

## Fluctuaciones en la respuesta inmune (actividad de fenoloxidasa) relacionadas con los ciclos circadianos y lunares en la anémona simbiótica *Exaiptasia diaphana* (Actinaria: Aiptasiidae)

Miel A Rodríguez-Jiménez<sup>1</sup>, Jacqueline Rivera-Ortega<sup>1,2</sup>, Patricia E Thomé<sup>1\*</sup>

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historial del artículo:

Recibido 17 de junio de 2024

Aceptado 5 de noviembre de 2024

Publicado 6 de diciembre de 2024

#### READ IN ENGLISH:

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

#### AUTOR DE CORRESPONDENCIA

\* E-mail: [thome@cmar.unam.mx](mailto:thome@cmar.unam.mx)

<sup>1</sup> 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, México.

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Coyoacán, Ciudad de México, México.

**RESUMEN.** La capacidad inmune de los cnidarios les permite mantener la integridad de sus tejidos y prevenir infecciones ante amenazas de daño. Los cnidarios cuentan con un sistema inmune innato que incluye la melanina y enzimas, como la fenoloxidasa, que se activa en presencia de patógenos, generando compuestos reactivos y tóxicos para su eliminación. La anémona *Exaiptasia diaphana* es un organismo modelo en estudios sobre simbiosis, nutrición e inmunidad, ya que mantiene una simbiosis facultativa con las microalgas de la familia Symbiodiniaceae, como los corales; *E. diaphana* también puede existir en un estado aposimbiótico. Por tanto, *E. diaphana* es un modelo adecuado para estudiar el sistema inmune de los cnidarios. Para conocer la actividad inmune básica de esta anémona, nos preguntamos si existe variabilidad en la actividad de la enzima fenoloxidasa a lo largo del día, considerando 2 fases lunares (luna llena y luna nueva). Se tomaron muestras de mucus de 6 anémonas simbióticas y 6 aposimbióticas, previamente aclimatadas y mantenidas en cajas de 6 pozos con agua de mar filtrada bajo condiciones de luz natural. La actividad de fenoloxidasa se estimó cada 6 h durante 48 h, con 2 repeticiones por fase lunar. La actividad de fenoloxidasa presentó mayor actividad a las 14:00 h, mientras que la actividad nocturna fue baja. La actividad de la enzima se incrementó bajo luna llena en las anémonas aposimbióticas ( $H = 17.47$ ,  $P = 0.0005$ ). Además, encontramos una relación negativa entre la densidad de simbioses y la actividad de fenoloxidasa ( $R^2 = 0.50$ ,  $P = 0.04$ ). Estos resultados nos permiten sugerir que *E. diaphana* puede mantener una inmunidad constitutiva y constante en condiciones de laboratorio, la cual responde a ciclos biológicos, como los ciclos circadianos y lunares.

**Palabras clave:** inmunidad constitutiva, mucus, fases lunares, simbiosis, ciclo circadiano, anémona simbiótica, fenoloxidasa, cnidario.

## INTRODUCCIÓN

*Exaiptasia diaphana* es una anémona simbiótica y un organismo modelo para estudiar diversos procesos en cnidarios como la simbiosis, la nutrición y los mecanismos inmunológicos (Lehnert et al. 2012, Matthews et al. 2017, Rådecker et al. 2018, Mansfield y Gilmore 2019, Dungan et al. 2020). Esta anémona mantiene una simbiosis facultativa con microalgas de la familia Symbiodiniaceae (Weis et al. 2008). Si bien los cnidarios tienen un comportamiento nocturno (Lewis y Price 1975, Sebens y De Riemer 1977), al establecer simbiosis con microalgas representan un reto para el estudio de los parámetros basales, ya que ambos se rigen por ritmos biológicos

distintos (Sorek et al. 2014). Los ritmos biológicos permiten a los organismos responder con anticipación y adaptarse a los cambios ambientales naturales (Roenneberg y Merrow 2005, Bednářová et al. 2013). Los cnidarios simbióticos presentan hábitos de alimentación heterótrofa por la noche (Lewis y Price 1975); en el día, utilizan la energía provista por sus algas endosimbiontes, lo que complica el estudio de su comportamiento rítmico. Además, se ha demostrado un comportamiento diferencial en el día y la noche; por ejemplo, anémonas no simbióticas pierden su ritmo circadiano cuando son mantenidas bajo luz u oscuridad constante (Aguillon et al. 2024). En organismos simbióticos, los tentáculos de las anémonas y los corales que les sirven para alimentarse se expanden por

Acceso abierto

En línea ISSN: 2395-9053

Verificado con Similarity Check impulsado por iThenticate

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



Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), que permite compartir y adaptar el trabajo, siempre y cuando se dé el crédito apropiado a los autores originales y la fuente, proporcione un enlace a la licencia Creative Commons e indique si se realizaron cambios. Las figuras, tablas y otros elementos del artículo están incluidos en la licencia CC BY 4.0 del artículo, a menos que se indique lo contrario. Debe solicitar permiso al titular de los derechos de autor para utilizar material no cubierto por esta licencia. El título de la revista está protegido por derechos de autor propiedad de la Universidad Autónoma de Baja California, y el título y el logotipo de la revista no están sujetos a esta licencia.

la noche, mientras que durante el día se expanden aquellos con una mayor densidad de simbioses (Sebens y De Riener 1977).

Los ciclos lunares son importantes para la reproducción de los animales marinos (Raible et al. 2017). En los corales, los ciclos lunares regulan el desove (Harrison et al. 1984), aunque este proceso puede verse modificado por factores como la temperatura (Lin y Nozawa 2023). Además, presentan correlación con la deposición de estructuras calcáreas denominadas disepimentos y con el crecimiento del esqueleto calcáreo de las colonias coralinas (Winter y Sammarco 2010).

Los ritmos biológicos son pieza clave para controlar la fisiología y, por tanto, el sistema 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 cambios en la expresión de moléculas inmunitarias (Revisado en Scheiermann et al. 2013). Además, cuando los organismos enfrentan un desafío inmunológico responden mejor en su fase activa (Revisado en 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.

Como en otros invertebrados, los cnidarios poseen un sistema inmune innato cuya función es mantener la salud del animal (Palmer 2018). Una vía inmunológica comúnmente utilizada por invertebrados es el sistema proFO, o la vía de la fenoloxidasasa (FO) (Cerenius et al. 2008). El sistema proFO es activado por las proteínas capaces de unirse a peptidoglicanos y lipopolisacáridos en varios invertebrados, como los insectos (Zhao et al. 2018), crustáceos (Liu et al. 2011) y cnidarios (Lehnert et al. 2012). Una vez activado, genera radicales libres citotóxicos, agentes aglutinantes y opsonina, que protegen al animal sin sintetizar melanina (Zhao et al. 2007, Cerenius y Söderhäll 2021). La síntesis de melanina como producto final, conocida como melanización, encapsula a microorganismos potencialmente dañinos (Zhao et al. 2007, Cerenius et al. 2008). Por ejemplo, Palmer et al. (2010) mostraron que después de un daño, los depósitos de melanina aparecen en algunos corales casi de forma instantánea.

En algunos cnidarios se ha estudiado la FO como respuesta a diversas enfermedades y al blanqueamiento (Mydlarz et al. 2009, Palmer et al. 2010, Rivera-Ortega y Thomé 2018); sin embargo, el estudio de la respuesta inmune basal y su relación con los ritmos biológicos no ha sido considerada. Estudiar la respuesta inmune en condiciones basales es importante ya que los procesos biológicos en cualquier organismo vivo alternan entre periodos de alta, escasa o nula actividad (Cardinali 2005). Por ello, nuestro objetivo fue caracterizar la fluctuación de FO en individuos de *E. diaphana* sanas, tanto simbióticas como aposimbióticas, a lo largo del día y durante las fases de luna llena y luna nueva. Además, para conocer si los simbioses tienen un efecto en la respuesta inmune, se compararon las fluctuaciones de FO tanto en *E. diaphana* simbióticas como aposimbióticas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

A fin de explorar si los ciclos biológicos influyen en la respuesta inmune, los experimentos se realizaron en diferentes horas a lo largo del día y durante 2 fases lunares (luna llena y luna nueva) utilizando 6 anémonas simbióticas y 6 anémonas aposimbióticas. En cada fase lunar se colectó mucus cada 6 h en 2 ciclos por 24 h; durante el primer ciclo, las muestras se tomaron a las 20:00 h, 2:00 h, 8:00 h y 14:00 h. Al día siguiente, se reanudaron las mediciones del segundo ciclo a las 14:00 h, 20:00 h, 2:00 h y 8:00 h. Se agrupó el mucus extraído de las 6 anémonas simbióticas y 6 anémonas aposimbióticas ( $n = 48$ ) por duplicado de fase lunar y por estado simbiótico. En total se emplearon 348 anémonas. El experimento fue realizado de septiembre a noviembre de 2023.

Para conocer la densidad de los simbioses se utilizaron 6 anémonas simbióticas por hora de muestreo. Este experimento se realizó en un ciclo en cada fase lunar. En total se emplearon 48 anémonas.

### Organismos

Las anémonas simbióticas se colectaron de los acuarios de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (Instituto de Ciencias de Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México), donde crecieron en condiciones naturales. Las anémonas aposimbióticas provinieron de un cultivo en el laboratorio de varios años. Después de la colecta, las anémonas fueron aclimatadas durante 14 d para evitar el efecto acuario. Posteriormente, las anémonas se mantuvieron individualmente en cajas de 6 pozos con agua de mar filtrada ( $0.22 \mu\text{m}$ ) bajo un régimen de luz/oscuridad (luna llena = 67.9-985 luxes; luna nueva = 67.4-838 luxes) y temperatura natural (luna llena = 28.87-29.60 °C; luna nueva = 28.47-29.48 °C) en un laboratorio húmedo sin ventanas. Las anémonas se alimentaron una vez por semana con nauplios de *Artemia* spp.

### Extracción de mucus

La extracción de mucus se realizó en anémonas con los tentáculos extendidos y la columna extendida. Previo a la extracción se retiró por completo el agua de cada pozo con una pipeta de transferencia desinfectada, limpiando el agua restante con un cotonete esterilizado. Con una micropipeta se colectó el mucus expulsado por la anémona en 2 min y se almacenó en microtubos individuales. Finalmente, se agregó a cada pozo 10 mL de agua de mar filtrada.

### Evaluación de la respuesta inmune

Para determinar la respuesta inmune basal de *E. diaphana* se midió la actividad de FO del mucus. Se

utilizaron cajas de 96 pozos en reacciones de 90  $\mu\text{L}$  por triplicado, como se describe a continuación. En cada pozo se colocaron 30  $\mu\text{L}$  de mucus ( $n = 6$  anémonas) y 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de pirógenos. Posteriormente, la caja se cubrió con aluminio y se incubó durante 5 min a 35  $^{\circ}\text{C}$ , con agitación (60 rpm). La reacción se inició añadiendo 30  $\mu\text{L}$  del sustrato L-Dopa [2.5 mM] e inmediatamente se tomaron mediciones en un lector de placas. La lectura de absorbancia se realizó a 450 nm cada minuto durante 10 min. La actividad de FO se presenta como el cambio en la absorbancia por microlitro de mucus por minuto.

### Densidad de simbioses

Para el conteo de los simbioses, las anémonas se pesaron y colocaron en microtubos con 500  $\mu\text{L}$  de agua de mar filtrada. Se homogeneizaron manualmente con un homogeneizador de plástico hasta no percibir tejido. Los simbioses se purificaron mediante 3 ciclos de centrifugación (14,000 rpm) por 1 min. Se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de agua de mar filtrada y se fijaron agregando lugol (30%). Las algas se contaron en un hemocitómetro y se calcularon por mililitro. El recuento total del número de células por anémona se normalizó a gramos de peso húmedo.

### Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad y homocedasticidad de los datos con las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Debido a que los datos no cumplieron con los supuestos, se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas. Para comparar la actividad de FO con la interacción entre la luna y el estado simbiótico, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y pruebas *post hoc* de Mann-Whitney. Se aplicó una correlación de Pearson entre la actividad de FO y la densidad de simbioses. Los análisis estadísticos se realizaron en RStudio v. 4.1.0 (Posit Team 2024).

## RESULTADOS

### Respuesta inmune

#### Ciclo circadiano

La actividad de FO tanto en las anémonas simbióticas como aposimbióticas mostró una variabilidad natural a lo largo del día, presentando 2 acrofases. El mayor pico de actividad fue a las 14:00 h, en el que las anémonas simbióticas en luna llena mostraron una menor actividad de FO en comparación con las aposimbióticas. Un segundo pico menor, pero igualmente representado, se detectó a las 2:00 h (Fig. 1). A pesar de mostrar cierta variabilidad biológica, los datos a lo largo del día no mostraron diferencias estadísticas significativas ( $H [7] = 7.09, P = 0.41$ ).

#### Ciclo lunar

El análisis de la actividad de FO, medida como la interacción entre la fase lunar y el estado simbiótico, mostró

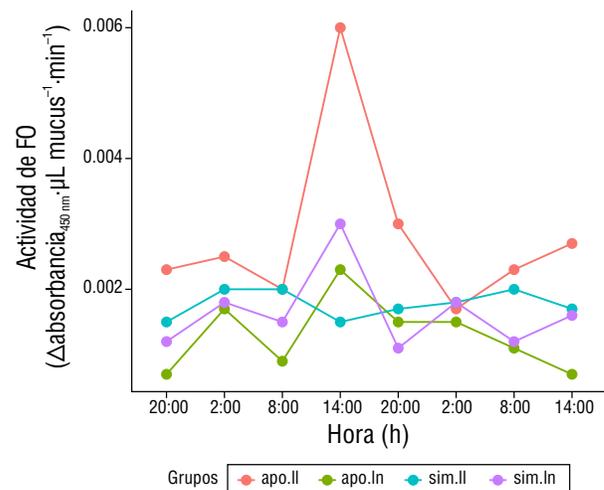
diferencias estadísticamente significativas ( $H [15] = 17.47, P = 0.0005$ ). De acuerdo con el análisis *post hoc*, se encontró que la actividad de FO en las anémonas aposimbióticas fue significativamente mayor en luna llena que en luna nueva y mayor que en las anémonas simbióticas en ambas lunas ( $P < 0.05$ ). Además, la actividad de FO en las anémonas simbióticas en luna llena fue significativamente mayor que en las anémonas aposimbióticas en luna nueva ( $P = 0.032$ ) (Fig. 2).

### Densidad de simbioses

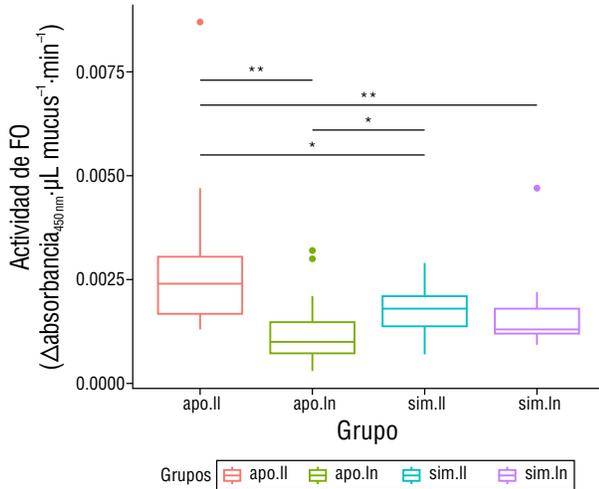
Encontramos una relación negativa entre la actividad de FO y la densidad de simbioses en las anémonas simbióticas ( $R^2 = 0.51, P = 0.04$ ) (Fig. 3). Además, la densidad de simbioses varió significativamente dependiendo de la hora del día ( $H [3] = 8.55, P = 0.035$ ). De acuerdo con el análisis *post hoc*, la densidad de simbioses fue significativamente mayor a las 14:00 h ( $P = 0.006$ , Fig. 4a). Tomando en cuenta la fase lunar, se encontró que la densidad de simbioses fue similar tanto en luna llena ( $H [3] = 4.84, P = 0.18$ ) como en luna nueva ( $H [3] = 4.32, P = 0.22$ ) (Fig. 4b).

## DISCUSIÓN

En este estudio se midió la actividad de FO en el mucus de *E. diaphana* en condiciones basales. Determinamos que la actividad de FO estuvo presente a lo largo del día, tanto



**Figura 1.** Variación de la actividad de fenoloxidasa (FO) durante el día en *Exaiptasia diaphana*. La actividad de FO se calculó en muestras tomadas cada 6 h por 48 h. Cada muestra de mucus corresponde a un grupo de 6 anémonas. Se presentan los resultados de una estimación; la repetición tuvo resultados muy similares. Abreviaciones: anémonas aposimbióticas en luna llena (apo.ll), anémonas aposimbióticas en luna nueva (apo.ln), anémonas simbióticas en luna llena (sim.ll) y anémonas simbióticas en luna nueva (sim.ln).



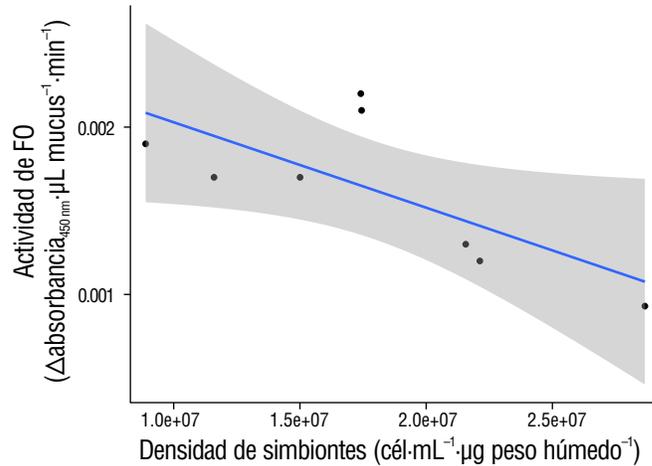
**Figura 2.** Comparación de la actividad de fenoloxidasa (FO) respecto al estado simbiótico y a la fase lunar mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Los gráficos de caja representan la media, el primer y tercer cuartil, el intervalo de confianza (95%) y los puntos atípicos (punto rojo, puntos verdes y punto morado). Cada muestra corresponde a los valores de actividad de 6 anémonas. Las líneas negras horizontales muestran las comparaciones entre los diferentes tratamientos; la significancia estadística de las comparaciones se representa mediante asteriscos (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ). Abreviaciones: anémonas aposimbióticas en luna llena (apo.II), anémonas aposimbióticas en luna nueva (apo.I), anémonas simbióticas en luna llena (sim.II) y anémonas simbióticas en luna nueva (sim.I).

en anémonas simbióticas como aposimbióticas. Por lo tanto, *E. diaphana* presenta una inmunidad constitutiva, y el sistema proFO es parte de su inmunidad basal. Lo anterior concuerda con lo propuesto por Palmer (2018), quien sugiere que, a pesar de que la inmunidad es comúnmente abordada como una respuesta que se activa ante señales de daño, el sistema inmune opera y se mantiene activo de manera constitutiva, incluso si no está siendo desafiado por una amenaza.

### Fluctuación de la inmunidad en el ciclo circadiano

La actividad de FO en el mucus de *E. diaphana* presentó fluctuaciones a lo largo del día, tanto en las anémonas simbióticas como en las aposimbióticas, observándose la mayor actividad de FO a las 14:00 h. Aunque no hay estudios previos que realicen un seguimiento de la actividad de FO a lo largo del día en cnidarios, nuestros resultados sientan un antecedente sobre cómo el ciclo circadiano de *E. diaphana* tiene un efecto en su inmunidad basal.

La variabilidad de la inmunidad basal a lo largo del día podría ser congruente con lo observado a nivel transcriptómico en cnidarios simbióticos. Gong et al. (2023) encontraron que los corales *Acropora pruinosa* y *Pocillopora damicornis* transcriben de manera diferencial ciertos genes en la noche en

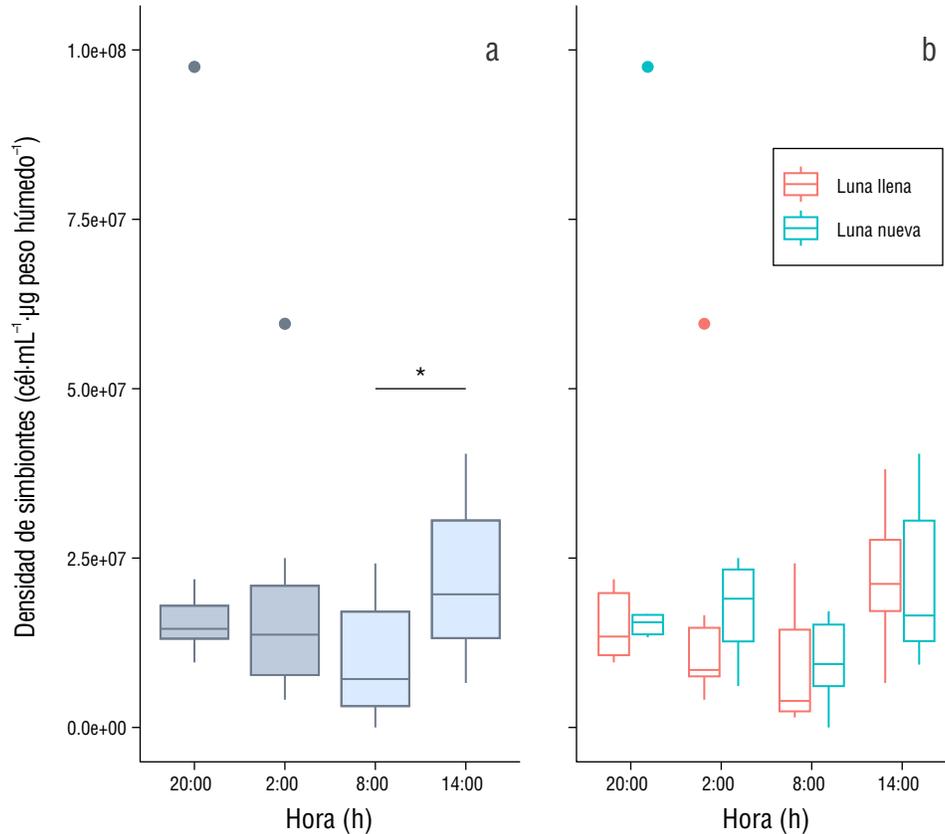


**Figura 3.** Relación entre la actividad de fenoloxidasa (FO) y la densidad de simbioses mediante una prueba de correlación de Spearman. La actividad de FO disminuye conforme aumenta la densidad de simbioses ( $\text{cél} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \mu\text{g peso húmedo}^{-1}$ ). La densidad de simbioses fue determinada en 48 anémonas, agrupadas en 6 anémonas por cada muestreo. El 95% de confianza se muestra sombreado.

comparación con la mañana. Por la noche, los genes transcritos están mayormente relacionados con el sistema inmune, el metabolismo y la transducción de señales, mientras que en el día, los genes transcritos se relacionan con el transporte y catabolismo. Sin embargo, Levy et al. (2011) reportaron que los genes de *Acropora millepora* asociados a la actividad antioxidante tienen picos de expresión por la noche, mientras que aquellos asociados al metabolismo se expresan más en el día. Más aún, en algunos crustáceos se ha encontrado una variación bimodal de FO en un ciclo diurno (She et al. 2019), mientras otros autores han reportado mayor actividad durante el día (Rund et al. 2016) o incluso una actividad constante de FO (Pfenning-Butterworth et al. 2022). Estos trabajos ilustran la importancia de considerar el ciclo circadiano en estudios del sistema inmune, ya que este podría ayudar a explicar algunas variaciones.

### Fluctuación de la inmunidad en respuesta al ciclo lunar

La actividad de FO en el mucus de *E. diaphana* fue ligeramente mayor en luna llena que en luna nueva en anémonas de ambos estados simbióticos. En corales, la reproducción y el crecimiento están sincronizados con los ciclos lunares (Boch et al. 2011). Sin embargo, a pesar de la amplia información sobre la influencia de la luna en la reproducción de corales, la información sobre el sistema inmune es escasa y prácticamente nula en *E. diaphana*. Dado que los valores de la actividad de FO en el mucus de *E. diaphana* mostraron un comportamiento diferente en luna llena que en luna nueva, es posible sugerir que la inmunidad constitutiva basal en esta anémona, también obedece a los ciclos lunares, sin importar su estado simbiótico. Este hallazgo constituye una aportación novedosa de esta investigación.



**Figura 4.** Comparación de la densidad de simbioses respecto a la hora del día y la fase lunar mediante la prueba de Kruskal-Wallis. **(a)** Densidad de simbioses considerando solamente la hora del día, sin tomar en cuenta la fase lunar. **(b)** Densidad de simbioses considerando fase lunar y hora del día. Los gráficos de caja representan la media, el primer y tercer cuartil, el intervalo de confianza (95%) y los puntos atípicos. El asterisco (\*) muestra diferencias significativas ( $P = 0.035$ ) en la densidad de simbioses a las 14:00 h respecto a las demás muestras.

### Densidad de simbioses

La relación negativa entre los simbioses y la respuesta inmune que encontramos coincide con lo observado en el coral *Orbicella faveolata*, en el cual se ha reportado una reducción en la expresión de genes relacionados con la inmunidad (Fuess et al. 2020). Otros estudios han correlacionado la actividad inmune con la actividad antioxidante y la síntesis de melanina de forma positiva (Changsut et al. 2022). Por último, se ha hipotetizado que la pérdida de simbioses después de un blanqueamiento en corales les confiere cierta protección, ya que se ha observado una menor incidencia de enfermedades (Merselis et al. 2018). Es probable que la simbiosis en cnidarios dependa de una actividad inmune reducida que facilite esta relación.

### CONCLUSIONES

El estudio de la inmunidad constitutiva y su relación con los ciclos biológicos en *E. diaphana* es un campo apenas explorado. Este estudio amplía el entendimiento de la actividad de FO como respuesta inmune en condiciones basales en anémonas aposimbióticas y simbióticas, las cuales mostraron

inmunidad constitutiva basal en condiciones de laboratorio. La respuesta varió conforme a los ritmos biológicos, mostrando mayor actividad durante el día y baja actividad durante la noche. Además, observamos una influencia de los ciclos lunares en la actividad de FO, siendo mayor en la fase de luna llena. También encontramos que el estado simbiótico tuvo un efecto en la respuesta inmune, probablemente debido a que la densidad de simbioses estuvo correlacionada negativamente con la actividad de FO, observándose una mayor densidad de simbioses a las 14:00 h. Estos resultados no solo brindan evidencia de una inmunidad constitutiva, sino que ilustran la complejidad de las relaciones del holobionte. Los estudios futuros enfocados en la relación entre la inmunidad y los ciclos biológicos son importantes para lograr una interpretación más adecuada de las respuestas biológicas ante factores estresantes.

### DECLARACIONES FINALES

#### Material suplementario

Este trabajo no incluye material suplementario.

### Agradecimientos

Agradecemos el apoyo a la Dra. Cristina Pascual Jiménez por sus ideas para estructurar el diseño experimental y la base de datos de FO, así como al Dr. Ernesto Maldonado por la donación de las anémonas aposimbióticas y los nauplios de *Artemia* spp.

### Fondos

Este estudio fue financiado por el Programa UNAM-PAPIIT a través del proyecto “Inmunidad innata en Cnidarios: el sistema proPO en el organismo modelo *Exaiptasia diaphana*” (IN201323). JRO recibió una beca de doctorado del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CVU 747651).

### Conflicto de interés

Las autoras declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Contribuciones de autor

Conceptualización: MARJ, JRO y PT; Curación de datos: MARJ; Análisis formal: MARJ; Adquisición de financiamiento: PT; Investigación: MARJ y JRO; Metodología: JRO y MARJ; Desarrollo experimental: MARJ; Recursos: PT; Supervisión: JRO y PT; Visualización: MARJ; Redacción—borrador original: JRO y MARJ; Redacción—revisión y edición: MARJ, JRO y PT.

### Disponibilidad de datos

Los datos crudos pueden accederse en la siguiente liga: [https://www.researchgate.net/publication/385169280\\_Raw\\_data\\_Rodriguez-Jimenez\\_et\\_al\\_2024](https://www.researchgate.net/publication/385169280_Raw_data_Rodriguez-Jimenez_et_al_2024).

### Uso de herramientas de IA

Los autores no utilizaron ninguna herramienta de inteligencia artificial para este trabajo.

### REFERENCIAS

- 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, Ananthasubramaniam B, Sweeney 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, Voolstra 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, Mellow 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, Díaz-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>

Este artículo forma parte de un número especial de *Ciencias Marinas* que comprende artículos seleccionados del "XII Congreso Mexicano de Arrecifes Coralinos y III Congreso Panamericano de Arrecifes Coralinos" de 2024 celebrado en Ensenada, Baja California, México.