germinal (Takeuchi & Akira, 2010). Además, son vitales para la comunicación entre el huésped y la microbiota, debido al constante intercambio de información. Los PRR son proteínas ubicadas en la membrana celular y a nivel intracelular; reconocen peptidoglicanos, lipopolisacáridos, ácido lipoteicoico, β -1-3 glucanos, entre otros. Dentro de los principales receptores descritos en invertebrados, como los cnidarios, son los receptores tipo Toll (TLR), receptores de lectinas tipo C (CLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores tipo Rig (RLR), receptores acoplados a proteína G (GPCR), las proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos (PGRP), receptores carroñeros (SR) y las integrinas (Dierking & Pita, 2020; Leal et al. 2022).

Posterior al ingreso de microorganismos o de la detección de señales reconocidas por los PRR, el animal enciende una vía de señalización. Algunas de estas vías son normalmente cascadas proteolíticas que activan los mecanismos de protección (Little et al. 2005). Las cascadas proteolíticas son las reacciones de coagulación, el sistema complemento y la cascada de activación de fenoloxidasa que produce melanina (Cerenius et al. 2010).

Los cnidarios son animales acuáticos filogenéticamente basales de los Metazoos, sin embargo, tienen una complejidad inmune. El estudio de inmunidad en cnidarios ha sido relativamente reciente. Sin embargo, se ha comprobado que el sistema inmune se encuentra constantemente activo, verificando y realizando los ajustes necesarios, lo anterior se denomina inmunidad constitutiva (Palmer, 2018). Aunque los receptores de reconocimiento y las múltiples vías de señalización se activan tras el reconocimiento de patógenos, algunos mecanismos efectores muestran actividad constitutiva, es decir, niveles basales o no inducidos directamente por patógenos (Pinzón et al. 2014b). Previamente se pensaba que una falta de actividad inmune significaba un sistema inmunitario inactivo; sin embargo, la presencia de microorganismos asociados, como simbiosis, indica más bien, una tolerancia (Moreno-García et al. 2014).

Además de los niveles basales y el reconocimiento de patógenos, el sistema inmunológico participa en la composición de comunidades microbianas, como por ejemplo la simbiosis o la microbiota. También, los cnidarios coloniales pueden distinguir los tejidos iguales a los de sus congéneres contiguos (Parisi et al. 2020).

2.4 Fenoloxidasa: una enzima de defensa

La fenoloxidasa es una enzima activadora en la síntesis de melanina, siendo parte del sistema de profenoloxidasa (proPO), unidad esencial en el sistema inmune innato. Esta enzima ha sido detectada en la hemolinfa o el celoma de varios invertebrados, indicando que este proceso es compartido en diversos grupos de artrópodos y es probablemente universal para el filo entero (Söderhäll et al. 1986). Generalmente esta enzima se encuentra como un zimógeno, es decir, una proenzima en su forma inactiva y la conversión de la profenoloxidasa a fenoloxidasa, está dada por una serie de proteólisis por serinas proteasas a través de un sistema activador endógeno o agentes exógenos (Hellio et al. 2007).

La enzima activada cataliza la oxigenación de fenoles a quinonas, los cuales finalmente pueden polimerizar a la melanina (Johansson & Söderhäll, 1989; Cerenius & Söderhäll 2004). La eliminación de patógenos normalmente está conectada con la producción de melanina o los intermediarios de reacción tóxica; no obstante, en estudios de algunos insectos y crustáceos sugieren que los productos del gen profenoloxidasa otorga inmunidad al huésped incluso sin una melanización visible (Cerenius & Söderhäll, 2021).

El sistema de activación de fenoloxidasa se describió por primera vez en la hemolinfa de un artrópodo, el gusano de seda, *Bombyx mori*. Surgieron varias hipótesis sobre su activación, entre ellas: 1) un proceso auto catalítico, 2) una proteólisis limitada de la pre-enzima por el activador y 3) la fijación de las subunidades (Ashida et al. 1967).

Söderhäll et al. (1979) realizaron un estudio con el cangrejo de río *Astacus astacus*, reportando que las fenoloxidasas se encuentran en los hemocitos, debido a que el material granular presentó actividad de fenoloxidasa. Además, mencionan que la fenoloxidasa responde a las células de las paredes de parásitos fúngicos, conocidos como los β -1-3 glucanos, provocando su activación. Posterior a su activación, los parásitos fúngicos son encapsulados y

eventualmente melanizados. Para este trabajo persistía la incógnita sobre la molécula o célula encargada del reconocimiento de los parásitos.

Posteriormente, [Cerenius et al. \(1991\)](#) encontró que el sistema de fenoloxidasa también se activaba con la presencia de peptidoglicanos y lipopolisacáridos. Además, se describieron más factores producidos por la activación del sistema, entre ellos, la encapsulación de células opsoninas, citotóxicas y los fungicidas que funcionan en la eliminación de los agentes intrusos de la cavidad del organismo.

La activación del sistema de fenoloxidasa es un proceso controlado, en el que todas las PO caracterizadas en la mayoría de los artrópodos, se sintetizan como precursores inactivos. La serina proteasa encargada de la proteólisis del precursor de proPO ha recibido distintos nombres como lo son proteína, enzima o factor, generalmente es más común utilizar el término de enzima activadora de profenoloxidasa (ppA). Esta enzima contiene un dominio de serina proteasa carboxi-terminal y dominios tipo clip en su extremo amino, los cuales se convierten proteolíticamente activos en presencia de elicitores ([Wang et al. 2001](#); [Cerenius & Söderhäll, 2004](#)).

El proceso de proteólisis es el mismo en la mayoría de los artrópodos, distinguiéndose de la presencia de uno a más factores. Para ejemplificar, ocuparemos la información de *Holotrichia diomphalia* para la descripción de este proceso. En esta especie de escarabajo, la ppA se denomina factor activador de profenoloxidasa (PPAF). Inicia con la cadena ascendente de proteínas de reconocimiento de patrones y proteasas que induce la escisión de la PPAF-III en PPAF-III catalíticamente activo. Esta proteasa activada escinde el homólogo de la serina proteasa proPPAF-II para activarla. Por otro lado, la activación del proPO sucede en dos pasos, el primero es la escisión proteolítica de proPO (pasando de 79 a 76 kDa) mediada por PPAF-I activo. La escisión de proPO por sí sola no es suficiente para dar lugar a una PO activa, por lo tanto, el segundo paso esta mediado por el PPAF-II activo y permite la aparición de una PO enzimáticamente activa ([Kwon et al. 2000](#); [Cerenius et al. 2008](#), [Figura 1](#)).

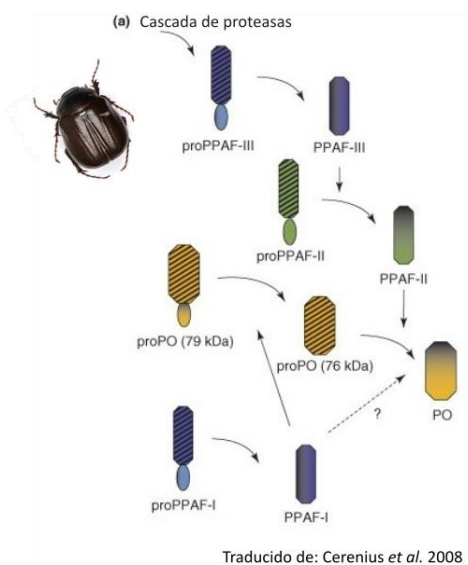


Figura 1. Esquema sobre el proceso de activación de fenoloxidasas en *Holotrichia diomphalia*.

En los cnidarios, tanto en el tejido como en el mucus se ha detectado fenoloxidasas en presencia de enfermedades y en organismos sanos. Estos reportes han sido en diversos panoramas, sin distinguir entre la forma de crecimiento, la especie, el tipo de reproducción y el contexto abiótico y biótico (Mydlarz et al. 2009; Palmer et al. 2011; Rivera-Ortega & Thomé, 2018; Thomé et al. 2021; Toledo-Hernández et al. 2023).

2.5 Mucus, una capa protectora

Como se mencionó anteriormente, las barreras físicas desempeñan un papel esencial en la defensa del organismo (McDonald & Levy, 2019). Los cnidarios cuentan con la capa mucosa superficial (CMS), que está compuesta por un complejo de polisacáridos, lípidos y proteínas entrelazados, que forman una biopelícula que contiene más del 95% de agua. Su funcionalidad radica en ser la primera línea de defensa contra patógenos invasores en cnidarios, puesto que es una barrera fisicoquímica protectora entre el tejido animal y el ambiente externo (Brown & Bythel, 2005). La CMS también participa en varios procesos biológicos y se considera como una capa dinámica, puesto que permite la transferencia de gases, el almacenamiento de metabolitos, la locomoción, el soporte estructural, la captura de partículas de alimentos y además varía con el medio ambiente y con el tiempo. Asimismo, es un nicho para la comunidad microbiana comensal y simbiótica asociada a los corales, los cuales suministran nutrientes y

participan en la defensa antimicrobiana (Brown & Bythell, 2005; Wahl et al. 2012; Palmer & Traylor-Knowles, 2018; Stabili, 2019; Parisi et al. 2020).

2.6 Ritmos biológicos: reloj circadiano y fases lunares

La adaptación de ritmos fisiológicos a señales ambientales es considerado universal en todos los organismos, mostrando oscilaciones y una coordinación persistente en la biología y el comportamiento ante los cambios externos diarios. En todas las especies el reloj circadiano molecular involucra bucles de retroalimentación de transcripción y traducción en un periodo de 24 horas (Hoadley et al. 2016). Además, está compuesto por las vías de entrada, el oscilador central y las vías de salida (Noordally & Millar, 2014). Las vías de entrada instruyen la información de tiempo del entorno ambiental al oscilador central, con el fin de restablecer la fase del ritmo. Un ejemplo de ello son los cambios de luz a oscuridad. Después de la sincronía con el entorno, el oscilador central es responsable de generar el ritmo de 24 h que controla los ritmos de los procesos biológicos y de comportamiento a través de las vías de salida. Esta última vía regula la expresión de genes que participan en una infinidad de procesos circadianos controlados. Aunque esté presente una oscilación circadiana intrínseca dentro del organismo, se ha observado que estas oscilaciones pueden diferir entre los tipos de célula (Hut & Beersma, 2011). Además, también hay comportamientos que ciclan simplemente en respuesta al fotoperiodo externo (Hut & Beersma, 2011; Noordally & Millar, 2014).

La presencia de un reloj circadiano dentro de los cnidarios está documentado y estos organismos se han adaptado a sus ritmos desde hace millones de años (Sorek et al. 2014). Los arrecifes de coral se encuentran en un ambiente marino en donde están expuestos a los ciclos solar, lunar y las mareas. Estos organismos han mostrado cambios reproductivos y de comportamiento debido a la sincronía con dichos ciclos. Además, las tasas de calcificación, fotosíntesis y respiración muestran ritmicidad diaria, utilizando la luz como señal principal (Hoadley et al. 2016).

Se ha observado que pequeños cambios en la luz de baja intensidad puede inducir respuestas en el comportamiento, indicando sensibilidad a lo largo del ciclo lunar (Hoadley et al. 2016). En general los efectos de las fases de la luna sobre el comportamiento de los organismos han sido reportados, teniendo impacto no solo en humanos, sino también en animales (Zimecki, 2006; Chakraborty, 2013). Al ciclo lunar se le suman las periodicidades de

14.75 y 29.5 días, es decir, fase de luna nueva y luna llena respectivamente, cuando el sol y la luna están en relación lineal entre sí, provocando un aumento en las fuerzas gravitacionales. Es por lo que la luna también puede proporcionar información temporal que puede afectar a los organismos (Ritter & Tessmar-Raible, 2024).

3. ANTECEDENTES

3.1 Defensa inmune en cnidarios

Algunas investigaciones han estudiado el genoma de cnidarios para determinar la participación de proteínas o genes asociados a la inmunidad innata. Para el caso del coral escleractinio *Acropora digitifera*, codifica al menos cuatro moléculas Toll/TLR, cinco proteínas asociadas a interferón IL-1R, entre otras. Mientras que la anémona *Nematostella vectensis* que no mantiene simbiosis, solo contiene una única proteína Toll/TLR. De acuerdo con Shinzato et al. (2011) argumenta que esta diferencia indica posiblemente que algunos de estos genes son responsables en desarrollar la función de simbiosis o la interacción entre colonias en corales. La especificidad de las moléculas propicia un panorama específico para resolver las dudas básicas sobre el proceso de reconocimiento y generar una correcta respuesta inmune.

Existen varios procesos fisiológicos en los cnidarios que influyen en la inmunidad y la salud del organismo. Estos mecanismos inmunes son orquestados tanto por el cnidario hospedero como por las comunidades microbianas y las microalgas simbióticas que son parte de este sistema complejo (Davy et al. 2012). Dentro de las funciones del sistema inmune de los cnidarios está la diferenciación de células que pueden tolerarse, como los simbiosites y por otra parte están los patógenos que deben eliminarse (Mydlarz et al. 2016). Ahora se reconoce ampliamente que las interacciones negativas y beneficiosas comparten varias de las vías de señalización, incluso las respuestas efectoras (Davy et al. 2012)

La infección de las microalgas simbióticas en el coral inicia de la misma forma que los otros asociados del holobionte, mediante el reconocimiento de los PRR. Una vez que los simbiosites ingresan a la célula huésped por medio de fagocitosis, existe evidencia de que su presencia evita la maduración del fagosoma, convirtiéndose en simbiosoma (Davy et al. 2012).

Es por lo que se ha desarrollado la hipótesis que la simbiosis provoca una reacción inmune y su persistencia depende de que el coral suprima algunos componentes de inmunidad (Mydlarz et al. 2010).

De acuerdo con el estudio realizado por Changsut et al. (2022) donde se utilizó al coral facultativo *Astrangia poculata*, obtuvieron una asociación positiva entre la inmunidad constitutiva y la densidad de simbiontes. Dicha inmunidad fue medida mediante la concentración de melanina y la actividad de catalasa. Para la explicación de la relación positiva manejan dos hipótesis, la primera argumenta que tanto la respuesta a factores estresores térmicos y la protección de los rayos UV son parte activa directa en el mantenimiento de la simbiosis alga-coral. La segunda hipótesis se desarrolla bajo la teoría de asignación de recursos, en donde una mayor población de simbiontes proporciona un mayor presupuesto energético, lo que permite una mayor asignación de recursos para la inmunidad.

Por otro lado, Fuess et al. (2020) manipularon al coral *Orbicella faveolata* mediante un enriquecimiento de amonio para el aumento de la densidad de los simbiontes. Posteriormente, los corales fueron expuestos a una estimulación inmunológica para probar el efecto de los simbiontes. Contrario al trabajo de Changsut et al. (2022), en este estudio los resultados mostraron una correlación negativa entre la densidad de simbiontes y la respuesta inmune. Concluyendo la posibilidad de que tanto la densidad y la identidad de las microalgas simbióticas pueden influir en la susceptibilidad de la enfermedad, debido a que la densidad de simbiontes puede reducir la respuesta inmune del huésped (Fuess et al. 2020).

Con respecto a la fenoloxidasa, se han detectado varios componentes de su sistema de activación en cnidarios mediante métodos moleculares y bioquímicos. Entre estos estudios se ha registrado la expresión de una serina proteasa similar a tripsina en el coral *A. millepora* y una especie de *Porites* ssp. después de ser desafiados con PAMP bacterianos y virales (Weiss et al. 2013). En otro estudio con *Pocillopora damicornis* expuesta al patógeno *Vibrio coralliilyticus*, encontraron una co-regulación de genes de la enzima activadora de profenoloxidasa y lacasa en la vía de melanización (Vidal-Dupiol et al. 2014). Además, se detectó en los genomas de *Nematostella vectensis* e *Hydra magnipapillata* la participación de genes de tirosina (Esposito et al. 2012). Otras investigaciones han señalado la actividad de proPO, PO y depósitos de melanina mediante estudios histológicos y bioquímicos en anémonas de mar, gorgonias, y

corales escleractinios (Mydlarz et al. 2007; Mydlarz et al. 2008; Palmer et al. 2008; Zaragoza et al. 2014).

La determinación de los distintos componentes dentro del sistema de fenoloxidasa conduce a una comprensión precisa acerca del proceso de respuesta de los corales ante la presencia de patógenos. Dentro de los corales hay indicio de actividades de fenoloxidasas tipo catecolasa, cresolasa y lacasa, y algunos muestran afinidad por sustratos particulares, sugiriendo el uso preferencial de vías particulares de síntesis de melanina. Lo anterior prueba que existe una heterogeneidad en las PO de coral (Mydlarz & Palmer, 2011).

Los estudios que abarcan la participación de fenoloxidasa como un indicador de salud en corales, normalmente enfrentan al animal a factores estresantes como lo sería un amplio espectro de temperaturas, pH, salinidad, enfermedades, entre otros. Lo anterior permite ver la diferencia entre la funcionalidad de las respuestas en corales sanos y corales con algún daño:

Por ejemplo, Mydlarz et al. (2009) emplearon varios ensayos inmunológicos para determinar la función inmunológica de *Montastraea faveolata* blanqueada, aparentemente sana y enferma por banda amarilla a lo largo de dos años de muestreo. Además, realizaron un conteo de la densidad de simbiontes en colonias blanqueadas y sanas. Obtuvieron que los niveles de todas las proteínas inmunes se vieron afectadas por el blanqueamiento, teniendo niveles más bajos de proPO en las colonias sanas. Los altos niveles inmunes en los corales blanqueados sugirieron que pueden ser explicados por dos hipótesis, la primera propone el aumento en la actividad de proPO como resultado indirecto de la estimulación de calcio. La segunda explicación se basa en que las microalgas simbióticas bloquean las respuestas inmunitarias del coral para persistir en el tejido. Como consecuencia, la respuesta inmune incrementaría durante el blanqueamiento y la expulsión del simbionte.

Conocer los componentes de la inmunidad de los corales y determinar la utilización diferencial de las vías inmunes entre taxones de coral, ha permitido visibilizar un panorama más amplio de los mecanismos que sustentan la salud de estos animales. Palmer et al. (2010) midieron los niveles constitutivos de inmunidad mediante cuatro parámetros inmunes (tamaño de las células granulares, concentración de fotoproteínas, proporción de melanina y actividad de PO) y sugieren que son medidas precisas y excelentes métricas de salud. En específico, los dos principales parámetros determinantes del rango basal de inmunidad y por consecuencia la

susceptibilidad a las enfermedades es el tamaño de las células granulares y la actividad de PO. Eso se comprueba con el registro de actividad de fenoloxidasa en 15 especies de coral y su respectiva variación significativa entre ellas. Es posible que la actividad de PO en corales sanos indique un nivel residual de defensa antimicrobiana por causa de la producción de intermediarios citotóxicos. Además, las diferencias en la actividad residual de fenoloxidasa entre los taxones de corales indican disparidades fisiológicas, teniendo efecto a escala ecológica vista desde la resistencia a enfermedades.

Los niveles constitutivos de inmunidad y mantenimiento de una respuesta inmune son procesos energéticamente costosos y probablemente compiten con algunos rasgos de vida como el crecimiento y la reproducción del animal (Armitage et al. 2003). Aquellos corales que asignan recursos a su inmunidad podrían reflejar un crecimiento lento, pero mostrar niveles más altos de inmunidad constitutiva y mejores respuestas de defensa que una especie que invierte en crecimiento o reproducción. Para demostrar esta capacidad inmune relativa entre las especies de corales, Palmer et al. (2011) trabajaron con tres especies de coral: *M. faveolata*, *P. astreoides* y *Stephanocoenia intersepta*. El experimento consistió en exponer a las especies a cuatro tratamientos: 1) temperatura ambiente, 2) temperatura ambiente con lipopolisacárido (LPS), 3) temperatura elevada y 4) temperatura elevada con LPS. Las tres especies mostraron diferentes niveles basales de inmunidad constitutiva a temperatura ambiente y sin tratamientos experimentales. Al mismo tiempo, documentaron la capacidad de varias especies para inducir el sistema PO en presencia de inductores de patógenos y por estrés de temperatura. *S. intersepta* respondió significativamente a la presencia de LPS, *P. astreoides* mostró mayor actividad de PO en presencia de LPS combinado con alta temperatura, mientras que en *M. faveolata* observaron una menor concentración de melanina por temperatura elevada. Los niveles de referencia de los parámetros inmunológicos para estas tres especies sugieren que los niveles de inmunidad pueden ser índices de la inversión en inmunidad como un rasgo de historia de vida.

Se ha reportado que los niveles constitutivos de fenoloxidasa, melanina y actividad antimicrobiana, se han relacionado con la resistencia a enfermedades, siendo un reflejo de una inversión en componentes del sistema inmunológico. Un estudio que evaluó la inmunidad constitutiva en conjunto con los patrones de enfermedades desde un enfoque filogenético indicó que el sistema inmunológico de al menos 14 especies de corales del Caribe ha sido moldeado

por su historia evolutiva y presiones selectivas pasadas (Pinzón et al. 2014a). Teniendo a las especies que pertenecen a un linaje más antiguo con una mayor resistencia y respuesta inmune basal que aquellas que son de un linaje más reciente. Además, la variación de la inmunidad constitutiva entre los taxones puede estar influenciada por gradientes ambientales y espaciales de un lugar determinado. Lo anterior respalda las observaciones acerca de la variación en la resistencia de enfermedades entre los distintos taxones de coral (Pinzón et al. 2014a).

Otro rasgo por tomar en cuenta en los estudios de inmunidad en corales, es la variación estacional de proteínas inmunes, como las proteínas fluorescentes (FP) específicas a corales y la actividad de fenoloxidasa. Particularmente, la actividad de PO aumenta en primavera hasta otoño, y posteriormente disminuye a partir de esta estación (Toledo-Hernández et al. 2023). Dichos autores demuestran que en ausencia de perturbaciones ambientales los niveles constitutivos de inmunidad varían de acuerdo con los ciclos ambientales relacionados a las estaciones.

Además, de acuerdo con Van de Water et al. (2016), la actividad potencial total y la activación de PO presenta una variación temporal significativa en tres diferentes especies de corales escleractinios estudiados a lo largo de un año. La actividad de PO no solo varía estacionalmente, sino también varía entre especies, comprobando nuevamente que los corales difieren en la asignación de recursos de nivel constitutivo para la respuesta inmune, teniendo así especies más resistentes.

En definitiva, existe una variación en la inmunidad basal y en las respuestas de las diferentes especies de coral, de acuerdo con sus características de historia de vida. De manera que la resistencia y la supervivencia de las especies dependen de cómo las especies priorizan y distribuyen sus recursos entre los rasgos fisiológicos (Pinzón et al. 2014a). Si bien es probable que todos los corales sanos sean inmunocompetentes y aptos para producir una respuesta inmune eficaz, dicha inmunocompetencia relativa podría variar entre distintas especies de coral (Palmer et al. 2011; Palmer & Traylor-Knowles, 2018).

3.2 El mucus, una herramienta en la inmunidad

La caracterización de las propiedades de defensa en cnidarios, también se ha investigado en ensayos en el mucus coralino para determinar la actividad de expresión de enzimas

antioxidantes. Como se ha mencionado anteriormente, usualmente se enfrentan a patógenos y comparan la respuesta de corales aparentemente sanos y enfermos. La actividad de fenoloxidasa en los corales sanos es menor cuando las condiciones se mantienen, mostrando una expresión diferencial de antioxidantes en mucus sano y enfermo (Bhagwat et al. 2023). El mucus coralino contiene biomoléculas involucradas en la defensa de corales, las cuales se expresan en mayor cantidad cuando los organismos son desafiados por estresores abióticos y bióticos (Bhagwat et al. 2023).

Otro estudio evaluó la capacidad de protección de la capa mucosa superficial en tres especies de cnidarios simbióticos: la anémona *E. diaphana*, la medusa *Cassiopea xamachana* y el coral *Pseudodiploria strigosa* (Rivera-Ortega & Thomé, 2018). Las autoras encontraron actividad inmune innata en la capa superficial de mucopolisacáridos, medida mediante la actividad de fenoloxidasa y la concentración de hidroxiprolina (Hyp). Para el caso de *P. strigosa* ocuparon colonias de coral aparentemente sanas y enfermas de banda negra. El mucus colectado de colonias aparentemente sanas tenía concentraciones más bajas de Hyp y PO, en comparación al mucus de la zona de transición de enfermedad. Por otro lado, utilizaron a *E. diaphana* y *C. xamachana* sanas y blanqueadas. La actividad de PO en *C. xamachana* sanas fue mayor que en las blanqueadas. Estos resultados sugieren que los cnidarios expulsan a la capa superficial de mucopolisacáridos moléculas con actividad inmune innata de sus tejidos (Rivera-Ortega & Thomé, 2018).

3.3 Cnidaria y sus ciclos biológicos

El reloj circadiano en los cnidarios se ha descifrado mediante trabajos tanto transcriptómicos (Brady et al. 2011) como genómicos (Shoguchi et al. 2013) logrando identificar genes del reloj circadiano. También existen estudios que comparan las diferencias en los ciclos de luz y lunares en conjuntos de genes de reloj (Vize, 2009; Reitzel et al. 2010; Hoadley et al. 2011; Leach et al. 2018).

Algunos genes implicados en la inmunidad innata durante un análisis transcriptómico en la anémona *Nematostella vectensis* se expresaron diferencialmente solo en condiciones de luz-oscuridad, con una regulación positiva durante el día (Leach et al. 2018). Sin embargo, no se retuvo este patrón de expresión en ausencia de luz. Estos datos podrían indicar que la fotorrecepción puede ser una señal importante para los mecanismos inmunes en cnidarios.

Las investigaciones en cnidarios sobre la caracterización del comportamiento o procesos biológicos en un ciclo circadiano han sido poco estudiadas. Algunas de estas investigaciones en antozoos han reportado patrones de comportamiento sobre los tentáculos, caracterizando su extensión en la noche y la contracción en el día (Gladfelter, 1975; Sweeney, 1976; Sebens & DeRiemer, 1977). Y otros han realizado un registro sobre las conductas de sueño y comportamiento diurnos en *Hydra* (Kanaya et al. 2020), así como en la medusa *Cassiopea sp.* (Nath et al. 2017).

Por otro lado, se realizó un estudio del comportamiento locomotor de *N. vectensis* a lo largo del ciclo circadiano bajo ciclos de luz fotoperiódicos y continuos, permitiendo complementar la información molecular obtenida con antelación (Hendricks et al. 2012). Encontraron que un reloj endógeno circadiano regula la ritmicidad de las actividades locomotoras, debido a que tanto en condiciones de luz-oscuridad y en oscuridad constante (DD), mostraron una actividad nocturna que casi duplica la actividad del día.

Siguiendo la misma línea de investigación en esta anémona, realizaron diferentes tratamientos de luz (roja, azul, verde y oscuridad) a lo largo del ciclo circadiano (Leach et al. 2020). Este diseño permitió identificar patrones de expresión que podrían indicar sensibilidad a la luz. En todos los tratamientos se reveló una actividad significativamente mayor durante la noche, donde la locomoción aumentó de luz roja a verde y azul. Sin embargo, en luz roja y DD se mostraron oscilaciones bimodales. También, los resultados de la expresión genética indican que los patrones observados en luz azul y verde son similares, mientras que la expresión en luz roja difiere enormemente. El comportamiento de actividad bimodal permite argumentar la posibilidad de un segundo oscilador dentro de los cnidarios que puede estar enmascarado por un reloj circadiano predominante.

Con respecto a la asociación entre el animal coralino y sus simbioses enfocados en el entendimiento del reloj circadiano, se argumenta la posibilidad de que el coral controle el reloj endógeno de las microalgas simbióticas (Sorek et al. 2014). Sin embargo, un estudio con el organismo modelo *E. diaphana* encontró que independientemente de la luz externa, es el reloj circadiano endógeno del simbiote el que controla la fotosíntesis e influye en la rítmica del huésped a través de la transferencia de metabolitos, alteraciones en el estado redox y contracción del cuerpo. Debido a que *E. diaphana* simbiótica presenta un ciclo circadiano, mientras que, *E.*

diaphana aposimbiótica tiene un ciclo circatidal (12 h) y al momento de restablecer la interacción con las microalgas simbióticas su ciclo cambia a un ciclo circadiano (Sorek et al. 2018).

Algunos de los pocos ejemplos que existen sobre el efecto de las fases lunares en cnidarios, se enfocan principalmente en la reproducción de corales, debido a que alrededor del 80% de corales escleractinios desovan en ciertas noches del año, durante una fase lunar específica (Lin et al. 2021). Además, de las primeras investigaciones sobre los genes del reloj circadiano en corales se enfocaron en la regulación de los eventos reproductivos. De acuerdo con Levy et al. (2007) en *A. millepora* hubo un aumento en el gen *Cry2* durante la luna llena, sugiriendo que los criptocormos desempeñan un papel en la sincronización reproductiva

3.4 *E. diaphana* y su respuesta inmune

Algunos estudios sobre enfoques inmunológicos en *E. diaphana* han abordado temas como el priming (también conocido como inmunidad entrenada o entrenamiento inmunológico), la respuesta ante la exposición de patógenos, el proceso de reconocimiento y mantenimiento de simbioses, regeneración de heridas, etc (Lehnert et al. 2012; Zaragoza et al. 2014; Brown et al. 2015; Van Der Burg et al. 2020; Jacobovitz et al. 2021). Para el primer caso, el entrenamiento inmunológico se ha documentado principalmente en animales invertebrados artrópodos, y se trata de una estimulación subletal del sistema inmunológico con efectos a corto plazo y que protegen a los invertebrados en la exposición posterior a los mismos patógenos a los que fueron desafiados (Sadd & Schmid-Hempel, 2006).

Para el caso de *E. diaphana*, se encontró que aquellas que habían sido expuestas al patógeno *Vibrio coralliilyticus* en condiciones subletales previo a las exposiciones letales mostraron una mayor supervivencia que las anémonas que no se habían preparado ante una exposición (Brown et al. 2015). Además, su respuesta fue de corta duración de hasta cuatro semanas y no es una respuesta inmune sostenida debido a una infección crónica por la exposición subletal, ya que las anémonas eliminaron al patógeno en cuatro días. Este estudio demuestra que el sistema de defensa de los cnidarios es capaz de ofrecer una protección inducida y de alguna manera duradera (Brown et al. 2015).

Por otro lado, la respuesta inmune ante la exposición de patógenos se ha medido mediante la actividad de proPO y PO. [Zaragoza et al. 2014](#) demostraron que la actividad proPO en pólipos infectados fue entre 8,5 y 10 veces mayor que la de pólipos sanos, indicando que la respuesta inmune aumenta posterior a una infección bacteriana, de manera similar a los distintos reportes de cnidarios en condiciones de estrés. Con este estudio se comprobó nuevamente la idoneidad de *E. diaphana* como un sustituto para estudiar los mecanismos de virulencia en patógenos de coral.

En cuestión del mantenimiento de microorganismos se ven dos procedimientos en *E. diaphana*. Esta anémona fagocita microalgas del ambiente y después de la absorción aquellas microalgas fagocitadas no simbióticas se eliminan mediante vomocitosis y la adquisición de simbiontes adecuados conduce a la supresión de las vías de inmunidad innata ([Jacobovitz et al. 2021](#)). Lo anterior, proporciona un sistema experimental óptimo para analizar los diferentes procesos inmunes en estos animales complejos.

Tabla 1. Resumen de antecedentes

Sección	Autor y año	Artículo	Highlights
3.1 Defensa inmune en cnidarios	Shinzato et al. 2011	Using the <i>Acropora digitifera</i> genome to understand coral responses to environmental change.	Diferenciación en la codificación de proteínas de inmunidad entre cnidarios simbióticos y no simbióticos.
	Mydlarz et al. 2010	What are the physiological and immunological responses of coral to climate warming and disease?	Hipótesis: simbiosis provoca reacción inmune debido a que el coral suprime componentes.

Davy et al. 2012	Cell biology of Cnidarian- dinoflagellate symbiosis	Reconocimiento de simbiontes también activan sistema inmune. Fagosoma se convierte en simbiosoma.
Mydlarz et al. 2016	Cnidarian immunity: from genomes to phenomes Variation in symbiont density is linked to changes in constitutive immunity in the facultatively symbiotic coral, <i>Astrangia poculata</i> .	El sistema inmune tolera mutualistas y elimina patógenos.
Changsut et al. 2022	Increased algal symbiont density reduces host immunity in a threatened Caribbean coral species, <i>Orbicella faveolata</i> .	Asociación positiva entre densidad de simbiontes e inmunidad constitutiva.
Fuess et al. 2020		Asociación negativa entre densidad de simbiontes y respuesta inmune.
Weiss et al. 2013		
Vidal-Dupiol et al 2014	Ver en literatura	Registro de la participación de la enzima fenoloxidasa en la defensa inmune de cnidarios.
Esposito et al. 2012	citada.	
Zaragoza et al. 2014		
Entre otros.		
Mydlarz & Palmer, 2011	The presence of multiple	Indicio de distintas fenoloxidasas en corales:

	phenoloxidasas in Caribbean reef-building corals.	catecolasa, cresolasa y lacasa.
	Immune defenses of healthy, bleached and diseased <i>Montastraea faveolata</i> during a natural bleaching event.	Heterogeneidad en las PO. Proteínas inmunes (PO) afectadas por blanqueamiento.
Mydlarz et al. 2009		
	Levels of immunity parameters underpin bleaching and disease susceptibility of reef corals.	Fenoloxidasa y tamaño de células granulares parámetros para indicar inmunidad constitutiva.
Palmer et al. 2010		
	Examining costs of induced and constitutive immune investment in <i>Tenebrio molitor</i> .	Inmunidad constitutiva y el mantenimiento de respuesta inmune son procesos energéticos costosos.
Armitage et al. 2003		
	Patterns of coral ecological immunology: variation in the responses of Caribbean corals to elevated temperature and a pathogen elicitor	Niveles basales de parámetros inmunológicos en corales son índices en el rasgo de historia de vida.
Palmer et al. 2011		
	Relationship between phylogeny	Inmunidad constitutive moldeada por historia
Pinzon et al. 2014a		

		and immunity suggests older Caribbean coral lineages are more resistant to disease.	evolutiva e influenciada por gradientes ambientales y espaciales.
	Toledo-Hernández et al. 2023	Uncovering the link between environmental factors and coral immunity: A study of fluorescent protein expression and phenoloxidase activity in <i>Acropora cervicornis</i>	Variación estacional de proteínas inmunes. Niveles constitutivos varían a ciclos ambientales (estaciones).
	Van de Water et al. 2016	Temporal patterns in innate immunity parameters in reef-building corals and linkages with local climatic conditions	Activación de PO varia estacionalmente y entre especies de corales.
	Palmer & Traylor-Knowles, 2018.	Cnidaria: Anthozoans in the Hot Seat	Corales son inmunocompetentes y varía entre especies.
3.2 El mucus, una herramienta en la inmunidad	Bhagwat et al. 2023	Characterization of the defense properties of healthy and diseased coral mucus	Mucus coralino con biomoléculas de defensa. Expresión mayor con factores bióticos y abióticos.

	Rivera-Ortega & Thomé, 2018	Contrasting antibacterial capabilities of the surface mucus layer from three symbiotic cnidarians.	Capacidad de protección de la CMS en <i>E. diaphana</i> , <i>C. xamachana</i> y <i>P. strigosa</i> . Cnidarios expulsan a CMS moléculas con actividad inmune
3.3 Cnidaria y sus ciclos biológicos	Brady et al. 2011 Shoguchi et al. 2013 Vize, 2009 Reitzel et al. 2010 Hoadley et al. 2011	Ver literatura citada	Identificación de genes del reloj circadiano en cnidarios por investigaciones transcriptómicas, genómicas. Diferencias por ciclos de luz y lunares.
	Leach et al. 2018	Transcriptome-wide analysis of differential gene expression in response to light:dark cycles in a model cnidarian	En <i>N. vectensis</i> genes de inmunidad se expresaron en condiciones de luz oscuridad. Regulación positiva en el día. Fotorrecepción importante en inmunidad.
	Gladfelter, 1975 Sweeney, 1976 Sebens & DeRiemer, 1977	Revisar literatura citada	Comportamiento circadiano sobre movimiento de tentáculos en antozoos
	Kanaya et al. 2020	A sleep-like state in <i>Hydra</i> unravels conserved sleep mechanisms during	Registro de la conducta del sueño en <i>Hydra</i>

	the evolutionary development of the central nervous system	
Hendricks et al. 2012	Characterization of circadian behavior in the starlet sea anemone	Descripción del comportamiento locomotor de <i>N. vectensis</i> en ciclo circadiano. Reloj endógeno regula la ritmicidad. Complemento del estudio locomotor de <i>N. vectensis</i>
Leach et al. 2020	Decoupling behavioral and transcriptional responses to color in an eyeless cnidarian	Diferentes tratamientos de luz. Mayor actividad en la noche Registro de actividad bimodal, puede haber un segundo oscilador enmascarado
Sorek et al. 2014	Circadian clocks in symbiotic corals: The duet between Symbiodinium algae and their coral host	Estudio en <i>E. diaphana</i> . Posibilidad de que coral controle el reloj endógeno de las microalgas.
Sorek et al. 2018	Setting the pace: host rhythmic behaviour and gene expression patterns in the facultatively symbiotic cnidarian <i>Aiptasia</i> are	Reloj circadiano del simbiote controla procesos biológicos. <i>E. diaphana</i> simbióticas tiene ciclo circadiano.

		determined largely by Symbiodinium	Anémonas aposimbióticas tienen un ciclo circatidial (12h). Cuando se reestablece relación simbiótica cambia a un ciclo circadiano.
	Lin et al. 2021	The influence of seawater temperature on the timing of coral spawnin	La luna afecta procesos en corales, como la reproducción
	Levy et al. 2007	Light-responsive cryptochromes from a simple multicellular animal, the coral <i>Acropora millepora</i>	En <i>A. millepora</i> aumenta el gen Cry2 en luna llena. Criptocromos desempeñan papel en reproducción.
3.4 <i>E. diaphana</i> y su respuesta inmune	Lehnert et al. 2012; Zaragoza et al. 2014; Brown et al. 2015; Van Der Burg et al. 2020; Jacobovitz et al. 2021	Ver literatura citada	Enfoques inmunológicos en <i>E. diaphana</i> : Priming, respuesta ante patógenos, reconocimiento, regeneración de heridas, mantenimiento de simbioses.
	Brown et al. 2015	Defending against pathogens – immunological priming and its molecular basis in a sea anemone, cnidarian	Caso de priming en <i>E. diaphana</i> Mayor supervivencia en aquellas expuestas al patógeno Protección inducida.

Zaragoza et al. 2014	Outcomes of infections of sea anemone <i>Aiptasia pallida</i> with <i>Vibrio</i> spp. Pathogenic to corals	Mayor actividad de PO en <i>E. diaphana</i> infectadas por bacterias. Idoneidad en el uso de <i>E. diaphana</i> .
Jacobovitz et al. 2021	Dinoflagellate symbionts escape vomocytosis by host cell immune suppression.	El éxito de la relación simbiótica es por supresión de vías de inmunidad. Aquellos simbioses no idóneos se eliminan por vomocitosis.

4. JUSTIFICACIÓN

La respuesta del holobionte a los factores estresantes depende de un amplio repertorio de mecanismos inmunológicos e inherentemente coexiste una variación significativa en la expresión de estos componentes (Mydlarz et al. 2010). Además, se ha confirmado la funcionalidad de PO como una medición en la salud de los invertebrados, y se ha garantizado equivalentemente la importancia en cnidarios. Sin embargo, los distintos estudios sugieren una variabilidad de esta respuesta en los antozoos (Mydlarz et al. 2009), resaltando la importancia ecológica de comprender las respuestas inmunes basales en estos animales.

Actualmente los factores de estrés, las amenazas locales y globales ponen en riesgo la salud de todos los organismos que conforman el arrecife de coral. Existe información referente a la respuesta inmune en cnidarios, pero se enfoca exclusivamente a la exposición a patógenos o cnidarios enfermos. Esto impide observar un panorama completo, por ello es urgente establecer las bases de referencia sobre una respuesta inmune a lo largo del día en condiciones naturales. Estudiar la respuesta inmune en condiciones basales es importante ya que los procesos biológicos en cualquier organismo no son constantes (Cardinali, 2005). En el presente estudio se pretende caracterizar la fluctuación de PO en *E. diaphana* sanas, tanto simbióticas como

aposimbióticas a lo largo del día, considerando las fases lunares de luna llena y luna nueva con organismos en cautiverio del estado de Quintana Roo.

Asimismo, este estudio pretende resaltar la importancia de los niveles constitutivos de la respuesta inmune, puesto que tener información basal del organismo modelo *E. diaphana* ayudará a replantear estrategias de conservación en temas de restauración de corales para poder prevenir y mitigar su pérdida.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN GENERAL

¿La actividad de fenoloxidasa como respuesta inmune varía en *E. diaphana* aposimbióticas y simbióticas siguiendo ciclos biológicos?

6. HIPÓTESIS GENERAL

Debido a que se ha demostrado que la actividad de fenoloxidasa varía no solo estacionalmente sino entre especies y, además la anémona *E. diaphana* presenta una relación simbiótica con microalgas de la familia Symbiodinaceae que influye en su comportamiento y fisiología, entonces habrá diferencias en la actividad de fenoloxidasa a lo largo del día y probablemente de acuerdo con la fase lunar.

7. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la actividad de fenoloxidasa como respuesta inmune en *E. diaphana* aposimbióticas y simbióticas a lo largo del día, en las fases lunares de luna nueva y luna llena.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar la respuesta inmune de *E. diaphana* simbiótica y aposimbiótica a lo largo del día, considerando dos fases lunares (luna llena y luna nueva).

2. Determinar la producción de mucus a lo largo del día en las fases de luna llena y luna nueva en las anémonas simbióticas y aposimbióticas.
3. Correlacionar la densidad de simbioses y la actividad de fenoloxidasa de las anémonas simbióticas *E. diaphana*.

9. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN PARTICULARES E HIPÓTESIS.

1. ¿La respuesta inmune de *E. diaphana* simbiótica y aposimbiótica difieren entre la fase de luna llena y luna nueva?
H1: Debido a que los procesos fisiológicos de los cnidarios están mediados por la incidencia de la luna llena, entonces la actividad de fenoloxidasa variará en luna llena y luna nueva.
2. ¿La cantidad de mucus cambia entre anémonas simbióticas y aposimbióticas?
H1: Ya que, el simbiote proporciona la mayor cantidad de energía a la anémona, entonces la cantidad de mucus expulsado será diferente entre anémonas simbióticas y aposimbióticas.
3. ¿La presencia de simbioses en *E. diaphana* sanas incide en la actividad de fenoloxidasa?
H1: Dado que se ha reportado en corales que la densidad de simbioses es diferente con respecto a los cambios estacionales de luz. Y, además, cuya ausencia de simbioses durante el blanqueamiento presenta cambios en PO, entonces se espera que los simbioses presentes incidan en la actividad de fenoloxidasa.

10. MÉTODOS

10.1 Características de *E. diaphana*

E. diaphana es una anémona de mar que alberga microalgas de la familia Symbiodinaceae simbióticas, al igual que sus parientes los corales escleractinios. Mantiene una simbiosis facultativa, lo que significa que puede vivir sin la presencia de las microalgas (Figura 2). *E. diaphana* comprende una variedad de tamaños de pólipos con una columna lisa de hasta 60 mm de altura y 30 mm de diámetro, lo que la hace conveniente para la experimentación y facilita su cultivo en laboratorio (Grajales & Rodríguez, 2014). Además, se puede conservar

indefinidamente en un estado aposimbiótico, es decir, libre de microalgas (Baumgarten et al. 2015).

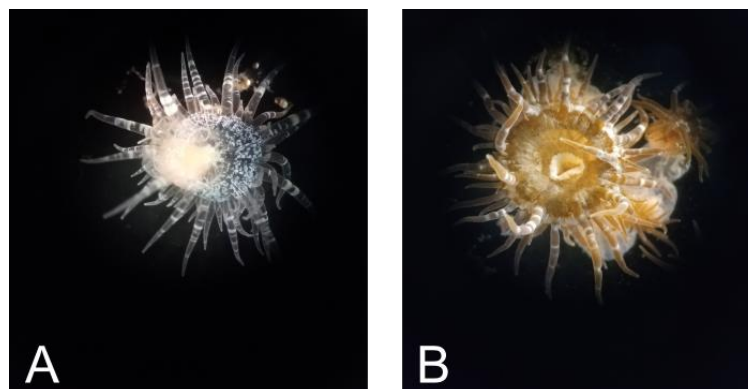


Figura 2. *E. diaphana* de 20 mm vistas en un estereoscopio. A) anémona aposimbiótica, B) anémona simbiótica.

10.2 Diseño experimental

La reproducción sexual y algunos comportamientos fisiológicos de *E. diaphana* se encuentran mediados por el ciclo lunar (Chen et al. 2008). Por lo tanto, en este trabajo fue importante tomar en cuenta dos fases lunares para comparar la variabilidad que estas implicaban. Toda la investigación se realizó en instalaciones de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, UNAM, Puerto Morelos, Quintana Roo y los días de experimentación se ubicaron dentro de las dos fases lunares de luna llena y luna nueva. Por cada fase se efectuaron dos repeticiones y se ocupó el mucus de 384 anémonas colocadas en el Laboratorio de Microbiología Molecular, UNAM. Cada proceso inició dos semanas antes de las lunas seleccionadas para su aclimatación. La experimentación se llevó a cabo en los meses de septiembre, octubre y noviembre de 2023 (Tabla 1).

Tabla 2. Fechas de experimentación para cada fase lunar realizadas en 2023.

1era repetición		2da repetición	
Luna llena	Luna nueva	Luna llena	Luna nueva
27 al 30 de septiembre	12 al 15 de octubre	26 al 29 de octubre	11 al 13 de noviembre

En cada fase lunar se hicieron dos ciclos de muestreo y la hora de inicio se cambió según la incidencia máxima de la luna correspondiente. En todas las fases se siguieron las mismas horas de muestreo, cada seis horas (20:00 pm, 2:00 am, 8:00 am y 14:00 pm). La experimentación de cada fase se realizó con 96 anémonas totales (48 aposimbióticas y 48 simbióticas), agrupando el mucus de $n =$ seis anémonas diferentes por hora de muestreo. Al día siguiente se reanudaron las mediciones del segundo ciclo en la misma hora que terminó el primer ciclo (14:00 pm, 20:00 pm, 2:00 am y 8:00 am, [Figura 3](#))

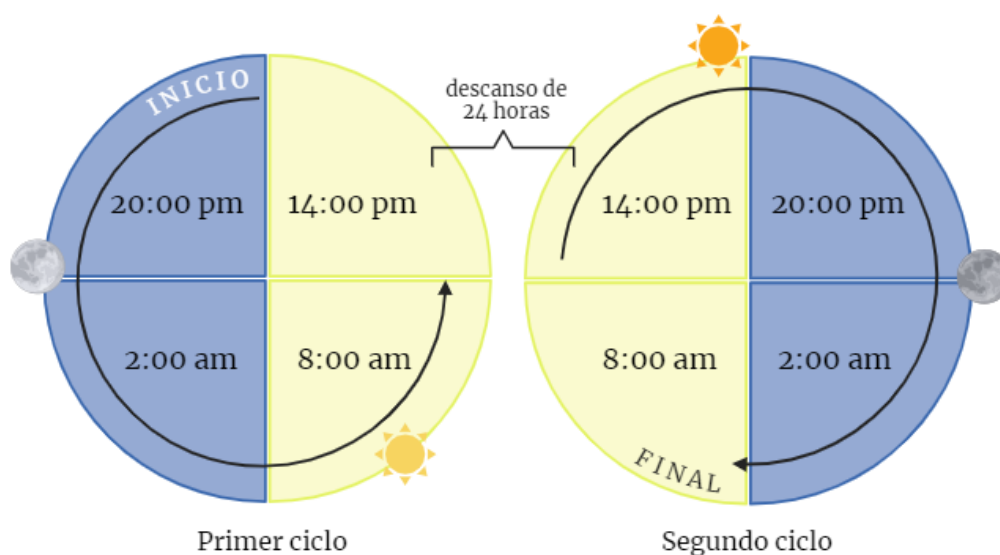


Figura 3. Representación gráfica del diseño experimental en el que se basaron las dos repeticiones en luna llena y luna nueva. Creado en Biorender.com

En cada hora, las muestras se procesaron para obtener los siguientes datos:

- 1) Cuantificación del volumen de mucus producido
- 2) Actividad de fenoloxidasa
- 3) Determinación de proteína

Por otro lado, para saber si la densidad de simbiosis incide en la variación de actividad de fenoloxidasa a lo largo del día la experimentación se realizó en dos fechas. Ambas se realizaron con días de antelación a la primera repetición de luna llena y la segunda repetición de luna nueva, respectivamente ([Tabla 2](#)). Se utilizaron 24 anémonas simbióticas por cada fase lunar, es decir, seis anémonas independientes por hora de muestreo. Se aclimataron seis días

previos al ensayo en placas de seis pozos. Las horas de muestreo fueron las mismas que en los anteriores experimentos (8:00 am, 14:00 pm, 20:00 pm y 2:00 am).

Tabla 3. Fechas de experimentación para el experimento de densidad de simbioses.

Luna llena	Luna nueva
22 y 23 de septiembre 2023	04 y 05 de noviembre 2023

En la [Figura 4](#) se muestra el diagrama de flujo general de la sección de métodos y en los siguientes apartados se explica detalladamente cada procedimiento.

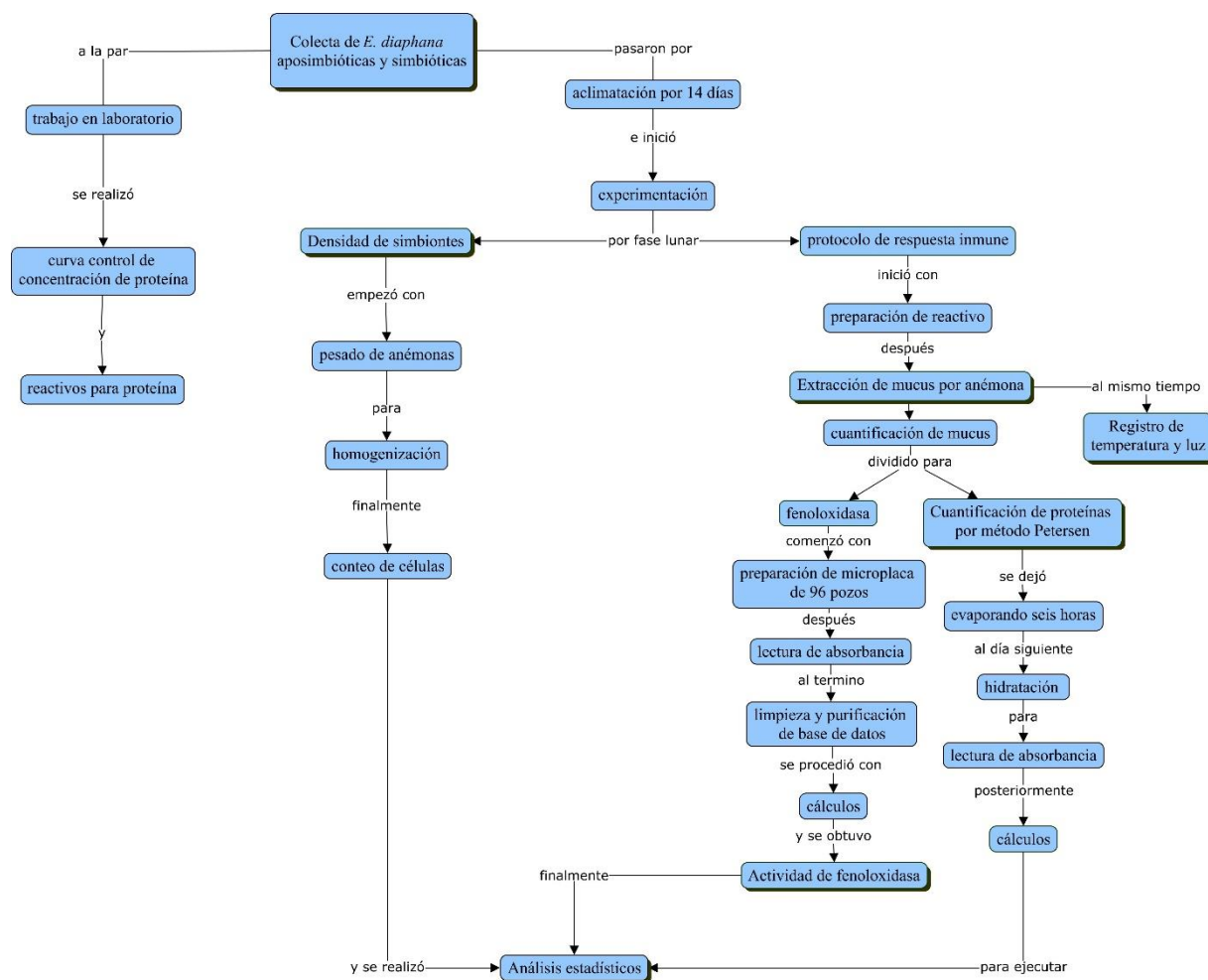


Figura 4. Diagrama de flujo sobre la sección de métodos.

10.3 Mantenimiento de los organismos

Para realizar los experimentos se colectaron 96 anémonas *E. diaphana* simbióticas y aposimbióticas. Las primeras se colectaron de los tanques de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Puerto Morelos, UNAM (Figura 5A), donde crecen en agua de mar y condiciones naturales; mientras que las segundas fueron colectadas de los acuarios del Laboratorio de Microbiología Molecular, UNAM (Figura 5B) las cuales provienen de una línea clonal en condiciones de cautiverio. Se mantuvieron siete días en contenedores de plástico de cuatro litros con agua de mar filtrada (AMF), con una salinidad de 35 PSU en un régimen de luz/oscuridad y temperatura naturales. Posteriormente fueron transferidas a una placa de seis pozos con 10 mL de AMF con las mismas condiciones. Este periodo de aclimatación de 14 días se realizó para excluir cualquier variación resultante del estrés dado por la manipulación. Las anémonas fueron alimentadas una vez a la semana con nauplios de *Artemia spp.* y el agua fue reemplazada una hora y 24 horas después de la alimentación.

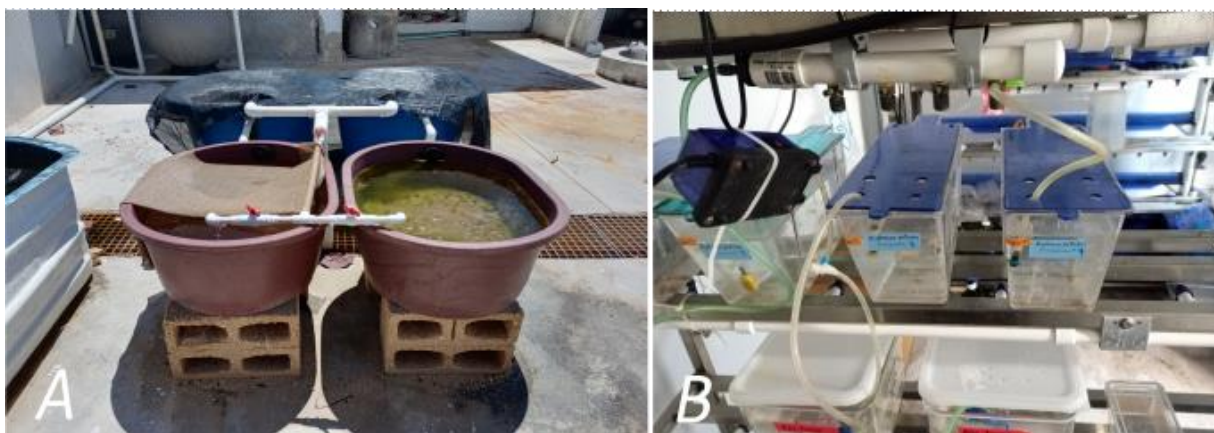


Figura 5. Ubicación de las anémonas *E. diaphana*. A) Tanques expuestos a condiciones naturales que contienen a las anémonas simbióticas. B) Acuarios controlados de la línea clonal que contienen las anémonas aposimbióticas.

10.4 Registro de temperatura y luz

En todo momento las anémonas se mantuvieron expuestas a condiciones de luz y temperatura naturales (es decir, dependían del tiempo reportado ese día). El acomodo de las placas fue al azar, numeradas del uno al ocho para el caso de las simbióticas, mientras que las aposimbióticas respetaron la misma numeración con la diferencia de ser acompañado por un subtipo señalado como “a”. Se utilizaron cinco placas extra y se colocaron estratégicamente para abarcar todo el sitio de muestreo. Estas últimas placas sirvieron para registrar la temperatura del agua de los seis pozos de cada placa con un termómetro y los fotones con la aplicación móvil Photone versión 0.5.2. Este registro se realizó cada hora de muestreo. En la [Figura 6](#) se ejemplifica el acomodo de las placas.

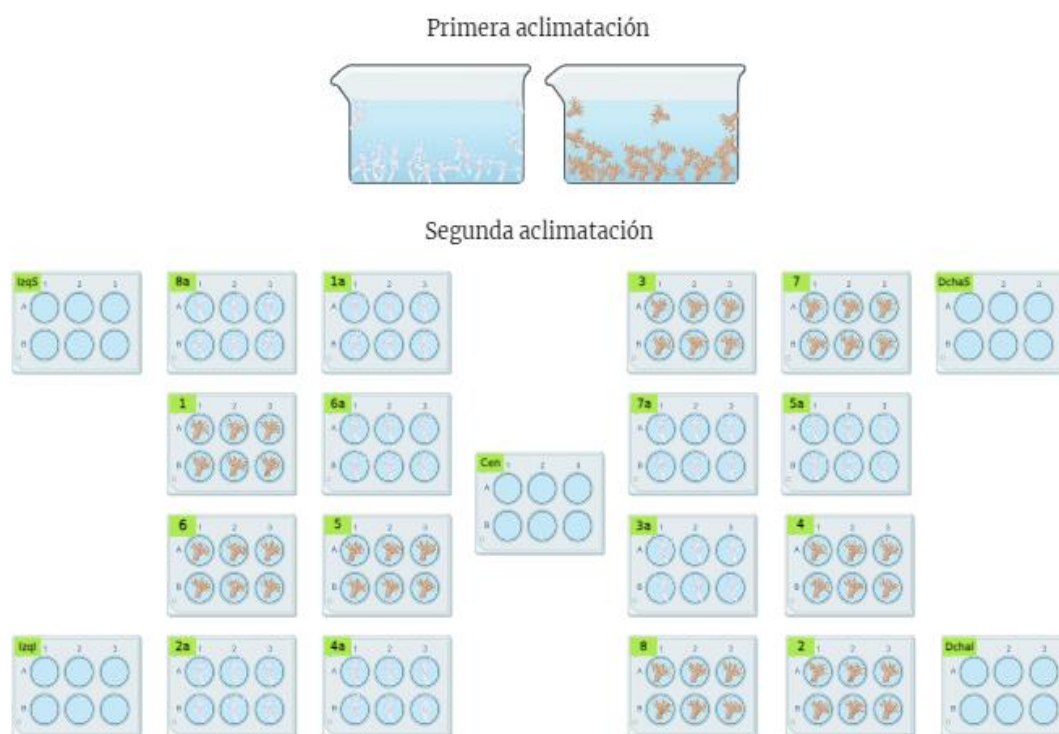


Figura 6. Primera aclimatación en contenedores de cuatro litros, posteriormente la segunda aclimatación en placas de seis pozos. El diseño de acomodo es el mismo en todas las fases lunares, con la diferencia de la numeración al azar de acuerdo con el ID. Creado con BioRender.com

10.5 Extracción de mucus

Las anémonas se mantuvieron en placas de seis pozos, un organismo por pozo, en agua de mar (Figura 7). Una vez relajadas (tentáculos, columna extendida y sin cambios de color en el tejido), como se muestra en la Figura 8, se retiró el agua con una pipeta de transferencia desinfectada y el agua restante se limpió con un cotonete esterilizado, cuidando no perturbar a los organismos. Con una micropipeta se extrajo el mucus expulsado por la anémona por máximo dos minutos, el mucus se almacenó en tubos de plástico de 2.5 mL individuales, teniendo 12 muestras por hora. El procedimiento se realizó una anémona a la vez. Al finalizar se llenó el pozo con 10 mL de AMF y 24 horas después de la extracción se devolvieron a sus estanques correspondientes.

Finalmente, se midió el volumen de mucus expulsado por anémona con una micropipeta de 200 μ L para su registro y se vació en un tubo de plástico de 2.5 mL estéril. Se obtuvieron dos muestras agrupadas de mucus correspondientes a las anémonas simbióticas y aposimbióticas.

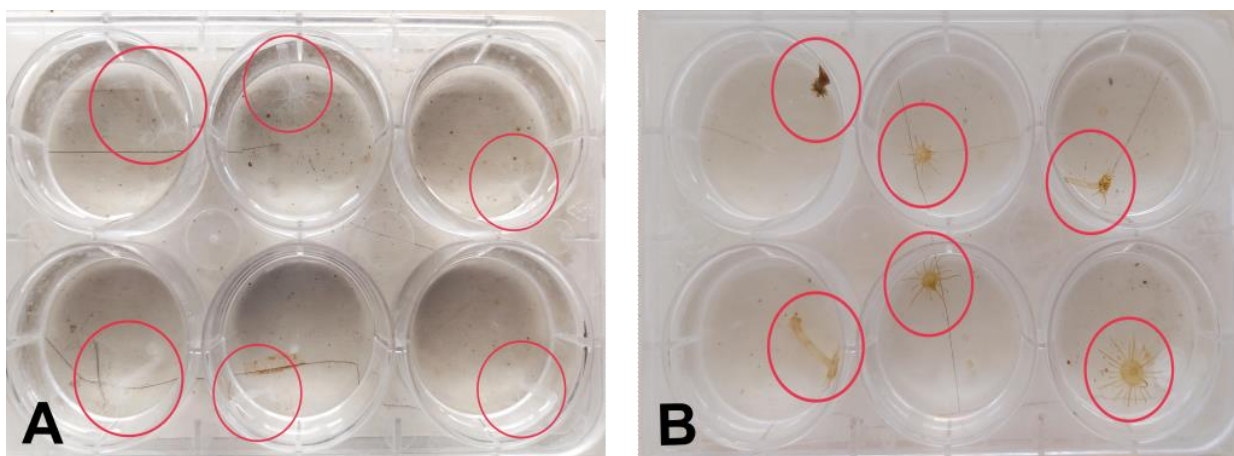


Figura 7. Anémonas en placas de seis pozos con agua de mar. A) *E. diaphana* aposimbióticas; B) *E. diaphana* simbióticas.

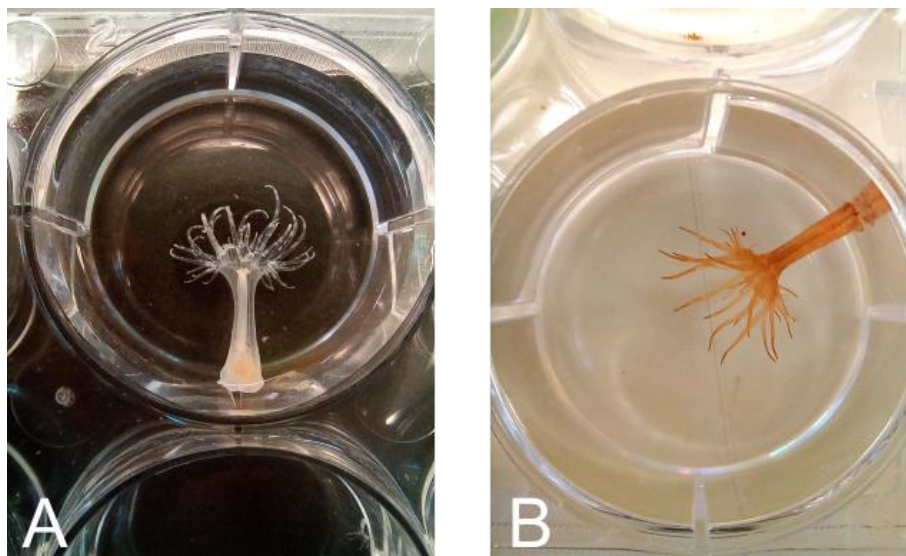


Figura 8. De izquierda a derecha *E. diaphana* aposimbiótica y simbiótica relajadas.

10.6 Cuantificación de la actividad de fenoloxidasa.

Para la cuantificación de fenoloxidasa se siguió el protocolo de [Mydlarz y Palmer \(2011\)](#) con modificaciones descritas a continuación. Previo a la extracción de mucus, se realizó la preparación de un mL de L-Dopa 2.5 mM y se colocó a 4°C. Inmediatamente después de la extracción de mucus se empezó a trabajar en una microplaca de 96 pozos por triplicado con sus correspondientes pozos control. De cada pool aposimbiótico y simbiótico se utilizó triplicado de 30 μL de mucus cada uno, posteriormente se añadió 30 μL de agua libre de pirógenos. Se envolvió la microplaca con aluminio para incubarla durante cinco minutos a 35 °C y 60 rpm. Al final se les añadió 30 μL de L-Dopa para leer la absorbancia en un lector de placas durante 45 min a 450 nm ([Figura 9](#)). Cada pozo contenía 90 μL (30 μL muestra, 30 μL agua libre de pirógenos, 30 μL L-Dopa), en el caso del control negativo en lugar de los 30 μL de mucus se agregaron 30 μL de agua libre de pirógenos, debido a la poca disponibilidad de mucus. Los datos se colectaron como cambio en la absorbancia $A_{450} \mu\text{L}^{-1} \text{min}^{-1}$.



Figura 9. Lectura de absorbancia de la actividad de fenoloxidasa en el lector de placas.

10.7 Densidad de simbioses

Iniciando la hora de muestreo las anémonas de una placa multipozo se transfirieron a tubos de plástico de 2.5 mL con 500 μ L de AMF para ser pesadas una a una, en una balanza analítica. A continuación, se inició la homogeneización manual con un homogeneizador plástico hasta no percibir tejido en el tubo (Figura 10); posteriormente, los tubos se centrifugaron a 14 000 rpm durante un minuto, se retiró el sobrenadante y nuevamente se añadió 500 μ L de AMF, se agitó tres veces, durante 30 segundos y se volvió a centrifugar. El proceso se repitió 3 veces, al finalizar se agregó lugol a las microalgas aisladas para su fijación (30%).

Las muestras fijadas se agitaron en vortex por un minuto; se tomó 25 μ l de la suspensión de células para añadirlas a cada lado de un hemocitómetro (cámara de Neubauer, Figura 11). Se eligió al azar tres cuadros de 1 mm para contabilizar las microalgas, el criterio utilizado fue contabilizar las células que se encontraban dentro su cuadro y aquellas que tocaban el borde superior y derecho. Este proceso se realizó con todas las muestras. Lo datos se reportaron como densidad de simbioses normalizado a peso húmedo de anémona.



Figura 10. Anémona simbiótica en tubo de plástico de 2.5 mL con 500 μ L de agua de mar previo a la homogenización.

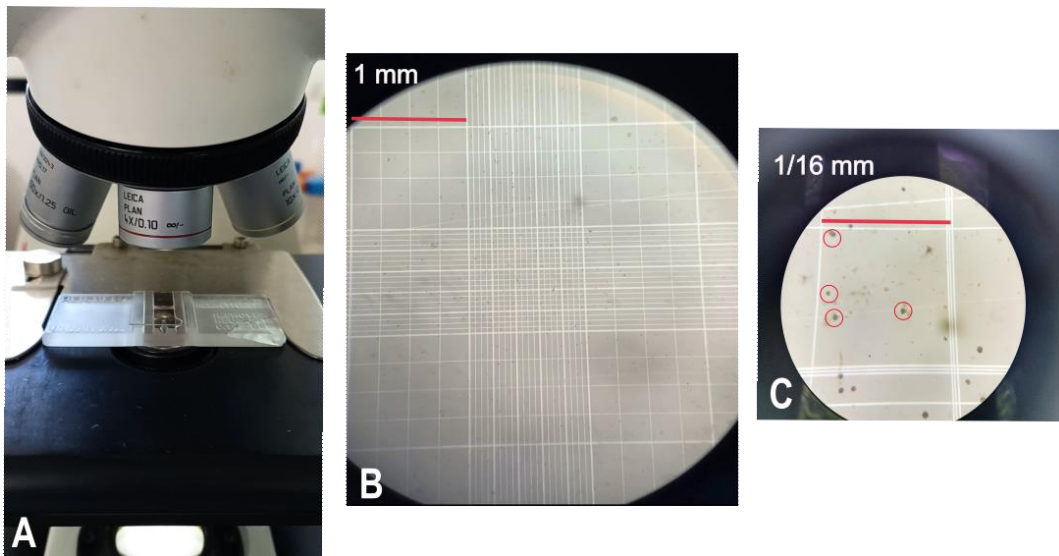


Figura 11. Cuantificación de densidad de simbioses: **A)** hemocitómetro con la suspensión de células colocado en el microscopio; **B)** visualización con el objetivo 10x; **C)** debido al tamaño y la poca cantidad de células se optó por contabilizarlas en el objetivo 40x.

10.8 Determinación de proteína

Cinco días previos a cada fase de experimentación se preparó los reactivos pertinentes para llevar a cabo el procedimiento. Al mismo tiempo, se preparó una curva control de concentración de proteína, según el método de Petersen (Lowry et al. 1951) (Figura 12).

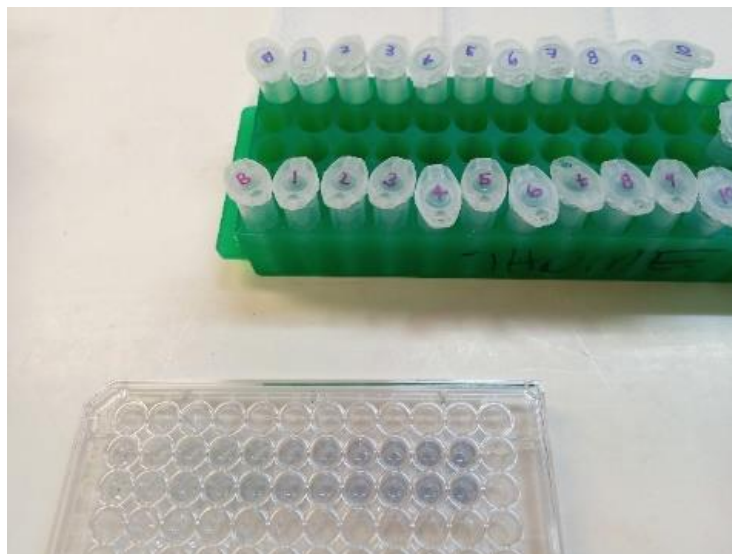


Figura 12. Ejemplo de una curva control para la determinación de proteína.

Para realizar este protocolo se dividió en dos partes, la primera se ejecutó inmediatamente después de finalizar el protocolo de fenoloxidasa. Con el mucus restante de cada pool, se realizó un duplicado por cada muestra. La extracción de proteína se describe a continuación:

En tubos de plástico de 2.5 mL se ocupó un volumen de mucus (30 μ L) al que se le añadió 30 μ L de ácido triclorocético (TCA) al 20% y se dejaron incubar por 30 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente (23°C). Después se retiró el sobrenadante conservando el pellet, se añadió 200 μ L de acetona al 100% y se incubó 30 min a -10°C. Nuevamente se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se conservó el pellet. Finalmente se agregó 100 μ L de acetona al 100% y se dejó evaporar a temperatura ambiente con la tapa del tubo abierta. Los tubos se colocaron en la campana de flujo laminar durante al menos seis horas o toda una noche. Después se dejaron congelar a -10°C.

La segunda parte del protocolo se realizó hasta tener todas las muestras por fase lunar de la siguiente manera: como primer paso se hidrataron las muestras con 500 μL de agua Milli-Q, se les añadió 100 μL del reactivo A y se incubaron durante 10 min. Posteriormente se les colocó 50 μL de reactivo B y se esperó 30 min (Tabla 3). Finalmente se colocó 200 μL en la placa de 96 pozos ELISA y se leyeron a 630 nm.

Tabla 4. Composición de los reactivos utilizados para la extracción de proteínas.

Reactivo A	Reactivo B
1. Tartrato de cobre-carbonato (CTC)*	
2. SDS (1g /10 mL)	
3. NaOH (0.32g /10MI)	
4. Agua	
*El CTC se compone de tres soluciones:	Reactivo de Folin-Ciocalteu fenol + 5 volúmenes de agua
1. Sulfato de cobre (4mg/1mL)	
2. Tartrato de sodio y potasio (8mg/1mL)	
3. Carbonato de sodio (400mg/2mL)	

10.9 Análisis estadístico

Los datos fueron recopilados y analizados por medio del software RStudio versión 4.1.0 (Posit Team, 2024), las funciones y librerías utilizadas se muestran en la tabla 5. Como primer análisis se realizó una correlación de Spearman para comprobar la asociación entre la densidad de simbiontes y la actividad de fenoloxidasa, debido a que los datos al realizar la prueba de normalidad Shapiro Wilk presentaron una distribución normal y una tendencia lineal. Además, para conocer si la densidad de simbiontes difiere a lo largo del día y entre lunas, se realizaron pruebas de Kruskal Wallis, debido a que los datos no cuentan con una distribución normal, comprobado por la prueba de normalidad Shapiro Wilk.

Por otro lado, de acuerdo con el diseño experimental también se obtuvieron tres variables de respuesta (actividad de fenoloxidasa, proteína total y volumen de mucus) medidas mediante los factores: luna (luna llena y luna nueva), estado simbiótico de la anémona (aposimbióticas y simbióticas) y el tiempo a lo largo del día (20:00, 2:00, 8:00, 14:00) en dos ciclos. Como primer paso se aplicó la prueba de Shapiro Wilk para conocer su distribución y la prueba de Levene para evaluar la igualdad de varianzas por cada variable. Debido que ninguna variable cumple con una distribución normal, pero sí con el supuesto de homogeneidad de varianza se optó por trabajar con las pruebas no paramétricas Kruskal Wallis y Mann Whitney Wilcoxon (DATAtab, 2024; Milton, 2001)

Se utilizaron pruebas de Mann Whitney Wilcoxon para examinar si existen diferencias significativas en fenoloxidasa, proteína total y volumen de mucus entre los grupos de luna y el estado simbiótico.

De acuerdo con los supuestos de la prueba de Kruskal Wallis se necesita tener una $k > 3$ (Milton, 2001) es por lo que se realizó en cada caso (PO, proteína, mucus) considerando a la hora del día como su variable independiente. Además, también se aplicó en todas las posibles combinaciones de las variables independientes. Posteriormente se aplicó la prueba post-hoc Mann-Whitney-Wilcoxon para encontrar cuales grupos difieren y su respectivo tamaño de efecto.

Tabla 5. Librerías y funciones con su respectiva cita utilizadas para cada prueba del análisis de datos en el software RStudio.

Prueba	Funciones {librería}	Cita
Spearman	cor.test(x,y, method = "spearman") {stats}	
Shapiro Wilk	shapiro.test() {stats}	R Core Team (2021)
Kruskal Wallis	kruskal.test() {stats}	
Mann Whitney Wilcoxon	wilcox.test() {stats}	
Levene	leveneTest() {car}	Fox & Weisberg (2019)

11. RESULTADOS

11.1 Registro de temperatura y luz

De acuerdo con el análisis exploratorio se muestra que tanto la temperatura como la luz comparten un comportamiento casi similar (Figura 13). Este patrón va en aumento conforme las horas del día transcurren. A las 14:00 horas se reporta un alza en la temperatura y la luz. Además, los datos son mayores en luna llena.

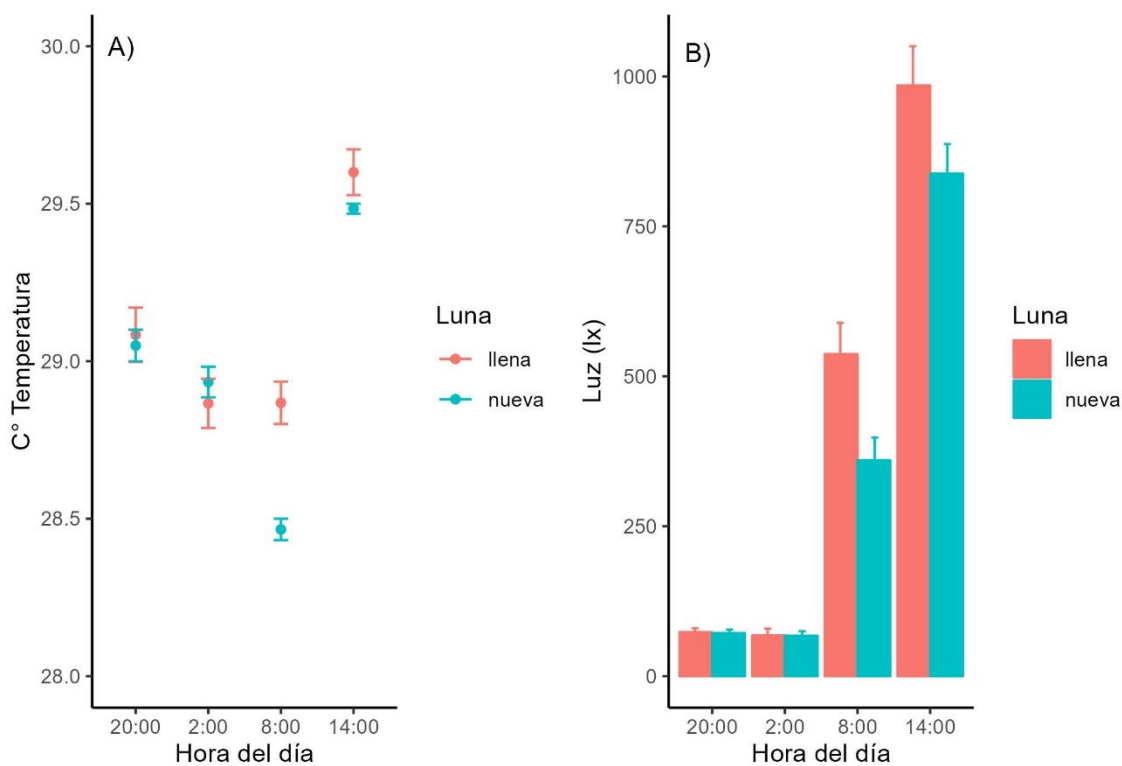


Figura 13. Gráfica de temperatura y luz durante las horas de muestreo en dos fases lunares. A) Temperatura media (\pm SE) registrada de las placas de seis pozos. B) Media de luz (\pm SE) reportados de cada placa de seis pozos.

11.2 Actividad de fenoloxidasa

La actividad de fenoloxidasa se presenta en la [Figura 14](#), donde se observan fluctuaciones en la actividad de PO a lo largo del día. Estas fluctuaciones son distintas según el estado simbiótico y la luna. En las anémonas simbióticas comparando las dos lunas es notable que la fluctuación de PO en luna llena es más constante, a diferencia de la luna nueva que existen más variación. Mientras que, las *E. diaphana* aposimbióticas en ambas lunas se observa un comportamiento bastante parecido, con la diferencia de tener menor cantidad de PO en luna nueva. Independientemente de las lunas y el estado simbiótico las acrofases se presentan a las 14:00 pm y en menor medida, pero igualmente representada, a las 2:00 am. Sin embargo, de acuerdo con los análisis estadísticos la actividad de fenoloxidasa no difirió significativamente ($H(7) = 7.09$, $gl = 7$, $P = 0.41$) entre las distintas horas del día.

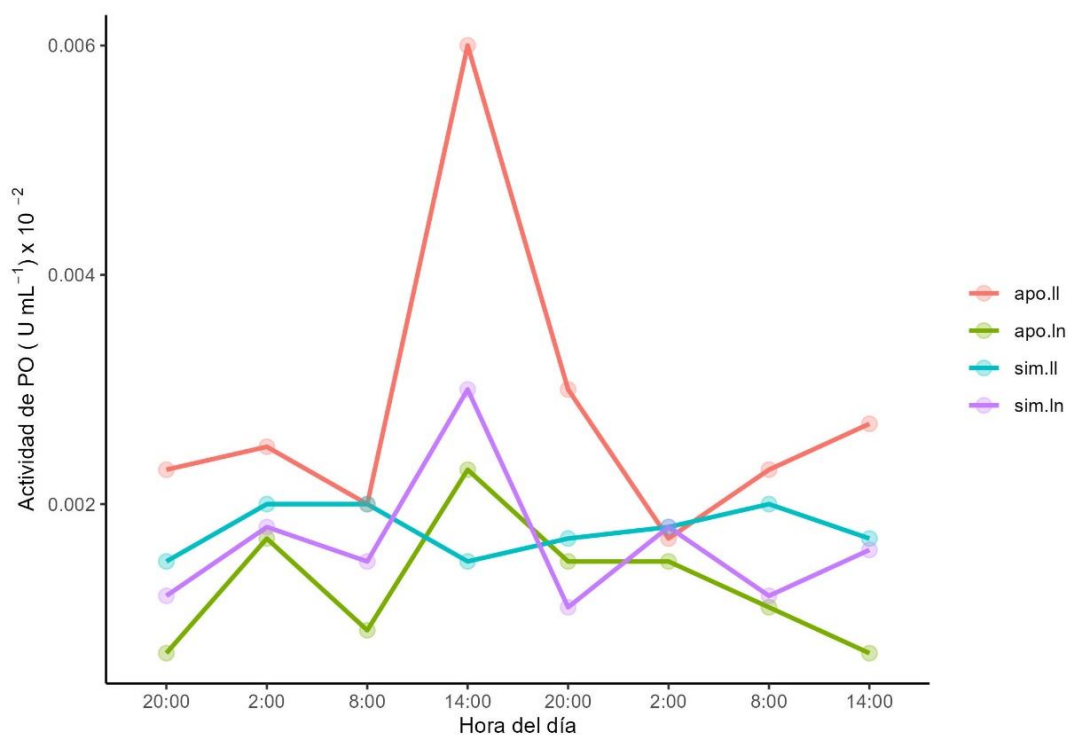


Figura 14. Actividad de fenoloxidasa normalizada a volumen de mucus a lo largo del día en *E. diaphana* aposimbiótica y simbiótica en dos fases lunares (llena y nueva). Los datos representan los promedios de las dos repeticiones realizadas por luna. Los símbolos significan: apo.ll = Aposimbióticas en luna llena; apo.ln= aposimbióticas en luna nueva; sim.ll= simbióticas en luna llena; sim.ln= simbióticas en luna nueva.

El análisis únicamente de la actividad de PO según su estado simbiótico no presentó diferencias significativas ($z = 0.50$, $gl = 1$, $P = 0.61$) entre las anémonas aposimbióticas ($Md = 0.00165$) y las simbióticas ($Md = 0.00150$, **Figura 15A**). Por el contrario, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($z = 3.58$, $gl = 1$, $P = 0.0002$) entre la luna llena ($Md = 0.0019$) y la luna nueva ($Md = 0.0013$), indicando una mayor actividad de PO en luna llena (**Tabla 4, Figura 15B**).

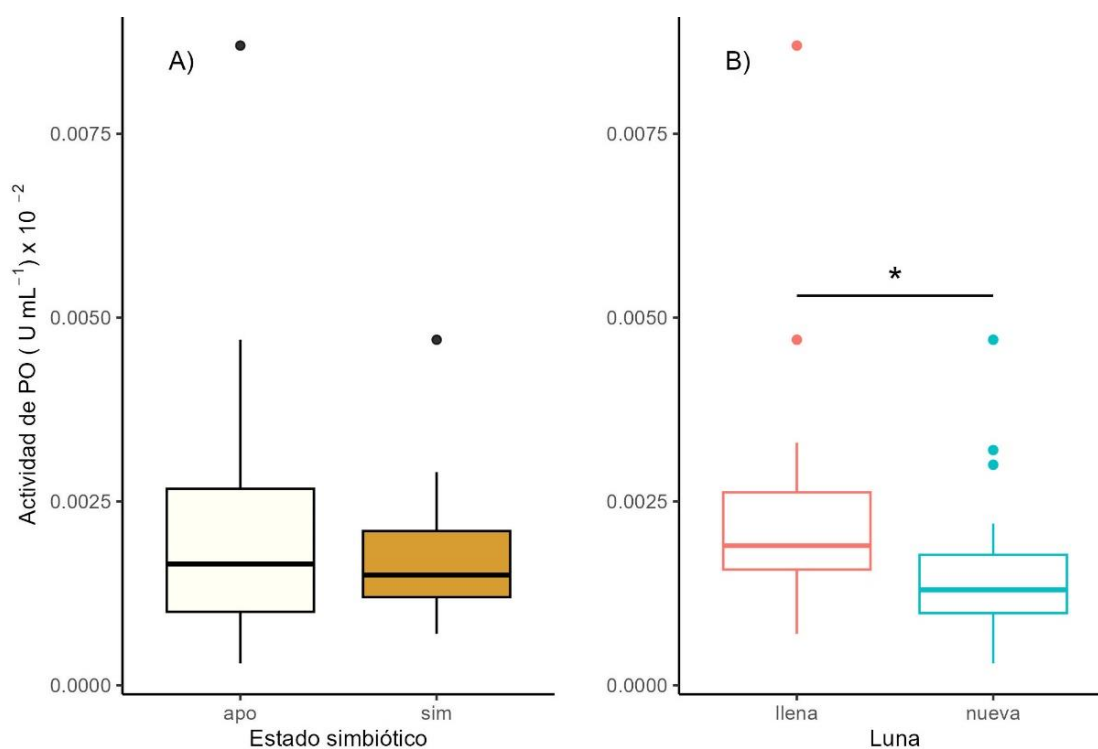


Figura 15. Actividad de fenoloxidasa respecto al estado simbiótico y la fase lunar. **A)** Actividad de PO de acuerdo con el estado simbiótico (aposimbióticas y simbióticas). **B)** Actividad de PO en dos fases lunares (luna llena y nueva). El asterisco representa valores de $P < 0.05$.

Tabla 6. Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para las distintas variables de respuesta mediadas por la luna (llena y nueva) y el estado simbiótico de la anémona (aposimbióticas y simbióticas). El texto marcado en negritas indica valores significativos menores a $\alpha = 0.05$.

Mann-Whitney-Wilcoxon	Luna			Estado Simbiótico			
	Grupo	Z	P	Efecto	Grupo	Z	P
Fenoloxidasa		3.58	0.0002	0.44		0.50	0.61
Proteína	llena-nueva	1.09	0.277	-	apo-sim	0.35	0.72
Mucus		-2.50	0.011	0.31		0.18	0.85

Finalmente, al conocer la interacción de la luna y el estado simbiótico de acuerdo con la actividad de PO se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($H(15) = 17.47$, $gl = 3$, $P = 0.0005$) entre los posibles grupos generados. De acuerdo con el análisis post-hoc de Mann-Whitney-Wilcoxon (Tabla 6), se encontraron diferencias entre cuatro grupos de combinaciones de las seis posibilidades, como se muestra en la Figura 16 y en el siguiente listado:

- 1) aposimbióticas en luna llena ($Md = 0.0024$) – aposimbióticas en luna nueva ($Md = 0.0010$).
- 2) aposimbióticas en luna llena ($Md = 0.0024$) – simbióticas en luna nueva ($Md = 0.0013$)
- 3) simbióticas en luna llena ($Md = 0.0018$) – aposimbióticas en luna nueva ($Md = 0.0010$)
- 4) aposimbióticas en luna llena ($Md = 0.0024$) – simbióticas en luna llena ($Md = 0.0018$)

Conforme al valor de P significativo ($P < 0.05$) y con su respectiva mediana, se obtuvo que los grupos de la izquierda del listado anterior tiene una mayor actividad de fenoloxidasa que los de la derecha, además están ordenados según su nivel de significancia. Los dos primeros casos tuvieron un valor de $P < 0.001$.

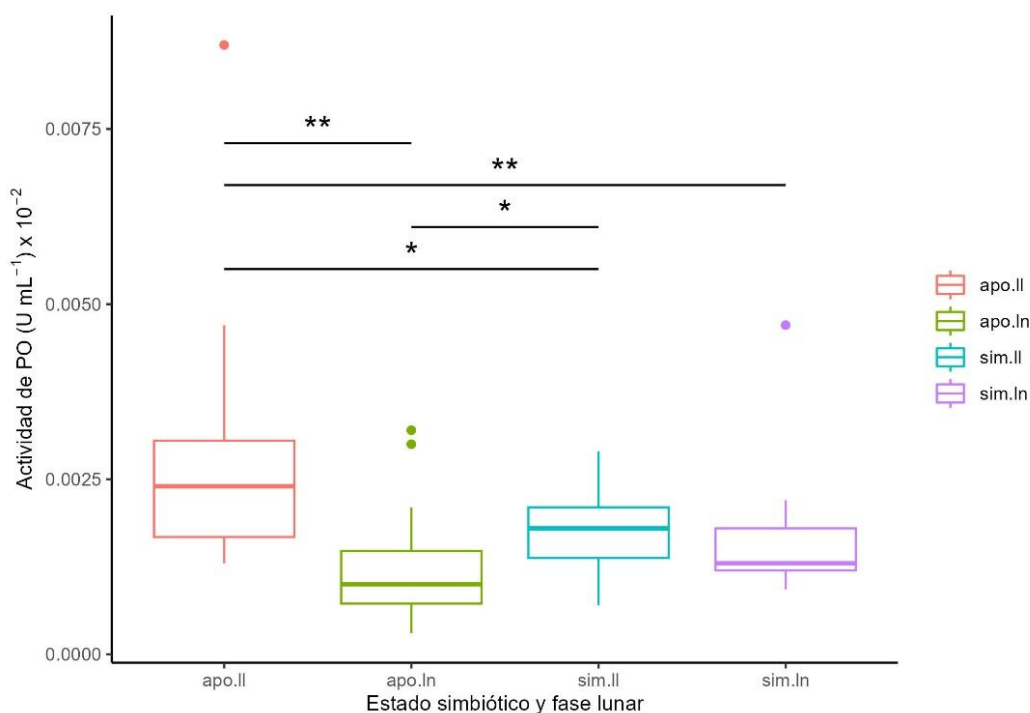


Figura 16. Actividad de fenoloxidasa en el organismo modelo *E. diaphana* entre la interacción de los grupos de luna (llena y nueva) y el estado simbiótico (aposimbióticas y simbióticas). Los ** representan valores de $P < 0.001$ y el * valores menores a $P < 0.05$.

Tabla 7. Prueba post-hoc de Mann Whitney Wilcoxon para encontrar las diferencias entre los grupos resultantes de la combinación de la luna y el estado de simbiosis de las anémonas. El texto marcado en negritas indica valores significativos menores a $\alpha = 0.005$.

		Luna x Anémonas			
		Grupo	P	z	Efecto
Fenoloxidasa	apo llena –		0.0004	3.36	0.42
	apo nueva				
	apo llena –		0.0008	3.21	0.40
	sim nueva				

apo llena – sim llena	0.035	2.09	0.26
sim llena – apo nueva	0.032	2.13	0.26
sim llena – sim nueva	0.178	1.36	-
apo nueva – sim nueva	0.079	-1.76	-

11.3 Volumen de mucus

Con respecto al mucus producido a lo largo del día es notable que la cantidad expulsada varía (Figura 17). Las anémonas aposimbióticas en luna llena y las simbióticas en luna nueva parecen tener una producción relativamente constante, es decir, el volumen difiere $\sim 5 \mu\text{L}$. En cambio, las aposimbióticas en luna nueva y las simbióticas en luna llena tienen fluctuaciones más marcadas, que varían entre $\sim 10 \mu\text{L}$ a $15 \mu\text{L}$.

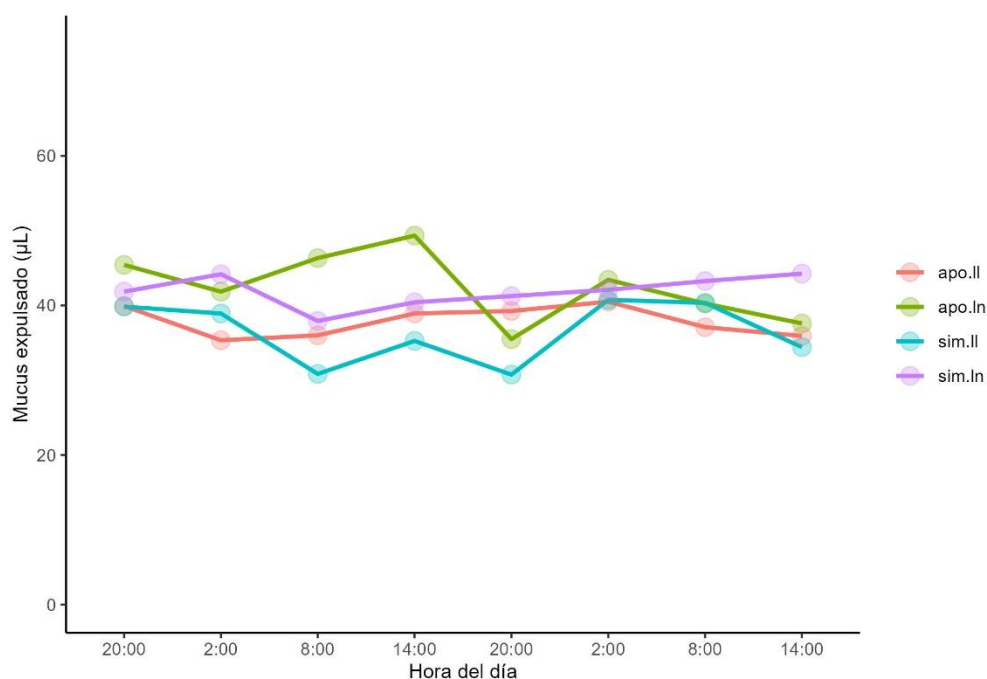


Figura 17. Volumen de mucus expulsado por anémonas simbióticas y aposimbióticas a lo largo del día en dos fases lunares (luna nueva y llena).

De acuerdo con los análisis estadísticos, no se observaron diferencias en el volumen de mucus ($H(7) = 3.42$, $gl = 7$, $P = 0.84$) entre las distintas horas del día. Así mismo, entre las anémonas aposimbióticas ($Md = 39.91$) y las anémonas simbióticas ($Md = 40.50$) la cantidad de mucus expulsado fue similar ($z = 0.18$, $gl = 1$, $P = 0.85$, [Figura 18A](#)).

Por el contrario, se hallaron diferencias significativas en el volumen de mucus entre la luna llena y la luna nueva ($z = -2.50$, $gl = 1$, $P = 0.011$, [Tabla 5](#)). La luna nueva presenta la cantidad de mucus más alto ($Md = 42.16$), mientras que la luna llena muestra una producción más baja ($Md = 37.33$, [Figura 18B](#)).

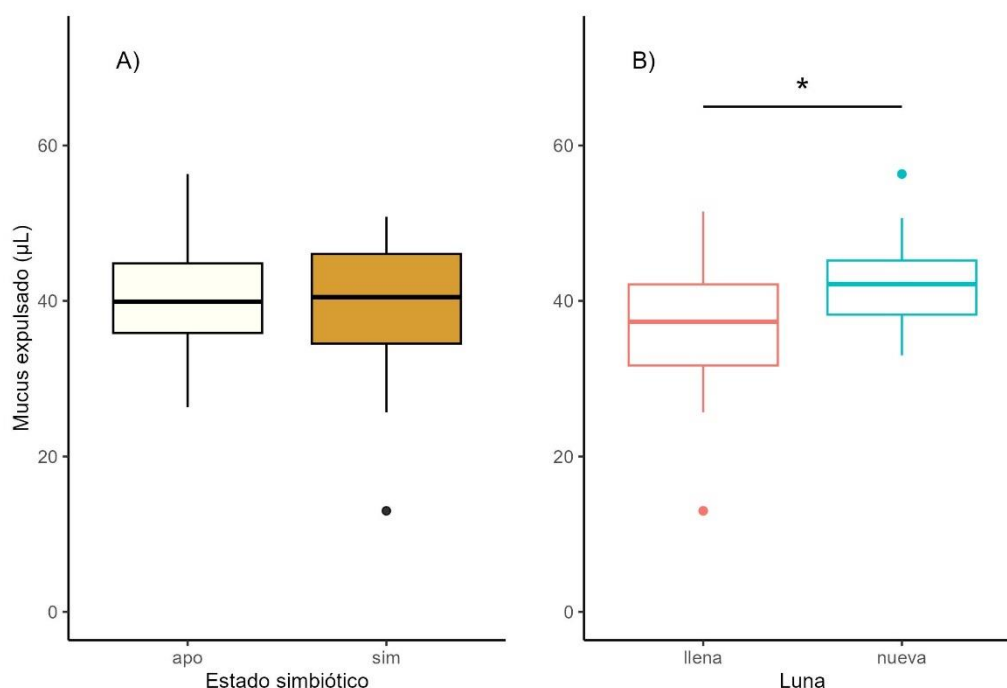


Figura 18. Volumen de mucus expulsado respecto al estado simbiótico y la fase lunar. **A)** Volumen de mucus de acuerdo con el estado simbiótico (aposimbióticas y simbióticas). **B)** Volumen de mucus en dos fases lunares (luna llena y nueva). El asterisco representa valores de $P < 0.05$.

11.4 Densidad de simbioses

Por otro lado, la densidad de simbioses en luna llena a lo largo de la hora del día no mostró diferencias estadísticamente significativas ($H(3) = 4.84$, $gl = 3$, $P = 0.184$). Lo mismo

sucedió con la densidad de simbioses en luna nueva ($H(3) = 4.32$, $gl = 3$, $P = 0.228$) (Tabla 6, Figura 19A). Sin embargo, al conjuntar los datos de densidad de simbioses sin clasificarlos según su fase lunar, se encontraron diferencias significativas ($H(3) = 8.55$, $gl = 3$, $P = 0.035$) entre las cuatro horas del día (Tabla 6).

De acuerdo con el análisis post-hoc de Mann Whitney Wilcoxon para hallar los grupos que difieren, solo se encontraron diferencias significativas a las 8:00 con respecto a las 14:00 horas. (Tabla 7). A las 14:00 pm hay una mayor densidad de simbioses ($Md = 19651525$) con respecto a las 8:00 am ($Md = 7141817$, Figura 19B).

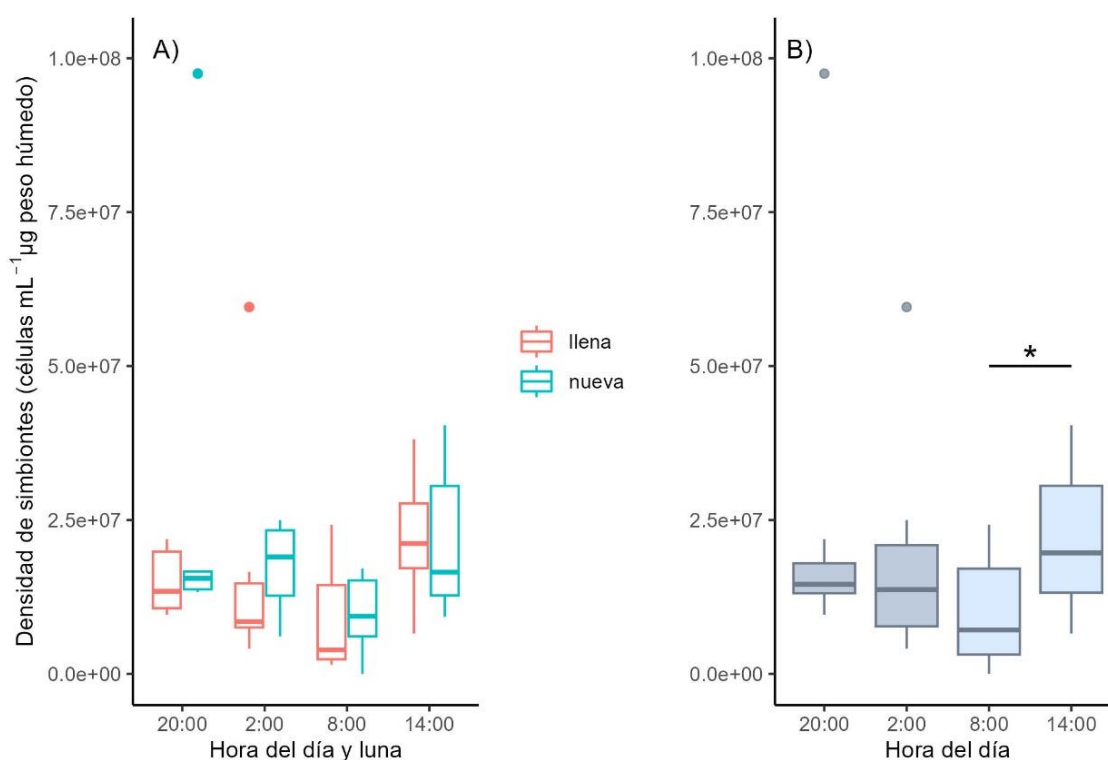


Figura 19. Densidad de simbioses a lo largo del día en las anémonas simbióticas *E. diaphana*.

A) Gráfica mostrando el comportamiento de la densidad de simbioses en luna llena y nueva. **B)** Gráfica conjuntando los datos de luna llena y nueva, la tonalidad azul oscura se refiere a la noche y el color claro son horarios diurnos. El asterisco representa valores de $P < 0.05$.

Tabla 8. Prueba de Kruskal Wallis para la densidad de simbiontes en luna llena, luna nueva y sin importar la fase lunar a lo largo de las horas del día (20:00, 2:00, 8:00 y 14:00). El texto en negritas indica valores de $P < 0.05$.

Kruskal Wallis	Hora del día		
	H	df	<i>P</i>
Densidad de simbiontes en luna llena	4.84	3	0.184
Densidad de simbiontes en luna nueva	4.32	3	0.228
Densidad de simbiontes	8.55	3	0.035

Tabla 9. Prueba post-hoc de Mann Withney Wilcoxon para encontrar los grupos que difieren de la densidad de simbiontes entre las diferentes horas del día. El texto en negritas indica valores de α significativos menores a 0.05.

Man Whitney Wilcoxon	Grupo	Hora del día		
		<i>P</i>	Z	Efecto
	20:00- 2:00	0.79	0.28	-
	20:00 – 8:00	0.11	1.58	-
Densidad de simbiontes	20:00-14:00	0.24	-1.21	-
	2:00- 8:00	0.08	1.73	-
	2:00- 14:00	0.21	-1.27	-
	8:00- 14:00	0.006	-2.64	0.38

Finalmente, se encontró que la densidad de simbiontes tiende a estar asociadamente negativamente con la actividad de fenoloxidasa, es decir, entre mayor sea la cantidad de simbiontes menor es la actividad de fenoloxidasa (Figura 20, Tabla 8).

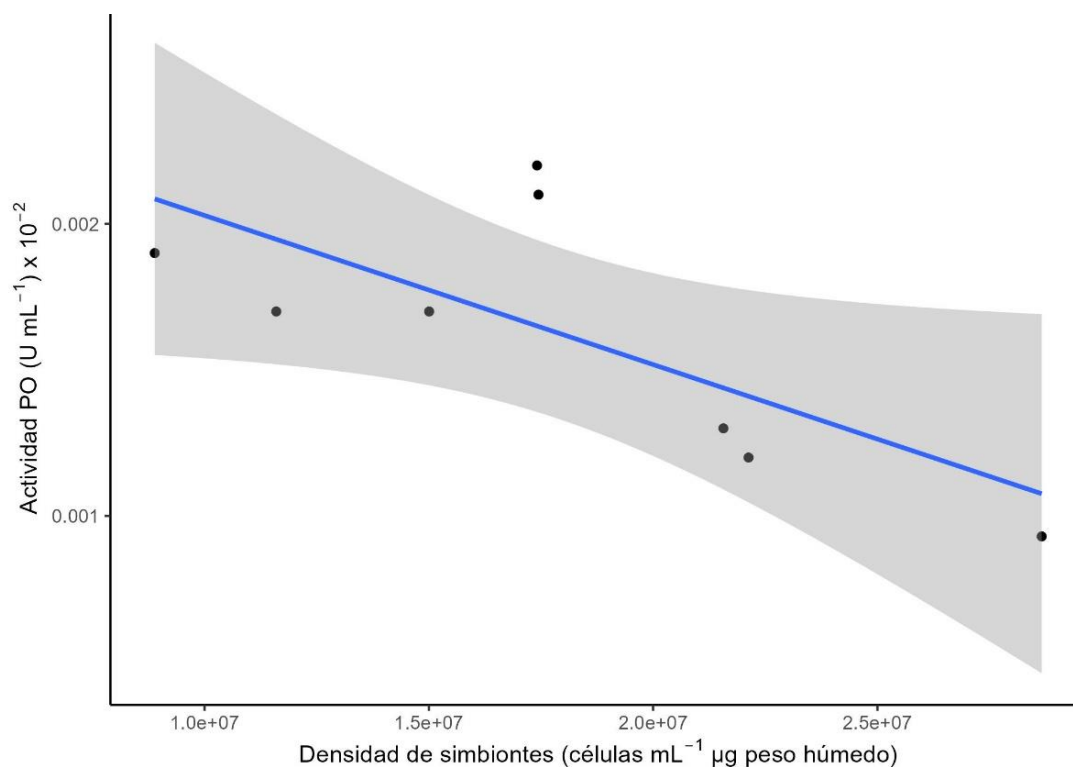


Figura 20. Relación negativa entre la densidad de simbiontes y la actividad de PO en *E. diaphana* simbióticas aparentemente sanas.

Tabla 10. Valores estadísticos sobre la correlación de Spearman entre la densidad de simbiontes y la actividad de fenoloxidasa en las anémonas *E. diaphana* simbióticas.

Estadísticos	Valores
<i>P</i>	0.0463
<i>r</i>	-0.71
<i>R</i> ²	0.51
gl	6

11.5 Proteína total

En la [Figura 21](#), se observa que la concentración de proteína es diferente según el estado simbiótico o la fase lunar y además no es la misma a lo largo del día. En general hay mayor cantidad de proteína en luna llena en ambos estados simbióticos en comparación a la luna nueva.

A pesar de estas variaciones, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo de día ($H(7) = 4.53$, $gl = 7$, $P = 0.71$) y la concentración de proteína total fue similar ($z = 0.35$, $gl = 1$, $P = 0.72$, [Tabla 4](#)) entre las anémonas simbióticas ($Md = 0.00245$) y aposimbióticas ($Md = 0.00290$, [Figura 22A](#)). Además, entre los grupos de luna llena ($Md = 0.00375$) y luna nueva ($Md = 0.00225$) tampoco se encontraron diferencias significativas ($z = 1.09$, $gl = 1$, $P = 0.27$, [Tabla 9](#), [Figura 22B](#)).

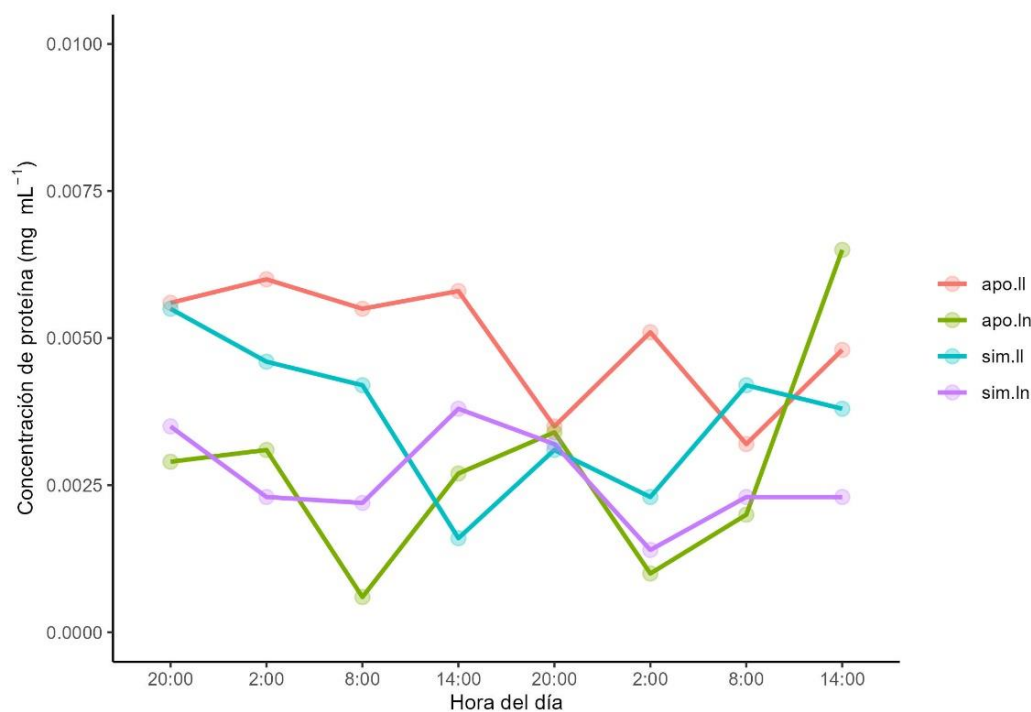


Figura 21. Cantidad de proteína total en *E. diaphana* simbiótica y aposimbiótica en luna nueva y luna llena a lo largo del día.

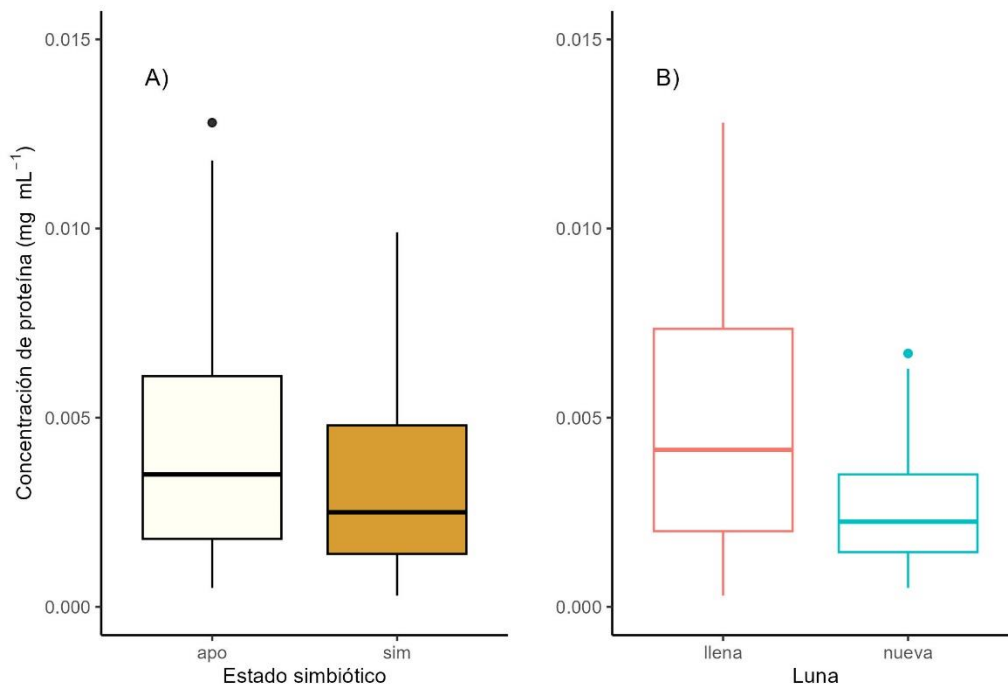


Figura 22. Cantidad de proteína total en *E. diaphana* respecto al estado simbiótico y la fase lunar. **A)** Proteína total de acuerdo con el estado simbiótico (aposimbióticas y simbióticas). **B)** Proteína total en dos fases lunares (luna llena y nueva).

Tabla 11. Valores recopilados sobre la actividad de fenoloxidasa, proteína y mucus en dos repeticiones experimentales en *E. diaphana* (n = seis). Se encuentran clasificados de acuerdo con su estado simbiótico, su respectiva luna y la hora del día.

Hora	Aposimbióticas						Simbióticas					
	Luna llena			Luna nueva			Luna llena			Luna nueva		
	PO (U mL ⁻¹ x 10 ⁻²)	Proteína (mg mL ⁻¹)	Mucus (μL)	PO (U mL ⁻¹ x 10 ⁻²)	Proteína (mg mL ⁻¹)	Mucus (μL)	PO (U mL ⁻¹ x 10 ⁻²)	Proteína (mg mL ⁻¹)	Mucus (μL)	PO (U mL ⁻¹) x 10 ⁻²	Proteína (mg mL ⁻¹)	Mucus (μL)
20:00	0.0015	-0.0006	47.16	0.0009	0.0023	45	0.0017	0.0011	47.67	0.0014	0.0025	50.67
20:00	0.003	0.0118	32.67	0.0005	0.0035	45.83	0.0013	0.0099	32	0.00093	0.0045	33
02:00	0.0024	-0.0008	40.67	0.0004	0.0018	39.5	0.0021	0.0003	50.83	0.0013	0.001	46.83
02:00	0.0026	0.0128	30	0.003	0.0043	44.17	0.0019	0.0089	27	0.0022	0.0035	41.5
08:00	0.0023	0.0008	40	0.0004	0.0006	47.83	0.0019	0.0006	36	0.0013	0.002	39.5
08:00	0.0016	0.0102	32	0.0013	0.0005	44.83	0.0021	0.0078	25.67	0.0017	0.0023	36.33
14:00	0.0033	-0.0002	51.5	0.0032	0.0018	56.33	0.0012	0.0006	29	0.0047	0.0051	35
14:00	0.0087	0.0118	26.33	0.0013	0.0035	42.33	0.0018	0.0026	41.5	0.0013	0.0025	45.83
20:00	0.0047	0.0011	37.17	0.0021	0.0009	37	0.0027	-0.0011	48.5	0.001	0.0009	44.17
20:00	0.0013	0.0058	41.33	0.0008	0.0058	34	0.0007	0.0072	13	0.0012	0.0055	38.33
02:00	0.0018	0.0061	34	0.002	0.0006	42	0.0014	0.0003	44	0.0022	0.0015	37.17
02:00	0.0017	0.004	47	0.001	0.0013	44.83	0.0022	0.0043	37.5	0.0013	0.0013	47
08:00	0.0013	0.0023	38.17	0.0013	0.0022	38	0.001	0.0023	50	0.0012	0.0018	44.67
08:00	0.0032	0.004	36	0.0008	0.0018	42.5	0.0029	0.0061	30.67	0.0011	0.0028	41.83
14:00	0.0024	0.0035	32	0.001	0.0063	39.67	0.0016	0.0024	30.83	0.0021	0.0018	41.83
14:00	0.0029	0.0061	39.83	0.0003	0.0067	35.5	0.0018	0.0052	38	0.0012	0.0028	46.67

Tabla 12. Resumen de resultados

Variable dependiente	Variable independiente	Estadísticos	Grupo	Figura
Fenoloxidasa	Hora del día	$H(7) = 7.09$, $gl = 7$, $P = 0.41$		Figura 14
	Estado simbiótico	$z = 0.50$, $gl = 1$, $P = 0.61$		Figura 15 A
	Luna	$z = 3.58$, $gl = 1$, $P = 0.0002$	Mayor en luna llena	Figura 15 B
	Interacción estado - luna	$H(15) = 17.47$, $gl = 3$, $P = 0.0005$	- Aposimbióticas en luna llena (Md = 0.0024) con mayor cantidad que: aposisimbióticas en luna nueva (Md = 0.0010), simbióticas en luna nueva (Md = 0.0013) y simbióticas en luna llena (Md = 0.0018). - Simbióticas en luna llena (Md = 0.0018) mayor PO que aposimbióticas en luna nueva (Md = 0.0010)	Figura 16
Mucus	Hora del día	$H(7) = 3.42$, $gl = 7$, $P = 0.84$		Figura 17
	Estado simbiótico	$z = 0.18$, $gl = 1$, $P = 0.85$		Figura 18 A

	Luna	$z = -2.50,$ $gl = 1,$ $P = 0.011$	Mayor en luna nueva	Figura 18 B
Densidad de simbioses	Hora del día en luna llena	$H (3) = 4.84,$ $gl = 3,$ $P = 0.184$		Figura 19 A
	Hora del día en luna nueva	$H (3) = 4.32,$ $gl = 3,$ $P = 0.228$		Figura 19 A
	Hora del día	$H (3) = 8.55,$ $gl = 3,$ $P = 0.035$	Mayor a las 14:00 horas	Figura 19 B
	PO	$R^2 = 0.51,$ $gl = 6,$ $P = 0.0463$	Entre mayor sea la densidad de simbioses, menor es la actividad de PO	Figura 20
Proteína	Hora del día	$H (7) = 4.53,$ $gl = 7, P = 0.71$		Figura 21
	Estado simbiótico	$z = 0.35, gl = 1,$ $P = 0.72,$		Figura 22 A
	Luna	$z = 1.09, gl = 1,$ $P = 0.27$		Figura 22 B

12. DISCUSIÓN

A pesar de que [Hernández et al. \(2023\)](#) investigó la actividad de fenoloxidasa de *E. diaphana* esta fue en respuesta a un estrés a temperaturas elevadas y únicamente en anémonas simbióticas. Por ello, este trabajo es el primer reporte que caracteriza la actividad de fenoloxidasa en el mucus de *E. diaphana* simbióticas y aposimbióticas, en condiciones basales a lo largo del día y durante dos fases lunares.

Se encontró una actividad de fenoloxidasa presente a lo largo del día tanto en las anémonas simbióticas como aposimbióticas, es decir, *E. diaphana* presenta una actividad constitutiva y dicha actividad de PO responde a una inmunidad basal. Lo anterior es similar a lo propuesto por [Pinzón et al. \(2014b\)](#) y [Palmer \(2018\)](#) donde argumentan que la activación de mecanismos inmunitarios (esencialmente en corales) no solamente son inducidos por patógenos o algún daño, sino el sistema inmune innato muestra actividad constitutiva, proporcionando a los organismos un estado saludable. Además, se ha reportado que el sistema inmune es altamente sensible a cambios ambientales ([Martín et al. 2008](#))

12.1 Variabilidad de PO acoplada al ciclo circadiano

La inmunidad constitutiva reflejada en la actividad de PO del mucus de *E. diaphana* aposimbióticas y simbióticas presentó fluctuaciones a lo largo del día. A pesar de que las variaciones no fueron estadísticamente significativas, es importante destacar que son variaciones biológicas que responden a procesos/relojes biológicos, sin importar el estado simbiótico de la anémona. El comportamiento de mecanismos inmunes a lo largo del ciclo circadiano se ha observado en análisis transcriptómicos en diferentes cnidarios. Por ejemplo, [Gong et al. \(2023\)](#) hallaron que dos corales, *A. pruinosa* y *P. damicornis* tienen oscilaciones día-noche en su transcripción génica. Durante el día están presentes genes asociados al transporte y catabolismo, mientras que en la noche los genes transcritos están relacionados con el sistema inmune, el metabolismo y la traducción de señales. De igual forma, [Levy et al. \(2011\)](#) reportó que genes involucrados en respuestas de estrés y la protección están sincronizados con el ciclo circadiano de corales formadores de arrecifes. Además, se conoce que los cnidarios responden a una amplia gama de longitudes de onda (400 – 550 nm) e intensidades de luz ([Hoadley et al. 2016](#)), por ello no es raro considerar que algunos procesos fisiológicos y locomotores analizados a la par de estudios transcriptómicos también han observado que los mecanismos inmunes en cnidarios responden a un ciclo circadiano sincronizado por fotorrecepción como señal principal ([Leach et al. 2018](#)).

Conforme a los resultados obtenidos, son visibles dos acrofases en la actividad de fenoloxidasa, a las 14:00 y 2:00 horas, esto podría ser congruente con [Leach y Reitzel \(2020\)](#) donde encontraron en *N. vectensis* patrones de expresión genética con sensibilidad de acuerdo con los distintos tipos de luz, mostrando un comportamiento bimodal, apuntando a la presencia

de un segundo oscilador dentro de los cnidarios, el cual esta enmascarado por un reloj circadiano predominante.

Asimismo, estas acrofases encontradas son similares a [Sorek et al. \(2018\)](#), donde demostraron que en *E. diaphana* simbiótica los procesos de fotosíntesis, alteraciones del estado redox y la rítmicidad en la contracción del cuerpo responden a un reloj circadiano endógeno del simbionte, debido a que las anémonas aposimbióticas tienen un ciclo circatidial y al momento de restablecer la interacción con las microalgas simbióticas su ritmicidad cambia de 12 horas a 24 horas. El reloj circadiano del simbionte tiene la capacidad de controlar procesos del huésped, debido que una de las hipótesis sobre las fuerzas impulsoras de la evolución de los relojes circadianos es la fusión simbiótica de un procarionta con una arqueobacteria que dio origen al primer organismo eucariota. Esta simbiosis requirió la sincronización metabólica, impulsando la evolución de un marcapasos interno ([Reitzel et al. 2013](#)).

12.2 Variabilidad de PO sincronizada al ciclo lunar

El ciclo lunar afecta directamente las actividades periódicas y procesos fisiológicos de numerosos invertebrados marinos, debido a la sensibilidad en su fotorrecepción ([Rosenberg et al. 2019](#)). Los cnidarios exhiben cambios de comportamiento, reproductivos y de crecimiento sincronizados con ciclos lunares ([Brady et al. 2016](#); [Hoadley et al. 2016](#)). En este estudio la actividad de fenoloxidasa en el mucus de *E. diaphana* en ambos estados simbióticos fue ligeramente mayor en luna llena que en luna nueva. Esta diferencia entre fases lunares puede ser congruente con lo reportado en [Levy et al. \(2007\)](#) donde comprobaron en el coral *A. millepora* la participación de genes de criptocromos en la detección y respuesta a la luz de la luna. Se reportó que el criptocromo tipo 2 (*cry 2*) mostró una expresión mayor en luna llena en comparación con la luna nueva. Lo anterior sugiere que se puede sincronizar el reloj endógeno de los corales con la fase lunar. Por lo tanto, es posible afirmar que la inmunidad constitutiva basal de *E. diaphana*, sin importar su estado simbiótico, también obedece a los ciclos lunares.

12.3 Producción de mucus

El éxito de los cnidarios simbióticos se debe en gran parte por la presencia de microalgas de la familia Symbiodiniaceae ([Sorek et al. 2014](#)). Esta simbiosis promueve el crecimiento y la supervivencia de los organismos en aguas oligotróficas, gracias a que promueven la

conservación y el reciclaje de nutrientes indispensables, es decir, las microalgas proporcionan energía a su hospedero (Davy et al. 2012). Las *E. diaphana* quien también albergan microalgas de la familia Symbiodinaceae y proporcionan un mayor presupuesto energético para el mantenimiento de las anémonas, se pensaría que con esta mayor disponibilidad de energía habría una mayor producción de mucus en anémonas simbióticas.

Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, la producción de mucus no difirió estadísticamente entre las anémonas *E. diaphana* simbióticas y aposimbióticas. A pesar de que se ha registrado que la composición de mucus varía temporalmente y entre especies de cnidarios (Bythell & Wild, 2011), en nuestro caso medir esta variación solo con volumen de mucus distinguiendo entre aposimbióticas y simbióticas no fue suficiente.

Además, al ser organismos holobiontes los cnidarios no solo se encuentran relacionados con los simbioses, sino que albergan una variedad de microorganismos mutualistas. Se sugiere tomar en cuenta estas relaciones y no solo el papel del simbionte en la producción de mucus, ya que al menos en las comunidades bacterianas dentro del mucus de coral exhiben una heterogeneidad espacial, que contribuyen a su naturaleza compleja y dinámica (Lema et al. 2012).

Por otro lado, el siguiente resultado muestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre la producción de mucus entre la luna llena y la luna nueva, esto es similar con lo reportado en Coffroth (1991) que trabajó con dos especies de corales, *P. furcata* y *P. astreoides*, reportando que la producción de mucus sigue una periodicidad lunar.

12.4 El rol del simbionte

La simbiosis está compuesta de una amplia gama de microalgas que influyen de forma diferencial en la aptitud del holobionte (Mieog et al. 2009). Existen estudios sobre monitoreos estacionales de la densidad de simbioses en corales, en donde las densidades más altas se reportan en temporada de invierno, argumentando que los patrones están dados por cambios estacionales en luz y temperatura (Fitt et al. 2000). Como primer paso en el estudio sobre la incidencia del simbionte, cuantificamos la densidad de simbioses a lo largo del día en luna llena y luna nueva. De acuerdo con los resultados obtenidos, la densidad de simbioses no varió significativamente en luna llena, ni en luna nueva. Sin embargo, sin discriminar entre fases

lunares, se encontró una variabilidad estadísticamente significativa entre las 8:00 horas y las 14:00 horas. Esta variabilidad es congruente con lo reportado en [Gong et al. \(2023\)](#) donde encontraron en dos corales simbióticos durante el día una alta densidad de Symbiodiniaceae, atribuida a la regulación positiva de genes asociados a la simbiosis y el metabolismo del nitrógeno y al mismo tiempo una regulación negativa de genes relacionados con el sistema inmune.

Lo anterior también sustenta el segundo resultado, debido a que encontramos una relación negativa entre la actividad de fenoloxidasa y la densidad de simbiontes en *E. diaphana* simbióticas, es decir, entre mayor densidad de simbiontes hay una menor cantidad de fenoloxidasa. La correlación negativa entre estas dos variables es congruente con lo reportado en [Mydlarz et al. \(2009\)](#) y [Fuess et al. \(2020\)](#). Ambos trabajos estudiaron corales simbióticos, donde argumentan que una mayor densidad de simbiontes puede tener efectos de largo alcance sobre el estrés celular y la respuesta inmune debido a las posibles compensaciones a nivel celular asociadas con el mantenimiento de la simbiosis.

12.5 Cuantificación de proteína.

En cnidarios, principalmente corales, se ha reportado que el mucus está compuesto por una cantidad importante de proteínas, dada en gran medida por la baja relación de C: N en el mucus coralino ([Brown & Bythell, 2005](#); [Bhagwat et al. 2024](#)). Generalmente la definición del mucus en cnidarios consiste en ser una red de polisacáridos y proteínas entrelazadas, siendo este último el componente orgánico más conspicuo ([Coffroth, 1990](#)). De acuerdo con [Stabili et al. \(2015\)](#) en la anémona *Actinia equina*, contiene un complejo de al menos 14 proteínas principales de diferentes tamaños, concordando con la naturaleza multiproteica del mucus de otros invertebrados marinos.

La determinación de proteína contenida en fluidos y tejidos es comúnmente utilizada como protocolo en estudios patológicos, bioquímicos e inmunológicos y se utiliza como referencia para la medición de otros componentes en sistemas biológicos ([Lee et al. 2003](#)).

Para este caso, el trabajar con volúmenes de 30 μL de mucus en cada muestra, debido a las características propias del organismo pudo limitar el procedimiento. En comparación con otros estudios, el mínimo necesario es 10 μL de mucus por organismo para no obtener ruido en

el resultado (Rivera, 2018). A pesar de esto, se completó el protocolo para la cuantificación de proteínas por duplicado y de acuerdo con los resultados las proteínas totales en algunas muestras son mayores que la absorbancia final de fenoloxidasa. Es por ello, que se decidió normalizar a volumen de mucus y no a cantidad de proteína. Aunque en la concentración de proteína no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

12.6 Perspectivas futuras

En definitiva, la respuesta inmune en cnidarios es una herramienta útil para conocer la salud de los organismos y puede ser clave en la comprensión de las respuestas ante factores estresantes. La inmunidad constitutiva puede dar paso a una interpretación pertinente de la salud de los organismos antes, durante y después de una amenaza. Este seguimiento de niveles basales puede emplearse no solo en un diseño de muestreo, sino también en grandes estrategias como la restauración coralina.

La actividad de fenoloxidasa ha demostrado ser una medida de salud idónea para detectar anomalías en el animal. El poder medir la variabilidad natural de la actividad de PO en organismos aparentemente sanos podría detectar cambios en su salud incluso antes de que presenten daños por alguna enfermedad.

Actualmente la salud de los arrecifes de coral es preocupante y necesariamente se debe abordar soluciones desde perspectivas complementarias. Además, considerar especies que son catalogadas como no dominantes espacialmente y que suelen pasarse por alto, como por ejemplo las anémonas y octocorales. A pesar de que en este estudio se ocupó un organismo modelo de corales, *E. diaphana* por si sola es parte fundamental del ecosistema. Se ha demostrado que las anémonas son animales estructuralmente complejos y son utilizados como hábitat, fuentes de alimento y sustrato de forrajeo por la fauna móvil (Steinberg et al. 2020).

La inmunología podría ser pieza clave en la comprensión de los mecanismos de supervivencia y además se propone tomar en cuenta todas las relaciones que conforman el holobionte.

13. CONCLUSIONES

La respuesta inmune y su relación con los relojes biológicos en *E. diaphana* sanas en sus dos estados simbióticos, es un enfoque que hasta ahora en la historia de la inmunología de este organismo no había sido publicado. Este trabajo contribuyó al entendimiento de la actividad de fenoloxidasa como respuesta inmune en condiciones naturales en las anémonas *E. diaphana* aposimbióticas y simbióticas, las cuales presentan inmunidad constitutiva basal en condiciones de laboratorio.

Se caracterizó la actividad de fenoloxidasa y se encontró que la respuesta varía de acuerdo con su ritmo biológico, mostrando mayor actividad durante el día y periodos nocturnos con baja actividad. Además, se comparó la respuesta inmune entre los dos estados simbióticos en dos fases lunares, y se observó una influencia de la luna en la actividad de PO, siendo mayor en la fase de luna llena. Asimismo, se determinó la producción de mucus, el cual no tuvo diferencias entre las anémonas aposimbióticas y simbióticas, pero sí entre lunas, con una mayor producción en luna nueva. Por otro lado, se identificó que la microalga simbiótica tiene un efecto en la respuesta inmune, debido a que la densidad de simbioses se encuentra correlacionada negativamente con la actividad de fenoloxidasa, presentando una mayor densidad de simbioses a las 14:00 horas.

Estos datos no solo muestran la evidencia de una inmunidad constitutiva, sino también ilustran una parte de la complejidad de las relaciones del holobionte. Además, conocer que existe en las anémonas una variación intrínseca en la actividad de fenoloxidasa, es decir, en su respuesta inmune, es un factor que debe estar presente en la esquematización pertinente de los diseños de muestreo y experimentales para eliminar cualquier sesgo y ruido en la investigación.

Las preguntas de investigación que se pretendieron contestar con este estudio, indican que: (1) la variabilidad biológica de la actividad de fenoloxidasa representa una inmunidad constitutiva; (2) la respuesta inmune de esta anémona difiere entre luna llena y luna nueva; (3) la cantidad de mucus que liberan las anémonas simbióticas es similar a aquella que liberan las anémonas aposimbióticas; sin embargo existieron diferencias en la producción de mucus con la fase lunar; (4) la presencia de microalgas en las anémonas sanas, resulta en una actividad de fenoloxidasa menor a mayor densidad de microalgas simbióticas.

14. LITERATURA CITADA

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2022). *Inmunología celular y molecular*. (10ma ed.) Elsevier.
- Angiolillo, M., & Fortibuoni, T. (2020). Impacts of marine litter on Mediterranean reef systems: from shallow to deep waters. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.581966>
- Armitage, S. A. O., Thompson, J. J. W., Rolff, J., & Siva-Jothy, M. T. (2003). Examining costs of induced and constitutive immune investment in *Tenebrio molitor*. *Journal Of Evolutionary Biology*, 16(5), 1038-1044. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00551.x>
- Ashida, M., & Ohnishi, E. (1967). Activation of pre-phenol oxidase in hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 122(2), 411-416. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(67\)90213-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(67)90213-5)
- Augustin, R., Fraune, S., & Bosch, T. C. (2010). How *Hydra* senses and destroys microbes. *Seminars In Immunology*, 22(1), 54-58. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.11.002>
- Baumgarten, S., Simakov, O., Esherick, L. Y., Liew, Y. J., Lehnert, E. M., Michell, C. T., Li, Y., Hambleton, E. A., Guse, A., Oates, M. E., Gough, J., Weis, V. M., Aranda, M., Pringle, J. R., & Voolstra, C. R. (2015). The genome of *Aiptasia*, a sea anemone model for coral symbiosis. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 112(38), 11893-11898. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513318112>
- Bednářová, A., Kodrík, D., & Krishnan, N. (2013). Nature's timepiece—molecular coordination of metabolism and its impact on aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 3026-3049. <https://doi.org/10.3390/ijms14023026>
- Bellis, E. S., & Denver, D. R. (2017). Natural variation in responses to acute heat and cold stress in a sea anemone model system for coral bleaching. *Biological Bulletin*, 233(2), 168-181. <https://doi.org/10.1086/694890>
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845-859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>
- Bhagwat, P. V., Ravindran, C., & Irudayarajan, L. (2023). Characterization of the defense properties of healthy and diseased coral mucus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108001>

- Bhagwat, P. V., Ravindran, C., & Irudayarajan, L. (2024). Beneficial properties of mucus in coral adaptations and ecological interactions. *Marine Biology*, 171(2). <https://doi.org/10.1007/s00227-023-04372-4>
- Bosch, T. C. G. (2008). The Path Less Explored: Innate Immune Reactions in Cnidarians. En *Nucleic acids and molecular biology* (pp. 27-42). https://doi.org/10.1007/978-3-540-73930-2_2
- Bourne, D. G., Garren, M., Work, T. M., Rosenberg, E., Smith, G. W., & Harvell, C. D. (2009). Microbial disease and the coral holobiont. *Trends in Microbiology*, 17(12), 554-562. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.09.004>
- Brady, A. K., Snyder, K. A., & Vize, P. D. (2011). Circadian cycles of gene expression in the coral, *Acropora millepora*. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025072>
- Brady, A. K., Willis, B. L., Harder, L. D., & Vize, P. D. (2016). Lunar phase modulates circadian gene expression cycles in the broadcast spawning coral *Acropora millepora*. *Biological Bulletin*, 230(2), 130-142. <https://doi.org/10.1086/bblv230n2p130>
- Brown, B., & Bythell, J. (2005). Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Marine Ecology Progress Series*, 296, 291-309. <https://doi.org/10.3354/meps296291>
- Brown, T., & Rodriguez-Lanetty, M. (2015). Defending against pathogens – immunological priming and its molecular basis in a sea anemone, cnidarian. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep17425>
- Bruno, J. F., Selig, E. R., Casey, K. S., Page, C. A., Willis, B. L., Harvell, C. D., Sweatman, H., & Melendy, A. M. (2007). Thermal stress and coral cover as drivers of coral disease outbreaks. *PLoS Biology*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050124>
- Bythell, J. C., & Wild, C. (2011). Biology and ecology of coral mucus release. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 408(1-2), 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.07.028>
- Cardinali, P. (2005). Ritmos biológicos. En Tresguerres, J. (ed). Fisiología humana. *McGraw-Hill Interamericana*, (pp. 1119- 1133).
- Carlisle, J. F., Murphy, G. K., & Roark, A. M. (2016). Body size and symbiotic status influence gonad development in *Aiptasia pallida* anemones. *Symbiosis*, 71(2), 121-127. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0456-1>

- Cerenius, L., Bangyeekhun, E., Keyser, P., Söderhäll, I., & Söderhäll, K. (2003). Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Cellular Microbiology*, 5(5), 353-357. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00282.x>
- Cerenius, L., Henttonen, P., Lindqvist, O. V., & Söderhäll, K. (1991). The crayfish pathogen *Psorospermium haeckeli* activates the prophenoloxidase activating system of freshwater crayfish in vitro. *Aquaculture*, 99(3-4), 225-233. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90243-z](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90243-z)
- Cerenius, L., Kawabata, S., Lee, B. L., Nonaka, M., & Söderhäll, K. (2010). Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(10), 575-583. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.006>
- Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29(6), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198(1), 116-126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2021). Immune properties of invertebrate phenoloxidases. *Developmental & Comparative Immunology*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104098>
- Chakraborty, U. (2013). Effects of different phases of the lunar month on humans. *Biological Rhythm Research*, 45(3), 383-396. <https://doi.org/10.1080/09291016.2013.830508>
- Changsut, I., Womack, H. R., Shickle, A., Sharp, K. H., & Fuess, L. E. (2022). Variation in symbiont density is linked to changes in constitutive immunity in the facultatively symbiotic coral, *Astrangia poculata*. *Biology Letters*, 18(11). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0273>
- Chen, C., Soong, K. y Chen, A. (2008). The smallest oocytes among broadcast-spawning actinarians and a unique lunar reproductive cycle in a unisexual population of the sea anemona *Aiptasia pulchella* (Anthozoa: Actinaria). *Zoological Studies*, 47(1): 37-45.

- Coffroth, M. A. (1990). Mucous sheet formation on poritid corals: An evaluation of coral mucus as a nutrient source on reefs. *Marine Biology*, 105(1), 39-49. <https://doi.org/10.1007/bf01344269>
- Coffroth, M. A. (1991). Cyclical mucous sheet formation on poritid corals in the San Blas Islands, Panama. *Marine Biology*, 109(1), 35-40. <https://doi.org/10.1007/bf01320229>
- DATAtab Team (2024). DATAtab: Online Statistics Calculator. DATAtab e.U. Graz, Austria. URL <https://datatab.es>
- Davy, S. K., Allemand, D., & Weis, V. M. (2012). Cell biology of Cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 229-261. <https://doi.org/10.1128/membr.05014-11>
- Dierking, K., & Pita, L. (2020). Receptors mediating host-microbiota communication in the metaorganism: the invertebrate perspective. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01251>
- Dungan, A. M., Hartman, L. M., Tortorelli, G., Belderok, R., Lamb, A. M., Pisan, L., McFadden, G. I., Blackall, L. L., & Van Oppen, M. J. H. (2020). *Exaiptasia diaphana* from the great barrier reef: a valuable resource for coral symbiosis research. *Symbiosis*, 80(2), 195-206. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00665-0>
- Ellis, R., Parry, H., Spicer, J., Hutchinson, T., Pipe, R., & Widdicombe, S. (2011). Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(6), 1209-1222. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.017>
- Esposito, R., D'Aniello, S., Squarzone, P., Pezzotti, M. R., Ristoratore, F., & Spagnuolo, A. (2012). New insights into the evolution of metazoan tyrosinase gene family. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035731>
- Fagiani, F., Di Marino, D., Romagnoli, A., Travelli, C., Voltan, D., Di Cesare Mannelli, L., Racchi, M., Govoni, S., & Lanni, C. (2022). Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00899-y>
- Fitt, W. K., McFarland, F. K., Warner, M. E., & Chilcoat, G. C. (2000). Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to

- coral bleaching. *Limnology and Oceanography*, 45(3), 677-685.
<https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.3.0677>
- Fox, J. & Weisberg, S. (2019). *An R Companion to Applied Regression*, Third edition. Sage, Thousand Oaks CA. <https://www.john-fox.ca/Companion/>
- Fuess, L. E., Palacio-Castro, A. M., Butler, C. C., Baker, A. C., & Mydlarz, L. D. (2020). Increased algal symbiont density reduces host immunity in a threatened Caribbean coral species, *Orbicella faveolata*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fevo.2020.572942>
- Gladfelter, W. B. (1975). Sea anemone with zooxanthellae: simultaneous contraction and expansion in response to changing light intensity. *Science*, 189(4202), 570-571.
<https://doi.org/10.1126/science.189.4202.570>
- Gong, S., Li, G., Liang, J., Xu, L., Tan, Y., Jin, X., Xia, X., & Yu, K. (2023). Day-night cycle as a key environmental factor affecting coral-Symbiodiniaceae symbiosis. *Ecological Indicators*, 146. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.109890>
- Grajales, A., & Rodríguez, E. (2016). Elucidating the evolutionary relationships of the Aiptasiidae, a widespread cnidarian–dinoflagellate model system (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria: Metridioidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, 252-263.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.004>
- Harrison P.L, Babcock, R.C., Bull, G.D., Oliver, J.K., Wallace, C.C. & Willis, B.L. (1984). Mass spawning in tropical reef corals. *Science*. 223(4641).
<https://doi.org/10.1126/science.223.4641.1186>
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., & Thomas-Guyon, H. (2007). Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(4), 433-440. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.014>
- Hendricks, W. D., Byrum, C. A., & Meyer-Bernstein, E. L. (2012). Characterization of circadian behavior in the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *PLoS ONE*, 7(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046843>
- Hernández, M. G., Rivera-Ortega, J. & Thomé, P. E. (2023). Actividad de la vía de la fenoloxidasas como respuesta a daño por temperaturas elevadas en *Exaiptasia diaphana*.

Red Universitaria de Cambio Climático, RedUCC.

<https://www.pincc.unam.mx/reducc/eventos/martes-17-de-enero-mesa-5/>

- Hoadley, K. D., Szmant, A. M., & Pyott, S. J. (2011). Circadian clock gene expression in the coral *Favia fragum* over diel and lunar reproductive cycles. *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019755>
- Hoadley, K. D., Vize, P. D., & Pyott, S. J. (2016). Current understanding of the circadian clock within cnidaria. En *The Cnidaria, Past, Present and Future* (pp. 511-520). *Springer eBooks*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_31
- Hughes, T., Barnes, M., Bellwood, D., Cinner, J., Cumming, G., Jackson, J., Kleypas, J., van de Leemput, I., Lough, J., Morrinson, T., Palumbi, S., van Nes, E. & Scheffer, M. (2017). Coral reefs in the Anthropocene. *Nature*, 546, 82–90. <https://doi.org/10.1038/nature22901>
- Hut, R. A., & Beersma, D. G. M. (2011). Evolution of time-keeping mechanisms: early emergence and adaptation to photoperiod. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 366(1574), 2141-2154. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0409>
- Jacobovitz, M. R., Rupp, S., Voss, P. A., Maegele, I., Gornik, S. G., & Guse, A. (2021). Dinoflagellate symbionts escape vomocytosis by host cell immune suppression. *Nature Microbiology*, 6(6), 769-782. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00897-w>
- Johansson, M. W., & Soderhall, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*, 5(6), 171-176. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90139-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90139-7)
- Kanaya, H. J., Park, S., Kim, J., Kusumi, J., Krenenou, S., Sawatari, E., Sato, A., Lee, J., Bang, H., Kobayakawa, Y., Lim, C., & Itoh, T. Q. (2020). A sleep-like state in *Hydra* unravels conserved sleep mechanisms during the evolutionary development of the central nervous system. *Science Advances*, 6(41). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb9415>
- Kwon, T. H., Kim, M. S., Choi, H. W., Joo, C. H., Cho, M. Y., & Lee, B. L. (2000). A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), 6188-6196. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01695.x>

- Leach, W. B., & Reitzel, A. M. (2020). Decoupling behavioral and transcriptional responses to color in an eyeless cnidarian. *BMC Genomics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6766-y>
- Leach, W., Macrander, J., Peres, R., & Reitzel, A. (2018). Transcriptome-wide analysis of differential gene expression in response to light:dark cycles in a model cnidarian. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics and Proteomics*, 26, 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2018.03.004>
- Leal, E., Suescún-Bolívar, P., & Gómez, M. M. (2022). Mecanismos inmunológicos en Cnidaria: un sistema inmune basal de gran complejidad e interés bioprospectivo. *Revista de Biología Tropical*, 70(1). <https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop.v70i1.49798>
- Lee, S.H., J.K. Suh & M. Li (2003). Determination of bovine serum albumin by its enhancement effect of Nile blue fluorescence. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 24: 45-48.
- Lehnert, E. M., Burriesci, M. S., & Pringle, J. R. (2012). Developing the anemone *Aiptasia* as a tractable model for cnidarian-dinoflagellate symbiosis: the transcriptome of aposymbiotic *A. pallida*. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-271>
- Lema, K. A., Willis, B. L., & Bourne, D. G. (2012). Corals form characteristic associations with symbiotic nitrogen-fixing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3136-3144. <https://doi.org/10.1128/aem.07800-11>
- Levy, O., Appelbaum, L., Leggat, W., Gothlif, Y., Hayward, D. C., Miller, D. J., & Hoegh-Guldberg, O. (2007). Light-responsive cryptochromes from a simple multicellular animal, the coral *Acropora millepora*. *Science*, 318(5849), 467-470. <https://doi.org/10.1126/science.1145432>
- Levy, O., Kaniewska, P., Alon, S., Eisenberg, E., Karako-Lampert, S., Bay, L. K., Reef, R., Rodriguez-Lanetty, M., Miller, D. J., & Hoegh-Guldberg, O. (2011). Complex diel cycles of gene expression in coral-algal symbiosis. *Science*, 331(6014), 175. <https://doi.org/10.1126/science.1196419>
- Lin, C., Takahashi, S., Mulla, A. J., & Nozawa, Y. (2021). Moonrise timing is key for synchronized spawning in coral *Dipsastraea speciosa*. *Proceedings Of The National Academy of Sciences*, 118(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.2101985118>

- Lin C.H & Nozawa Y. (2023). The influence of seawater temperature on the timing of coral spawning. *Coral Reefs*. 42(2):417-26. <https://doi.org/10.1007/s00338-023-02349-9>
- Little, T. J., Hultmark, D., & Read, A. F. (2005). Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nature Immunology*, 6(7), 651-654. <https://doi.org/10.1038/ni1219>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Mansfield K.M. & Gilmore T.D. (2019). Innate immunity and cnidarian-Symbiodiniaceae mutualism. *Developmental and Comparative Immunology*. 90:199-209. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.09.020>
- Martin, L.B., Weil, Z. M. & Nelson, R. J. (2008). Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 363: 321-339. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2142>
- Matthews J.L., Crowder C.M., Oakley C.A., Lutz A., Roessner U., Meyer E., Grossman A.R., Weis V.M., Davy S.K. (2017). Optimal nutrient exchange and immune responses operate in partner specificity in the cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 114(50). <https://doi.org/10.1073/pnas.1710733114>
- McDonald, D. R., & Levy, O. (2019). Innate immunity. En *Clinical Immunology Principles and Practice* (Fifth Edition, pp. 39-53). Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-6896-6.00003-x>
- Mieog, J. C., Olsen, J. L., Berkelmans, R., Bleuler-Martinez, S. A., Willis, B. L., & Van Oppen, M. J. H. (2009). The roles and interactions of symbiont, host and environment in defining coral fitness. *PLoS ONE*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006364>
- Milton, J. S. (2001). Estadística para biología y ciencias de la salud. *McGraw-Hill Interamericana* (pp. 467-487).
- Moreno-García, M., Condé, R., Bello-Bedoy, R., & Lanz-Mendoza, H. (2014). The damage threshold hypothesis and the immune strategies of insects. *Infection Genetics and Evolution*, 24, 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.02.010>
- Moser, M., & Leo, O. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine*, 28, C2-C13. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.022>

- Mydlarz, L., Couch, C., Weil, E., Smith, G., & Harvell, C. (2009). Immune defenses of healthy, bleached and diseased *Montastraea faveolata* during a natural bleaching event. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87, 67-78. <https://doi.org/10.3354/dao02088>
- Mydlarz, L. D., Fuess, L., Mann, W., Pinzón, J. H., & Gochfeld, D. J. (2016). Cnidarian immunity: from genomes to phenomes. En *The Cnidaria, Past, Present and Future* (pp. 441-466). *Springer eBooks*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_28
- Mydlarz, L. D., & Harvell, C. D. (2007). Peroxidase activity and inducibility in the sea fan coral exposed to a fungal pathogen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 146(1), 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.005>
- Mydlarz, L. D., Holthouse, S. F., Peters, E. C., & Harvell, C. D. (2008). Cellular responses in sea fan corals: granular amoebocytes react to pathogen and climate stressors. *PLoS ONE*, 3(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001811>
- Mydlarz, L. D., McGinty, E. S., & Harvell, C. D. (2010). What are the physiological and immunological responses of coral to climate warming and disease? *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 934-945. <https://doi.org/10.1242/jeb.037580>
- Mydlarz, L. D., & Palmer, C. V. (2011). The presence of multiple phenoloxidases in Caribbean reef-building corals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 159(4), 372-378. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.03.029>
- Nath, R. D., Bedbrook, C. N., Abrams, M. J., Basinger, T., Bois, J. S., Prober, D. A., Sternberg, P. W., Gradinaru, V., & Goentoro, L. (2017). The jellyfish *Cassiopea* exhibits a sleep-like state. *Current Biology*, 27(19), 2984-2990. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.014>
- Noordally, Z. B., & Millar, A. J. (2014). Clocks in Algae. *Biochemistry*, 54(2), 171-183. <https://doi.org/10.1021/bi501089x>
- Oldham, R. K. (2009). Current concepts in immunology. En *Principles of Cancer Biotherapy* (pp. 85-99). *Springer eBooks*. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2289-9_5
- Palmer, C. V. (2018). Immunity and the coral crisis. *Communications Biology*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0097-4>

- Palmer, C. V., Bythell, J. C., & Willis, B. L. (2010). Levels of immunity parameters underpin bleaching and disease susceptibility of reef corals. *The FASEB Journal*, 24(6), 1935-1946. <https://doi.org/10.1096/fj.09-152447>
- Palmer, C. V., McGinty, E. S., Cummings, D. J., Smith, S. M., Bartels, E., & Mydlarz, L. D. (2011). Patterns of coral ecological immunology: variation in the responses of Caribbean corals to elevated temperature and a pathogen elicitor. *Journal of Experimental Biology*, 214(24), 4240-4249. <https://doi.org/10.1242/jeb.061267>
- Palmer, C. V., Mydlarz, L. D., & Willis, B. L. (2008). Evidence of an inflammatory-like response in non-normally pigmented tissues of two scleractinian corals. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 275(1652), 2687-2693. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0335>
- Palmer, C. V., & Traylor-Knowles, N. G. (2018). Cnidaria: Anthozoans in the hot seat. In *Advances in Comparative Immunology* (pp. 51-93). *Springer eBooks*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_3
- Parisi, M. G., Parrinello, D., Stabili, L., & Cammarata, M. (2020). Cnidarian immunity and the repertoire of defense mechanisms in Anthozoans. *Biology*, 9(9), 283. <https://doi.org/10.3390/biology9090283>
- Pinzón, H. C. J., Beach-Letendre, J., Weil, E., & Mydlarz, L. D. (2014a). Relationship between phylogeny and immunity suggests older Caribbean coral lineages are more resistant to disease. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104787>
- Pinzón H. C. J., Dornberger L, Beach-Letendre J, Weil, E., & Mydlarz L. D. (2014b). The link between immunity and life history traits in scleractinian corals. *PeerJ*, 2. <https://doi.org/10.7717/peerj.628>
- Posit Team (2024). RStudio: Integrated Development Environment for R. v. 4.1.0. Boston (USA): Posit PBC. <https://posit.co>
- Punt, J., Stranford, S., Jones, P., & Owen, J. (2020). Kuby, Immunology. (8th ed.) *McGraw-Hill Interamericana*.
- Puntin, G., Sweet, M., Fraune, S., Medina, M., Sharp, K., Weis, V. M., & Ziegler, M. (2022). Harnessing the power of model organisms to unravel microbial functions in the coral holobiont. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(4). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00053-22>

- Rädecker, N., Raina, J., Pernice, M., Perna, G., Guagliardo, P., Kilburn, M. R., Aranda, M., & Voolstra, C. R. (2018). Using *Aiptasia* as a model to study metabolic interactions in cnidarian-Symbiodinium symbioses. *Frontiers In Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00214>
- R Core Team (2021). R: A language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>
- Reed, K., Muller, E., & Van Woesik, R. (2010). Coral immunology and resistance to disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 90(2), 85-92. <https://doi.org/10.3354/dao02213>
- Reitzel, A. M., Behrendt, L., & Tarrant, A. M. (2010). Light entrained rhythmic gene expression in the sea anemone *Nematostella vectensis*: the evolution of the animal circadian clock. *PLoS ONE*, 5(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012805>
- Reitzel, A. M., Tarrant, A. M., & Levy, O. (2013). Circadian clocks in the cnidaria: environmental entrainment, molecular regulation, and organismal outputs. *Integrative and Comparative Biology*, 53(1), 118-130. <https://doi.org/10.1093/icb/ict024>
- Ritter, A., & Tessmar-Raible, K. (2024). Time me by the moon. *EMBO Reports*, 25(8), 3169-3176. <https://doi.org/10.1038/s44319-024-00196-5>
- Rivera Ortega, Jacqueline. (2018). "Actividad antimicrobiana del mucus de cnidarios simbióticos". (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/161231>
- Rivera-Ortega, J., & Thomé, P. E. (2018). Contrasting antibacterial capabilities of the surface mucus layer from three symbiotic cnidarians. *Frontiers in Marine Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00392>
- Roenneberg, T., & Merrow, M. (2005). Circadian clocks — the fall and rise of physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(12), 965-971. <https://doi.org/10.1038/nrm1766>
- Rosenberg, Y., Doniger, T., Harii, S., Sinniger, F., & Levy, O. (2019). Demystifying circalunar and diel rhythmicity in *Acropora digitifera* under constant dim light. *Science*, 22, 477-488. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.040>
- Sadd, B. M., & Schmid-Hempel, P. (2006). Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology*, 16(12), 1206-1210. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047>

- Sakai, Y., Hatta, M., Furukawa, S., Kawata, M., Ueno, N., & Maruyama, S. (2020). Environmental factors explain spawning day deviation from full moon in the scleractinian coral *Acropora*. *Biology Letters*, 16(1). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0760>
- Sánchez-Salgado, J. L., Pereyra, M. A., Alpuche-Osorno, J. J., & Zenteno, E. (2021). Pattern recognition receptors in the crustacean immune response against bacterial infections. *Aquaculture*, 532. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735998>
- Scheiermann, C., Gibbs, J., Ince, L., & Loudon, A. (2018). Clocking in to immunity. *Nature Reviews Immunology*, 18(7), 423-437. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0008-4>
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y., & Frenette, P. S. (2013). Circadian control of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 190-198. <https://doi.org/10.1038/nri3386>
- Sebens, K. P., & DeRiemer, K. (1977). Diel cycles of expansion and contraction in coral reef anthozoans. *Marine Biology*, 43(3), 247-256. <https://doi.org/10.1007/bf00402317>
- Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., Hamada, M., Hisata, K., Tanaka, M., Fujie, M., Fujiwara, M., Koyanagi, R., Ikuta, T., Fujiyama, A., Miller, D. J., & Satoh, N. (2011). Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature*, 476(7360), 320-323. <https://doi.org/10.1038/nature10249>
- Shoguchi, E., Tanaka, M., Shinzato, C., Kawashima, T., & Satoh, N. (2013). A genome-wide survey of photoreceptor and circadian genes in the coral, *Acropora digitifera*. *Gene*, 515(2), 426-431. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.038>
- Smith, V. J. (2010). Immunology of invertebrates: cellular. *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002344.pub2>
- Söderhäll, K., Häll, L., Unestam, T., & Nyhlén, L. (1979). Attachment of phenoloxidase to fungal cell walls in arthropod immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 34(3), 285-294. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(79\)90075-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(79)90075-2)
- Söderhäll, K., & Smith, V. J. (1986). The prophenoloxidase activating system: the biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with special reference to Crustaceans. En *Proceedings in life sciences* (pp. 208-223). https://doi.org/10.1007/978-3-642-70768-1_15

- Sorek, M., Díaz-Almeyda, E. M., Medina, M., & Levy, O. (2014). Circadian clocks in symbiotic corals: The duet between *Symbiodinium* algae and their coral host. *Marine Genomics*, 14, 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2014.01.003>
- Sorek, M., Schnytzer, Y., Ben-Asher, H. W., Caspi, V. C., Chen, C., Miller, D. J., & Levy, O. (2018). Setting the pace: host rhythmic behaviour and gene expression patterns in the facultatively symbiotic cnidarian *Aiptasia* are determined largely by *Symbiodinium*. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0465-9>
- Souter, D. W., & Lindén, O. (2000). The health and future of coral reef systems. *Ocean & Coastal Management*, 43(8-9), 657-688. [https://doi.org/10.1016/s0964-5691\(00\)00053-3](https://doi.org/10.1016/s0964-5691(00)00053-3)
- Spalding, M. D., & Brown, B. E. (2015). Warm-water coral reefs and climate change. *Science*, 350(6262), 769-771. <https://doi.org/10.1126/science.aad0349>
- Stabili, L. (2019). The mucus of marine invertebrates: cnidarians, polychaetes and echinoderms as case studies. In: Trincone, A. (eds). *Enzymatic technologies for marine polysaccharides*. <https://doi.org/10.1201/9780429058653>
- Stabili, L., Schirosi, R., Parisi, M. G., Piraino, S., & Cammarata, M. (2015). The mucus of *Actinia equina* (Anthozoa, Cnidaria): an unexplored resource for potential applicative purposes. *Marine Drugs*, 13(8), 5276-5296. <https://doi.org/10.3390/md13085276>
- Steinberg, R. K., Dafforn K. A., Ainsworth, T. & Johnston, E. L. (2020). Know thy anemone: a review of threats to octocorals and anemones and opportunities for their restoration. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00590>
- Sweeney, B. M. (1976). Circadian rhythms in corals, particularly Fungiidae. *Biological Bulletin*, 151(1), 236-246. <https://doi.org/10.2307/1540717>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Thomé, P. E., Rivera-Ortega, J., Rodríguez-Villalobos, J. C., Cerqueda-García, D., Guzmán-Urieta, E. O., García-Maldonado, J. Q., Carabantes, N., & Jordán-Dahlgren, E. (2021). Local dynamics of a white syndrome outbreak and changes in the microbial community associated with colonies of the scleractinian brain coral *Pseudodiploria strigosa*. *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.10695>

- Toledo-Hernández, C., Ruiz-Díaz, C. P., Ramírez-Lugo, J. S., Torres-Díaz, M., Santiago-Pagán, L., Bruno-Chardón, A., & Díaz-Vázquez, L. M. (2023). Uncovering the link between environmental factors and coral immunity: A study of fluorescent protein expression and phenoloxidase activity in *Acropora cervicornis*. *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1133486>
- Van Der Burg, C. A., Pavasovic, A., Gilding, E. K., Pelzer, E. S., Surm, J. M., Smith, H. L., Walsh, T. P., & Prentis, P. J. (2020). The rapid regenerative response of a model sea anemone species *Exaiptasia pallida* is characterised by tissue plasticity and highly coordinated cell communication. *Marine Biotechnology*, 22(2), 285-307. <https://doi.org/10.1007/s10126-020-09951-w>
- van Oppen, M. J. H., Oliver, J. K., Putnam, H. M., Gates, R.D. (2015). Building coral reef resilience through assisted evolution. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 112 (8), 2307-2313. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422301112>
- Van de Water, J. A. J. M., Lamb, J. B., Heron, S. F., Van Oppen, M. J. H., & Willis, B. L. (2016). Temporal patterns in innate immunity parameters in reef-building corals and linkages with local climatic conditions. *Ecosphere*, 7(11). <https://doi.org/10.1002/ecs2.1505>
- Vidal-Dupiol, J., Dheilly, N. M., Rondon, R., Grunau, C., Cosseau, C., Smith, K. M., Freitag, M., Adjeroud, M., & Mitta, G. (2014). Thermal stress triggers broad *Pocillopora damicornis* transcriptomic remodeling, while *Vibrio coralliilyticus* infection induces a more targeted immuno-suppression response. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107672>
- Vize, P. D. (2009). Transcriptome analysis of the circadian regulatory network in the coral *Acropora millepora*. *Biological Bulletin*, 216(2), 131-137. <https://doi.org/10.1086/bblv216n2p131>
- Wahl, M., Goecke, F. R., Labes, A., Dobretsov, S., & Weinberger, F. (2012). The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00292>
- Wang, R., Lee, S. Y., Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2001). Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *European*

- Journal of Biochemistry*, 268(4), 895-902. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.01945.x>
- Weis, V. M., Davy, S. K., Hoegh-Guldberg, O., Rodriguez-Lanetty, M., & Pringle, J. R. (2008). Cell biology in model systems as the key to understanding corals. *Trends In Ecology & Evolution*, 23(7), 369-376. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.03.004>
- Weiss, Y., Forêt, S., Hayward, D. C., Ainsworth, T., King, R., Ball, E. E., & Miller, D. J. (2013). The acute transcriptional response of the coral *Acropora millepora* to immune challenge: expression of GiMAP/IAN genes links the innate immune responses of corals with those of mammals and plants. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-400>
- Westwood, M. L., O'Donnell, A. J., De Bekker, C., Lively, C. M., Zuk, M., & Reece, S. E. (2019). The evolutionary ecology of circadian rhythms in infection. *Nature Ecology & Evolution*, 3(4), 552-560. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0831-4>
- Zaragoza, W. J., Krediet, C. J., Meyer, J. L., Canas, G., Ritchie, K. B., & Teplitski, M. (2014). Outcomes of infections of sea anemone *Aiptasia pallida* with *Vibrio* spp. Pathogenic to corals. *Microbial Ecology*, 68(2), 388-396. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0397-2>
- Zimecki, M. (2006). The lunar cycle: effects on human and animal behavior and physiology. *PubMed*, 60, 1-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16407788/>

Fluctuations in immune response (phenol oxidase activity) related to circadian and lunar cycles in the symbiotic anemone *Exaiptasia diaphana* (Actinaria: Aiptasiidae)

Miel A Rodríguez-Jiménez¹, Jacqueline Rivera-Ortega^{1,2}, Patricia E Thomé^{1*}

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 June 2024

Accepted 5 November 2024

Published 6 December 2024

LEER EN ESPAÑOL:

<https://doi.org/10.7773/cm.v2024.3505>

CORRESPONDING AUTHOR

* E-mail: thome@cmar1.unam.mx

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular, Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 77580 Puerto Morelos, Quintana Roo, Mexico.

² Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Coyoacán, Ciudad de México, Mexico.

ABSTRACT. The immune capacity of cnidarians allows them to maintain the integrity of their tissues and prevent infections when facing threats of damage. Cnidarians have an innate immune system that includes melanin and enzymes, like phenol oxidase, that is activated in the presence of pathogens and generates reactive and toxic compounds for their elimination. The anemone *Exaiptasia diaphana* is a model organism for symbiosis, nutrition, and immune studies, as it maintains a facultative symbiosis with microalgae of the Symbiodiniaceae family, like corals; *E. diaphana* can also exist in an aposymbiotic state. Therefore, *E. diaphana* is a suitable model to study the cnidarian immune system. To learn about the basic immune activity of this anemone, we asked ourselves if it exhibited variability in its immune activity throughout the day, considering 2 lunar phases (full moon and new moon). Mucus samples were taken from 6 symbiotic and 6 aposymbiotic anemones, which were previously acclimatized and maintained in 6-well plates with filtered seawater under natural light conditions. Phenol oxidase activity was estimated every 6 h for 48 h, with 2 repetitions for each moon phase. Phenol oxidase activity was highest at 14:00 h, whereas nocturnal activity was low. Enzyme activity increased under the full moon in aposymbiotic anemones ($H = 17.47$, $P = 0.0005$). We found a negative relationship between symbiont density and phenol oxidase activity ($R^2 = 0.05$, $P = 0.04$). These results allow us to suggest that this anemone can maintain a constant constitutive immunity under laboratory conditions, which responds to biological cycles such as circadian and moon cycles.

Key words: constitutive immunity, mucus, lunar phases, symbiosis, circadian cycle, symbiotic anemone, phenol oxidase, cnidarian.

INTRODUCTION

Exaiptasia diaphana is a symbiotic anemone and a model organism to study various processes in cnidarians such as symbiosis, nutrition, and immunological mechanisms (Lehnert et al. 2012, Matthews et al. 2017, Rädercker et al. 2018, Mansfield and Gilmore 2019, Dungan et al. 2020). This anemone maintains a facultative symbiosis with microalgae of the Symbiodiniaceae family (Weis et al. 2008). Cnidarians exhibit nocturnal behavior (Lewis and Price 1975, Sebens and De Riemer 1977) and establish symbiosis with microalgae, which represents a challenge for the study of basal parameters, since both are governed by different biological rhythms (Sorek et al. 2014). Biological

rhythms allow organisms to anticipate and adapt to natural environmental changes (Roenneberg and Merrow 2005, Bednářová et al. 2013). Symbiotic cnidarians exhibit heterotrophic feeding habits at night (Lewis and Price 1975) and use the energy provided by their endosymbiont algae during the day; this complicates the study of their rhythmic behavior. Furthermore, they show differential behavior during the day and night; for example, non-symbiotic anemones lose their circadian rhythm when kept under constant light or darkness (Aguillon et al. 2024). In symbiotic organisms, the tentacles of anemones and the corals that allow them to feed expand at night, whereas those with a higher density of symbionts expand during the day (Sebens and De Riemer 1977).

Open Access

Online ISSN: 2395-9053

Screened via Similarity Check powered by iThenticate

<https://doi.org/10.7773/cm.v2024.3505>



This is an Open Access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which allows you to share and adapt the work, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. Figures, tables, and other elements in the article are included in the article's CC BY 4.0 license, unless otherwise indicated. You must seek permission from the copyright holder for use of material not covered by this license. The journal title is protected by copyrights owned by Universidad Autónoma de Baja California, and the journal title and logo are not subject to this license.

Lunar cycles are important for the reproduction of marine animals (Raible et al. 2017). In corals, lunar cycles regulate spawning (Harrison et al. 1984), although factors such as temperature can modify this process (Lin and Nozawa 2023). In addition, they have a correlation with the deposition of calcareous structures called dissepiments and with the growth of the calcareous skeleton of coral colonies (Winter and Sammarco).

Biological rhythms are key in controlling physiology and, therefore, the immune system (Fagiani et al. 2022). In mammals, studies have found that the circadian cycle is related to the migration of cells of the innate immune system and changes in the expression of immune molecules (Reviewed in Scheiermann et al. 2013). Furthermore, when organisms face an immunological challenge, they respond best in their active phase (Reviewed in Westwood et al. 2019). In cnidarians, the relationship between biological rhythms and the immune system has not yet been studied.

As in other invertebrates, cnidarians have an innate immune system whose function is to maintain the health of the animal (Palmer 2018). An immunological pathway commonly used by invertebrates is the proPO system, or the phenol oxidase (PO) pathway (Cerenius et al. 2008). The proPO system is activated by proteins capable of binding to peptidoglycans and lipopolysaccharides in various invertebrates, such as insects (Zhao et al. 2018), crustaceans (Liu et al. 2011), and cnidarians (Lehnert et al. 2012). Once activated, it generates cytotoxic free radicals, binding agents, and opsonin, which protect the animal without synthesizing melanin (Zhao et al. 2007, Cerenius and Söderhäll 2021). The synthesis of melanin as a final product, known as melanization, encapsulates potentially harmful microorganisms (Zhao et al. 2007, Cerenius et al. 2008). For example, Palmer et al. (2010) showed that after damage, melanin deposits appear in some corals almost instantaneously.

In some cnidarians, PO has been studied as a response to various diseases and bleaching (Mydlarz et al. 2009, Palmer et al. 2010, Rivera-Ortega and Thomé 2018). However, the study of the basal immune response and its relationship with biological rhythms has not been considered. Studying the immune response under basal conditions is important since biological processes in any living organism alternate between periods of high, low, or no activity (Cardinali 2005). Therefore, our aim was to characterize the fluctuation of PO in healthy *E. diaphana* individuals, both symbiotic and aposymbiotic, throughout the day and during the phases of full moon and new moon. In addition, to understand whether symbionts affect the immune response, PO fluctuations were compared in both symbiotic and aposymbiotic *E. diaphana*.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

To explore whether biological cycles influence the immune response, the experiments were done at different times

throughout the day and during 2 lunar phases (full moon and new moon) using 6 symbiotic anemones and 6 aposymbiotic anemones. In each lunar phase, mucus was collected every 6 h in 2 cycles per 24 h; during the first cycle, samples were taken at 8:00 p.m., 2:00 a.m., 8:00 a.m., and 2:00 p.m. The next day, measurements of the second cycle were resumed at 2:00 p.m., 8:00 p.m., 2:00 a.m., and 8:00 a.m. Mucus extracted from the 6 symbiotic anemones and 6 aposymbiotic anemones ($n = 48$) was grouped in duplicate per lunar phase and per symbiotic state. In total, 348 anemones were used. The experiment was carried out from September to November 2023.

To determine symbiont density, 6 symbiotic anemones were used per hour of sampling. This experiment was done in a cycle for each lunar phase. In total, 48 anemones were used.

Organisms

The symbiotic anemones were collected from the aquariums of the *Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (Instituto de Ciencias de Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México)*, where they grew under natural conditions. The aposymbiotic anemones came from a laboratory culture of several years. After their collection, the anemones were acclimatized for 14 d to avoid the aquarium effect. Subsequently, anemones were maintained individually in 6-well plates with filtered seawater ($0.22 \mu\text{m}$) under a light/dark regime (full moon = 67.9–985 lux; new moon = 67.4–838 lux) and at natural temperature (full moon = 28.87–29.60 °C; new moon = 28.47–29.48 °C) in a humid windowless laboratory. Anemones were fed once a week with nauplii of *Artemia* spp.

Mucus extraction

Mucus was extracted from anemones exhibiting extended tentacles and column. Before extraction, the water was completely removed from each well with a disinfected transfer pipette, wiping off the remaining water with a sterilized cotton swab. The mucus expelled by the anemone after 2 min was collected with a micropipette and stored in individual microtubes. Finally, 10 mL of filtered seawater was added to each well.

Evaluation of the immune response

To determine the basal immune response in *E. diaphana*, mucus PO activity was measured. We used 96-well plates in 90- μL reactions in triplicate, as described below. Each well contained 30 μL of mucus ($n = 6$ anemones) and 30 μL of pyrogen-free water. Subsequently, the plate was covered with aluminum and incubated for 5 min at 35 °C with shaking (60 rpm). The reaction was started by adding 30 μL of L-Dopa substrate [2.5 mM]; measurements were immediately taken in a plate reader. The absorbance reading was performed at

450 nm every minute for 10 min. The activity of PO is presented as the change in absorbance per microliter of mucus per minute.

Symbiont density

To count symbionts, the anemones were weighed and placed in microtubes with 500 μL of filtered seawater. They were homogenized manually with a plastic homogenizer until no tissue was visible. Symbionts were purified by 3 centrifugation cycles (14,000 rpm) for 1 min. They were resuspended in 500 μL of filtered seawater and fixed by adding lugol (30%). Algae were counted in a hemocytometer and calculated per milliliter. The total cell number count per anemone was normalized to grams of wet weight.

Statistical analysis

Data normality and homoscedasticity were evaluated with the Shapiro–Wilks and Levene tests, respectively. Because the data did not meet the assumptions, nonparametric statistical tests were used. To compare PO activity with the interaction between the moon and symbiotic state, the Kruskal–Wallis test and post hoc Mann–Whitney tests were used. A Pearson correlation was applied between PO activity and symbiont density. Statistical analyses were performed in RStudio v. 4.1.0 (Posit Team 2024).

RESULTS

Immune response

Circadian cycle

The activity of PO in both symbiotic and aposymbiotic anemones showed natural variability throughout the day, with 2 acrophases. The highest peak of activity was at 2:00 p.m., with symbiotic anemones at full moon showing lower PO activity compared to aposymbiotic anemones. A second smaller, but equally represented, peak was detected at 2:00 h (Fig. 1). Despite showing some biological variability, data showed no statistically significant differences ($H [7] = 7.09$, $P = 0.41$) throughout the day.

Lunar cycle

The analysis of PO activity, measured as the interaction between the lunar phase and the symbiotic state, showed statistically significant differences ($H [15] = 17.47$, $P = 0.0005$). According to the post hoc analysis, PO activity in aposymbiotic anemones was found to be significantly higher at full moon than at new moon and higher than in symbiotic anemones for both moons ($P < 0.05$). Furthermore, PO activity in symbiotic anemones at full moon was

significantly higher than that observed in aposymbiotic anemones at new moon ($P = 0.032$) (Fig. 2).

Symbiont density

We found a negative relationship between PO activity and symbiont density in symbiotic anemones ($R^2 = 0.51$, $P = 0.04$) (Fig. 3). Furthermore, symbiont density varied significantly depending on the time of day ($H [3] = 8.55$, $P = 0.035$). According to the post hoc analysis, symbiont density was significantly higher at 14:00 h ($P = 0.006$, Fig. 4a). Taking into account the lunar phase, we found that symbiont density was similar for both the full moon ($H [3] = 4.84$, $P = 0.18$) and the new moon ($H [3] = 4.32$, $P = 0.22$) (Fig. 4b).

DISCUSSION

In this study, PO activity was measured in the mucus of *E. diaphana* under basal conditions. We determined that both symbiotic and aposymbiotic anemones show PO activity throughout the day. Therefore, *E. diaphana* shows constitutive immunity, and the proPO system is part of its basal immunity. The above agrees with what was proposed by Palmer (2018), who suggests that, though immunity is commonly approached as a response activated by damage signals,

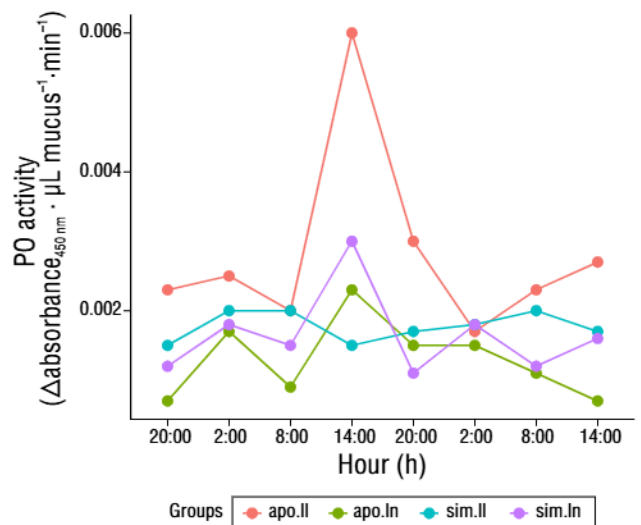


Figure 1. Variation of phenol oxidase (PO) activity during the day in *Exaiptasia diaphana*. The activity of PO was calculated in samples taken every 6 h for 48 h. Each mucus sample corresponds to a group of 6 anemones. The results of one estimation are shown; repetitions had very similar results. Abbreviations: aposymbiotic anemones at full moon (apo.II), aposymbiotic anemones at new moon (apo.II.n), symbiotic anemones at full moon (sim.II), and symbiotic anemones at new moon (sim.II.n).

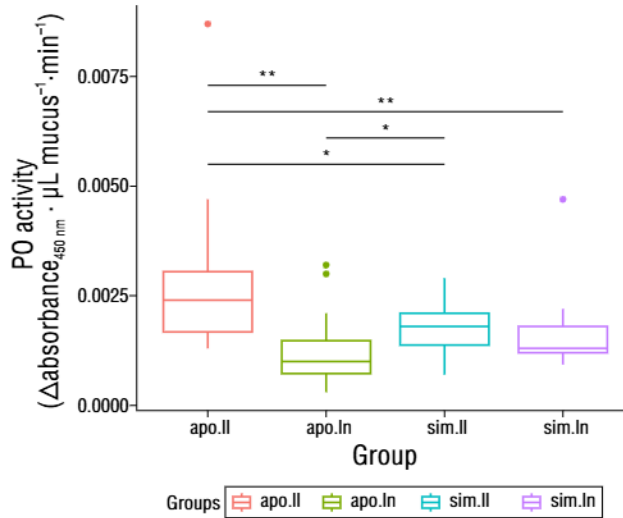


Figure 2. Comparison of phenol oxidase (PO) activity with respect to the symbiotic state and the lunar phase using the Kruskal–Wallis test. Boxplots represent the mean, first and third quartiles, confidence interval (95%), and outlier points (red dot, green dots, and purple dot). Each sample corresponds to the activity values of 6 anemones. The horizontal black lines show the comparisons between the different treatments; statistical significance of comparisons is represented by asterisks (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Abbreviations: aposymbiotic anemones at full moon (apo.II), aposymbiotic anemones at new moon (apo.I), symbiotic anemones at full moon (sim.II), and symbiotic anemones at new moon (sim.I).

the immune system operates and remains active in a constitutive manner, even if it is not being challenged by a threat.

Immunity fluctuation in the circadian cycle

The PO activity in the mucus of *E. diaphana* fluctuated throughout the day, both in symbiotic and aposymbiotic anemones, with the highest PO activity at 2:00 p.m. No previous studies track PO activity throughout the day in cnidarians; our results provide a background for how the circadian cycle of *E. diaphana* affects its basal immunity.

The variability of basal immunity throughout the day could be consistent with what was observed at the transcriptomic level in symbiotic cnidarians. Gong et al. (2023) found that the corals *Acropora pruinosa* and *Pocillopora damicornis* differentially transcribe certain genes at night compared to the morning. At night, transcribed genes are mostly related to the immune system, metabolism, and signal transduction, whereas during the day, transcribed genes relate to transport and catabolism. However, Levy et al. (2011) reported that *Acropora millepora* genes associated with antioxidant activity have expression peaks at night, whereas those associated with metabolism are more expressed during the day. Furthermore, some studies report that crustaceans have a bimodal variation of PO in a diurnal cycle (She et al. 2019), whereas others have

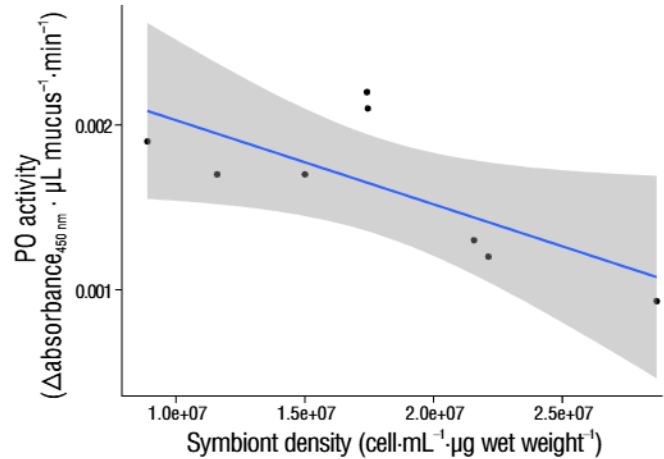


Figure 3. Relationship between phenol oxidase (PO) activity and symbiont density using a Spearman correlation test. The activity of PO decreases as symbiont density increases ($\text{cell} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \mu\text{g wet weight}^{-1}$). The density of symbionts was determined in 48 anemones, grouped into 6 anemones for each sampling. The 95% confidence level is shaded.

reported greater activity during the day (Rund et al. 2016) or even constant PO activity (Pfenning-Butterworth et al. 2022). These studies illustrate the importance of considering the circadian cycle in studies of the immune system because it could help explain some variations.

Immunity fluctuations in response to the lunar cycle

The PO activity in *E. diaphana* mucus was slightly higher with the full moon than with the new moon in anemones of both symbiotic states. In corals, reproduction and growth are synchronized with lunar cycles (Boch et al. 2011). However, despite the extensive information on the influence of the moon on coral reproduction, information on the immune system is scarce and practically non-existent in *E. diaphana*. Given that the values of PO activity in the mucus of *E. diaphana* showed different behavior in the full moon than in the new moon, we can suggest that the basal constitutive immunity in this anemone also obeys the lunar cycles, regardless of its symbiotic state. This finding constitutes a novel contribution of the present study.

Symbiont density

We found a negative relationship between symbionts and the immune response that coincides with studies on the coral *Orbicella faveolata*, which reported a reduction in the expression of genes related to immunity (Fuess et al. 2020). Other studies have positively correlated immune activity with antioxidant activity and melanin synthesis (Changsut et al. 2022). Finally, it has been hypothesized that, in corals, the loss of symbionts after bleaching confers some protection, since a lower incidence of diseases has been observed

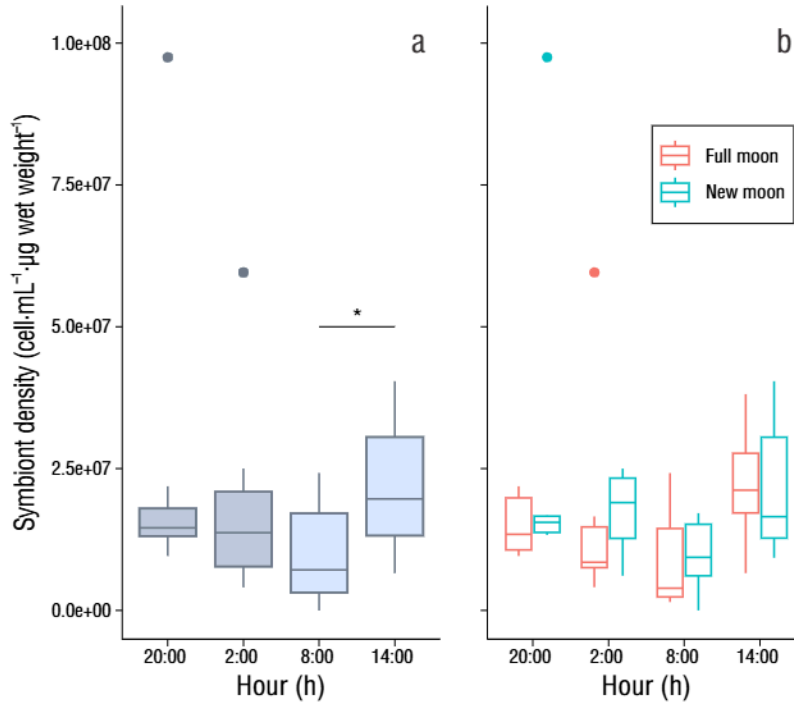


Figure 4. Comparison of symbiont density with respect to time of day and lunar phase using the Kruskal–Wallis test. **(a)** Symbiont density considering only the time of day, without taking into account the lunar phase. **(b)** Symbiont density considering lunar phase and time of day. Boxplots represent the mean, first and third quartiles, confidence interval (95%), and outliers. The asterisk (*) shows significant differences ($P = 0.035$) in the density of symbionts at 14:00 h compared to the other samples.

(Merselis et al. 2018). It is possible that symbiosis in cnidarians depends on reduced immune activity that facilitates this relationship.

CONCLUSIONS

The study of constitutive immunity and its relationship with biological cycles in *E. diaphana* is a scarcely explored field. The present study expands the understanding of PO activity as an immune response under basal conditions in aposymbiotic and symbiotic anemones, which showed basal constitutive immunity under laboratory conditions. The response varied according to biological rhythms, showing greater activity during the day and low activity at night. Furthermore, we observed that lunar cycles influenced PO activity, which was greater in the full moon phase. We also found that symbiotic status had an effect on the immune response, probably because symbiont density was negatively correlated with PO activity, with higher symbiont density observed at 14:00 h. These results not only provide evidence for constitutive immunity, but also illustrate the complexity of holobiont relationships. Future studies focusing on the relationship between immunity and biological cycles are important to achieve a more adequate interpretation of biological responses to stressors.

English translation by Claudia Michel-Villalobos.

DECLARATIONS

Supplementary material

This work does not include supplementary material.

Acknowledgments

We thank Dr. Cristina Pascual Jiménez for her ideas to structure the experimental design and the PO database and Dr. Ernesto Maldonado for donating the aposymbiotic anemones and nauplii of *Artemia* spp.

Funding

This study was funded by the UNAM-PAPIIT Program through the project “*Immunidad innata en Cnidarios: el sistema proPO en el organismo modelo Exaiptasia diaphana*” (IN201323). JRO received a doctoral scholarship from Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CVU 747651).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contributions

Conceptualization: MARJ, JRO, and PT; Data curation: MARJ; Formal analysis: MARJ; Funding acquisition: PT; Research: MARJ and JRO; Methodology: JRO and MARJ; Experimental development: MARJ; Resources: PT; Supervision: JRO and PT; Visualization: MARJ; Writing—original draft: JRO and MARJ; Writing—review and editing: MARJ, JRO, and PT.

Data availability

The raw data can be accessed at the following link: https://www.researchgate.net/publication/385169280_Raw_data_Rodriguez-Jimenez_et_al_2024.

Use of AI tools

The authors did not employ any AI tools in this work.

REFERENCES

- Aguillon R, Rinsky M, Simon-Blecher N, Doniger T, Appelbaum L, Levy O. 2024. CLOCK evolved in cnidaria to synchronize internal rhythms with diel environmental cues. *Elife*. 12:RP89499. <https://doi.org/10.7554/eLife.89499.4>
- Bednářová A, Kodrlik D, Krishnan N. 2013. Nature's timepiece—Molecular coordination of metabolism and its impact on aging. *Int J Mol Sci*. 14(2):3026-3049. <https://doi.org/10.3390/ijms14023026>
- Boch CA, Ananthasubramanian B, Sweaney AM, Doyle FJ, Morse DE. 2011. Effects of light dynamics on coral spawning synchrony. *Biol Bull*. 220(3):161-173. <https://doi.org/10.1086/BBLv220n3p161>
- Cardinali P. 2005. *Ritmos biológicos*. 3th ed. Spain: McGraw-Hill Interamericana. 1178 p.
- Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol*. 29(6):263-271. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>
- Cerenius L, Söderhäll K. 2021. Immune properties of invertebrate phenoloxidases. *Dev Comp Immunol*. 122:104098. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104098>
- Changsut I, Womack HR, Shickle A, Sharp KH, Fuess LE. 2022. Variation in symbiont density is linked to changes in constitutive immunity in the facultatively symbiotic coral, *Astrangia poculata*. *Biol Lett*. 18:20220273. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0273>
- Dungan AM, Hartman LM, Tortorelli G, Belderok R, Lamb AM, Pisan L, McFadden GI, Blackall LL, van Oppen MJ. 2020. *Exaiptasia diaphana* from the great barrier reef: a valuable resource for coral symbiosis research. *Symbiosis*. 80:195-206. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00665-0>
- Fagiani F, Marino DD, Romagnoli A, Travelli C, Voltan D, Mannelli LDC, Racchi M, Govoni S, Lanni C. 2022. Molecular regulations of circadian rhythm and implication for physiology and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 7:41. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00899-y>
- Fuess LE, Palacio-Castro AM, Butler CC, Baker AC, Mydlarz LD. 2020. Increased algal symbiont density reduces host immunity in a threatened Caribbean coral species, *Orbicella faveolata*. *Front Ecol Evol*. 8:572942. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.572942>
- Gong S, Li G, Liang J, Xu L, Tan L, Jin X, Xia X, Yu K. 2023. Day-night cycle as a key environmental factor affecting coral-Symbiodiniaceae symbiosis. *Ecol Indic*. 146:109890. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.109890>
- Harrison PL, Babcock RC, Bull GD, Oliver JK, Wallace CC, Willis BL. 1984. Mass spawning in tropical reef corals. *Science*. 223(4641):1186-1189. <https://doi.org/10.1126/science.223.4641.1186>
- Lehnert EM, Burriesci MS, Pringle JR. 2012. Developing the anemone *Aiptasia* as a tractable model for cnidarian-dinoflagellate symbiosis: the transcriptome of aposymbiotic *A. pallida*. *BMC Genomics*. 13:271. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-271>
- Levy O, Kaniewska P, Alon S, Eisenberg E, Karako-Lampeert S, Bay LK, Reef R, Rodriguez-Lanetty M, Miller DJ, Hoegh-Guldberg O. 2011. Complex diel cycles of gene expression in coral-algal symbiosis. *Science*. 331(6014):175. <https://doi.org/10.1126/science.1196419>
- Lewis JB, Price WS. 1975. Feeding mechanisms and feeding strategies of Atlantic reef corals. *J Zool*. 176(4):527-544. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1975.tb03219.x>
- Lin CH, Nozawa Y. 2023. The influence of seawater temperature on the timing of coral spawning. *Coral Reefs*. 42(2):417-26. <https://doi.org/10.1007/s00338-023-02349-9>
- Liu H, Wu C, Matsuda Y, Kawabata SI, Lee BL, Söderhäll K, Söderhäll I. 2011. Peptidoglycan activation of the proPO-system without a peptidoglycan receptor protein (PGRP)? *Dev Comp Immunol*. 35(1):51-61. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.08.005>
- Mansfield KM, Gilmore TD. 2019. Innate immunity and cnidarian-Symbiodiniaceae mutualism. *Dev Comp Immunol*. 90:199-209. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.09.020>
- Matthews JL, Crowder CM, Oakley CA, Lutz A, Roessner U, Meyer E, Grossman AR, Weis VM, Davy SK. 2017. Optimal nutrient exchange and immune responses operate in partner specificity in the cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *PNAS*. 114(50):13194-13199. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710733114>
- Merselis DG, Lirman D, Rodriguez-Lanetty M. 2018. Symbiotic immuno-suppression: is disease susceptibility the price of bleaching resistance? *PeerJ*. 6:e4494. <https://doi.org/10.7717/peerj.4494>
- Mydlarz LD, Couch CS, Weil E, Smith G, Harvell CD. 2009. Immune defenses of healthy, bleached and diseased *Montastrea faveolata* during a natural bleaching event. *Dis Aquat Organ*. 87(1-2):76-78. <https://doi.org/10.3354/dao02088>
- Palmer CV. 2018. Immunity and the coral crisis. *Commun Biol*. 1:91. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0097-4>
- Palmer CV, Bythell JC, Willis BL. 2010. Levels of immunity parameters underpin bleaching and disease susceptibility of reef corals. *FASEB Journal*. 24(6):1935-1946. <https://doi.org/10.1096/fj.09-152447>
- Pfenning-Butterworth AC, Nguyen DT, Hite JL, Cressler CE. 2022. Circadian rhythms mediate infection risk in *Daphnia dentifera*. *Ecol Evol*. 12(9):e9264. <https://doi.org/10.1002/ece3.9264>
- Posit Team. 2024. RStudio: Integrated Development Environment for R. v. 4.1.0. Boston (USA): Posit PBC. <https://posit.co>
- Rädecker N, Raina J-B, Pernice M, Perna G, Guagliardo P, Kilburn MR, Aranda M, Woolstra CR. 2018. Using *Aiptasia* as a model

- to study metabolic interactions in cnidarian-*Symbiodinium* symbioses. *Front Physiol.* 9:214.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00214>
- Raible F, Takekata H, Tessmar-Raible K. 2017. An overview of monthly rhythms and clocks. *Front Neurol.* 8:189.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00189>
- Rivera-Ortega J, PE Thome. 2018. Contrasting antibacterial capabilities of the surface mucus layer from three symbiotic cnidarians. *Front Mar Sci.* 5:392.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00392>
- Roenneberg T, Merrow M. 2005. Circadian clocks – the fall and rise of physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:965-971.
<https://doi.org/10.1038/nrm1766>
- Rund SS, Yoo B, Alam C, Green T, Stephens MT, Zeng E, George GF, Sheppard AD, Duffield GE, Milenkovic T, Pfrender ME. 2016. Genome-wide profiling of 24 hr diel rhythmicity in the water flea, *Daphnia pulex*: network analysis reveals rhythmic gene expression and enhances functional gene annotation. *BMC Genomics.* 17(1):1-20.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2998-2>
- Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette SP. 2013. Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 13:190-198.
<https://doi.org/10.1038/nri3386>
- Sebens KP, DeRiemer K. 1977. Diel cycles of expansion and contraction in coral reef anthozoans. *Mar Biol.* 43:247-256.
<https://doi.org/10.1007/BF00402317>
- She Q, Han Z, Liang S, Xu W, Li X, Zhao Y, Wei H, Dong J, Li Y. 2019. Impacts of circadian rhythm and melatonin on the specific activities of immune and antioxidant enzymes of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Fish Shellfish Immunol.* 89:345-53.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.011>
- Sorek M, Diaz-Almeyda EM, Medina M, Levy O. 2014. Circadian clocks in symbiotic corals: the duet between *Symbiodinium* algae and their coral host. *Mar Genomics.* 14:47-57.
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2014.01.003>
- Weis VM, Davy SK, Hoegh-Guldberg O, Rodriguez-Lanetty M, Pringle JR. 2008. Cell biology in model systems as the key to understanding corals. *Trends Ecol Evol.* 23(7):369-376.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.03.004>
- Westwood ML, O'Donnell AJ, de Bekker C, Lively CM, Zuk M, Reece SE. 2019. The evolutionary ecology of circadian rhythms in infection. *Nat Ecol Evol.* 3:552-560.
<https://doi.org/10.1038/s41559-019-0831-4>
- Winter A, Sammarco PW. 2010. Lunar banding in the scleractinian coral *Montastraea faveolata*: fine-scale structure and influence of temperature. *J Geophys Res.* 115(G4):G04007.
<https://doi.org/10.1029/2009JG001264>
- Zhao P, Li J, Wang Y, Jiang H. 2007. Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated *in vitro* by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Bioch Mol Biol.* 37(9):952-959.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.05.001>
- Zhao S, Wang X, Cai S, Zhang S, Luo H, Wu C, Zhang R, Zhang J. 2018. A novel peptidoglycan recognition protein involved in the prophenoloxidase activation system and antimicrobial peptide production in *Antheraea pernyi*. *Dev Comp Immunol.* 86:78-85.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.04.009>

This article pertains to a special issue of *Ciencias Marinas* comprising select papers from the 2024 "XII Congreso Mexicano de Arrecifes Coralinos and III Congreso Panamericano de Arrecifes Coralinos" held in Ensenada, Baja California, Mexico.