



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

“Efecto de la contaminación lumínica sobre la longitud corporal y la expresión de tres genes componentes del reloj circadiano de la anémona de mar

*Exaiptasia pallida*”

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

PRESENTA:

**GABRIELA LÓPEZ CARRASCO**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA**  
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, ICMYL

**COMITÉ TUTOR:**  
**DR. GUILLERMO HORTA PUGA**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**DRA. JUDITH SANCHEZ RODRÍGUEZ**  
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, ICMYL

**DR. FELIPE AMEZCUA MARTÍNEZ**  
UNIDAD ACADÉMICA DE MAZATLÁN, ICMYL

**DRA. PATRICIA THOMÉ ORTÍZ**  
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, ICMYL

**QUINTANA ROO, MÉXICO**

**Octubre, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por brindarme nuevamente la oportunidad de continuar con mi desarrollo académico. Al posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por permitirme ampliar mi conocimiento acerca de los ecosistemas marinos y sus habitantes. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios.

Al Dr. Ernesto Maldonado Olvera, por todo su apoyo, por los consejos, su paciencia pero sobre todo por adentrarse conmigo a mundos desconocidos y por nunca dejar de apoyar y creer en mi propuesta, por ayudarme a adaptar el proyecto para que resultara de la mejor manera posible. Mil gracias por brindarme un espacio en el laboratorio y por las palabras de apoyo cuando las cosas no salían de acuerdo a lo planeado.

A los miembros de mi comité: la Dra. Patricia Thomé Ortiz, por compartir su laboratorio, reactivos y conocimientos conmigo y por todas sus aportaciones para mejorar el proyecto. A la Dra. Judith Sánchez Rodríguez por permitirme usar su equipo de laboratorio, por sus comentarios de aliento y por compartir su conocimiento conmigo buscando siempre mejorar mi trabajo. Al Dr. Guillermo Horta Puga por, seguir acompañándome en el proceso de desarrollo académico que he decidido continuar en gran parte gracias a sus enseñanzas, por sus observaciones y aportaciones a mi investigación. Al Dr. Felipe Amezcua Martínez, por formar parte del comité, por sus atinadas observaciones para mejorar mi escrito y por compartir siempre su conocimiento y punto de vista, que fueron de gran ayuda para que mi trabajo concluyera de la mejor manera posible.

A los integrantes del laboratorio de Evo-Devo que me acompañaron durante este camino de exponencial adquisición de conocimiento. En especial a la Dra. María Victoria Grosó Becerra, por compartir sus conocimientos de biología molecular conmigo, por sus consejos, por su paciencia y por todos sus consejos que me sirven tanto dentro como fuera del laboratorio. A la Biol. María Elizabeth Rodríguez Salazar, por adentrarse conmigo al complicado camino que implica el entendimiento de los procesos moleculares que ocurren dentro de los seres vivos y por ser una excelente roomie.

A los miembros de Corallium, Esclero y Barco lab que convirtieron mi estancia en la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales en una experiencia inolvidable. A mi amigo mi (Raúl Padilla Guzmán) por siempre estar conmigo sin importar nada, por ser el humano más increíble con el que tuve la suerte de coincidir en el Caribe, a Mérdia, Gandhi, Tecalco, Sandy, Mau, Paquito, Sarita, Nuri, Esmé y todos los miembros de la UASA que compartieron un pedacito de su existencia conmigo, gracias por las risas que nunca faltaron, por sus consejos, por tanta... vida.

A los miembros del SAMO, por ayudarme y siempre solucionar las dificultades técnicas que se me presentaron en el camino.

A Eden Magaña, por ayudarme con la instalación y modificaciones del sistema de acuario que permitió la realización de la fase experimental, sin la cual este proyecto no hubiera sido posible.

Y sobre todo a mi familia a mis papás porque siempre me apoyan en cualquier decisión que tome y porque ellos me inculcaron el amor por el mar desde pequeña, a mi hermana por ser mi compañera de vida incondicional, por sus consejos y su apoyo, gracias por creer en mí siempre y enseñarme a perseguir mis sueños y alcanzar mis metas, saben que siempre los llevo conmigo a donde quiera que vaya

“No amount of experimentation can ever prove me right; a single experiment can prove me wrong.” —*Albert Einstein*

## **RESUMEN**

Al igual que casi todos los habitantes del planeta Tierra las anémonas de mar de la especie *Exaiptasia pallida*, poseen un reloj biológico que está gobernado por un mecanismo molecular, que determina diversos procesos fisiológicos y de comportamiento que se presentan a lo largo de un ciclo circadiano; de los que depende la supervivencia de este organismo. La luz es la principal señal a través de la que se desencadena el mecanismo del reloj circadiano. En este estudio, se estableció un sistema de cultivo de la anémona *E. pallida* y se analizó la expresión de 3 genes (*Criptocromo 1 (Cry 1)*, *Criptocromo 2 (Cry 2)* y *Timeless (Tim)*), componentes del reloj; así como el comportamiento de las anémonas en términos de longitud corporal bajo distintas condiciones lumínicas. El mecanismo de reloj de *E. pallida* al igual que el de otros Cnidarios responde a las condiciones lumínicas y esto se evidencia en las variaciones observadas en las curvas de expresión relativa de los genes monitoreados. Así mismo, encontramos que, en las anémonas, la contaminación lumínica altera el comportamiento de elongación corporal, lo que provoca variaciones en el intervalo de longitud corporal con respecto a los controles, inhibiendo la sensibilidad a las fluctuaciones de iluminación que ocurren normalmente a lo largo de un día.

Palabras clave: *Exaiptasia pallida*, reloj circadiano, genes de reloj, contaminación lumínica.

## ÍNDICE

<b>1.-INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13-19</b>
<b>2.-ANTECEDENTES.....</b>	<b>14-19</b>
<b>3.-JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA.....</b>	<b>20</b>
<b>4.-PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>5.-HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>6.-OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
6.1 General.....	23
6.2 Particulares.....	23
<b>7.-MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>24-41</b>
7.1 Material biológico.....	24
7.2 Sistema de cultivo de <i>Exaiptasia pallida</i> .....	25-28
7.3 Tratamientos experimentales.....	28 y 29
7.4 Colecta de organismos.....	29 y 30
7.5 Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificar tres genes de reloj circadiano de <i>Exaiptasia pallida</i> .....	30-32
7.6 Extracción de RNA total.....	32 y 33
7.7 Determinación de la concentración, calidad e integridad del RNA.....	34
7.8 Síntesis de cDNA.....	34-36
7.9 Degradación del DNA genómico usando la enzima DNase recombinante de Roche®.....	36 y 37
7.10 Re-extracción de RNA total: método de Fenol-Cloroformo-Isoamílico.....	37 y 38
7.11 Síntesis de cDNA (sin tratamiento con ez DNase).....	38 y 39

7.12 Integridad del cDNA.....	39
7.13 PCR punto final.....	39
7.14 Confirmación de la presencia de los genes de interés .....	39
7.14 PCR tiempo real (qPCR) Monitoreo de la expresión de tres genes del reloj circadiano de <i>Exaiptasia pallida</i> .....	40
7.14 Monitoreo de la longitud corporal de las anémonas .....	40 y 41
<b>8.- RESULTADOS.....</b>	<b>42-61</b>
8.1 Material biológico.....	42
8.2 Sistema de cultivo .....	43
8.3 Extracción y calidad del RNA .....	43-48
8.4 cDNA .....	48 y 49
8.5 Amplificación de genes.....	50
8.6 PCR tiempo real (qPCR) Monitoreo de la expresión de tres genes del reloj circadiano de <i>Exaiptasia pallida</i> .....	50-53
8.7 Curvas de expresión de genes de interés, puntos de máxima expresión .....	53-56
8.8 Monitoreo de la longitud corporal de las anémonas bajo distintas condiciones lumínicas.....	57-61
<b>9.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>62-66</b>
<b>10.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68-73</b>
<b>12.- ANEXOS.....</b>	<b>74</b>
12.1 Video1: 24 horas tratamiento contaminación lumínica.....	74



12.2 Video 2: 24 horas tratamiento de luz natural artificial .....	74
--	----

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1: Estanque destinado al cultivo de <i>Exaiptasia pallida</i> .	24
Figura 2: Acondicionamiento del espacio e instalación del sistema de cultivo de <i>Exaiptasia pallida</i> .	25
Figura 3: Parámetros físico-químicos del estanque exterior y acuario.	27
Figura 4: Iluminación en el estanque exterior y el acuario.	27
Figura 5. Organismos dentro del sistema de acuario, los cuadros violetas representan los horarios de colecta durante oscuridad total o contaminación lumínica y los amarillos, son horarios de colecta durante horas de sol artificial.	42
Figura 6. Organismos dentro del sistema de cultivo; A: condición de contaminación lumínica; B: Luz solar artificial.	43
Figura 7. Geles de Electroforesis de RNA total, de las anémonas colectadas durante 24 horas, luz natural (Control).	47
Figura 8. Geles de Electroforesis de RNA total, de las anémonas colectadas durante 24 horas, tratamiento luz natural artificial (12:12)	48
Figura 9. Geles de electroforesis usando oligos de Actina y cDNA de organismos bajo condiciones naturales de luz, colectados durante 24 hrs. (estanque exterior; tamaño del fragmente esperado: 384 pb).	49
Figura 10. Geles de agarosa de los productos de PCR usando los oligonucleótidos específicos para cada gen.	50

Figura 11. Curva de expresión de A: RLP 11; B: Cry 2; C: resumen.	51
Figura 12. Curva de expresión de cDNA y primers; A: muestra 1; B: muestra 2; C: muestra 3; D: muestra 4; E: muestra 5; F: curva de dilución de todas las condiciones probadas.	53
Figura 13. Curvas de expresión relativa del gen Cry 1 en distintas condiciones lumínicas .A: luz natural; B: luz natural artificial; C: contaminación Lumínica y D: Comparación entre tratamientos.	54
Figura 14. Curvas de expresión relativa del gen Cry 2 en distintas condiciones lumínicas. A: luz natural; B: luz natural artificial y C: contaminación lumínica.	55
Figura 15. Curvas de expresión relativa del gen Tim bajo distintas condiciones lumínica. A: luz natural; B: luz natural artificial; C: Contaminación lumínica y D: comparación de los tratamientos experimentales.	56
Figura 16. Anémonas en tratamiento de luz natural artificial: A: Comportamiento nocturno; B: comportamiento diurno; C: comportamientos observados durante la noche las flechas verdes señalan anémonas recostadas en el fondo de la pecera y los círculos amarillos anémonas en posición de "burbuja".	58
Figura 17. Anémonas en tratamiento de contaminación lumínica. A: comportamiento diurno; B: comportamiento nocturno, C; Ausencia de comportamientos observados en LNA.	59 60
Figura 18. Longitud corporal de las anémonas durante un ciclo circadiano bajo distintas condiciones lumínicas; A: LNA, B: CL y C: comparación entre los tratamientos, línea punteada LNA, línea sólida CL.	61

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla1. Tratamientos experimentales	29
Tabla 2. Secuencias del primer set de primers sintetizados	31
Tabla 3. Secuencias del segundo set de primers sintetizados	32
Tabla 4. Mezcla para la degradación del gDNA	35
Tabla 5. Mezcla para el control positivo y negativo	35
Tabla 6. Buffer de incubación	36
Tabla 7. Degradación de DNA genómico	37
Tabla 8. Mezcla de control positivo y negativo	38
Tabla 9. Extracciones de RNA (Grupo control bajo condiciones naturales de luz)	44
Tabla 10. Extracciones de RNA (Tratamiento de Luz Natural artificial 12:12(luz/oscuridad))	45
Tabla 11. Extracciones de RNA (Tratamiento de Contaminación lumínica 12:12(luz/contaminación lumínica))	46
Tabla 12. Concentraciones de primers y cDNA probadas.	52

## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

Ap. Actin                      *Aiptasia pallida* actina

Ap. Clock	<i>Aiptasia pallida</i> Clock
Ap. Cry 1L	<i>Aiptasia pallida</i> Cry 1 Like
Ap. Cry 2L	<i>Aiptasia pallida</i> Cry 2 Like
Ap. Cyc	<i>Aiptasia pallida</i> Cycle
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
Clk	Clock
CL	Contaminación Lumínica
<i>Cry</i>	<i>Criptocromo</i>
<i>Cry 1</i>	<i>Criptocromo 1</i>
<i>Cry 2</i>	<i>Criptocromo 2</i>
<i>Cyc</i>	<i>Cycle</i>
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
dNTP's	Deoxinucleósido trifosfato
Ea Clock	<i>Exaiptasia pallida</i> Clock
Ea Cry 1	<i>Exaiptasia pallida</i> Cry 1
Ea RLP 11	<i>Exaiptasia pallida</i> Ribosomal Protein 11
Ea Tim -like1	<i>Exaiptasia pallida</i> Timless-like 1
Ea Tim -like5	<i>Exaiptasia pallida</i> Timless-like 5
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
IDT	Integrated DNA Technologies
Kb	Kilobases (1000 pares de bases)
LNA	Luz Natural Artificial
LN	Luz Natural
µg	Microgramo
mM	Milimolar
µl	Microlitro

$\mu\text{M}$	Micro molar
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
Nm	Nanómetros
Pb	Pares de Bases
<i>Per</i>	<i>Period</i>
Pg	Picogramos
pH	Potencial Hidrógeno
RLP11	Proteína Ribosomal 11
RNAse	Ribonucleasa
RQ	Cuantificación Relativa
SDS	Domodifidecilsulfato sódico
TAE	Buffer Tris Acetato EDTA
<i>Tim</i>	<i>Timeless</i>
TM	Melting Temperature
Tris	Trizma base

## **INTRODUCCIÓN**

Desde el origen de la vida en los mares primitivos del planeta Tierra, los organismos se han visto envueltos en una constante lucha por sobrevivir, una de las piezas claves de esta supervivencia ha sido sincronizar sus tiempos de actividad con los diversos patrones de luz y oscuridad que existen como consecuencia de los movimientos que describe nuestro planeta alrededor del Sol, nuestra estrella más cercana, lo cual trae como consecuencia el día y la noche.

Además, el movimiento de los cuerpos celestes crea un ciclo predecible de la duración e intensidad de la luz solar, lunar y estelar que muchas veces definen el tiempo de actividad de los habitantes de este planeta (diurno, nocturno, crepuscular) (Gaston *et al.*, 2013; Naylor, 1999). Los ciclos pueden ser de corta duración como el ciclo circadiano (24 hrs.) o de mayor duración como el ciclo circalunar (28 días) (Tessmar-Raible *et al.*, 2011; Reitzel *et al.*, 2013) y brindan a los organismos información de gran utilidad para navegar, regular y coordinar eventos de maduración y reproducción, ajustar procesos fisiológicos y disparar comportamientos guiados por señales visuales como la depredación, reproducción y la comunicación (Gaston *et al.*, 2013; Naylor, 1999).

La necesidad de los organismos para anticiparse y prepararse para los cambios periódicos se evidencia en la presencia de relojes circadianos, que son variaciones bioquímicas que oscilan en periodos con una duración de  $\pm 24$  hrs. y que están presentes en una amplia gama de organismos (Rijo-Ferreira, 2017), así como en distintos niveles de organización y que van desde expresión de genes hasta la sincronía de diversos comportamientos e interacciones (Panda, 2002; Tessmar-Raible *et al.*, 2011; Reitzel, 2013; Sorek *et al.*, 2014)

Estos relojes se ubican en las profundidades de los seres vivos y para ser reconocidos como tales deben cumplir con ciertas características como son: poseer un componente exógeno, es decir que pueden ser ajustados a señales ambientales, siendo la luz la principal señal que los condiciona. Y un componente endógeno ya que son gobernados también por mecanismos moleculares robustos que son capaces de mantener su función independientemente de las señales ambientales por algún tiempo (entrainment).

Además de la luz existen otras señales ambientales como la disponibilidad de alimento y la temperatura que pueden provocar oscilaciones en la expresión de los genes que componen el reloj molecular (Vollmers *et al.*, 2009, Glaser & Stanewsky, 2005).

En el caso específico de los cnidarios existen varios aspectos de su biología que presentan una variación cíclica guiados por señales lumínicas detectadas por mecanismos de fotosensibilidad extraocular que se traduce en comportamientos observables incluyendo la migración vertical, fototaxis larval y asentamiento, variaciones en la longitud corporal; expansión y retracción de la columna corporal (Taddei, *et al.*, 2004; Taddei-Ferretti & Musio 2000; Hendricks et al. 2012).

## **ANTECEDENTES**

Para tratar de comprender que tan ligados puede estar un comportamiento observable o medible a una señal ambiental o Zeitgivers (dadores de tiempo) como se conocen en cronobiología, se han realizado una gran cantidad de estudios que han llevado a la creación de una nueva línea de investigación: "la cronobiología", pero sin duda uno de los primeros estudios que trataba de descifrar esta interrogante, fue el realizado por el Dr. Kleitman quien en 1938 se usó junto con uno de sus estudiantes como sujetos experimentales y permanecieron dentro de una cueva por 32 días. Ellos mismos se impusieron un ciclo de 28 hrs. que se subdividía en 10 horas de trabajo, nueve de ocio y otras nueve horas de sueño.

Durante este periodo se dieron cuenta que cada día se dormían cuatro horas más tarde que el día anterior y que a pesar de no estar al tanto de las señales ambientales su temperatura corporal fluctuaba en un ciclo de aproximadamente 24 horas (Kleitman, 1939). Los experimentos en las cuevas continuaron y se repitieron años

más tarde como el realizado por el Dr. Jürgen Aschof en 1960 quien paso 40 días dentro de una cueva artificial, aislado de señales ambientales monitoreando sus ciclos de sueño y a pesar de que estos se mantuvieron normales, cada día se despertaba más tarde y perdió la noción del tiempo, al tal grado que aseguraba haber pasado un día menos dentro de las instalaciones experimentales de lo que en realidad había sucedido. Cuando volvió a entrar en contacto con las señales ambientales sus ciclos se regularizan a cómo eran antes de aislarse, lo que sugiere que los relojes no dependen de las señales ambientales, pero si pueden sincronizarse con estas.

Estos estudios fundaron la bases para tratar de entender cómo funciona el reloj biológico de los organismos partiendo de dos interrogantes, la primera fue tratar de entender en donde se ubica este reloj interno, para lo cual la Dra. Vitaterna, 1994 y su equipo realizaron diversos estudios en los que se pretendía seguir la luz, partiendo de la evidencia de que la luz regula el reloj, y la estrategia fue tratar de ubicar las áreas del cerebro que interactúan con este estímulo. Con lo que lograron descifrar las bases del reloj circadiano de mamíferos e identificar el gen Clock usando como organismo modelo a la mosca de la fruta *Drosophila* en 1994.

La segunda interrogante fue si realmente existe el reloj interno y si este está determinado genéticamente, de ser así, la siguiente interrogante a contestar era: ¿Existen genes que controlen el reloj?, la búsqueda de los componentes del reloj molecular inició en 1971 cuando Konopka & Benzer descubrieron que una mutación en el gen *Period* era capaz de modificar e incluso anular el comportamiento circadiano de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). Desde entonces se describió el primer gen capaz de modificar el comportamiento de un organismo y se han realizado distintas investigaciones en organismos modelos como son *D.*



*melanogaster* y el ratón (*Mus musculus*), gracias a estas investigaciones ahora sabemos que existe un mecanismo molecular encargado de regular el reloj circadiano de los organismos.

Este mecanismo está compuesto por un grupo de genes (Panda *et al.*, 2002); que se encuentra conservado en casi todos los animales incluyendo de acuerdo a investigaciones recientes a los cnidarios. Lo que nos muestra que el mecanismo molecular del reloj circadiano se originó muy temprano hablando en términos de evolución (Young & Kay, 2001). El reloj está compuesto por genes que codifican para factores transcripcionales, como *Clock (Clk)* y *Cycle (Cyc)* (ortólogos de *bmal1* en vertebrados) y otros componentes reguladores como *Period (Per)*, *Timeless (Tim)* y *Criptocromo (Cry)* (Lin & Todo, 2005; Lobby & Loudon, 2005; Hardin, 2009).

La presencia de los genes de reloj en cnidarios no es extraña ya que sabemos que algunos organismos pertenecientes a este *phylum* presentan comportamientos circadianos acorde a los ciclos diarios de luz solar y lunar. Por ejemplo, la retracción de tentáculos durante el día para evitar la depredación y la expansión durante la noche para alimentarse es un comportamiento bien conocido observado en muchas especies de corales escleractinios de aguas poco profundas (Yonge, 1940; Sweeney, 1976; Sebens & DeRiemer, 1977), así como las contracciones rítmicas de la pared corporal en respuesta a la luz descritas en Hydras (Passano & McCullough, 1962) y anémonas (Sorek *et al.*, 2018). Además, las tasas de calcificación, fotosíntesis y respiración también muestran ritmicidad circádica (Lasker, 1979; Moya *et al.*, 2006; Sorek & Levy, 2012), por si esto no fuera suficiente los eventos de desove masivo en los que participan la mayoría de las especies de corales escleractinios, ocurren únicamente una o dos veces al año durante ciertas fases lunares. Esta sincronía excepcional se considera esencial para que existan altas tasas de fertilización y podría

estar fuertemente regulada por el ciclo lunar y la duración de los días (Sweeney *et al.*, 2011).

También se han realizado estudios más específicos sobre el mecanismo molecular del reloj en cnidarios, Vize en el 2009 realizó un análisis bioinformático del genoma de *M. musculus* y *Drosophila* contra el de la anémona *Nematostella vectensis* y el coral *Acropora millepora* y encontró que dentro del genoma de cnidarios existen y se expresan algunos de los genes que regulan las vías circadianas en mamíferos e insectos.

En otro estudio que se confirma la presencia de genes de reloj dentro del genoma de cnidarios como el realizado por Rietzel y su equipo en el 2010, quienes sometieron a especímenes de la anémona *N. vectensis* a distintas longitudes de onda dentro del espectro de luz visible para estudiar la ritmicidad de estos genes. (Rietzel *et al.*, 2010). La influencia de la luz en la ritmicidad de la expresión de estos genes también fue estudiada por Hoadly en el 2011, quien identificó 4 genes de reloj (*Cry 1*, *Cry 2*, *Clock* y *Cycle*) en el genoma del coral *Favia fragum*, monitoreo la expresión de estos bajo distintos tratamientos de luz, el comportamiento de expansión y retracción de los tentáculos y el papel de estos genes en la reproducción sexual (Hoadly, 2011).

De igual manera se ha tratado de entender el mecanismo de reloj responsable de la sincronía del desove de los corales, Kaniewska y su equipo realizaron experimentos usando como modelo al coral *Acropora millepora*, y demostraron que las señales de luz de Luna juegan un papel crucial para que se de esta sincronía, además describieron los mecanismos necesario para la detección de esta señal ambiental así

como toda la cascada de señalizaciones que desencadenan el desove. (Kaniewska, 2015)

También se ha estudiado el mecanismo a través del cual el reloj de dos organismos que comparten una relación simbiótica pueden llegar a integrarse, para ello Sorek, realizó en el 2018, un estudio en el que aprovechó la relación simbiótica facultativa de la anémona *Aiptasia diaphana* y algunos dinoflagelados del género *Symbiodinium*. En su estudio, monitoreó los patrones de expresión de genes del ciclo circadiano en especímenes con y sin simbiosis (Sorek, 2018).

Como se ha mencionado anteriormente la luz es la principal señal ambiental que regula los ciclos circadianos y de manera natural tanto los animales como las plantas están expuestos a la luz durante la noche en niveles que varían de aproximadamente  $5 \times 10^{-5}$  lux del cielo nublado, a  $1 \times 10^{-4}$  lux por el cielo estrellado en una noche sin Luna, a  $2 \times 10^{-2}$  lux en el cuarto de Luna, a 0.1–0.3 lux durante la semana de la Luna llena (Falchi *et al.*, 2011). Desgraciadamente en la actualidad los patrones de iluminación nocturna usuales se han alterado como consecuencia de las actividades humanas que traen consigo una gran variedad de factores de estrés, uno de ellos es la contaminación lumínica.

Existen dos tipos de contaminación lumínica: la astronómica que se refiere a la incapacidad del ojo humano para distinguir cuerpos celestes en el cielo nocturno debido al brillo directo de la luz artificial o al reflejo de esta y la ecológica que es capaz de alterar los patrones de luz y oscuridad de un ecosistema. Verheijen en 1985 propone el término de fotocontaminación para referirse a la luz artificial que puede tener efectos adversos sobre la fauna silvestre.

La contaminación lumínica ecológica incluye deslumbramiento directo, aumento crónico de la iluminación y fluctuaciones temporales e inesperadas en la iluminación. Las fuentes de contaminación lumínica ecológica incluyen resplandores del cielo, edificios y torres iluminadas, faroles de alumbrado público, barcos de pesca, luces de seguridad, luces en vehículos, bengalas en plataformas petroleras marinas e incluso luces en embarcaciones de investigación submarinas, todo lo cual puede alterar los ecosistemas en diversos grados. Por lo tanto, el fenómeno involucra efectos potenciales en un rango de escalas espaciales y temporales. (Verheijen, 1985).

A pesar de que se ha usado luz artificial para iluminar la noche durante siglos y que alrededor del mundo más de un billón de personas (23% de la población mundial) vive a 100 Km de la línea de costa (Small & Nicholls 2003), no fue hasta hace unos años que se reconoció su impacto ambiental y se ha documentado en ecosistemas terrestres; sin embargo, se sabe muy poco acerca de cómo afecta a los ecosistemas marinos (Depledge *et al.*, 2013). La cantidad de contaminación depende en gran medida de las características espectrales de las lámparas, sin embargo las emisiones azules son las más contaminantes (Falchi *et al.*, 2011), e iluminaciones tan bajas como 1.5 lux son capaces de alterar los ritmos circadiano (Wright *et al.*, 2001).

### **JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA**

Debido al importante papel que juega la luz en la regulación de los ciclos circadianos, a la creciente problemática de la contaminación lumínica y al desconocimiento del mecanismo molecular que regula el reloj circadiano en cnidarios, el presente estudio pretende conocer la oscilación en la expresión de los genes: *Criptocromo 1 (Cry 1)*, *Criptocromo 2 (Cry 2)* y *Timeless (Tim)*, componentes del reloj circadiano, bajo

distintos tratamientos de luz, así como el efecto que la contaminación lumínica puede tener sobre estos y en la longitud corporal de la anémona *Exaiptasia pallida*.

### **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

- 1) ¿Cómo se expresan los genes *Cry 1*, *Cry 2* y *Tim* componentes del reloj circadiano de *Exaiptasia pallida* bajo condiciones de luz natural (LN), luz natural artificial (LNA) y contaminación lumínica (CL)?

- 2) ¿En qué momento del ciclo circadiano se presenta el pico de expresión para cada uno de los genes de interés, bajo distintas condiciones lumínicas (LN, LNA Y CL)?
  
- 3) ¿Es posible alterar los patrones de expresión de los genes *Cry 1*, *Cry 2* y *Tim* componentes del reloj circadiano al variar las condiciones lumínicas de *Exaiptasia pallida*?
  
- 4) ¿Es posible alterar el comportamiento en términos de longitud corporal de la anémona *Exaiptasia pallida* al someterla a distintas condiciones lumínicas?

## **HIPÓTESIS**

- Si los relojes circadianos están compuestos de genes que responden a estímulos de luz, y los patrones de iluminación varían de manera natural a lo largo de un día, entonces la expresión de dichos genes también debe variar a

lo largo del día, de acuerdo con los patrones de iluminación característicos del ciclo circadiano.

- Si los genes que componen el reloj circadiano están presentes en el genoma de *Exaiptasia pallida* y al igual que en otros organismos estos reaccionan a estímulos naturales de luz, proveniente del Sol y la Luna, entonces la presencia de contaminación lumínica podría alterar el mecanismo molecular del reloj circadiano de esta especie.
- Si el comportamiento en términos de longitud corporal de la anémona *Exaiptasia Pallida* varía de acuerdo con las condiciones lumínicas en las que se encuentre, entonces la presencia de contaminación lumínica podría alterar la longitud corporal de la anémona.

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar las variaciones de la longitud corporal de *Exaiptasia pallida* y los patrones de expresión de tres genes componentes del reloj circadiano de dicha especie en condiciones de luz natural, luz natural artificial y contaminación lumínica.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Establecer un sistema de cultivo de la anémona *Exaiptasia pallida*.
- 2.-Monitorear la oscilación de los genes *Criptocromo 1 (Cry1)*, *Criptocromo 2 (Cry 2)* y *Timless (Tim)*, componentes del reloj circadiano de *Exaiptasia pallida*, bajo condiciones de luz natural, luz natural artificial y expuestos a contaminación lumínica.
- 4.-Observar y registrar el comportamiento en términos de longitud corporal de las anémonas bajo distintas condiciones de luz.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

Para la realización de este estudio se requirieron en total 42 anémonas de la especie *Exaiptasia pallida* (N= 14 por tratamiento), estos organismos fueron obtenidos de un estanque ubicado dentro de las instalaciones de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales de la UNAM, dicho estanque está destinado al cultivo de esta especie, y se encuentra a la intemperie, por lo que está expuesto a condiciones naturales de luz. El agua que recibe es bombeada directamente de la laguna arrecifal del Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos (Figura 1).



**Figura 1.** Estanque destinado al cultivo de *Exaiptasia Pallida*.

## Sistema de cultivo

Para el desarrollo de los tratamientos experimentales, se diseñó e instaló un sistema de cultivo interior para la anémona *E. pallida*, el cual consistió en una pecera de 20 L con un sistema de cerrado de recirculación de agua (Figura 2).



**Figura 2.** Acondicionamiento del espacio e instalación del sistema de cultivo de *Exaiptasia pallida*.

El agua usada dentro del sistema provenía de la laguna arrecifal, para evitar enfermedades el agua fue irradiada con un filtro UV antes de ingresar al sistema. Para remover bacterias y algas potencialmente dañinas, además de materia orgánica disuelta y particulada, el sistema contaba con un biofiltro, un filtro de cilindro y un filtro de bolsa, estos dos últimos fueron reemplazados cada 15 días y 3 días respectivamente durante los tratamientos experimentales.

A pesar de que esta especie tiene rangos de tolerancia fisiológica muy amplios a diversos parámetros fisicoquímicos (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, concentración de nitritos, nitratos y amonio), estos fueron monitoreados y controlados. La temperatura se reguló empleando un enfriador (TECO Sea chill TK150) y un calentador (Evojagger, modelo Ts) para asegurar que se mantuviera entre 26 -27.5°C. La temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH fueron monitoreados en el estanque exterior (Figura 3) con ayuda de una sonda multiparamétrica YSI modelo Pro DSS, estas condiciones fueron replicadas en el acuario (Figura 3), esto se logró realizando recambios diarios del 10% del agua del sistema.

Para mantener las condiciones descritas anteriormente durante los periodos experimentales los parámetros fisicoquímicos fueron monitoreados diario usando una sonda multiparamétrica YSI modelo Pro DSS. La concentración de nitritos, nitratos y amonio dentro del acuario fue medida una vez a la semana con ayuda de un kit colorimétrico de la marca API, para cada parámetro.

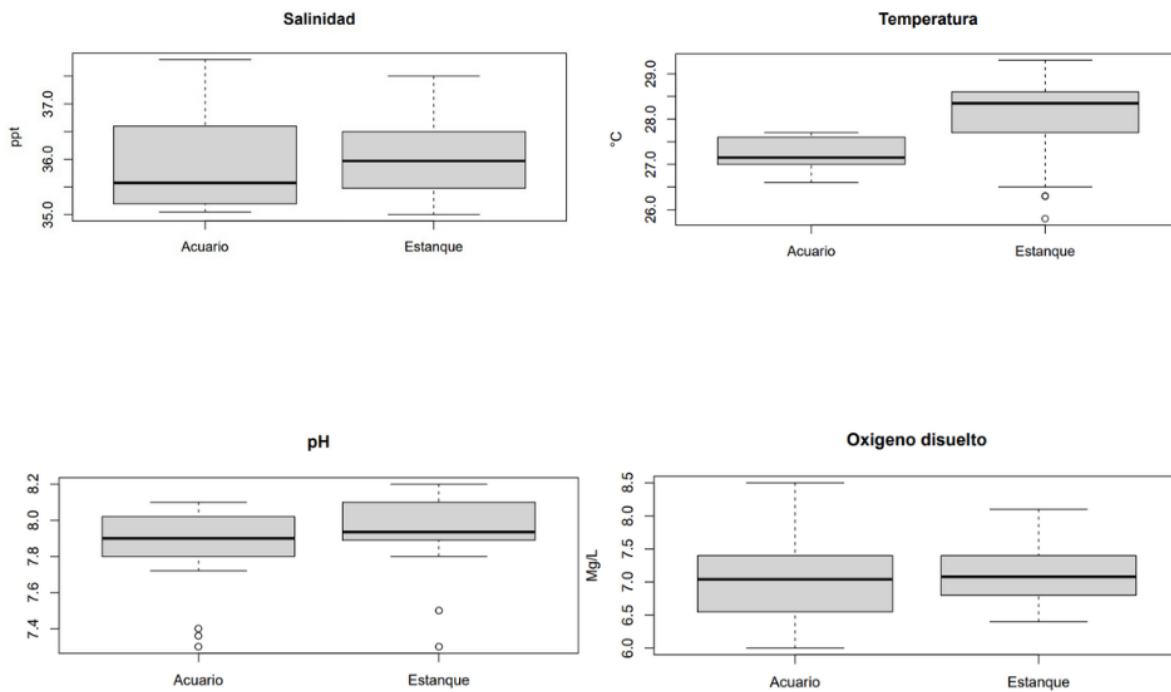


Figura 3. Parámetros físico químicos del estanque exterior y el acuario.

Para determinar las condiciones lumínicas dentro del acuario se monitoreo la intensidad luminosa del estanque exterior durante 4 días, obteniendo registros cada 30 minutos con ayuda de un *HOBO light temperature data logger* y estas fueron ajustadas dentro del acuario (Figura 4).

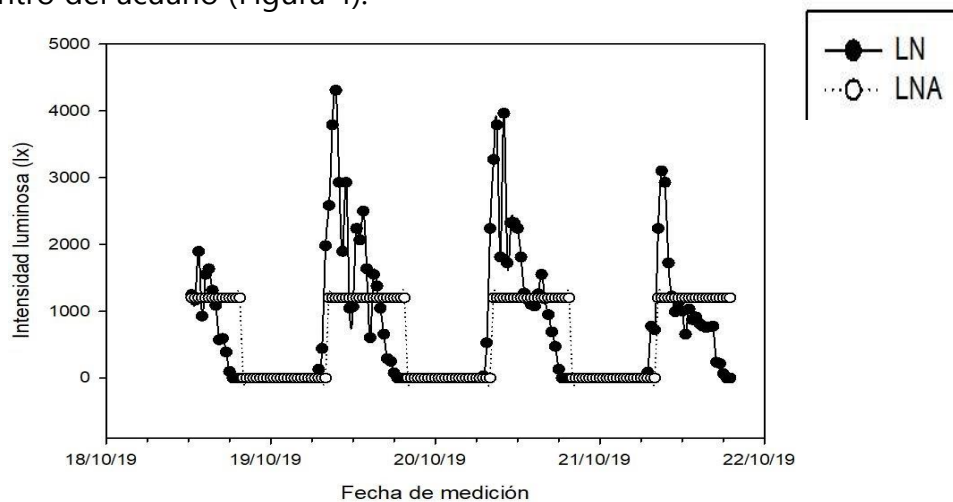


Figura 4. Iluminación en el estanque exterior y dentro del acuario

Durante el tiempo que permanecieron las anémonas dentro del acuario, fueron alimentadas 5 veces a la semana con nauplios de *Artemia salina*, estos fueron eclosionados cada 24 hrs. a partir de huevos colocados en un cono con 1.5 litros de agua dulce y 170 ml de una solución concentrada de sales (NaCl+NaHCO<sub>3</sub>), ubicado dentro de una vitrina con luz y aireación constante.

### **Tratamientos experimentales**

Los tratamientos experimentales tuvieron una duración de 15 días y se hicieron de manera consecutiva. El día en que se colectaban las anémonas del estanque exterior y se re-ubicaban dentro del acuario se consideró como el día 1 del tratamiento en ambos casos. La colecta se realizó de manera manual despegando a las anémonas del fondo con ayuda de una espátula de plástico, estas eran colocadas en una pecera con agua de mar y transportadas al acuario.

Los tratamientos experimentales consistieron en someter a las anémonas a distintas condiciones lumínicas (Tabla 1), para lo cual se usaron lámparas de la marca Econolux, modelo Solar Stinger Sun Strip marine para simular la luz solar.

El primer tratamiento de luz natural artificial (LNA) consistió en 12 horas de luz solar artificial seguidas de 12 horas de oscuridad absoluta, mientras que para el tratamiento de contaminación lumínica (CL) se tenían 12 horas de luz solar artificial y 12 horas de contaminación lumínica; para este último tratamiento, durante la noche se simuló contaminación lumínica usando lámparas Solar Stinger modelo Sun Strip de Econolux, en este caso se usó luz azul, a una intensidad de 0.2 lux., lo que es usado en muchos estudios como luz de Luna llena.

**Tabla1. Tratamientos experimentales**

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
Control(LN)	Condiciones naturales de Luz solar lunar y/o estelar.
Luz Natural Artificial (LNA)	Ciclo circadiano artificial 12:12 (luz solar artificial/ oscuridad).
Contaminación Lumínica (CL)	Ciclo circadiano 12:12 (Luz Solar Artificial: Contaminación Lumínica)

### **Colecta de organismos**

Al finalizar los 15 días de tratamiento se realizó para cada condición una colecta de 24 horas, durante las cuales cada 4 hrs. se colectaba un organismo iniciando a las 2 am, siempre se buscaba colectar a los especímenes más grandes (~2cm de alto) para así poder obtener una cantidad de material genético suficiente para los análisis posteriores.

Los horarios de colecta se hicieron siguiendo el protocolo de colecta descrito por Sorek *et al.* en el 2018(Figura 5). La razón por la que se decidió realizar las colectas en estos horarios es porque se considera que es en estos momentos del ciclo

circadiano cuando se presentan variaciones drásticas en la intensidad lumínica y también se tomó en cuenta el tiempo de exposición.

La colecta se realizó desprendiendo a los organismos con ayuda de una espátula del lugar en donde se encontraban asentados, con ayuda de la misma se colocó al espécimen dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml, con la menor cantidad de agua posible y fue colocado inmediatamente en nitrógeno líquido, la muestra fue transportada al laboratorio donde se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior procesamiento.

Para las colectas del grupo control (LN) y del tratamiento de luz natural artificial (LNA) se empleó una luz infrarroja para evitar alteraciones en los patrones de iluminación planeados.

### **Diseño de oligonucleótidos**

Se eligieron tres genes que participan en el reloj circadiano de organismos modelo y que están presentes en *E. pallida*, los genes elegidos fueron *Cry1*, *Cry2* y *Tim*.

Para el diseño del primer set de los oligonucleótidos se realizó una búsqueda en NCBI del gen de interés, una vez encontrado se realizó un análisis BLAST de los genes antes mencionados del genoma de *F. fragum* contra el genoma de *E. pallida*, de los resultados de este análisis se eligió el primer hit. Finalmente se diseñaron los oligonucleótidos con ayuda de la herramienta virtual Primer 3.

Para el segundo set de oligonucleótidos se usaron las secuencias empleadas por Sorek (2018) y además se diseñaron dos primers para el gen *Tim* siguiendo el procedimiento descrito anteriormente y un primer para el gen *receptor like protein 11 (Rp11)* que es un gen que codifica la proteína ribosomal 11 y que de acuerdo con Sorek *et al.*, 2018 presenta un patrón de expresión muy estable al ser sometido a experimentos de ciclo circadiano y que será usado como gen de referencia (housekeeping) en este estudio.

Los oligonucleótidos diseñados fueron sintetizados por la compañía Integrated DNA technologies ® (IDT) para su utilización todos los oligonucleótidos fueron resuspendido para una concentración final de 100 µM y se preparó una solución de trabajo a 25 µM.

Las secuencias y tamaño de los amplicones se muestran en las en la tablas 2 y 3.

**Tabla 2. Secuencias del primer set de primers sintetizados**

<b>Gen</b>	<b>Froward(5´-3´)</b>	<b>Reverse(3´-5´)</b>	<b>Tamaño del amplicón (PB)</b>
ApActin	AAATACTGATGCGGGACTGG	GCAATTTGAAGCAGAAGACT	384
ApCry1L	CATGGTCAACGGGGTGC ACTGG	TGGATCAGCTGGGAGGAGGGAC	147
ApCry2L	AGAGCCCAACAAGCCGGAGTT	GGCCAACCCACCGCAAGAATGT	150
ApClock	GCTGTGGCCTATCTTCGGAGTCA	ACGACGCAGAGCTAAACCAAGTGC	109
ApCYC	ATATGGTGCCTGGCGACTCGG	AGCGAGTTCTACGGAGGCAGCA	149



**Tabla 3. Secuencias del segundo set de primers sintetizados**

<b>Gen</b>	<b>Forward(5'-3')</b>	<b>Reverse(3'-5')</b>	<b>Tamaño del amplicón (PB)</b>
EaCry 1	GATCCTCCATTGCTCTGAATAG	GCTTGAGGAATTAGACGGTAG	106
EaRpl11	AGCCAAGGTCTTGGAGCAGCTTA	TTGGGCCTCTGACAGTACAGTGA ACA	125
EaClock	CAAGGGCTGTGTTAGGTTAG	GTGCTTCTCTTGTGTTGGA	121
Ea Tim-like5	ACAGCTGACGACAGGGAAGACA ACG	TGCCCCGGTATGCGCCAGAATGT	169
EaTim-like 1	ACATTCTGGCGCATACCGGGCA	ACGTGATGCTGCAAGAGCTGCC A	138
RLP11	AGCCAAGGTCTTGGAGCAGCTTA	TTGGGCCTCTGACAGTACAGTGA ACA	125

### **Extracción de RNA**

La purificación de RNA se hizo a partir de un individuo de *E. pallida* (aprox. 2 cm de alto), siguiendo el protocolo publicado por Pawlowski *et al.*, 1994, con algunas

modificaciones. Los especímenes fueron privados de alimento 3 días antes de realizar la extracción.

Cada organismo fue macerado hasta obtener un polvo fino, lo cual se logra adicionando nitrógeno líquido; al macerado se le agregó en una proporción 1:4 del buffer de extracción (1:1, fenol ácido: buffer de lisis) y se adicionó 1  $\mu$ l de RNAsa OUT por cada ml de suspensión.

A continuación se centrifugó a 13,000 RPM durante 25 minutos a 4°C, se lavó dos veces con CHCl<sub>3</sub> (1:1), centrifugando entre lavados a 13,000 RPM y 4°C por 20 minutos, en el último lavado se midió el volumen de la fase acuosa recuperada y se le adicionó  $\frac{1}{3}$  del volumen medido de LiCl 8M, se mezcló y se dejó precipitar por 24 horas a 4°C.

Pasado este periodo se centrifugó a 13,000 RPM durante 25 minutos a 4°C, se descartó la fase acuosa y se lavó la pastilla dos veces con 700  $\mu$ l etanol al 70%, centrifugando entre lavados bajo las condiciones antes descritas, al finalizar el segundo lavado se descartó la fase acuosa y se resuspendió la pastilla en 300 $\mu$ l de acetato de sodio 0.3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol al 70%, se mezcló y se dejó precipitar por 2 horas a 20°C.

Posteriormente se centrifugó a 13,000 RPM durante 2 minutos a 4°C, nuevamente se descartó la fase acuosa y se lavó dos veces más la pastilla con 750 $\mu$ l etanol al 70%, se centrifugó a 13,000 por 5 minutos a 4°C. Finalmente se dejó secar la pastilla, dejando el tubo abierto boca abajo, a temperatura ambiente, durante 20 minutos, antes de re suspenderla con 30  $\mu$ l agua tratada con DEPC.

## **Concentración, calidad e integridad del RNA**

Para determinar la concentración del RNA extraído se analizaron 2  $\mu$ l de la muestra con un Bioespectrofotómetro de la marca Eppendorf a una longitud de onda de 280 nm. Todas las muestras fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 5  $\mu$ l hasta la retrotranscripción a cDNA.

Para analizar la calidad e integridad del RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en Buffer TAE al 1 X para visualizar las bandas de las subunidades ribosomales 28 y 18S. Las muestras fueron preparadas con 3  $\mu$ l de RNA, 2  $\mu$ l de colorante gel red, 1  $\mu$ l de buffer de carga y para el marcador de peso molecular se mezcló 1  $\mu$ l de O'gene ruler 1 kb, 1  $\mu$ l de buffer de carga y 2  $\mu$ l de gel red. La electroforesis corrió a 60 W durante 40 minutos y finalmente el gel se visualizó en un transiluminador modelo Bio doc it de la marca UVP a 250 nm de longitud de onda.

## **Síntesis de cDNA**

La síntesis de cDNA se realizó empleando el kit SuperScript IV VILO MASTER MIX de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó a partir de 10  $\mu$ l de RNA extraído de *E. pallida*.

El primer paso de este procedimiento consistió en realizar la degradación del DNA genómico, para lo cual se preparó, por cada tubo, la siguiente mezcla de reacción:

**Tabla 4. Mezcla para la degradación del gDNA**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
Buffer ezDNasa 10x	1µl
Enzima ezDNasa	1µl
RNA	5µl
Agua libre de nulceasas	3µl

De la mezcla anterior se prepararon 2 tubos; uno para el control negativo (-RT) y el otro para el control positivo (+RT), los tubos se incubaron a 37°C por dos minutos en un termociclador, se centrifugaron brevemente y se colocaron en hielo. A cada tubo se le agrego lo siguiente:

**Tabla 5. Mezcla para el control positivo y negativo**

<b>Componente</b>	<b>Control positivo (+RT)</b>	<b>Control negativo (-RT)</b>
SuperScript IV VILO Master Mix	4µl	-----
SuperScript IV VILO Master Control Negativo	-----	4µl
Agua libre de nucleasas	6µl	6µl

Para finalizar la síntesis de cDNA los tubos fueron colocados nuevamente en el termociclador y se dejó correr por completo un programa que se diseñó basándose en la "melting temperature" (TM) de los primers que consiste en incubar por 40s a 95°C para el alineamiento de los primers, seguido de 1 minuto a 60°C para la

transcripción reversa del RNA y finalmente se inactiva la enzima incubando a 72°C por 5 minutos. El cDNA de cada muestra fue almacenado a -18°C hasta su posterior procesamiento.

Algunas muestras fueron procesadas de una manera diferente, ya que se terminó la enzima del Kit Vilo para la degradación del DNA genómico, lo que se hizo en estos casos fue tratar el RNA total extraído con la enzima DNase I recombinant RNase free de Roche.

### **Degradación de DNA genómico usando la DNasa I recombinante de Roche**

Para poder usar esta enzima primero se preparó el buffer de incubación de la misma puesto que el que incluye el kit ya se había terminado; el buffer se preparó mezclando los siguientes componentes:

**Tabla 6. Buffer de incubación**

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Tris-HCl	400mM
NaCl	100mM
MgCl <sub>2</sub>	60mM
CaCl <sub>2</sub>	10mM

Una vez que se mezclaron los componentes antes mencionados, se ajusta el pH del buffer con HCl puro hasta 7.9.

La degradación de DNA genómico se hizo preparando la siguiente mezcla:

**Tabla 7. Degradación de DNA genómico**

<b>Componente</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen empleado</b>
RNA total	10-50µg	1µl
Buffer de incubación 10X	5µl	5 µl
DNasa recombinante 1, Rnase free	2.5-10 unidades	1 µl
Inhibidor de Rnasa (opcional)	10 unidades	1 µl
Agua	Suficiente para 50µl	42 µl
<b>Volumen final</b>		50 µl

Esta mezcla se incubó en un termociclador de la marca Perkin Elmer, modelo geneamp PCR system 2400, por 20 minutos a 37°C, pasado este tiempo se detuvo la reacción y se añadieron 2 µl de EDTA 0.2M pH 8 y se incubó a 75°C por 10 minutos para inactivar la enzima.

Debido a que la enzima se inactiva con EDTA y que esto podría afectar los resultados de PCR, por lo que después del tratamiento con la enzima se realizó una re-extracción de RNA usando fenol-cloroformo-isoamílico.

### **Re-extracción de RNA usando fenol-cloroformo-isoamílico**

Los 50 µl de RNA tratados con la enzima de Roche se llevaron a un volumen final de 200 µl añadiendo agua tratada con DEPC y se añadieron 200 µl de fenol-cloroformo-isoamílico, esta mezcla se agitó con un mezclador tipo "vortex" y se dejó precipitando 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó por 15 minutos 1,000 RPM y a 4°C.

Se recuperó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo donde se le adicionaron 500  $\mu$ l de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó precipitando a temperatura ambiente por 10 minutos, después se centrifugó por 15 minutos a 13,000 RPM y 4°C. Se retiró y descartó el sobrenadante y al tubo que ahora contenía un pellet se le añadió 1 ml de Etanol al 75% y se centrifugó por 5 minutos a 13,000 RPM y 4°C (este lavado se realizó 2 veces), posteriormente se descartó el sobrenadante y el tubo se dejó abierto para que se evaporara el etanol, una vez que el tubo estuvo seco se resuspendió el pellet usando 30  $\mu$ l de agua tratada con DEPC.

El material re-extraído fue cuantificado para corroborar que la cantidad de material fuera suficiente para los estudios posteriores y se realizó la síntesis de cDNA usando el kit IV VILO Master Mix, sin realizar el tratamiento con la ez DNasa.

### **Síntesis de cDNA (sin tratamiento de ez DNasa)**

Para sintetizar el cDNA de las muestras después de la re-extracción con fenol-cloroformo-isoamílico se preparó la siguiente mezcla:

**Tabla 8. Mezcla de control positivo y negativo**

<b>Componente</b>	<b>Muestra(Rt+)</b>	<b>Control (Rt-)</b>
Super script IV Vilo master mix (Randon hexamer primers)	4 $\mu$ l	---
Super script IV VILO No RT Control	---	4 $\mu$ l
RNA(1pg-2.5 $\mu$ g)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Agua libre de RNasas	11 $\mu$ l	11 $\mu$ l

<b>Volumen final</b>	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
----------------------	------------	------------

Esta mezcla se colocó en el termociclador y se corrió un programa especialmente diseñado para este proceso que consistió en incubar por 10 minutos a 25°C, seguido una incubación por 10 minutos a 50°C para la transcripción reversa del RNA y finalmente se inactivó la enzima incubando por 5 minutos a 85°C.

### **Integridad del cDNA**

Para conocer la integridad y calidad del cDNA sintetizado se realizó un PCR punto final usando los primers de actina y finalmente para corroborar la presencia de los genes de interés, con los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer Tae al 1X.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, punto final) y presencia de genes de interés**

Se amplificaron fragmentos de cDNA de todas las muestras, mediante PCR punto final empleando una polimerasa termoestable (Dream taq) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C durante 3 minutos seguido de 30 ciclos: desnaturalización a 95°C durante 40 segundos, apareamiento de DNA a 60°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 1 minuto, inactivando finalmente la enzima a 72°C durante 10 minutos.

Con los productos de PCR se realizó una electroforesis para corroborar la presencia de los genes de interés. Observado en el gel de agarosa la presencia de las bandas con un tamaño correspondiente al fragmento que se amplificó.



## **PCR de tiempo real (qPCR)**

Se utilizó esta técnica para conocer la manera en que se expresan los genes de interés y también para determinar el momento del día en que tienen mayor expresión y de esta manera saber si la luz tiene alguna influencia en ellos.

De los dos tipos de cuantificación que pueden realizarse con el qPCR para cumplir con los objetivos de este estudio se realizó una cuantificación relativa usando el método  $\Delta\Delta C_t$ , ya que esto permite comparar la expresión de un gen respecto a un gen de referencia (housekeeping); (Livak y Schmittgen, 2001)

Los cálculos de expresión relativa (RQ) y gráficas de curvas de expresión de los genes, se realizaron usando el software Sigma Plot.

Debido a que la síntesis de cDNA se realizó a partir de concentraciones variables de RNA total, al momento de cargar las placas de qPCR se usaron volúmenes variables de cDNA de cada muestra para una concentración final de 40 ng/ $\mu$ l y un volumen de reacción de 25  $\mu$ l.

## **Monitoreo de la longitud corporal de las anémonas**

A fin de determinar si la contaminación lumínica tiene un efecto observable sobre la longitud corporal de las anémonas, se realizó nuevamente una colecta de organismos del estanque exterior destinado al cultivo de anémonas. Dichos organismos fueron reubicados dentro del acuario, se dejaron aclimatar por 5 días antes de iniciar nuevamente los tratamientos experimentales con duración de 15 días

cada uno, los videos de realizaron en los últimos días de tratamiento a fin de evitar variaciones debidas a la aclimatación de los organismos a distintas condiciones lumínicas de las que reciben de manera natural.

Para monitorear el comportamiento de las anémonas y poder determinar variaciones en la longitud corporal, se instaló un sistema de grabación continua. Se usó una cámara marca Pro visión ISR modelo BX-372C. Los videos fueron procesados usando el software Filmora para obtener un video continuo del comportamiento de las anémonas durante un ciclo circadianos, una vez que se obtuvo el video se obtuvieron fotografías de los primeros minutos de cada hora durante un día completo (anexo2) y con ellas se realizaron mediciones de la longitud corporal de las anémonas durante un periodo de 24 hrs. bajo distintas condiciones lumínicas.

En el caso del tratamiento de luz natural artificial donde las anémonas permanecían 12 hrs. en oscuridad total se utilizó una lámpara led marca Steren de espectro infrarrojo (850nm) con 12 w de potencia, para poder obtener una grabación de su comportamiento durante la noche sin alterar los patrones de iluminación deseados.

Con la información obtenida se realizaron gráficas para visualizar el intervalo de longitud corporal que presentan los organismos en los tratamientos experimentales.

## **RESULTADOS**

### **Material biológico**

La colecta de organismos se llevó a cabo siguiendo la metodología y horarios descritos por Sorek (2018) (Figura 5), la razón por la que se decidió realizar las colectas en estos horarios es porque se considera que es en estos momentos del ciclo circadiano es cuando se presentan variaciones drásticas en la intensidad lumínica. En cada colecta se eligieron las anémonas más grandes para obtener una buena cantidad de RNA y las muestras eran colocadas inmediatamente en nitrógeno líquido, así fueron transportadas al laboratorio y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar posteriormente las extracciones de RNA.

Los organismos del grupo control fueron colectados del estanque exterior, en los horarios de colecta mencionados anteriormente, a diferencia de los especímenes sometidos a tratamientos experimentales estos no fueron reubicados dentro del acuario, simplemente fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior procesamiento.



**Figura 5.** Organismos dentro del sistema de acuario, los cuadros violetas representan los horarios de colecta durante oscuridad total o contaminación lumínica y los amarillos, son horarios de colecta durante horas de Sol artificial.

## Sistema de cultivo

El sistema diseñado resulto ser efectivo para el cultivo de *E. pallida*, los organismos se mantuvieron con vida durante los tratamientos experimentales (Figura 6), con los cuidados descritos en la sección de material y métodos.

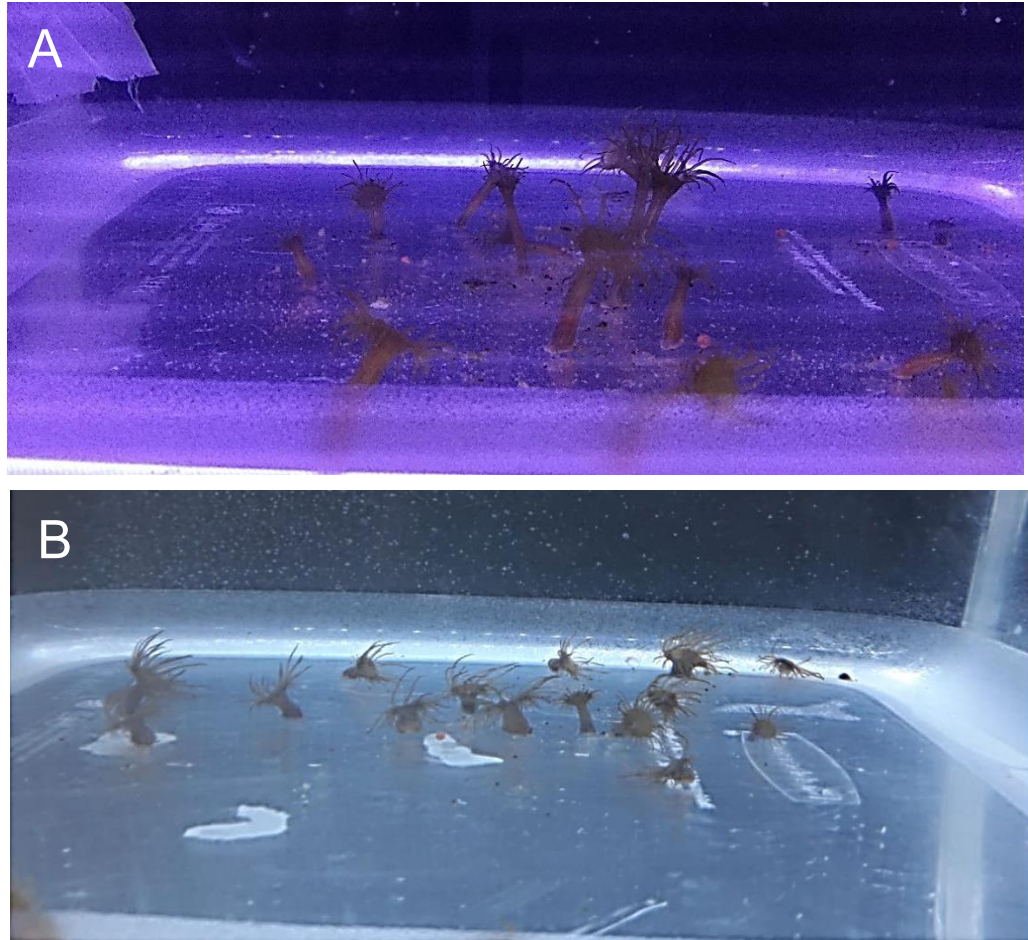


Figura 6. Organismos dentro del sistema de cultivo; A: condición de contaminación lumínica; B: Luz solar artificial.

## Extracción y Calidad del RNA

Se estandarizó la técnica para la extracción de RNA total a partir de un espécimen de *E. pallida*, el material obtenido fue suficiente para los análisis posteriores; en la tabla 9, 10 y 11 podemos observar la concentración obtenida en cada extracción.

**Tabla 9. Extracciones de RNA (Grupo control bajo condiciones naturales de luz)**

Fecha y hora de Colecta	Concentración del RNA (µg/ml)		A 260/280		A 260/230	
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2
<b>3/9/2019, 10 hrs.</b>	Tubo 1	17.1	Tubo 1	1.78	Tubo 1	1.75
	Tubo 2	18.1	Tubo 2	1.91	Tubo 2	1.83
<b>3/9/2019, 14hrs.</b>	Tubo 1	269.5	Tubo 1	1.08	Tubo 1	1.97
	Tubo 2	264.7	Tubo 2	1.14	Tubo 2	1.99
<b>3/9/2019, 18 hrs.</b>	Tubo 1	13.7	Tubo 1	1.66	Tubo 1	2.15
	Tubo 2	175.7	Tubo 2	1.96	Tubo 2	2.24
<b>3/9/2019, 22 hrs.</b>	Tubo 1	145.1	Tubo 1	2.05	Tubo 1	1.92
	Tubo 2	121.5	Tubo 2	1.83	Tubo 2	1.36
<b>10/9/2019, 6 hrs.</b>	Tubo 1	82.3	Tubo 1	1.76	Tubo 1	2.21
	Tubo 2	23.8	Tubo 2	1.46	Tubo 2	1.86
<b>6/10/2019, 2 hrs.</b>	Tubo 1	228.9	Tubo 1	1.90	Tubo 1	3.84
	Tubo 2	324.5	Tubo 2	2.07	Tubo 2	2.64
<b>3/11/2019, 10 hrs.</b>	Tubo 1	166.9	Tubo 1	2.07	Tubo 1	2.42
	Tubo 2	295.4	Tubo 2	1.75	Tubo 2	2.05

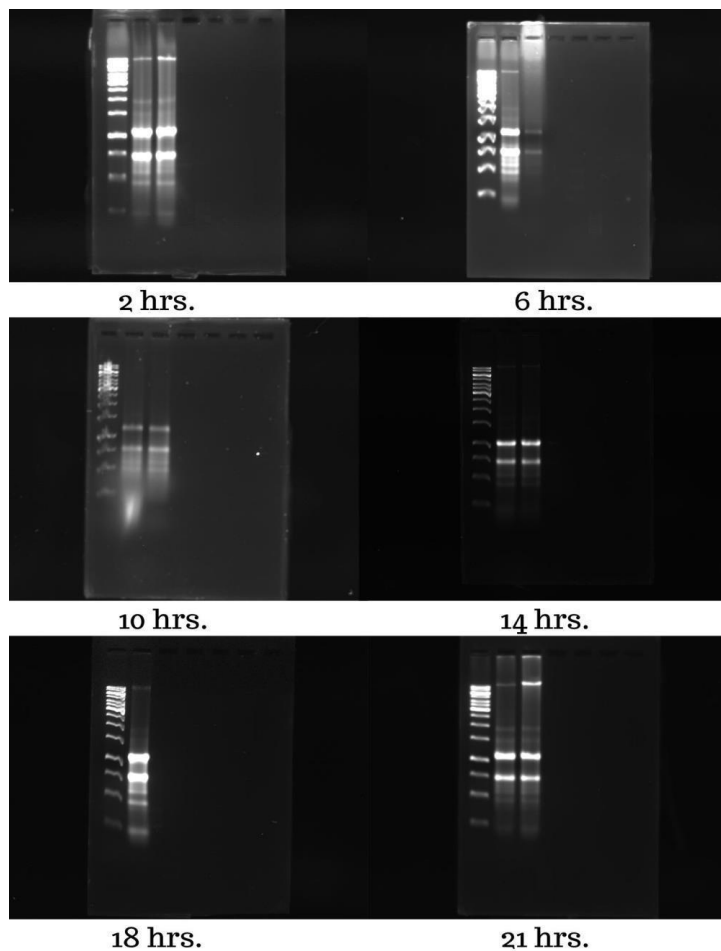
**Tabla 10. Extracciones de RNA (Tratamiento de Luz Natural artificial 12:12 (luz/oscuridad))**

Fecha y hora de Colecta	Concentración del RNA ( $\mu\text{g/ml}$ )		A 260/280		A 260/230	
	Tubo	Concentración	Tubo	Ratio	Tubo	Ratio
5 de noviembre 2019 2 hrs.	Tubo 1	58.2	Tubo 1	1.81	Tubo 1	2.02
5 de noviembre 2019 6 hrs.	Tubo 1	386.5	Tubo 1	1.87	Tubo 1	2.49
	Tubo 2	301.6	Tubo 2	1.88	Tubo 2	2.45
5 de noviembre 2019 10 hrs.	Tubo 1	312.2	Tubo 1	1.98	Tubo 1	2.4
5 de noviembre 2019 14 hrs.	Tubo 1	472.2	Tubo 1	1.89	Tubo 1	2.20
	Tubo 2	446.5	Tubo 2	1.95	Tubo 2	2.45
5 de noviembre 2019 18 hrs.	No se pudo cuantificar					
5 de noviembre 2019 22 hrs.	Tubo 1	394.8	Tubo 1	1.91	Tubo 1	3.96

**Tabla 11. Extracciones de RNA (Tratamiento de Contaminación lumínica 12:12 (luz/contaminación lumínica))**

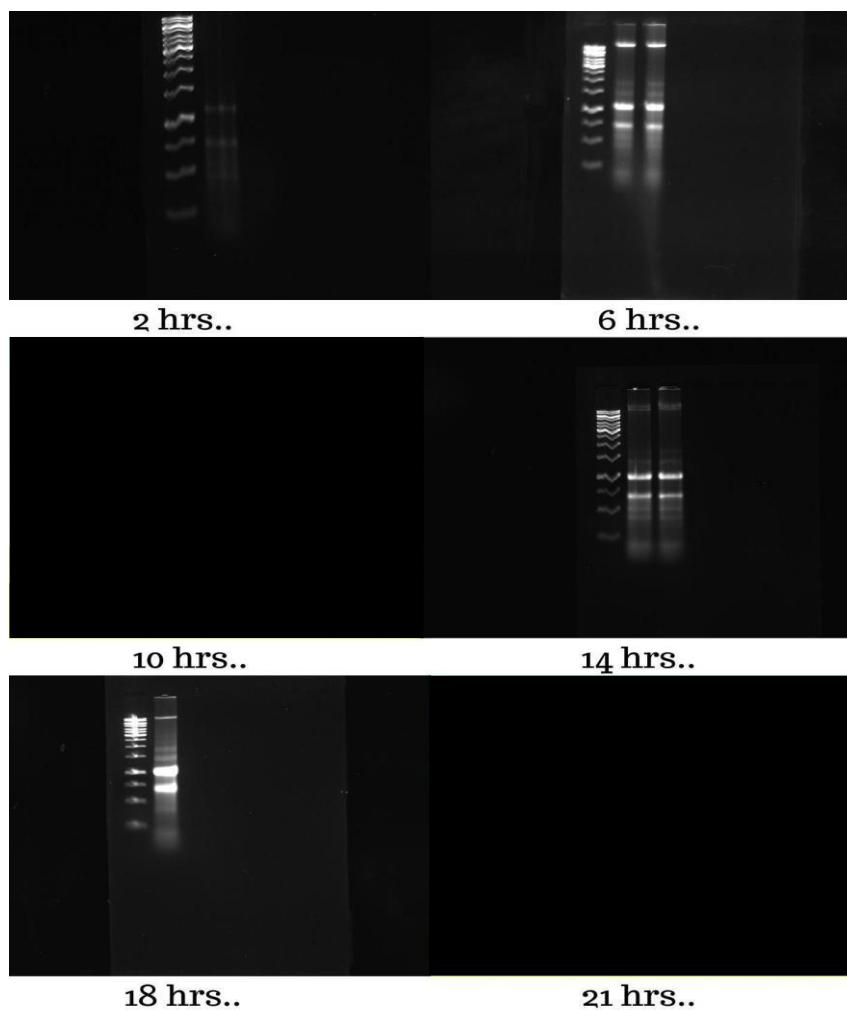
<b>Fecha y hora de Colecta</b>	<b>Concentración del RNA (µg/ml)</b>	<b>A 260/280</b>	<b>A 260/230</b>
<b>22 de diciembre 2019, 2 hrs.</b>	54.3	2.44	1.2
<b>22 de diciembre 2019, 6 hrs.</b>	111.7	2.15	1.31
<b>22 de diciembre 2019, 10 hrs.</b>	49.4	2.04	2.73
<b>22 de diciembre 2019, 14 hrs.</b>	628.4	1.96	2.59
<b>22 de diciembre 2019, 18 hrs.</b>	147	1.70	2.20
<b>22 de diciembre 2019, 22 hrs.</b>	32.4	1.96	1.16

La integridad del material obtenido, se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, en los que se comprobó la presencia de las bandas de la subunidades 28s y 18s (Figura 7 y 8).



**Figura 7.** Geles de Electroforesis de RNA total, de las anémonas colectadas durante 24 horas, luz natural (Control).

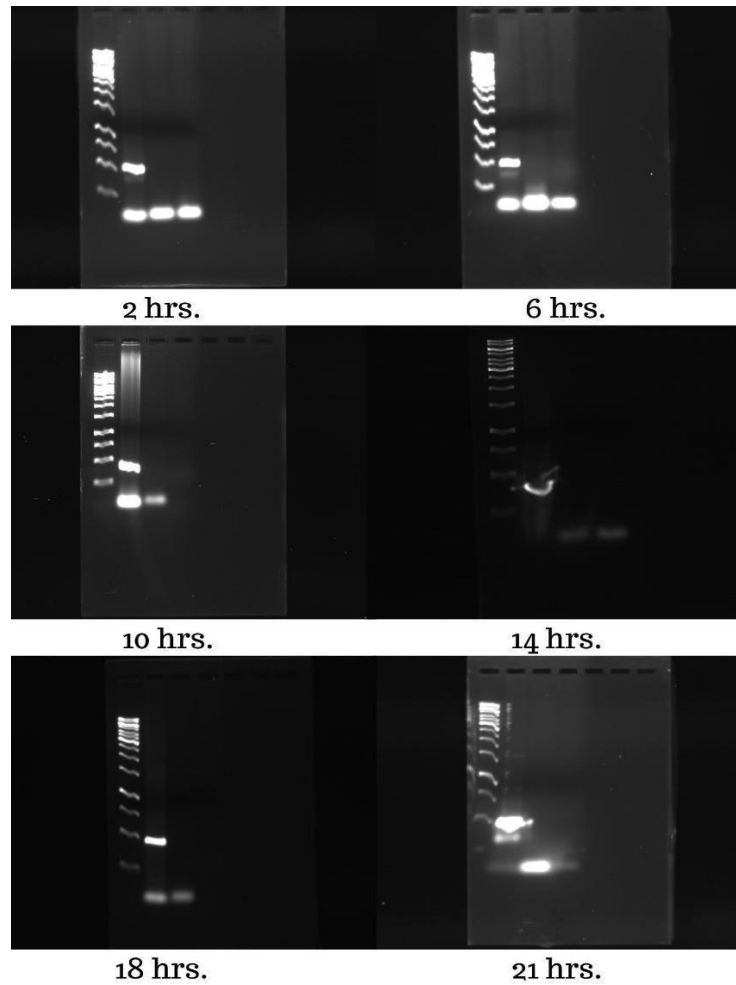




**Figura8.** Geles de Electroforesis de RNA total, de las anémonas colectadas durante 24 horas, tratamiento luz natural artificial (12:12).

### **cDNA y Amplificación de los genes**

Una vez que se determinó la integridad del RNA total se realizó la síntesis de cDNA usando 10µl de cada muestra y se probó su integridad mediante electroforesis, usando primers de Actina para todas las muestras de las colectas de 24 horas (Figura 9).

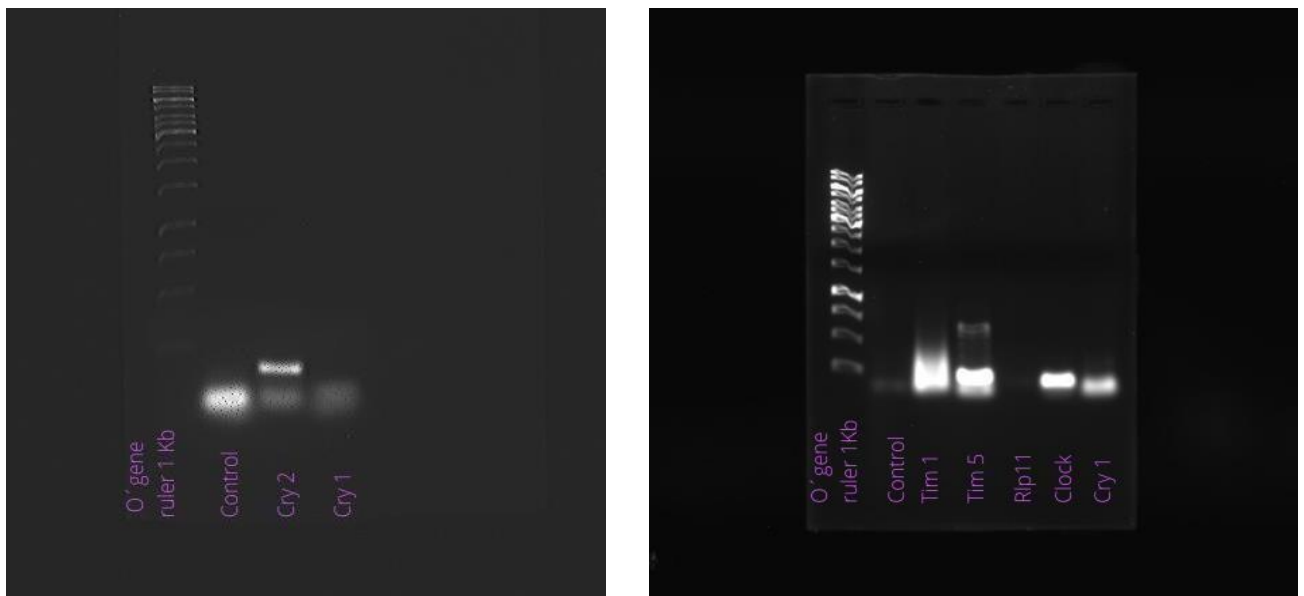


**Figura 9.** Geles de electroforesis usando oligos de Actina y cDNA de organismos bajo condiciones naturales de luz, colectados durante 24 hrs. (estanque exterior; tamaño del fragmente esperado: 384 pb).

## Amplificación de los genes

Con el primer set de primers que se diseñó se amplificó el gen *Cry 2*, y con el segundo set de oligos se amplificaron *Tim* y *Cry 1*.

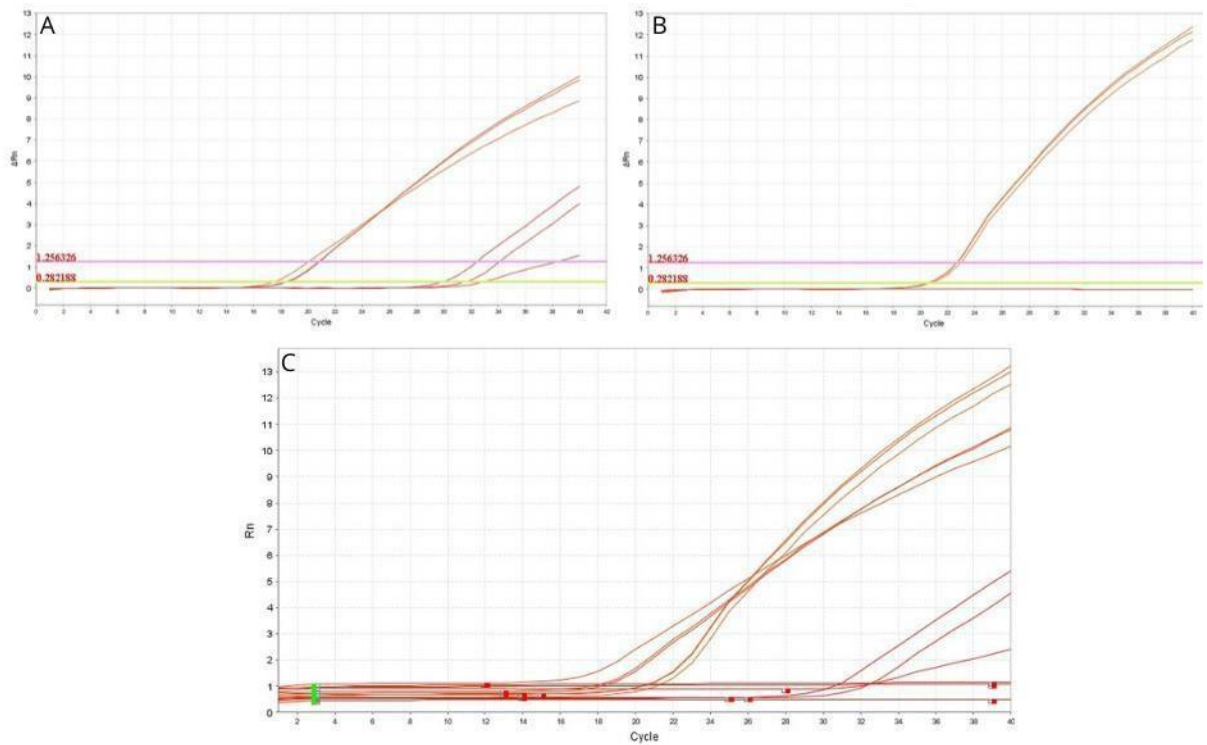
Se logró amplificar a los 3 genes de interés en las anémonas colectadas en el estanque exterior, bajo condiciones de luz natural, como podemos observar en la figura 10.



**Figura 10.** Geles de agarosa de los productos de PCR usando los oligonucleótidos específicos para cada gen.

## PCR de tiempo real (qPCR)

Se realizó un primer ensayo de la técnica de qPCR en el cual se pretendía estandarizar el método, en la figura 11 podemos observar la curva de expresión de los genes *RLP11* y *Cry 2*.



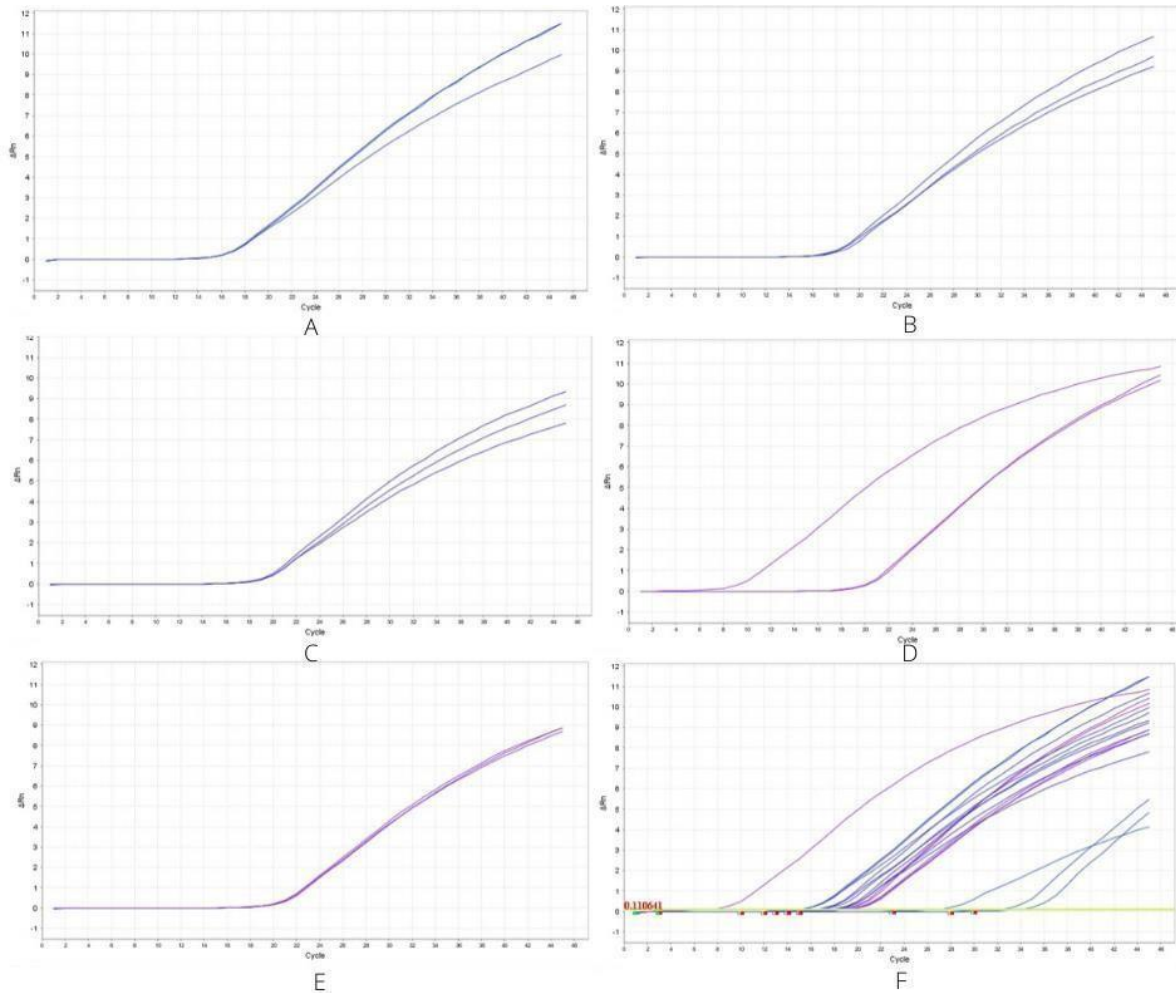
**Figura 11.** Curva de expresión de A: *RLP 11*; B: *Cry 2*; C: resumen. La línea rosa representa la señal mínima de fluorescencia (baseline) y la línea verde es el límite de detección (treshold)

Una vez obtenidos los resultados anteriores se realizó un ensayo de qPCR, con una curva de disoluciones tanto de cDNA, como de oligonucleótido específico con la finalidad de determinar las concentraciones a usar en el procesamiento de las muestras de los tratamientos experimentales, se pretendía encontrar una combinación en la cual los reactivos se consumieran casi en su totalidad durante los ciclos del qPCR a fin de evitar residuos que puedan arrojar resultados falsos en cuanto a la expresión de genes.

En la tabla 12 podemos observar las concentraciones que se probaron en el ensayo y en la figura 12 las curvas de amplificación de las condiciones probadas.

**Tabla 12. Concentraciones de primers y cDNA probadas.**

<b>Número de la muestra</b>	<b>Dilución del cDNA</b>	<b>Concentración del primer</b>
<b>1</b>	1:1	0.6 ng/μl
<b>2</b>	1:2	0.6 ng/μl
<b>3</b>	1:5	0.3 ng/μl
<b>4</b>	1:10	0.6 ng/μl
<b>5</b>	1:10	0.3 ng/μl



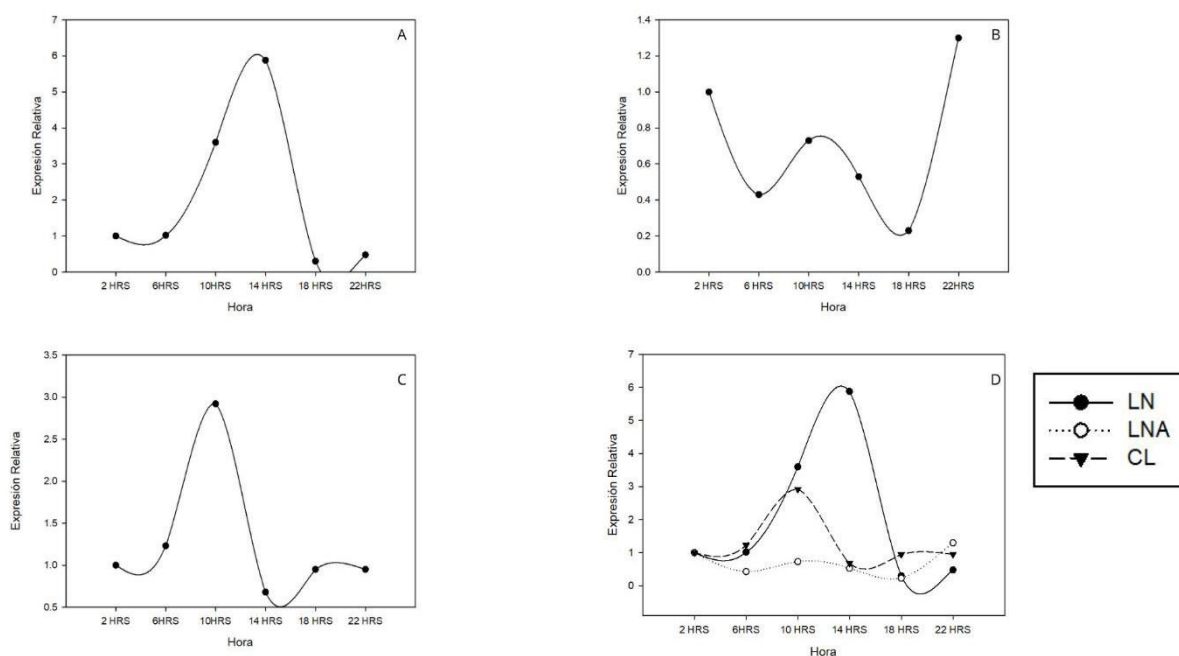
**Figura 12.** Curva de expresión de cDNA y primers; A: muestra 1; B: muestra 2; C: muestra 3; D: muestra 4; E: muestra 5; F: curva de dilución de todas las condiciones probadas.

Consideramos que la mejor combinación de condiciones resulto ser una dilución de cDNA 1:10 con primers a una concentración de 0.3 ng/μl, así que estas fueron las condiciones que se usaron para procesar todas las muestras.

### **Curvas de expresión de genes de interés y puntos de máxima expresión mediante qPCR**

Se diseñaron y corrieron experimentos para monitorear la expresión de los genes de

interés dentro de un ciclo circadiano bajo distintas condiciones lumínicas y tal como podemos observar en la figura 13 el gen *Cry 1* presenta una oscilación independientemente del tratamiento experimental, el punto de máximo de expresión en condiciones naturales de luz es un poco antes de las 14 hrs.(Figura 13, A), mientras que en condiciones de luz natural artificial es a las 22 hrs. (Figura 13, B) y al estar expuestos a contaminación lumínica podemos observar que el punto de máxima expresión es cerca de las 10:00 hrs. (Figura 13, C), si bien no se pierde la oscilación del gen bajo ninguna de las condiciones experimentales es interesante observar como el punto de máxima expresión se desfasa.



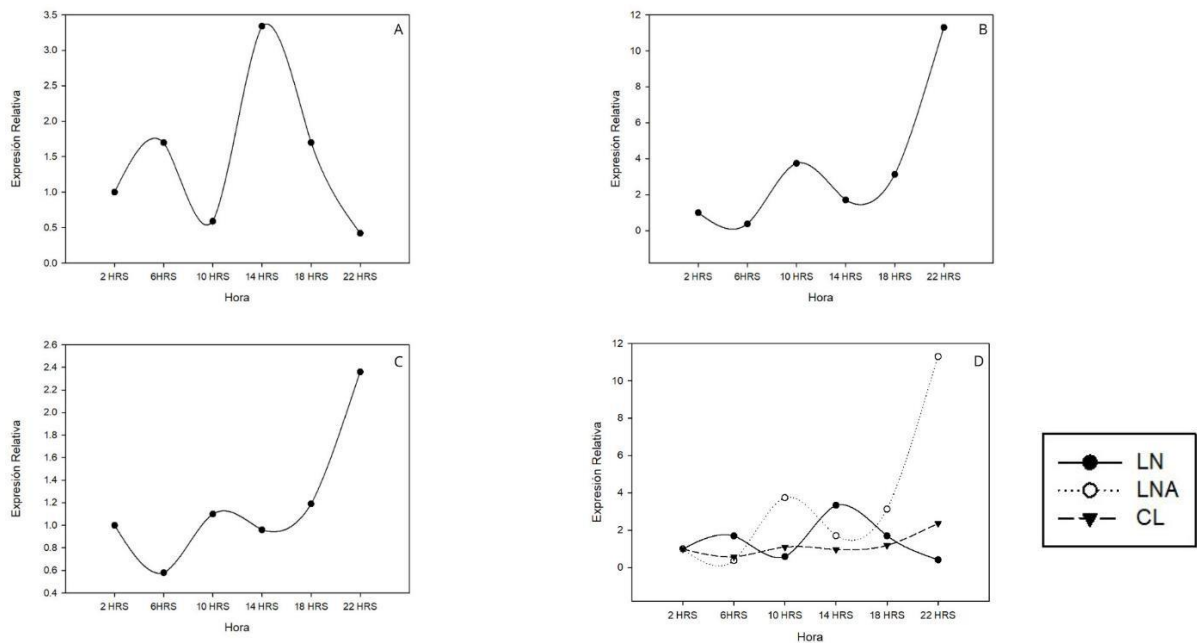
**Figura 13.** Curvas de expresión relativa del gen *Cry 1* en distintas condiciones lumínicas .A: luz natural; B: luz natural artificial; C: contaminación Lumínica y D: Comparación entre tratamientos.

Al comparar la expresión en los tratamientos experimentales con el control (Figura 15, D) podemos observar que la escala de expresión relativa es mucho mayor en condiciones naturales de luz y que en este gráfico la oscilación en condiciones de

luz natural artificial son muy tenues, incluso parecería que existe una tendencia por perder la oscilación, contrario a lo que sucede en presencia de contaminación lumínica, lo que podría sugerir que la expresión del gen *Cry 1* se pierde al encontrarse en condiciones de oscuridad total.

En cuanto a la expresión de el gen *Cry 2* como se observa en la figura 14 en condiciones naturales de iluminación este gen muestra una oscilación muy distinta a la que se observa en las condiciones experimentales, en las que el punto máximo de expresión se da a las 22 hrs., es decir después de 5 hrs. de haber estado expuestos a las condiciones experimentales, mientras que en condiciones naturales de luz este se da cerca de las 14 hrs.

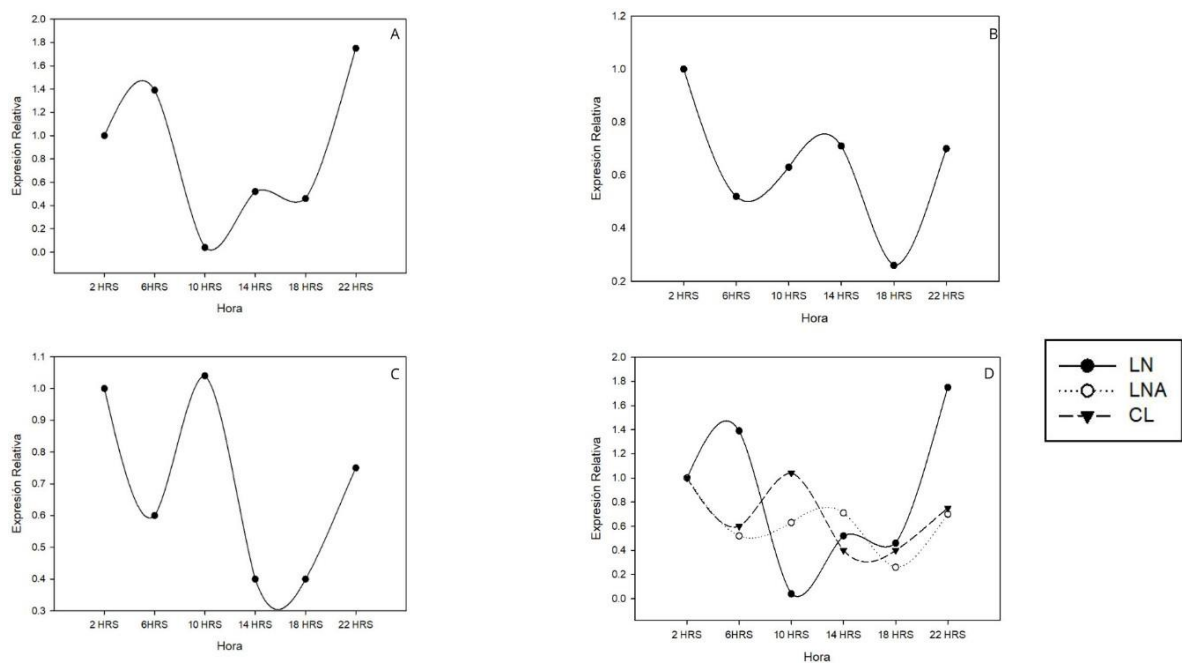
Al comprar las curvas de expresión del control y los tratamientos se observa que esta vez es en el tratamiento de contaminación lumínica en el que prácticamente se pierde la oscilación del gen.



**Figura 14.** Curvas de expresión relativa del gen *Cry 2* en distintas condiciones lumínicas: A, luz natural; B, luz natural artificial y C, contaminación lumínica.



En lo que respecta a la expresión del gen *Tim* podemos observar en la figura 15, que en condiciones naturales de luz, el punto máximo de expresión se da a las 22 hrs. y su punto mínimo a las 10 hrs. Mientras que bajo las condiciones experimentales pasa casi lo opuesto. En el tratamiento de luz natural artificial el punto máximo de expresión se da a las 2 hrs. y en contaminación lumínica las 10 hrs. Sin embargo, se observó que el punto máximo de expresión de este gen se presenta bajo condiciones de baja o nula iluminación (control y LNA), contrario a lo que sucede en presencia de contaminación lumínica, cuando el punto de máxima expresión se presenta mientras las anémonas están recibiendo luz solar artificial, lo que sugiere que quizás la expresión de este gen este más bien regulada por el tiempo de exposición al estímulo lumínico y no por la intensidad luminosa.



**Figura 15.** Curvas de expresión relativa del gen *Tim* bajo distintas condiciones lumínica: A, luz natural; B, luz natural artificial; C, Contaminación lumínica y D: comparación de los tratamientos experimentales.

## Monitoreo de la longitud corporal de las anémonas

Tras analizar los videos se observó que la presencia de luz en la noche tiene un efecto sobre el comportamiento de las anémonas. Al tener un foto periodo 12: 12 (L:D) las anémonas presentaron variaciones en cuanto a la longitud corporal; similar a un estado de descanso y vigilia, ya que en el momento en que la luz se apagaba comenzaban a extender la columna corporal (Figura 19,A) y conforme iba avanzando la noche se pudo observar cómo algunas doblaban la columna corporal sobre el fondo de la pecera y otras retraían los tentáculos formando una especie de burbuja con su cuerpo (Figura 16 A y C); al momento de recibir la luz del "Sol" la longitud corporal disminuía y extendían los tentáculos, el comportamiento de doblar la columna corporal sobre el fondo de la pecera y de formar burbujas es inexistente durante las horas de luz solar (Figura 16,B).

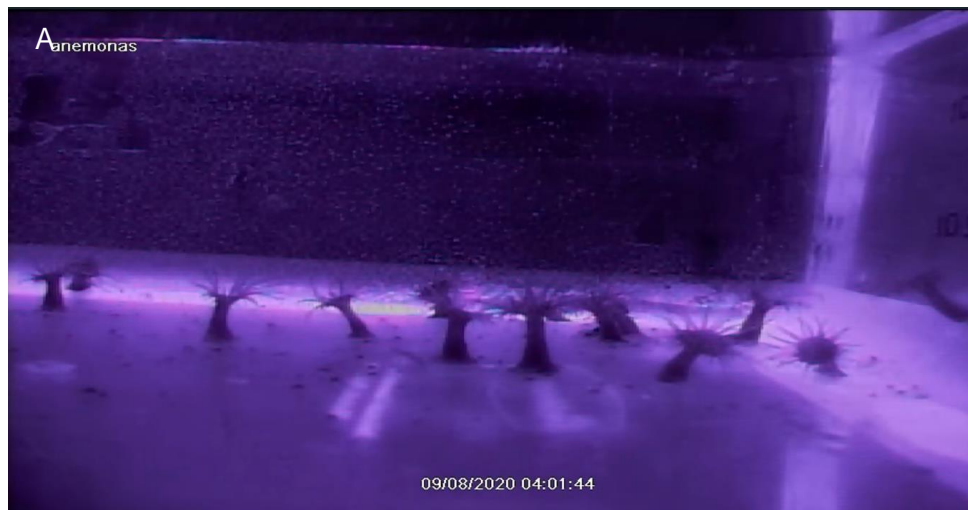


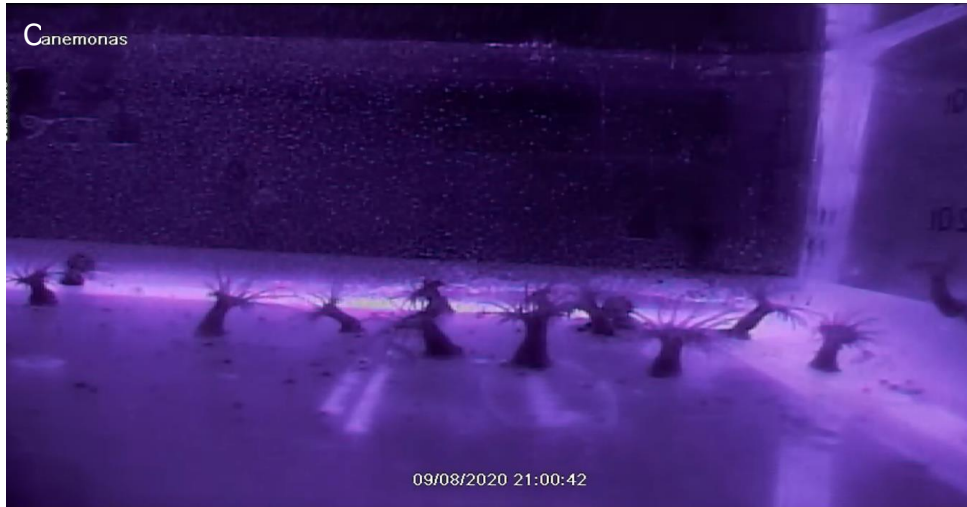


**Figura 16.** Anémonas en tratamiento de luz natural artificial: A: Comportamiento nocturno; B: comportamiento diurno; C: comportamientos observados durante la noche, las flechas verdes señalan anémonas recostadas en el fondo de la pecera y los círculos amarillos anémonas en posición de "burbuja".

En los organismos expuestos a contaminación lumínica se observó un comportamiento distinto. Los organismos sometidos a este tratamiento presentaron una longitud corporal más estable durante todo el ciclo circadiano (Figura 17, A y B). El comportamiento de doblar la columna sobre el fondo de la pecera durante la noche fue prácticamente inexistente (Figura 17, C) y los pocos organismos que lo presentaron, solo lo hicieron por periodos cortos de tiempo antes de volver a erguirse, durante el día algunas de las anémonas formaron burbujas con su cuerpo

en horas de luz de Sol. Al estar sometidas a luz durante 24 hrs. tal vez adoptaban esta posición como una manera de protección contra la luz, también se observó que al estar expuesta a luz durante 24 hrs. estas expulsaron una gran cantidad de simbiontes mismos que podemos apreciar en el fondo de la pecera (Figura 17, B).

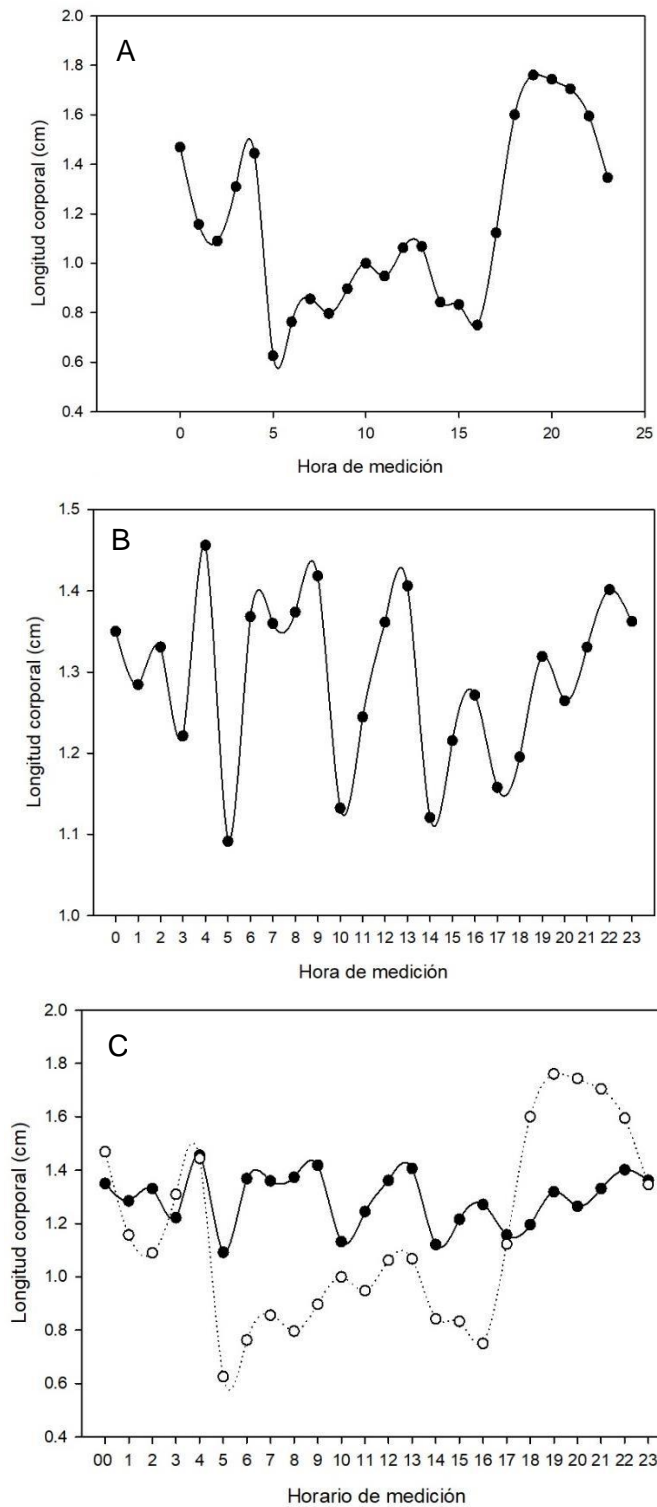




**Figura 17.** Anémonas en tratamiento de contaminación lumínica. A: comportamiento diurno; B: comportamiento nocturno, C; Ausencia de comportamientos observados en LNA.

Además de los cambios observables en el comportamiento, se realizaron mediciones de la longitud corporal de las anémonas bajo los distintos tratamientos durante 24 horas, como podemos observar en la figura 18-A el intervalo de longitud corporal es más amplio en condiciones de luz natural artificial, ya que durante la noche, en oscuridad total las anémonas se elongaban y algunas llegaron a alcanzar una longitud de hasta 2.8 cm, y durante las horas de luz solar la máxima longitud corporal registrada fue de 1.92 cm.

Mientras que los organismos del tratamiento de contaminación lumínica presentan de manera general una amplitud menor en cuanto al intervalo de longitudes corporales registradas, la mayor longitud registrada fue de 1.48 cm mientras que la menor fue de 1.1cm (Figura 18, B). La diferencia en los intervalos de longitud corporal entre los tratamientos no es tan evidente si los analizamos de manera individual (figura18-A o 18-B), sin embargo al observar la figura 20-C, podemos apreciar las diferencias que se mencionaron anteriormente.



**Figura 18.** Longitud corporal de las anemonas durante un ciclo circadiano bajo distintas condiciones lumínicas; A: LNA, B: CL y C: comparación entre los tratamientos, línea punteada Luz Natural Artificial; línea sólida Contaminación Lumínica.

## Discusión

Para ayudar a comprender las implicaciones de la contaminación lumínica sobre los corales escleractinios, en este estudio se usó como modelo a la anémona *E. pallida*. Los organismos fueron sometidos a distintos regímenes de luz (LNA Y CL) y se usó como control un grupo de organismos colectados del estanque exterior que se encontraban en condiciones naturales de luz; las curvas de expresión de sus genes, sirvieron como referencia al compararlas con las de los tratamientos experimentales.

Al analizar las curvas de expresión relativa de los relojes circadianos es evidente la presencia de un componente endógeno del reloj circadiano de *E. pallida* ya que a pesar de que no existiera una la señal ambiental o esta fuera diferente a la que se presenta en condiciones naturales de iluminación, el mecanismo de reloj continuó funcionando, también es notable el hecho de que los relojes se ajustan o adaptan rápidamente a las condiciones en la que se encuentran, pues si bien no se perdió por completo la oscilación bajo ninguno de los tratamientos experimentales, los puntos de máximos expresión si cambiaron de hora respecto a lo que se observó en el grupo control.

Las curvas de expresión observadas para el gen *Cry 1* coinciden con lo reportado por Rietzel en el 2010, quien observo que al someter a *N. vectensis* a condiciones de oscuridad total, está pierde la oscilación típica de la expresión de genes de reloj. También se ha reportado en *A. millepora* (Brady *et al.*, 2016) y *F. fragum* (Hoadly *et al.*, 2011) que al permanecer por 24 y 72 hrs. respectivamente en oscuridad total, las anémonas en este estudio no estaban en oscuridad total lo cual explicaría que no se haya perdido completamente la expresión de *Cry 1* en condiciones de luz artificial y porque en dicho tratamiento es tan tenue al compararla con el control y el grupo

sometido a CL. Quizá la oscilación observada en dichos organismos se deba al “entrainment” del reloj o que quizá se requiere más tiempo de exposición a los tratamientos experimentales para poder observar la pérdida de la oscilación por completo.

En cuanto a la expresión de *Cry 2* y *Tim*, se observó que la expresión de *Cry 2* se ve afectada por la contaminación lumínica ya que se comporta de manera prácticamente contraria a lo que ocurren en luz natural, mientras que *Tim* a pesar de que Reitzel ,2013 reporta que los cnidarios carecen de el gen *Tim* en este estudio logramos amplificar este gen y monitorear su expresión relativa, observando que se comporta de manera similar en las 3 condiciones sin embargo es evidente hay un desfase en las curvas. Lo observado concuerda con los efectos antes reportados de la contaminación lumínica, donde los genes de reloj presentan expresiones arrítmicas (Levy *et al.*, 2007(A); Brady *et al.*, 2016; Hoadly, 2011; Shoguchi, 2013 y Levy *et al.*, 2011 (B)).

Al igual que la expresión de genes el comportamiento de las anémonas se ve sumamente afectado por la contaminación lumínica y esto podría deberse a lo reportado por Rosenberg (2019), ya que de acuerdo con su investigación la contaminación lumínica causa en *Acropora eurystoma* diversas alteraciones en la expresión génica como son trastornos en genes implicados en la proliferación celular (2625 genes), lesiones y anomalías del organismo (2662 genes) y enfermedades del sistema reproductivo (1654 genes) y alguna de estas afectaciones podría estar causando este comportamiento. Cabe recalcar que tal como indica Reitzel *et al*, 2013 los relojes de mamíferos e insectos parecen tener un entrainment mucho más robusto ya que existen estudios que demuestran que los relojes de estos organismos son capaces de seguir funcionando bajo condiciones constantes durante largos



periodos de tiempo, mientras que la pérdida de la ritmicidad en la expresión de genes y cambios de comportamiento podrían ser características propias del reloj de los cnidarios, esto a su vez podría deberse a la supuesta ausencia del gen *Per* dentro del genoma de cnidarios. De acuerdo con Hoadly, 2011, durante su investigación en *F. fragum*, no lograron aislar al gen *Per* dentro del transcriptoma de esta especie y tampoco se ha encontrado este gen en *N. vectensis* a pesar de que se tiene completamente secuenciado su genoma, motivo por el cual los autores sugieren que tal vez este gen se haya perdido con el paso de la evolución a los cnidarios o que quizá evoluciono después de que se diera la diferenciación entre cnidarios y metazoarios bilaterio.

De manera general los resultados obtenidos concuerdan con los reportados anteriormente para los patrones de expresión de genes de reloj en cnidarios, donde se presenta oscilaciones a lo largo de día y que dichas curvas de expresión se ve afectadas por alteraciones en los patrones de iluminación. Los genes de reloj de *E. pallida* evaluados se comportaron de manera parecida a lo reportado por Hoadly en el 2011, lo que sugiere que al igual que el reloj de *F. fragum*, el funcionamiento del reloj de *E. pallida* es más parecido al de *D. melanogaster* que al de mamíferos y también que tal como sugiere Kaniewska *et al.*, 2015 y Rosenberg *et al.*, 2019, la contaminación lumínica puede afectar los procesos fisiológicos que desencadenan comportamientos importantes para la supervivencia de los organismos. En el caso *E. pallida* la pérdida del reflejo de acortar la longitud corporal durante el día podría significar una mayor vulnerabilidad ante depredadores en condiciones naturales. Sin embargo tal como indicó Rosenberg en el 2019, las investigaciones en las que se evalúa la implicación fisiológica de alternar ciclos de luz solar, seguidos de ciclos de iluminación de baja intensidad de noche son escasos.

En cuanto al comportamiento de las anémonas se observó de manera general que *E. pallida*, es un animal con hábitos nocturnos que al igual que lo reportado por Oren *et al.* 2015 y Hendricks *et al.* 2012 para *N. vectensis*, presenta oscilaciones diarias de actividad controladas por un reloj endógeno, a pesar de que *E. pallida* no presentó ningún tipo de desplazamiento longitudinal, presenta comportamientos similares a los de *N. vectensis* al encontrarse en condiciones de oscuridad; ambas especies presentan movimiento lateral de la corona tentacular y el doblamiento de la columna corporal cuya ritmicidad es inhibida por la presencia de luz.

Respecto a la longitud corporal de las anémonas se observó que la presencia de contaminación lumínica tiene un efecto sobre el intervalo de longitud corporal. De manera general este presentó una menor amplitud en las anémonas que recibieron luz durante la noche, a comparación de las que tuvieron oscuridad en horario nocturno; en las que se observó una disminución en la longitud corporal al recibir luz "solar" y una extensión de la columna corporal al estar en oscuridad. Esta pérdida de fotosensibilidad, traducida a variaciones en la longitud corporal concuerda con la inhibición comportamientos ligados a señales lumínicas reportados anteriormente en cnidarios como la inhibición de la contracción y extensión de tentáculos que se presenta en condiciones de luz constante, observados en corales pertenecientes a la familia *Fungida* por Sweeney, 1976; en el coral *F. fragum* de acuerdo con Hoadly *et al.* 2011 y a la pérdida del comportamiento típico de contracción de pólipos observado en *Hydra vulgaris*, reportada por Kanaya, 2019.

Así mismo se observó que *E. pallida* al igual que *Hydra vulgaris* de acuerdo con lo reportado por Singer *et al.*, 1963 es sensible a la luz azul ( $\lambda$  de 380 a 500 nm), la cual coincide con el espectro de la contaminación lumínica más abundante hoy en día,

ya que la luz de las lámparas y focos LED, que es la más empleada para iluminar en horas de noche a pesar de parecer blanca, su espectro pertenece a la luz azul de acuerdo con Aubé *et al.* 2013, por lo que la inhibición del comportamiento observado causado por la contaminación lumínica, podría tener otras implicaciones más severas sobre funciones fisiológicas y/o comportamientos cruciales para la supervivencia de organismos sensibles a este tipo de luz.

Por lo anterior se recomienda realizar más investigaciones a fin de conocer los genes que componen el reloj circadiano de cnidarios, su funcionamiento y las implicaciones que la presencia de la contaminación lumínica podría tener sobre los procesos fisiológicos y comportamiento de estos organismos.

## Conclusiones

- El sistema diseñado, es un sistema de bajo costo que resulto ser efectivo no solo para el mantenimiento de organismos de la especie *E. pallida* sino también para probar condiciones experimentales.
- Las curvas de expresión de los genes de interés demuestran que existe una respuesta directa del mecanismo de reloj a los estímulos lumínicos y esto se evidencia en las diferencias de expresión relativa observadas bajo los distintos tratamientos experimentales.
- Los genes reloj circadiano de *E. pallida* monitoreados en este estudio, varían su expresión dependiendo de las condiciones lumínicas en las que se encuentren.
- La contaminación lumínica tiene un efecto sobre la expresión de genes de reloj de *E. pallida*.
- El comportamiento de las anémonas en términos de longitud corporal, se ve afectado por la contaminación lumínica.

## Bibliografía

- Aubé, M., Roby, J., & Kocifaj, M. (2013). Evaluating potential spectral impacts of various artificial lights on melatonin suppression, photosynthesis, and star visibility. *PLoS one*, 8(7), e67798.
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25, 11–28 pp.
- 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*. *Biol. Bull.* 230, 130–142 pp.
- Depledge, M.H., Galgani, F., Panti, C., Calianis, I., Casini, S. Casini, Fossi, M.C. (2013). Plastic litter in the sea, *Mar. Environ. Res.*, 92, 279–281 pp.
- Falchi, F., Cinzano P., Elvidge C.D., Keith D.M., Haim A. (2011). Limiting the impact of light pollution on human health, environment and stellar visibility. *J. Environ. Manag.*, 92(10), 2714–2722 pp.
- Gaston, K. J., Bennie, J, Davies, T. W., Hopkins, J. (2013). The ecological impacts of night-time light pollution: A mechanistic appraisal. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 88(4), 912–927 pp.
- Glaser, F.T., Stanewsky, R. (2005) Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock *Curr Biol* 15: 1352–1363 pp.
- Hardin, P.E., (2009). Molecular mechanisms of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Sleep and Biological Rhythms* 7, 235–242 pp.
- 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, e46843.

- 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): e19755.
- Kanaya, H.J., Kobayakawa, Y. & Itoh, T.Q. (2019). *Hydra vulgaris* exhibe variación día-noche en el comportamiento y los niveles de expresión génica. *Lett zoológico* 5, 10.
- Kaniewska, P., Alon, S., Karako-Lampert, S., Hoegh-Guldberg, O. & Levy, O. (2015). Signaling cascades and the importance of moonlight in coral broadcast mass spawning. *eLife* 4, e09991
- Kleitman, N. (1939) Sleep and Wakefulness. Chicago: Univ. of Chicago Press.
- Konopka, R.J., Benzer, S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A 68:2112–2116 pp.
- Lasker, H.R., (1979). Light dependent activity patterns among reef corals-*montastrea-cavernosa*. Biological Bulletin 156, 196-211 pp.
- 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. 19; 318(5849):467-70 pp.
- 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. 14; 331(6014):175.
- Lin, C., Todo, T. (2005) The cryptochromes. *Genome Biol.* 6, 220 pp.
- Livk, J.K. y Schmittgen, D.T. (2001) Analysis of relative gen expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta ct}$  method. Methods. 2Dec; 25(4):402-8 pp.

- Looby, P., Loudon, A.S.I., (2005). Gene duplication and complex circadian clocks in mammals. *Trends in Genetics* 21, 46-53 pp.
- Moya, A., Tambutté, S., Tambutté, E., Zoccola, D., Cimini, N. y Allemand, D. (2006) Study of calcification during a daily cycle of the coral *Stylophora pistillata*: implications for light-enhanced calcification. *J Exp Biol* 209:3413–3419 pp.
- Naylor, E. (1999), Marine animal behavior in relation to lunar phase, *Earth, Moon and Planets* 85-86:291-302 pp.
- Oren, M., Tarrant, A., Alon, S., Simon-blecher, N., Elbaz, I., Applebun, L. & Levy, O. (2015). Profiling molecular and behavioral circadian rhythms in the non-symbiotic sea anemone *Nematostella vectensis*. *Sci Rep* 5, 11418
- Panda, S., Hogenesch, J.B., Kay, S.A. (2002) Circadian rhythms from flies to humans. *Nature* 417:329-335 pp.
- Passano, L.M., McCullough, C.B. (1962) The light response and the rhythmic potentials of hydra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48:1376–1382 pp.
- Pawlowski, K., Kunze, R., De Vries, S., Bisseling, T. (1994) Isolation of total, poly(A) and polysomal RNA from plant tissues. In: Gelvin S.B., Schilperoort R.A. (eds) *Plant Molecular Biology Manual*. Springer, Dordrecht.
- 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): e12805
- 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, 118-130 pp.
- Rijo-Ferreira, F., Takahashi, J.S., Figueiredo, L.M. (2017) Circadian rhythms in parasites. *PLoS Pathog* 13(10): e1006590.

- Rosenberg, Y., Doniger, T. & Levy, O. (2019). Sustainability of coral reefs are affected by ecological light pollution in the Gulf of Aqaba/Eilat. *Commun Biol* **2**, 289 p.
- Sebens, K.P., DeRiemer, K. (1977) Diel cycles of expansion and contraction in coral reef anthozoans. *Mar Biol* 43:247–256 pp.
- 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**, 426–431 pp.
- Singer, R.H., Rushforth, N.B., Burnett, A.L. (1963). The Photodynamic Action Of Light On Hydra. *J Exp Zool.* Nov;154 :169-73.
- Small, C. & Nicholls, R.J. (2003) A global analysis of human settlement in costal zones. *J Costal res.* 19:584-99 pp.
- Sorek, M., Schnytzer, Y., Ben-Asher, H., Chalifa-Caspi, V., Chen, C.S., Miller, D. & 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. 10.1186/s40168-018-0465-9.
- 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 pp.
- Sorek, M. y Levy, O. (2012) Influence of the Quantity and Quality of Light on Photosynthetic Periodicity in Coral Endosymbiotic Algae. *PLOS ONE* 7(8): e43264.
- 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 pp.



- Sweeney, B.M. (1976) Circadian rhythms in corals, particularly fungiidae. Biol Bull 151:236–246 pp.
- Sweeney, A.M., Boch, C.A., Johnsen, S., Morse, D.E., (2011). Twilight spectral dynamics and the coral reef invertebrate spawning response. J. Exp. Biol. 214, 770–777 pp.
- Taddei-ferretti, C., Musio, C., Santillo, S. & Cotugno, A., (2004). The photobiology of *Hydra's* periodic activity. *Hydrobiologia* 530, 129–134
- Taddei-Ferretti C, Musio C. (2000) Photobehaviour of Hydra (Cnidaria, Hydrozoa) and correlated mechanisms: a case of extraocular photosensitivity. J. Photochem Photobiol B.; 55(2-3):88-101. doi: 10.1016/s1011-1344(00)00041-5. Erratum in: J Photochem Photobiol B 2001 Apr; 60(1):66.
- Tessmar-Raible, K., Raible, F. & Arboleda, E. (2011) Another time, another place: Marine species and rhythms of life. *Bioessays* 33:165-172 pp.
- Verheijen, F. J. (1985). Photopollution: artificial light optic spatial control systems fail to cope with. Incidents, causation, remedies. *Experimental Biology*, 44(1), 1–18 pp.
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W., Takahashi, J.S. (1994). "*Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior*". *Science*. 264 (5159): 719–725 pp.
- Vize, P.D., (2009). Transcriptome analysis of the circadian regulatory network in the coral *Acropora millepora*. *Biological Bulletin* 216, 131-137 pp.
- Vollmers, C., Gill, S., DiTacchio, L., Pulivarthy, S.R., Le, H.D., Panda, S. (2009) Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 15; 106(50):21453-8 pp.
- Wright, K. P., Jr, Hughes, R. J., Kronauer, R. E., Dijk, D. J., & Czeisler, C. A. (2001). Intrinsic near-24-h pacemaker period determines limits of circadian

entrainment to a weak synchronizer in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (24), 14027–14032 pp.

- Young, M.W., Kay, S.A. (2001) Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet* 2:702–715 pp.
- Yonge, C.M. (1940) Great barrier reef expeditions (1928–1929) British Museum of Natural History. The biology of reef-building corals. 353–391 pp.

## **Anexo**

**Video 1:** Comportamiento de las anémonas bajo el tratamiento de luz natural artificial.

**Video 2:** Comportamiento de las anémonas bajo el tratamiento de contaminación lumínica.

**Fotografías:** Monitoreo del comportamiento de las anémonas bajo condiciones de luz natural artificial.

**Fotografías:** Monitoreo del comportamiento de las anémonas bajo condiciones de contaminación lumínica.