



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

**EXPRESIÓN DE PIWI EN CNIDARIOS, UNA PROTEÍNA  
MARCADORA DE CÉLULAS MADRE GERMINALES Y SOMÁTICAS**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:

**MARIANA EVELYN MELÉNDEZ CONTRERAS**

**TUTORES PRINCIPALES:**

**DRA. ANASTAZIA TERESA BANASZAK**

UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, ICMyL

**DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA**

UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, ICMyL

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**DRA. PATRICIA THOMÉ ORTÍZ**

UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, ICMyL

**DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**

UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, ICMyL

**ASESOR EXTERNO:**

**DR. PEDRO MEDINA ROSAS**

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, CENTRO UNIVERSITARIO DE LA COSTA

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO, 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



**EXPRESIÓN DE PIWI EN CNIDARIOS, UNA PROTEÍNA  
MARCADORA DE CÉLULAS MADRE GERMINALES Y SOMÁTICAS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:  
**MARIANA EVELYN MELÉNDEZ CONTRERAS**

**TUTOR(A) O TUTORES PRINCIPALES:**  
**DRA. ANASTAZIA TERESA BANASZAK**  
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFAES, ICMyL  
**DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA**  
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFAES, ICMyL

**COMITÉ TUTOR:**  
**DRA. PATRICIA THOMÉ ORTÍZ**  
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFAES, ICMyL  
**DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**  
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFAES, ICMyL

**ASESOR EXTERNO:**  
**DR. PEDRO MEDINA ROSAS**  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, CENTRO UNIVERSITARIO DE LA COSTA

**MÉXICO, CD. MX., AGOSTO, 2023**

*Dedicado a Dios y a mi gran amor, Omar.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México que a través del instituto de Ciencias del Mar y Limnología y la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales me ha brindado todo lo necesario para desarrollarme profesionalmente. Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por aceptarme en el programa de posgrado y por su orientación durante mis estudios.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (clave 2020-000026) que me otorgó para realizar esta investigación.

Agradezco profundamente a la Doctora Anastazia Teresa Banaszak y al Doctor Ernesto Maldonado Olvera por permitirme desarrollar este proyecto bajo su dirección, por facilitarme todo lo necesario, por su orientación y comprensión.

Agradezco a mi jurado de examen: la Doctora Patricia Thomé, el Doctor Pedro Medina y la Doctora Judith Sánchez. Por sus valiosos comentarios durante el desarrollo de la investigación y sus recomendaciones para mejorar este trabajo.

Por su asesoría y atención a mis consultas sobre Western Blot, agradezco al Doctor Raúl Castillo. A la Doctora Victoria Grosso por compartirme sus conocimientos sobre histología. Al Doctor Edén Magaña por su apoyo en el mantenimiento del acuario. Y al Dr. Raúl Llera y a la Dra. Emma Rangel por sus consejos y recomendaciones siempre que las necesité.

Quiero agradecer a mis compañeros del Laboratorio 8, principalmente a Elizabeth Rodríguez por su contribución en el desarrollo de los cultivos y fotografías, a Valery Vilchis y a Gabriela Castillo. Agradezco también a mis compañeros de CORALIUM por su apoyo en la colecta de organismos, especialmente a la M. en C. Sandra Mendoza, al Biol. Gandhi y al Biol. Raúl Tecalco.

También agradezco al personal del grupo Xcaret por su amable donación de ejemplares de medusas.

Al M. en C. Omar Guzmán por su asesoría con las representaciones esquemáticas.

Agradezco a todo el personal académico, técnico y trabajadores de la UASA, especialmente a la M. en C. Laura Celís, por su apoyo en la búsqueda de información y asuntos académicos.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, por ser tan bueno y mostrarme su gran amor cada día.

A mi esposo Omar Guzmán, porque tu apoyo y motivación fue fundamental para concluir este proyecto, gracias por todo el amor, comprensión y consejos. Este logro sin duda es de ambos.

A mi papá Juventino Meléndez, gracias papá por animarme siempre a crecer, por tu amor incondicional, tu ejemplo y todo tu esfuerzo.

A mi hermana Daniela Meléndez, por seguir a mi lado, por tu amistad y por mostrarme cómo ser valiente.

A mi amiga Elizabeth Rodríguez por enseñarme, ayudarme y acompañarme en todos los momentos frustrantes y alegres. Sobre todo, agradezco tu amistad que hicieron de este tiempo más agradable.

A mis amigos Viridiana, Francisco y Aarón, por su valiosa amistad y por animarme durante todo este tiempo.

A mis sobrinos Juventino, Evelyn, Daniela y Leonardo, por ser un ejemplo de perseverancia, por el cariño y la alegría que me comparten.

A mi familia los Meléndez y los Guzmán por la motivación que me han brindado.

## ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT .....	3
3.	INTRODUCCIÓN.....	4
3.1.	Anatomía general.....	6
3.2.	Reproducción sexual en cnidarios.....	8
3.2.1.	<i>Acropora palmata</i> .....	10
3.2.2.	<i>Exaíptasia diaphana</i> .....	11
3.2.3.	<i>Aurelia aurita</i> .....	13
3.2.4.	Plexauridae .....	15
3.3.	Células Germinales.....	16
3.4.	La proteína Piwi .....	18
4.	JUSTIFICACIÓN .....	21
5.	HIPÓTESIS.....	22
6.	OBJETIVOS.....	22
7.	MÉTODOS .....	23
7.1.	Obtención y mantenimiento de organismos .....	23
7.2.	Disección y observaciones .....	28
7.3.	Histología .....	29
7.4.	Inmunohistoquímica .....	31
7.5.	Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot.....	32
8.	RESULTADOS.....	34
8.1.	Cultivos .....	34
8.2.	Análisis histológicos y de la expresión de Piwi en diferentes Cnidarios .....	36
8.2.1.	Coral <i>Acropora palmata</i> .....	37
8.2.2.	Anémona <i>Exaíptasia diaphana</i> . .....	40
8.2.3.	Medusa <i>Aurelia aurita</i> .....	45
8.2.4.	Octocoral Plexauridae.....	51
8.3.	Esquematización de la ubicación de Piwi en mesenterios.....	54
8.4.	Análisis SDS-PAGE y Western blot .....	57
9.	DISCUSIÓN .....	59
10.	CONCLUSIONES.....	66
11.	PERSPECTIVAS.....	67
12.	REFERENCIAS .....	68

13.	ANEXOS.....	73
13.1.	ANEXO I Manual de cuidado y mantenimiento del cultivo de anémonas <i>Exaiptasia diaphana</i> aposimbióticas.....	73
13.2.	ANEXO II Manual para desarrollo y mantenimiento del cultivo de medusas <i>Aurelia aurita</i> .....	78
13.3.	ANEXO III Protocolo de tinción hematoxilina de Harris-eosina para tejidos de cnidarios.....	93
13.4.	ANEXO IV Protocolo de preparación de reactivos para electroforesis SDS-PAGE y Western blot.....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Representación líneal de la organización de los dominios de las proteínas argonautas.	18
<b>2</b>	Fragmentos recolectados de <i>Acropora palmata</i> .	24
<b>3</b>	Estaque de <i>Exaiptasia diaphana</i> simbiótica en condiciones naturales.	25
<b>4</b>	Peceras con anémonas aposibióticas en cultivo.	26
<b>5</b>	Cultivo de medusas y organismos donados por Xcaret	27
<b>6</b>	Estanque del Octocoral Plexauridae sp.	28
<b>7</b>	Fragmento de <i>Acropora palmata</i> y el octocoral Plexauridae descalcificados.	30
<b>8</b>	Medusas de <i>Aurelia aurita</i> con gónadas.	35
<b>9</b>	Secciones histológicas de pólipos de <i>Acropora palmata</i> y tejidos mesentéricos con tinción H/E para núcleos y citoplasma.	38
<b>10</b>	Inmunotinciones de mesenterios de <i>Acropora palmata</i> .	39
<b>11</b>	Organismos y cavidad gastrovascular de <i>Exaiptasia diaphana</i> aposimbiótica y simbiótica.	41
<b>12</b>	Secciones histológicas de tejidos mesentéricos de <i>Exaiptasia diaphana</i> aposimbiótica teñidos con H/E.	42
<b>13</b>	Micrografías de mesenterios de <i>Exaiptasia diaphana</i> simbiótica con folículos espermáticos en diferentes estadios de madurez.	43
<b>14</b>	Inmunotinciones de los mesenterios de <i>Exaiptasia diaphana</i> simbiótica.	44
<b>15</b>	Observaciones del pliegue genital en diferentes etapas de <i>Aurelia aurita</i> .	47
<b>16</b>	Gónada de <i>Aurelia aurita</i> .	48
<b>17</b>	Filamentos gástricos y cavidad gastrovascular de <i>Aurelia aurita</i> .	49
<b>18</b>	Inmunotinciones positivas a Piwi de los filamentos gástricos en la cavidad gastrovascular de <i>Aurelia aurita</i> .	50
<b>19</b>	Observaciones de pólipos y secciones del octocoral Plexauridae.	52
<b>20</b>	Mesenterios del octocoral de la familia Plexauridae	52
<b>21</b>	Inmunotinciones de la cavidad gastrovascular y mesenterios del octocoral Plexauridae.	53
<b>22</b>	Representación esquématica de la expresión de Piwi en <i>Acropora palmata</i> .	54
<b>23</b>	Representación esquématica de la expresión de Piwi en <i>Exaiptasia diaphana</i> .	55
<b>24</b>	Representación esquématica de la expresión de Piwi en <i>Aurelia aurita</i> .	56
<b>25</b>	Análisis de SDS-Page y Western Blot de anti-Piwi en tejidos de mesenterios de <i>A. palmata</i> , <i>A. aurita</i> y <i>E. diaphana</i> .	58
<b>A</b>	Peceras con <i>Exaiptasia diaphana</i> aposimbiótica.	73
<b>B</b>	Estróbilos y éfiras recuperadas de <i>Aurelia aurita</i> .	81
<b>C</b>	Éfiras <i>A. aurita</i> de 2 a 7 mm de diámetro.	82

<b>D</b>	Éfiras de <i>A. aurita</i> de 7 mm a 1 cm de diámetro y los tres tipos de peceras usadas para el cultivo.	84
<b>E</b>	Peceras de 2 L con flujo semicircular acopladas al sistema de recirculación.	88
<b>F</b>	Peceras de 10 L con medusas de 7 cm de diámetro o más.	91

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Número de tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Resumen de ejemplares con gónadas.	36
<b>A</b>	Parámetros del agua aceptables para el cultivo de anémonas aposimbióticas.	77
<b>B</b>	Parámetros del agua aceptables para el cultivo de <i>Aurelia aurita</i> .	80
<b>C</b>	Reactivos y cantidades para el stock del gel de separación y apilamiento	95

## ABREVIATURAS

<b>AMF</b>	Agua de mar filtrada
<b>BSA</b>	Suero Albumino Bovino
<b>CGP</b>	Células Germinales Primordiales
<b>CMG</b>	Células Madre Germinal
<b>CMM</b>	Células Madre Multipotentes
<b>CORALIUM</b>	Laboratorio de Investigación Integral para la Conservación de Arrecifes
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>H/E</b>	Tinción Hematoxilina-Eosina
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>IHC</b>	Inmunohistoquímica
<b>IHC-P</b>	Inmunohistoquímica en parafina
<b>LED</b>	Light-emitting diode (Diodo Emisor de Luz)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Magnesio
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato Salino
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PIWI</b>	P-element Induced Wimpy testis
<b>RNP</b>	Rubonucleoproteína
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SSC</b>	Buffer Salino citrato de Sodio
<b>TAE</b>	Buffer Tris-acetato-EDTA
<b>TBS</b>	Buffer Tris Salino
<b>TE</b>	Buffer Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
<b>TNT</b>	Buffer Tris-NaCl-Tween
<b>UASA</b>	Unidad Académica de Sistemas Arrecifales

## 1. RESUMEN

Las células madre germinales (CMGs) son las precursoras de los gametos en los animales en donde se han estudiado; sin embargo, en los cnidarios se sabe poco acerca de su localización anatómica. La proteína argonauta Piwi es uno de los marcadores de CMGs que ha sido más utilizado debido a que es ampliamente conservada y se expresa en muchos organismos. Piwi es parte del complejo Piwi-piRNA el cual reprime retrotransposones manteniendo la integridad del genoma lo cual es particularmente importante para las CMGs. El objetivo de este estudio fue buscar la localización a nivel tisular de las CMGs en varios cnidarios, incluyendo el coral arrecifal *Acropora palmata*, la anémona *Exaiptasia diaphana* (en individuos simbióticos y aposimbióticos), la medusa *Aurelia aurita* y un octocoral de la familia Plexauridae. En particular, se tomó en cuenta la localización de las CMGs con respecto a las gónadas. Se buscaron gónadas por observaciones directas, histología y tinciones con HE en *A. palmata* y *E. diaphana* simbiótica en época reproductiva, así como en *E. diaphana* aposimbiótica, la medusa *A. aurita*, y el octocoral, provenientes de cultivos sin considerar la época del año. La observación histológica mostró folículos espermáticos únicamente en la anémona simbiótica. La presencia de Piwi se detectó por medio de inmunotinciones con un anticuerpo Piwi comercial, y se verificó la identidad de la proteína por medio de Western Blot. La expresión de la proteína Piwi se observó en todos los animales a excepción del octocoral y de *E. diaphana* aposimbiótica. La expresión de Piwi se observó en el coral *A. palmata* dentro de los mesenterios. Para el caso de la anémona *E. diaphana* simbiótica, Piwi fue detectada en los mesenterios y en los filamentos mesentéricos, y alrededor de las gónadas, pero no al interior de ellas. Por su parte en la medusa *A. aurita*, Piwi se detectó en células específicas de los filamentos gástricos. Estas observaciones muestran que las células inmunomarcadas se encontraron aún sin la presencia de gónadas lo que es de esperarse para células que son precursoras de gametos. En conclusión, se considera que Piwi es un buen marcador de células de línea germinal y células madre somáticas para la mayoría de las especies de cnidarios estudiados. Estos datos son un nuevo aporte al conocimiento de la biología reproductiva de cnidarios y serán útiles en el desarrollo de técnicas de cultivo de gametos in vitro de especies de corales

amenazados, ya que la restauración de sus poblaciones, por medio de reclutas sexuales, se ve limitada a la obtención anual de gametos.

## 2. ABSTRACT

Germ stem cells (GSCs) are the precursors of gametes in animals where they have been studied; however, in cnidarians little is known about their localization. The Piwi argonaut protein is one of the most widely used GSCs markers. Piwi is part of the Piwi-piRNA complex which represses retrotransposons while maintaining genome integrity, which is particularly important for GSCs since they are the cells that will eventually give rise to offspring and the continuity of a species. The goal of this study was to localize GSCs in 4 species of cnidarians: the reef-coral *Acropora palmata*, the sea anemone *Exaiptasia diaphana* (in symbiotic and aposymbiotic individuals), the jellyfish *Aurelia aurita*, and an octocoral from the Plexauridae family. In particular, we only considered the localization of the GSCs with respect to the gonads. The gonads were located by direct observations, histology and HE staining in *A. palmata* and symbiotic *E. diaphana* during their reproductive season; and *A. aurita*, aposymbiotic *E. diaphana* and the octocoral were observed without considering the season. Histological observations showed detected sperm follicles only in the symbiotic sea anemone. The presence of Piwi was detected by immunostaining and the identity of the protein was verified by Western Blot. Piwi protein expression was demonstrated in *A. palmata*, symbiotic *E. diaphana* and *A. aurita* but not in the octocoral Plexauridae and aposymbiotic *E. diaphana*. Piwi expression in *A. palmata* was observed within the mesenteries. In the symbiotic anemone *E. diaphana*, Piwi was detected in the mesenteries and in the mesenteric filaments, and around the gonads but not inside them. In the jellyfish *A. aurita* Piwi was observed in specific cells of the gastric filaments. Our observations show that the immunolabeled cells were found even without the presence of gonads, which is to be expected for cells that are precursors to sexual gametes. In conclusion, our results suggest that Piwi is considered a good marker of germline cells and somatic stem cells for most of the cnidarian species studied. These data are a new contribution to the knowledge of the reproductive biology of cnidarians and will be useful in the development of in vitro gamete culture techniques for threatened coral species, since the restoration of their populations, through sexual recruits, is limited to the annual collection of gametes.

### 3. INTRODUCCIÓN

Cnidaria es un phylum de especies mayormente marinas; son organismos con gran éxito ecológico debido a sus variadas innovaciones fisiológicas, como el uso de células urticantes, los cnidocitos (a las que deben su nombre), a las relaciones con eucariontes endosimbióticos fototróficos, a los planes corporales coloniales y al ciclo de vida metagénico que incluye etapas de medusa y pólipo (Kayal *et al.*, 2018).

El phylum está integrado por tres clados principales: Anthozoa, Medusozoa y Endocnidozoa. Anthozoa abarca más de la mitad de las especies conocidas y consta de Octocorallia (plumas de mar, abanicos de mar y corales blandos), Hexacorallia (corales pétreos, corales blandos y anémonas) y Ceriantharia o anémonas tubulares. Por su parte, Medusozoa se componen de Cubozoa o medusas de caja, Hydrozoa (hidroides, sifonóforos e hidromedusas), Scyphozoa (medusas verdaderas) y Staurozoa. Por último, los Endocnidozoa son organismos completamente parasitarios que incluyen especies de Myxozoa (Collins, 2009; Kayal *et al.*, 2018).

En sus nichos ecológicos, los cnidarios son un grupo esencial ya que forman parte de las redes tróficas, siendo tanto depredadores como presa y entre ellos, los corales forman los arrecifes de coral, que son ecosistemas fundamentales para la biodiversidad marina. Además, proveen bienes y servicios a millones de personas por medio de las pesquerías y servicios turísticos que generan un movimiento económico significativo, además, proveen protección de las costas, en caso de huracanes, y generan arena (Rangel-Huerta *et al.*, 2017; Berzins *et al.*, 2018).

Algunas especies de medusas son conocidas por sus picaduras o por su repentina proliferación que, en algunas partes del mundo, afecta a las pesquerías y al turismo. Otros cnidarios, como los corales blandos y las anémonas son una fuente de sustancias antibióticas y toxinas de interés para la industria farmacéutica (Genzano *et al.*, 2014; Woodhead *et al.*, 2019).

Pese a su importancia, muchos cnidarios se encuentran amenazados por impactos negativos relacionados directa o indirectamente con la contaminación como los fertilizantes agrícolas pesticidas, extracción de petróleo, la sobrepesca, el calentamiento

global, acidificación de los océanos, daños físicos, etc. (Genzano *et al.*, 2014; Woodhead *et al.*, 2019).

La conservación de la vida silvestre abarca una gran variedad de actividades que tienen el objetivo de prevenir o mitigar la pérdida de especies y aunque las prácticas de conservación *in situ*, como las áreas marinas protegidas pueden ayudar, los efectos globales del cambio climático seguirán provocando la disminución de las poblaciones (Pandolfi *et al.*, 2011).

Es por ello que mantener y maximizar la diversidad genética debe ser una prioridad en los esfuerzos de conservación y restauración, lo que implicará que algunos individuos podrán hacer frente a condiciones de ambientes estresantes, impulsando la recuperación de la especie (Drury *et al.*, 2017).

La criopreservación es una herramienta de conservación eficaz para mantener la diversidad genética, tiene el potencial de mantener y proteger especies raras y en peligro de extinción, especialmente para ayudar a gestionar o rescatar los genomas de individuos genéticamente valiosos, es una herramienta ya aplicada en corales. Sin embargo, las aplicaciones a gran escala todavía están limitadas (Hagedorn y Spindler, 2014; Comizzoli y Holt, 2014).

Hay enfoques novedosos que pretenden ser alternativas complementarias a la preservación de gametos por criopreservación, como son la vitrificación y la transferencia de células germinales primordiales (CGP). Esta última ha tenido resultados prometedores; por ejemplo, las CGP en embriones de pez cebra, trucha y aves en estadio avanzado se han aislado, criopreservado y transferido a otros embriones. La descendencia fértil resultó de los embriones transferidos de CGP y expresó los genotipos de las mismas, lo que indica que las CGP eran viables (Clulow *et al.*, 2014; Holt *et al.*, 2014). No obstante, esta alternativa ha sido poco explorada en cnidarios.

Los ciclos de reproducción sexual y gametogénesis de cnidarios se han estudiado en varias especies. Sin embargo, se sabe poco sobre los mecanismos o factores intrínsecos que regulan el desarrollo de células germinales en diferentes cnidarios, ya que pocos trabajos

han tenido como objetivo demostrar el origen y ubicación las Células Madre Germinales (Shikina *et al.*, 2012; Chiu *et al.*, 2021).

Localizar las CMG además de ayudar a conocer más acerca de la biología de los organismos, puede aportar información para el desarrollo de técnicas para la restauración y conservación de arrecifes, al hacer posible la inducción a la reproducción sexual *in vitro*, que resulte en una producción eficiente de reclutas genéticamente diversas no limitada únicamente a las temporadas de desove, que en su mayoría son anuales.

Durante este trabajo se hace referencia a clase Hexacorallia, particularmente a los corales, anémonas y octocorales, y a la medusa luna como parte de la clase Scyphozoa, por lo que a continuación se hace una revisión general de las características anatómicas de estos organismos haciendo énfasis en las células y tejidos involucrados en el desarrollo gonadal y a las células que dan origen a los gametos.

### **3.1. Anatomía general**

Los cnidarios son metazoos de cuerpo blando, con simetría radial, presentan forma de saco, con una sola abertura que funciona como boca y ano, y que conduce a la cavidad gastrovascular, poseen tentáculos, carecen de cefalización, sistema nervioso centralizado y de órganos respiratorios, circulatorios, excretores y el sistema reproductivo consiste solo en agregaciones de células germinales (Brusca y Brusca, 2015; Berzins *et al.*, 2021; Peters, 2016).

Tienen dos capas celulares: la epidermis y la gastrodermis que se encuentran separadas por una capa de aspecto gelatinoso llamada mesoglea, en donde pueden existir elementos esqueléticos (Galloway *et al.*, 2007; Berzins *et al.*, 2021).

La epidermis, es la capa externa formada por epitelio cilíndrico simple o pseudoestratificado que son células epitelio-musculares, además, de otros tipos celulares cnidocitos, mucocitos, células pigmentarias, células calicoblásticas, células de la red nerviosa y células intersticiales. Estas últimas, son probablemente las células más estudiadas de la epidermis por ser células indiferenciadas y totipotenciales (Cairns *et al.*, 2009; Berzins *et al.*, 2021; Genzano *et al.*, 2014; Peters, 2016).

La mesoglea es una matriz amorfa de espesor variable compuesta por proteínas, polisacáridos y fibras de colágeno. Esta capa ayuda a mantener en su lugar a las células y las capas celulares, es importante para el funcionamiento del esqueleto hidrostático, proporcionando rigidez al organismo. Esta capa puede presentar amebocitos, esclerobastos y es donde ocurre la diferenciación de células germinales (Berzins *et al.*, 2021; Peters, 2016).

La gastrodermis, es la capa interna, recubre la cavidad gastrovascular. En esta capa se encuentran células nutrivomusculares, intersticiales, glandulares, algas simbiotas en vacuolas, células de sostén ciliadas o flageladas, cnidocitos, amebocitos, células sensoriales y mucocitos. Esta capa es el sistema digestivo del coral con células fagocíticas que absorben nutrientes (Cairns *et al.*, 2009; Genzano *et al.*, 2014; Galloway *et al.*, 2007; Peters, 2016).

La cavidad gastrovascular se subdivide en mesenterios, pliegues de la mesoglea recubiertos de gastrodermis. Estos brindan soporte estructural y aumentan el área de superficie, para la absorción de nutrientes (Galloway *et al.*, 2007). Cabe resaltar que, en los mesenterios es donde tiene lugar la gametogénesis, sobre este tema se hará énfasis en los siguientes apartados.

En los antozoos el borde de los mesenterios se engrosa en forma de cinta que puede tener forma multilobulada; esta estructura se conoce como filamento mesentérico o filamento gástrico (Berzins *et al.*, 2021). En caso de ser multilobulado, la banda media contiene nematocistos, células columnares ciliadas, mucocitos y células glandulares las cuales producen enzimas para digerir las presas, esta banda se denomina banda cnidoglandular, mientras que los lóbulos están compuestos por células gastrodérmicas y células de soporte ciliadas (Galloway *et al.*, 2007; Berzins *et al.*, 2021; Peters, 2016).

Los mesenterios se presentan en pares y en múltiplos de seis en el caso de los hexacorales, mientras que en los octocorales hay ocho mesenterios completos (Brusca y Brusca, 2005).

En los antozoos, la actinofaringe o faringe, es un pasaje corto tubular que va desde la cavidad gastrovascular hasta la boca, en la superficie del disco oral de todos los pólipos; algunos de los mesenterios de los pólipos hexacorales y todos los pólipos octocorales se adhieren a la pared del cuerpo de la actinofaringe y sostienen los tejidos del disco oral, se

les conoce como “mesenterios completos”. Los hexacorales pueden tener múltiples mesenterios incompletos, que no se adhieren a la actinofaringe, pero todos los mesenterios del pólipo octocoral están completos (Peters, 2016).

Por otro lado, en los escifozoos estos filamentos se conocen como filamentos gástricos, que se encuentran en la cavidad gastrovascular dentro de las cuatro bolsas gástricas. Los filamentos gástricos son digitiformes y se encuentran dispuestos en forma de herradura en la parte interna de un pliegue de la gastrodermis conocido como pliegue genital, estos son fácilmente observados a través de las paredes del cuerpo como cuatro semicírculos formas de herradura (Eckelbarger y Larson, 1988).

Durante el ciclo de vida se alternan estadios de pólipos larvarios y medusas. A partir de un cigoto se desarrolla una larva plánula que se fija a un sustrato dando lugar a un pólipo. Los pólipos se reproducen asexualmente dando lugar a nuevos pólipos que bajo determinadas condiciones ambientales producen medusas, mediante un proceso de fisión transversal de metamorfosis denominado estrobilación (en escifozoos). Las medusas son liberadas a la columna de agua y crecen hasta alcanzar la madurez sexual, formando gametos que tras la fertilización dan lugar a un cigoto, cerrando así el ciclo (Genzano *et al.*, 2014). Este ciclo no se lleva a cabo completamente en escifozoos, mientras que en antozoos todo el ciclo se lleva a cabo por el pólipo ya que en su ciclo de vida no se presenta la fase medusoide.

La reproducción asexual también se presenta en el phylum es definida como el incremento de individuos o colonias genéticamente idénticos (Kramarsky-Winter, 2016), no obstante, en este estudio no se hace referencia a este tipo de reproducción.

### **3.2. Reproducción sexual en cnidarios**

En cnidarios existen diferentes estrategias de reproducción sexual, en todas ellas se producen gametos (óvulos y/o espermatozoides). Pueden ser monoicos, generando tanto óvulos como espermatozoides, o dioicos, con individuos de sexos separados (gonocóricos). Las especies monoicas también se denominan hermafroditas, aunque por lo general no se autofertilizan, incluso si son hermafroditas simultáneos; otras especies pueden ser

hermafroditas secuenciales, cambiando el tipo de gametos producidos entre años o etapas de vida. Dependiendo de la especie, pueden ser desovadores o incubadores (explicar diferencias básicas) (Berzins *et al.*, 2021).

Las gónadas surgen de una población de células madre (totipotenciales o multipotenciales a veces denominadas células intersticiales) entre las células epiteliales o en la mesoglea, que se mueven hacia el centro de la mesoglea y se diferencian en células germinales. Las células germinales individuales se convierten en óvulos a través de cuatro etapas o en espermatozoides a partir de las divisiones mitóticas y meióticas de un grupo de células germinales, y se pueden encontrar diferentes etapas de maduración dentro de un folículo espermático en desarrollo, desde los espermatoцитos primarios más cercanos a la mesoglea hasta los espermatozoides en el centro, hasta que se llena todo el espermario con espermatozoides (Peters, 2016).

Dado que los cnidarios no secuestran células germinales a lo largo de su vida, estas células se desarrollan *de novo* a partir de una presunta línea de células madre germinales durante cada nueva temporada reproductiva. Estas células germinales pueden convertirse en gametos masculinos o femeninos dependiendo de factores genéticos y/o epigenéticos (Kramarsky-Winter, 2016).

En antozoos, la región gonadal o gametogénica tiene lugar en la mesoglea de los mesenterios entre los músculos y los filamentos mesentéricos de los pólipos; los gametos de ambos sexos pueden o no ocurrir en el mismo mesenterio, pero al mismo tiempo solo algunos mesenterios pueden ser gametogénicos. En las especies desovadoras, las capas mesogleales y gastrodérmicas se rompen, liberando gametos en la cavidad gastrovascular y luego fuera del animal por la boca, y en especies incubadoras, estas crían huevos fertilizados dentro de la cavidad gastrovascular o en los tentáculos (Berzins *et al.*, 2021).

En escifozoos, las gónadas surgen en la parte externa del pliegue genital, derivado de la migración de células germinales de la gastrodermis a la mesoglea, dentro de las cuatro bolsas gástricas (Eckelbarger y Larson, 1988).

Es posible que la reproducción dependa de una sinergia de numerosas señales ambientales y parámetros fisiológicos, incluyendo la disponibilidad de alimento,

temperatura e irradiación solar y lunar actuando en el ciclo reproductivo, así como en el desove y desarrollo de la plánula (Kramarsky-Winter, 2016).

A continuación, se hace un resumen de las principales características y estrategias de reproducción del coral *Acropora palmata*, la anémona *Exaiptasia diaphana*, octocoral de la familia Plexauridae y de la medusa *Aurelia aurita*, que son los organismos en los que se enfoca este documento. Con estos ejemplares se abarca a varios grupos representativos del phylum.

### **3.2.1. *Acropora palmata***

Los corales pétreos, como el coral Cuerno de Alce (*A. palmata*), forman un esqueleto de aragonita, una forma de carbonato de calcio. Son coloniales, y los pólipos están unidos por tejido llamado coenénquima, para formar colonias. Los pólipos carecen de sifonoglifos y lóbulos laterales ciliados en los filamentos mesentéricos (Brusca y Brusca, 2005; Galloway *et al.*, 2007).

Durante la espermatogénesis en los corales, los espermatozoides en maduración o espermatoцитos pasan por estadios de maduración celular llamados meiosis I y II, sin condensación nuclear. Esto da como resultado el desarrollo de espermátidas que contienen una capa delgada de citoplasma alrededor del núcleo. En la fase final de este proceso, el núcleo se condensa y se reorganiza el citoplasma y las mitocondrias. En esta etapa, la gónada (testículos) está llena de espermatozoides con cabezas discernibles y colas que extienden hacia la luz central y las colonias están listas para el desove (Kramarsky-Winter, 2016).

La oogenesis u ovogénesis también comienza con la migración de células intersticiales desde las capas gastrodérmicas hacia la mesoglea, como células individuales o, a veces como grupos de células. Las células suelen ser pequeñas con muy poco citoplasma que rodea un núcleo grande y, a menudo, adopta una forma ameboidea. La vitelogénesis, el desarrollo de gotitas de lípidos y vitelo por lo general ocurre una vez que el ovocito ha entrado en la mesoglea; en este punto, los ovocitos en desarrollo pueden denominarse ovogonias de etapa II. A medida que los ovocitos continúan creciendo, tanto el citoplasma

como los núcleos aumentan de tamaño (etapa III) hasta que alcanzan casi su tamaño completo. En la diferenciación de ovocitos el logro de la etapa IV está marcado por la formación de la membrana vitelina, que consiste en una capa de vesículas corticales (Kramarsky-Winter, 2016; Szmant *et al.*, 1980).

En los corales, algunos ovocitos en maduración interrumpen este proceso y se convierten en células nodrizas, participando en la nutrición de otros ovocitos (Kramarsky-Winter, 2016).

Szmant en 1986 describió a *Acropora palmata* como una especie desovadora hermafrodita, con un ciclo de gametogénesis anual culminando con el desove sincrónico durante agosto. La gametogénesis de ovocitos ocurre de septiembre a mayo y la de espermatozoides mayo a julio (Szmant 1986; Vargas-Ángel *et al.*, 2006).

Durante el desove, cada pólipo libera paquetes de gametos con espermatozoides rodeados de óvulos, generalmente después de la luna llena de agosto; los paquetes flotan hacia la superficie donde se separan y se fertilizan con gametos de otras colonias, después los embriones y las larvas pasan por un período de desarrollo antes de asentarse (Fogarty *et al.*, 2012; Baums *et al.*, 2005).

El coral Cuerno de Alce, *Acropora palmata*, es una de las especies más importantes en la formación de barreras coralinas en el Caribe mexicano (Jordán-Dahlgreen y Rodríguez-Martínez, 2003); no obstante, sus poblaciones han experimentado un declive regional, con pérdidas de hasta el 98 % en algunas áreas. La compleja interacción entre diferentes factores de riesgo hace que las poblaciones sean cada vez más vulnerables a disminuir su abundancia, reducir sus tasas de fecundidad, reclutamiento sexual y por lo tanto a perder cobertura (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2014).

### **3.2.2. *Exaiptasia diaphana***

La anémona, *Exaiptasia diaphana*, previamente conocida como *Exaiptasia pallida* y *Aiptasia pallida*, es una especie que se presenta en ambientes marinos tropicales de aguas poco profundas. Sus pólipos son dioicos solitarios y como todos los hexacorales, no presenta fase medusoide. Es un organismo modelo ya que posee la misma relación

mutualista, con algas de la familia Symbiodiniaceae. que los corales, pero carece de esqueleto calcáreo, por lo que es un buen modelo para la investigación sobre simbiosis (Carlisle *et al.*, 2017; Sunagawa *et al.*, 2009; Dungan *et al.*, 2020).

El género *Aiptasia* es considerado gonocórico (existen ambos sexos) y la gametogénesis ocurre entre abril y agosto con un pico en el porcentaje de individuos reproductivos entre julio y agosto; sin embargo, se observó cierta plasticidad reproductiva en organismos derivados de una línea clonal en cultivo, los descendientes pueden ser hermafroditas simultáneos, aunque esta estrategia es muy rara (Schlesinger *et al.*, 2010).

Las gónadas femeninas contienen óvulos separados unos de otros, en diferentes etapas de desarrollo, no forman agregaciones y maduran de forma asincrónica por lo que se pueden encontrar en diferentes etapas de desarrollo en un mismo mesenterio (Bocharova y Kozevich, 2011).

Los ovocitos mantienen contacto limitado con el epitelio gastrodérmico basal a través de células gastrodérmicas ultraestructuralmente modificadas llamadas trofocitos. Éstas son células accesorias de origen somático que, en conjunto, forman una asociación de célula accesoria-ovocito que no se ha observado en otros grupos más que en cnidarios. El trofonema juega un papel importante en el transporte de productos nutritivos desde la cavidad gastrovascular hasta el ovocito (Eckelbarger *et al.*, 2008).

Por otro lado, las gónadas masculinas se desarrollan en la mesoglea de los mesenterios. Inicialmente, las células germinales cambian de apariencia mientras se desplazan hacia la base de la capa epitelial y se diferencian en espermatogonias. Posteriormente, las divisiones mitóticas de las espermatogonias dan lugar a espermatocitos primarios que seguirán diferenciándose hasta espermatozoides. En un folículo espermático, se pueden distinguir en la periferia espermatocitos de primer y segundo orden, espermátidas y finalmente espermatozoides más cerca del centro. En algunas especies se han reportado células con la misma función del trofonema en hembras (Bocharova y Kozevich, 2011).

La diferencia macroscópica de las gónadas masculinas y femeninas es difícil de distinguir, pero los mesenterios presentan bultos que en el caso de las gónadas masculinas son más pequeños y de color más claro que las gónadas femeninas (Dungan *et al.*, 2020).

Carlisle y colaboradores en 2017 mostraron que, aunque *Aiptasia pallida* puede persistir indefinidamente en ausencia de simbiosis, las anémonas con simbiosis pueden asignar más nutrientes a la reproducción sexual que las aposimbióticas del mismo tamaño, por lo que la relación simbiótica parece tener un efecto positivo en la reproducción sexual.

La gametogénesis de esta anémona se ha logrado inducir en individuos de aproximadamente >0.7 cm de diámetro del disco oral y es regulada por ciclos circa-lunares. En condiciones de laboratorio la luz azul por cinco noches consecutivas (simulando la luna llena), cada mes, desencadena la liberación de gametos en un máximo de 9-10 días después de la última exposición a la luz azul; este efecto es específico en longitud de onda de 400 a 460 nm, mientras que la luz natural es ineficaz (Grawunder *et al.*, 2015). El estudio concluyó que, el desove sincrónico es inducido genéticamente y que la luz de la luna y la luz del sol aseguran el desove durante el momento más oscuro de la noche.

### **3.2.3. *Aurelia aurita***

*Aurelia aurita* o medusa luna es un organismo marino, con la fase de pólipo de corta duración y generalmente una fase medusa de larga duración (Cairns *et al.*, 2009), aunque esto puede ser variable dependiendo de las condiciones ambientales.

La campana de la medusa es típicamente una gruesa capa de mesoglea, el margen suele ser festoneado o lobulado, a lo largo se encuentran los ropalia que son centros sensoriales. La boca está al centro de la superficie inferior de la campana entre una extensión tubular llamada manubrio seguido de estructuras alargadas similares a tentáculos, llamados brazos orales, que ayudan en la captura de presas. La cavidad gastrovascular está dividida en cuatro mesenterios, conocidos como bolsas gástricas (Berzins *et al.*, 2021).

La medusa luna es gonocórica con fertilización interna y es incubadora, es decir que sus embriones se desarrollan en el interior de la madre hasta la fase de plánula. Los gametos

surgen a lo largo de los mesenterios o en los pliegues de la gastrodermis y a veces pueden observarse macroscópicamente como cuatro órganos en forma de herradura suspendidos en la campana (Adonin *et al.*, 2012).

La gastrodermis que recubre el piso de cada bolsa gástrica se invagina para formar un gran pliegue en forma de cinta que es mayormente plano con pocos pliegues secundarios en medusas pequeñas, pero se vuelven más complejos con la madurez sexual. A lo largo de la porción interna de este pliegue hay numerosos filamentos gástricos y los gametos se distribuyen a lo largo de la parte exterior del pliegue genital (Eckelbarger y Larson, 1988).

El ovario es un saco de células gastrodémicas lleno de mesoglea en el que se abultan los ovocitos en desarrollo. Los ovocitos crecen y sobresalen gradualmente en la mesoglea mientras mantienen contacto físico durante la vitelogénesis, con células que transportan nutrientes de la cavidad gastrovascular a los ovocitos, llamadas trofocitos; su función es la misma que en antozoos, a medida que la diferenciación de ovocitos transcurre los trofocitos se convierten gradualmente en las únicas células del epitelio germinal en contacto con el ovocito en desarrollo (Eckelbarger y Larson, 1988).

La gónada masculina se compone de varios folículos. La maduración de las células germinales en cada folículo ocurre desde la periferia al centro del folículo. Las espermatogonias se encuentran en el margen del folículo, formando una capa delgada, son esféricos con citoplasma reducido. Los espermatozoides son células esféricas con citoplasma reducido y el espermatozoide tiene una cabeza cónica y una cola apuntando hacia el centro del folículo antes de volverse móvil (Morandini y Da Silveira, 2001).

*Aurelia aurita* se reproduce durante verano, los gametos se liberan de las gónadas hacia las bolsas gástricas. Mientras los óvulos permanecen en el cuerpo femenino y los espermatozoides salen al mar por la boca, entran en la boca de una hembra y se dirigen a la gónada donde fertilizan los huevos. Los embriones se liberan a su vez de la boca, incubándose en los brazos orales (Adonin *et al.*, 2012)

Los brotes o afloramientos de medusa luna ocurren en áreas costeras de algunas regiones del mundo y se han relacionado con la sobrepesca, la eutrofización, el cambio climático y las modificaciones del hábitat. Estas afloraciones tienen importantes

consecuencias ecológicas y socioeconómicas, ya que las medusas compiten con los peces por el alimento, obstruyen las redes de pesca y afectan el turismo (Sokolowski *et al.*, 2016).

#### **3.2.4. Plexauridae**

Los gorgonáceos son miembros de comunidades de arrecifes de coral que actúan como refugio para pequeños invertebrados como cangrejos, caracoles y estrellas de mar (Kumar *et al.*, 2018). Los tentáculos del pólipo se caracterizan por ser pinados. Son organismos modulares, los pólipos se encuentran anclados al eje o axis en su extremo aboral. Este eje tiene un cordón central y está rodeado por una corteza y una vaina axial compuesta por gorgonina, una proteína colágena fibrosa (Peters, 2016).

La vaina axial contiene canales longitudinales en donde se encuentran escleritos que difieren de los que se encuentran en el coenénquima, tejido continuo entre los pólipos constituido por la pared corporal superficial y los conductos gastrovasculares (Galloway *et al.*, 2007). Los ocho mesenterios de los octocorales son completos y están forrados por células gastrodérmicas, que pueden contener zooxantelas. Los filamentos mesentéricos son muy similares a los que exhiben los hexacorales, tienen una banda cnidoclandular, pero la banda y los lóbulos pueden estar muy reducidos (Peters, 2016).

Las gónadas de los octocorales se desarrollan dentro de la mesoglea de seis mesenterios. Pequeños grupos de células germinales se diferencian en espermatogonias, formando folículos espermáticos. Las divisiones meióticas progresan desde la periferia hacia el centro, donde se encuentran los espermatozoides maduros que tienen cabezas cónicas y colas acidofílicas delgadas, mientras que los ovocitos crecen individualmente rodeado de gastrodermis (Peters, 2016). Son principalmente gonocóricos, presentan gametogénesis continua, fertilización interna e incubación de embriones. La duración de la temporada de reproducción varía entre especies y depende de la ubicación geográfica (Kahng *et al.*, 2011; Hellström *et al.*, 2010).

De la misma forma que los corales escleractinios, los gorgonáceos son susceptibles a enfermedades, contaminación y blanqueamiento por estrés a la alta temperatura, por lo que son elementos frágiles de los ecosistemas arrecifales (Pakes y Woollacott, 2008).

### 3.3. Células Germinales

Las células germinales consisten en ovarios y espermatozoides; surgen de una pequeña población de células conocidas como Células Germinales Primordiales o Células Madre Germinales, que tienen un alto potencial germinativo (Wylie, 2000).

En especies con órganos diferenciados, generalmente durante las primeras etapas de la embriogénesis, migran a través de los tejidos del embrión para unirse a las células somáticas que forman las células accesorias de las gónadas (Solana, 2013).

En organismos basales como los cnidarios, las células madre intersticiales o células i, dan lugar tanto a células somáticas como a células germinales; se ha observado que constituyen una población de posibles células germinales primordiales que, en lugar de dividirse en una célula germinal primordial y en una célula somática al principio del desarrollo, se renueva a lo largo de la vida del cnidario, similar a una célula madre (Rebscher *et al.*, 2008).

En cnidarios, las células germinales se originan a partir de estas células madre intersticiales que consisten principalmente en dos tipos, células madre multipotentes (CMM) y células madre de línea germinal (CMGs). Las CMM poseen capacidades para autorrenovarse, así como de generar múltiples linajes celulares, como nematocistos, células nerviosas, y células glandulares. Las CMGs, por su parte, pueden renovarse por sí mismas, y sólo podrán generar células de la línea germinal; sirven como reservorio de linajes de células germinales en el mesenterio que producirán células germinales diferenciadas para eventos de desove posteriores, por lo que estas células funcionan como células madre de la línea germinal en cnidarios (Shikina *et al.*, 2015).

Las Células Primordiales Germinales en algunos metazoos como *Drosophila spp.* y *Caenorhabditis elegans* residen en un microambiente o nicho celular, que da soporte y brinda componentes de señalización celular; además, garantiza el equilibrio adecuado entre las células madre y progenitoras, y señales que median la respuesta equilibrada de las células madre a las necesidades del organismo. En cnidarios, se han localizado nichos de

células madre en *Hydra* y en el coral *Euphyllia ancora*, en la mesoglea de los mesenterios de donde migran a sus tejidos para diferenciarse (Bosch *et al.*, 2010; Shikina *et al.*, 2015).

Las células germinales poseen un citoplasma especializado compuesto de gránulos electrodensos que carecen de membrana y contienen ARN y complejos específicos de ribonucleoproteína (RNP), generalmente conocidos como gránulos germinales, plasma germinal o gránulos P, los cuales son esenciales para la determinación, conservación y función de la línea germinal (Maldonado *et al.*, 2011; Kulkarni y Extavour, 2017).

Los gránulos germinales se comparten entre diferentes grupos taxonómicos. Entre sus funciones se encuentra el silenciamiento de transposones en la transcripción de células germinales (Maldonado *et al.*, 2011). En el mecanismo de especificación de la línea germinal los genes compartidos son importantes e incluyen ARN helicasas, proteínas represoras traduccionales y pequeños reguladores de ARN Piwi (Yajima y Wessel, 2012; Gao y Arkov, 2013). Uno de los componentes de los gránulos germinales son proteínas de la familia Piwi.

Las células germinales tienen un estatus especial como mediadores de la supervivencia a largo plazo de las especies y exhiben varios mecanismos especializados para el control de la expresión de genes y para la protección de su genoma, uno de estos mecanismos protectores es el establecido por las proteínas Piwi (van Wolfswinkel, 2014).

La identificación de la línea germinal depende de marcadores moleculares. Al respecto, se ha demostrado que genes específicos de células madre germinales como Piwi son buenos marcadores para células madre intersticiales multipotentes y células madre germinales, por lo que el uso de estos marcadores es uno de los métodos más confiables para estudiar el comportamiento de las células germinales tempranas en cnidarios (Bosch *et al.*, 2010; Shikina *et al.*, 2015).

Las células madre somáticas conservan el potencial para generar células germinales, por lo que la presencia de las proteínas Piwi en estas células podría estar relacionada con ese potencial (Juliano *et al.*, 2011).

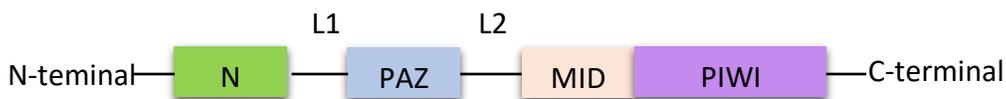
Por ejemplo, Piwi fue identificada en el coral escleractinio *Euphyllia ancora* en células de línea germinal en etapa temprana y se ha demostrado que es un marcador molecular confiable para identificar células de línea germinal en corales, además desempeña un papel

crucial en la formación, el mantenimiento y el desarrollo de células germinales, así como en la maduración de los gametos (Shikina *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2020).

### 3.4. La proteína Piwi

Los miembros de la familia de las proteínas argonautas son altamente conservadas y juegan un papel central en la regulación de redes de expresión génica estableciendo y manteniendo la identidad de las células a lo largo del ciclo de vida (Müller *et al.*, 2020).

Todas las estructuras de las proteínas argonautas están formadas por un lóbulo N-terminal y C-terminal unidos por dos enlaces denominados L1 y L2 (Fig. 1); el lóbulo N-terminal contiene un dominio variable N-terminal (N) y un dominio Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ) vinculados por L1, mientras que L2 une el lóbulo N-terminal con el lóbulo C-terminal que está formado por los dominios medio (MID) y PIWI (Jin *et al.*, 2021; Müller *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Representación lineal de los dominios de las proteínas argonautas.

Estas proteínas forman asociaciones con ARN por lo que es denominado el complejo de silenciamiento inducido por RNA, RISC por sus siglas en inglés. El mecanismo funcional de las proteínas argonautas es actuar como endonucleasas guiadas por ARN, que pueden cortar y silenciar la traducción de secuencias complementarias específicas, defendiendo así de ácidos nucleicos invasores (Jin *et al.*, 2021; Müller *et al.*, 2020).

Un representante importante de la familia de proteínas argonautas en células de la línea germinal es la proteína Piwi, o “P-element induced wimpy testis” que fue descubierta como un gen necesario para la proliferación de células germinales de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Lin y Spradling, 1997).

Las proteínas Piwi son conocidas por sus funciones en la línea germinal animal, ya que son esenciales para su desarrollo, mantenimiento y, junto con sus socios de unión, los piRNAs, median el silenciamiento de transposones. Recientemente, se han identificado

proteínas Piwi en células madre somáticas en diversos animales, la expresión en estas células podría estar relacionada con la capacidad de dichas células para contribuir a la línea germinal (van Wolfswinkel, 2014).

El desarrollo adecuado de las células de la línea germinal es vital para la preservación de las especies, por lo que los sistemas reguladores para la expresión génica deben operar en estas células. Uno de estos sistemas es la realizada por la asociación de proteínas Piwi con pequeños RNA conocido como Piwi-piRNAs que está implicado en la supresión de la actividad del elemento transponible. El RNA pequeño actúa como un guía que, mediante el emparejamiento de bases, dirige la proteína argonauta a un objetivo específico de RNA o DNA, lo que puede dar como resultado la inhibición de la traducción o la modificación epigenética (van Wolfswinkel, 2014).

Los transposones representan una gran parte del genoma y tienden a ser más activos en las líneas germinales; esto se debe a que muchos genes específicos de la línea germinal deben expresarse en las gónadas y, por lo tanto, los cromosomas deben mantenerse en una estructura más flexible durante un período. En tal entorno, los transposones tienen una mayor probabilidad de transponerse, lo que representa una amenaza considerable para la especie (Siomi y Kuramochi-Miyagawa, 2009; Nong et al., 2020).

El complejo Piwi-piRNA, reconoce los ARNs que dependen de la complementariedad de la secuencia y escinden las dianas mediante la actividad cortadora que posee el dominio Piwi. Con esta vía, el complejo reprime los retrotransposones en las células germinales, preservando la integridad del genoma. Piwi se ha estudiado en ratones, pez cebra y moscas que demuestran la necesidad de la vía piRNA en la represión de retrotransposones en los animales bilaterios (Maldonado et al., 2011; Watanabe et al., 2011).

En *Drosophila*, Piwi no sólo se expresa en la línea germinal sino en las células somáticas acompañantes, probablemente porque los retrotransposones presentes en ellas pueden dar lugar a partículas virales que pueden invadir la línea germinal. Por otro lado, el homólogo en cnidarios Cniwi, se expresa tanto en células de nicho somático como en células germinales en la medusa *Podocoryne carnea* (Solana 2013; Seipel et al., 2004).

Además, Bosch y colaboradores en 2010 identificaron en Hydra que Piwi se expresa tanto en las CMGs como en las CMM. Por otra parte, Shikina y colaboradores en el 2015 observaron que en el coral *Euphillia ancora* Piwi se expresa principalmente en células de la línea germinal dentro o cerca de la región gonadal y no se detectó en ninguna célula somática en el tentáculo, la boca y otros tejidos somáticos importantes, lo que sugiere que Piwi solo se expresa en células de la línea germinal de este coral.

Con base en lo anterior, vemos que Piwi es una proteína de células madre involucrada en el mantenimiento de las células madre somáticas y germinales, esencial para mantener la CMGs y se expresa tanto en células de nicho somático como en células germinales; es decir, en las células vecinas a las CMGs (Solana 2013; Seipel et al., 2004).

Debido a la relevancia de las CMGs en cnidarios y a su importancia en el desarrollo de estrategias de conservación, este estudio se enfocó en localizar a las CMGs en cuatro especies de cnidarios *Acropora palmata*, *Exaiptasia diaphana*, *Aurelia aurita* y un octocoral de la familia *Plexuridae* y su relación con gónadas, por medio de Piwi, marcador de CMGs y Células Madre Somáticas.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En cnidarios, el estudio sobre la ubicación y función de las Células Madre Germinales (CMGs) está en desarrollo. Sin embargo, en la mayoría de las especies este conocimiento es aún escaso. Adicionalmente, las CMGs han tomado relevancia para desarrollar técnicas de restauración de especies amenazadas o en peligro de extinción lo que está muy aunado a favorecer la variabilidad genética de estas especies.

Por esta razón, el presente trabajo se enfocó en localizar a las CMGs en cuatro especies de cnidarios: el coral arrecifal *Acropora palmata*, la medusa *Aurelia aurita*, la anémona *Exaiptasia diaphana* y un octocoral de la familia Plexauridae y analizar su relación con gónadas y mesenterios mediante el marcaje con Piwi, el cual es un marcador de CMGs y Células Madre Somáticas (CMS) que se ha empleado en otros cnidarios, invertebrados y vertebrados.

La información obtenida en este trabajo aportará conocimiento acerca de la ubicación tisular de las CMGs y el papel que juegan en la formación de gametos sexuales de diferentes especies de cnidarios; además, será útil en el desarrollo de técnicas para obtención de gametos in vitro que apoyen a la restauración ecológica basada en reclutas sexuales, como en corales formadores de arrecifes.

## 5. HIPÓTESIS

Si Piwi es una proteína relacionada con células madre germinales y células madre somáticas en cnidarios entonces será detectada en mesenterios y gametos de *Acropora palmata*, *Aurelia aurita*, *Exaiptasia diaphana* y el octocoral de la familia Plexauridae durante el desarrollo de gametos.

## 6. OBJETIVOS

### GENERAL

Analizar la presencia de la proteína Piwi y su relación con células madre germinales en tejidos de diferentes especies de cnidarios.

### PARTICULARES

1. Desarrollar el cultivo de medusas juveniles de *Aurelia aurita* y anémonas aposimbióticas de *Exaiptasia diaphana* para obtener organismos con desarrollo de gónadas.
2. Analizar por histología tejidos de *Acropora palmata*, *Exaiptasia diaphana*, *Aurelia aurita* y el octocoral de la familia Plexauride para confirmar la presencia de gónadas.
3. Identificar la expresión de Piwi por inmunohistoquímica en *Acropora palmata*, *Exaiptasia diaphana*, *Aurelia aurita* y un octocoral de la familia Plexauride.

## 7. MÉTODOS

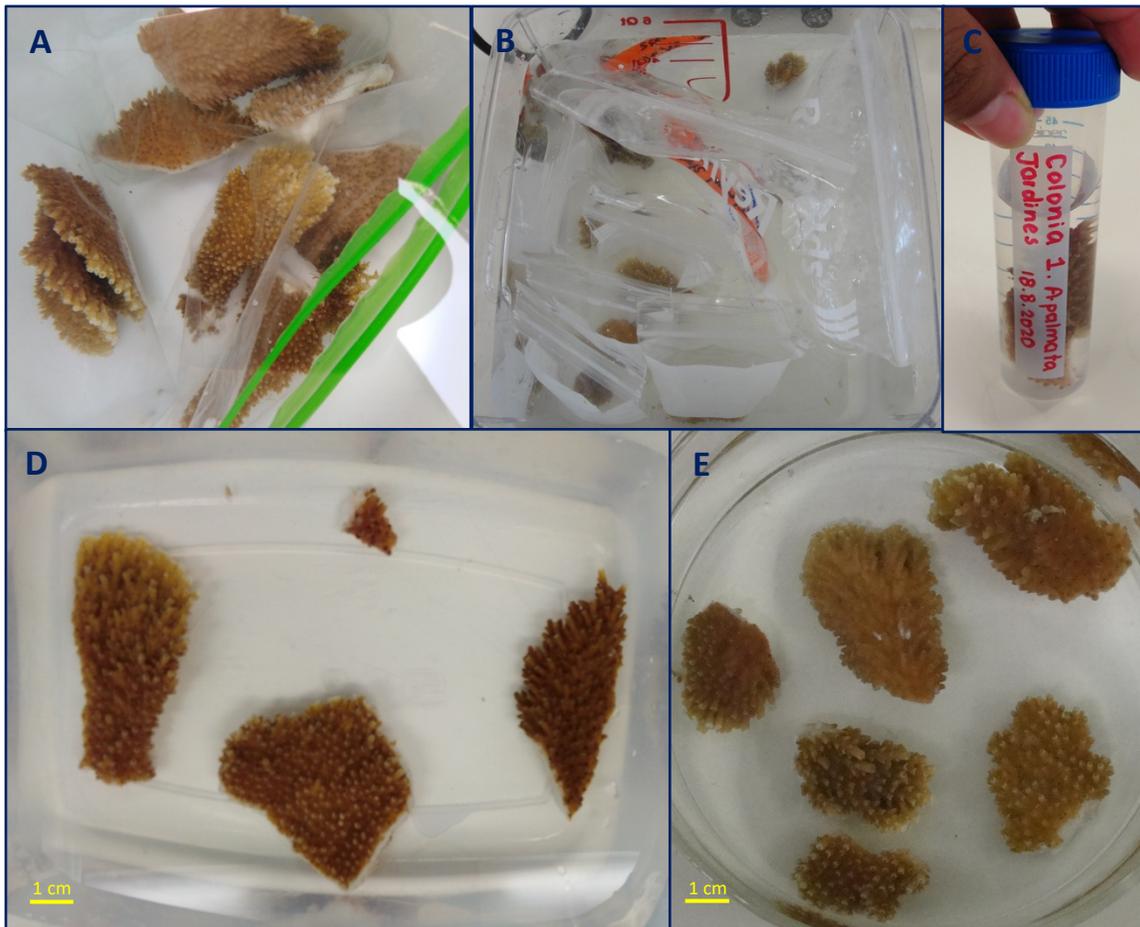
### 7.1. Obtención y mantenimiento de organismos

Los ejemplares usados se obtuvieron de diferentes fuentes: los fragmentos del coral *Acropora palmata* se recolectaron en dos arrecifes del Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos. *Exaiptasia diaphana* simbiótica y el octocoral de la familia Plexauridae se tomaron de los estanques de la zona de acuarios de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA). Además, se mantuvieron en cultivo organismos de *Exaiptasia diaphana* aposimbiótica, así como pólipos y juveniles de *Aurelia aurita* en el acuario de anémonas y medusas del Laboratorio de EvoDevo. También, se recibió una donación de medusas *Aurelia aurita* adultas de los acuarios del grupo Xcaret. Todo lo anterior se detalla a continuación.

- *Acropora palmata*

El coral Cuerno de Alce fue recolectado por medio de buceo autónomo (SCUBA) por parte de miembros del Laboratorio de Investigación Integral para la Conservación de Arrecifes (CORALIUM). Se recolectaron en dos arrecifes del Parque Nacional en fechas cercanas a la época de desove (Mendoza-Quiroz, Tecalco-Renteria y Banaszak, 2021): la primera colecta fue en el arrecife Jardines el 18 agosto del 2020 y la segunda en el arrecife La Ceiba el 22 julio 2021, se usaron los permisos de SEMARNAT número de oficio SGPA/DGVS/03661/20 y SGPA/DGVS/03784/21 respectivamente. En total fueron diez fragmentos de colonias distintas que se trasladaron al laboratorio (Fig. 2).

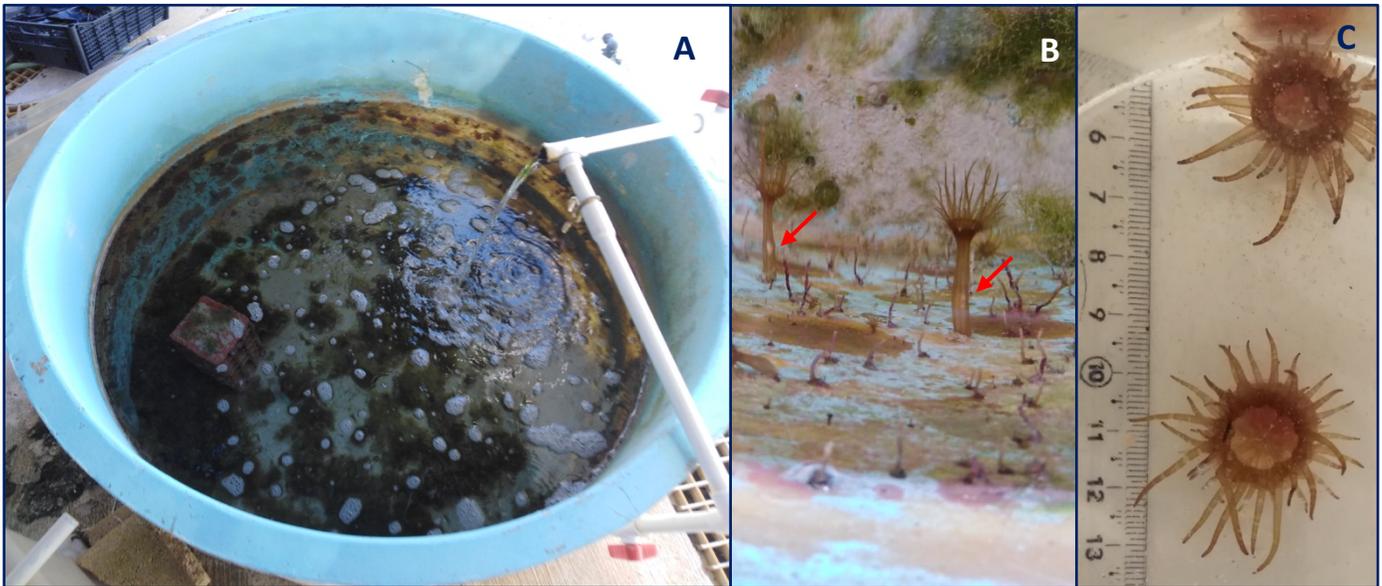
Para las observaciones histológicas e inmunohistoquímicas, cada fragmento se sumergió al instante en paraformaldehído al 4 % (PFA 4 %) con agua de mar filtrada por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y para el análisis de proteínas las muestras se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido para después almacenarse a -70 °C.



**Figura 2.** Fragmentos de *Acropora palmata*. A) Fragmentos provenientes del arrecife Jardines en agosto del 2020. B) Fragmentos del arrecife la Ceiba en julio 2021. C) Fragmentos en fijación en PFA. D) Fragmentos en AMF del arrecife Jardines. E) Fragmentos en AMF del arrecife la Ceiba.

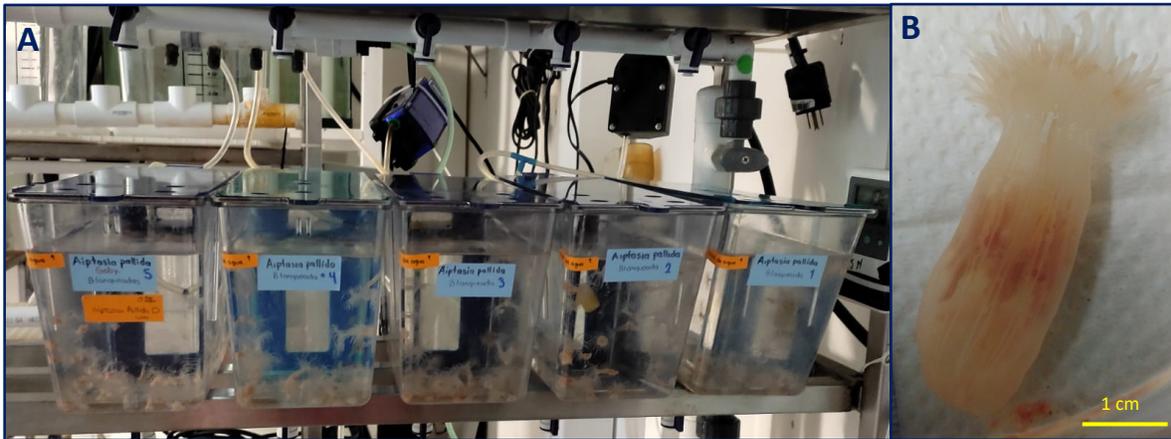
○ *Exaiptasia diaphana*

La anémona simbiótica fue recolectada del estanque de anémonas de la UASA donde crecen de manera natural; el permiso usado para la colecta fue otorgado por CONAPESCA con número de oficio PPF/DGOPA-093/20. Estas recibían agua proveniente de la laguna arrecifal, no recibían alimentación adicional y la temperatura del agua oscilaba entre los 29 y 31 °C. Durante julio de 2022 se observaron paquetes de gametos a través de las paredes del cuerpo por lo que se recolectaron organismos desprendiéndolos de las paredes del estanque con ayuda de una espátula plástica y se trasladaron al laboratorio en pequeñas peceras con agua de mar (Fig. 3). En el laboratorio, se anestesiaron agregando a las peceras 5 ml de  $MgCl_2$  al 7 % con AMF cada 15 o 20 min.



**Figura 3.** Estanque de *Exaipasia diaphana* y acercamiento de los organismos. 1) Estanque de anémonas simbióticas en condiciones naturales. 2) Anémonas adheridas a la pared del estanque en julio 2022. Se señala con flechas rojas los paquetes de gónadas en los mesenterios que se observan a través de las paredes des cuerpo. 3) Anémonas en peceras con AMF en el laboratorio.

Posteriormente, para la histología e inmunohistoquímica se sumergieron en PFA al 4 % y se almacenaron a 4 °C durante 24 h, o se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C para el análisis de proteínas. Al mismo tiempo, se mantuvo en cultivo una línea clonal de anémonas aposimbióticas de la misma especie, en el Acuario de anémonas y medusas del Laboratorio de EvoDevo; estas se propagaron asexualmente por laceración pedal en peceras de 3 L con agua de mar filtrada (AMF) (Fig. 4A). Se alimentaron cada 48 a 72 h con nauplios de *Artemia salina* de la marca Brine Shrimp Direct. El agua se mantuvo entre 21 y 22 °C, las peceras se conservaron conectadas a una bomba de aire y se realizaron cambios del 100 % de agua una vez por semana. Para más detalles acerca de este cultivo consultar el Anexo I al final de esta tesis.

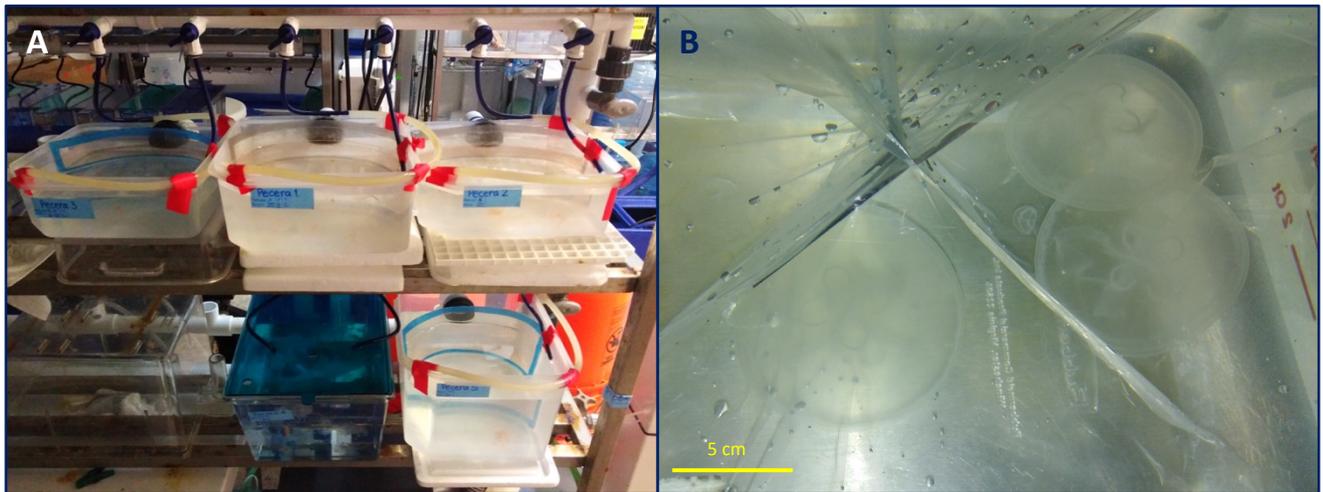


**Figura 4.** Peceras con anémonas aposimbióticas en cultivo. A) Anémonas de *E. diaphana* aposimbiótica, se observan organismos en diferentes tamaños. B) Anémona de aposimbiótica anestesiada en el laboratorio.

- *Aurelia aurita*

Los ejemplares de la medusa *Aurelia aurita* se obtuvieron de dos fuentes diferentes. Por un lado, se recibió una donación de pólipos del grupo Xcaret, en años anteriores a este trabajo. Se expandió el cultivo por clones y se mantuvieron en el acuario del laboratorio de EvoDevo. Algunos de estos pólipos se indujeron a la estrobilación por descenso de temperatura (21 a 10 °C), y las éfiras resultantes se trasladaron a peceras sin flujo y posteriormente las medusas juveniles se llevaron a peceras conectadas a un sistema de recirculación de agua marina (Fig. 5A). Se alimentaron cada 24 a 48 h con nauplios de *Artemia salina*, al pasar tres horas se retiraron los restos de alimento con pipetas y/o se realizaron cambios del 100 % de AMF y la temperatura del agua se mantenía entre 21 y 22 °C.

Para más información detallada sobre el cultivo de medusas, consultar el Anexo II. Se seleccionaron medusas que visiblemente presentaban los mayores diámetros, engrosamientos de los pliegues genitales y sin ningún daño en la campana o tentáculos. Estas se trasladaron al laboratorio en pequeños contenedores con AMF. El permiso usado para este cultivo fue otorgado por CONAPESCA con número de oficio PPF/DGOPA-093/20.



**Figura 5.** Cultivo de medusas y organismos donados por Xcaret. A) Diferentes tipos de peceras usadas para el cultivo de *Aurelia aurita* B) Medusas donadas por Xcaret en aclimatación.

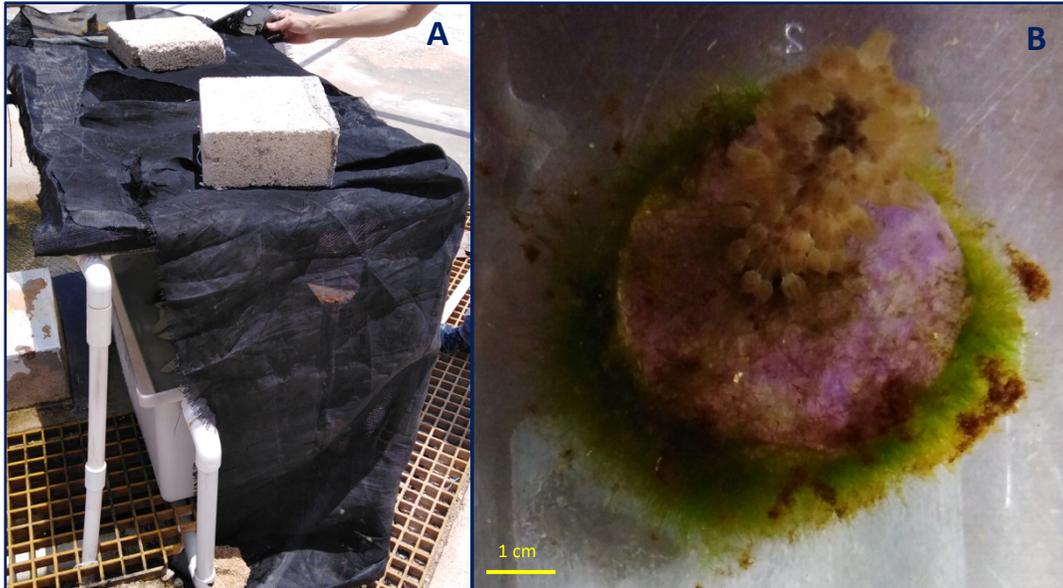
Por otro lado, se recibieron seis organismos adultos como donación del grupo Xcaret, estos se trasladaron al laboratorio donde se mantuvieron por aproximadamente dos horas en bolsas de plástico con cambios constantes de AMF para aclimatarlas (Fig. 5B). Ya en el laboratorio, los ejemplares se anestesiaron agregando 5 ml de  $MgCl_2$  al 7 % con AMF a las peceras en intervalos de 15 a 20 min hasta observar que el espécimen no respondía al contacto. A continuación, los organismos seleccionados para histología e inmunohistoquímica se sumergieron en PFA al 4 % y se almacenaron a 4 °C durante 24 h, y para el análisis de proteínas se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

Durante el tiempo de cultivo de *E. diaphana* aposimbiótica y *A. aurita* se realizaron revisiones constantes de los parámetros del AMF para mantener la temperatura a 21-22 °C, salinidad de 34 a 35 ppm, pH de 7.8 a 8.5 y concentración de amonio, nitritos y nitratos en niveles óptimos (Anexo I y II).

- Octocoral (Plexauridae).

Se tomó un único ejemplar de un octocoral de uno de los estanques en los acuarios de la UASA (Fig.6). Este organismo se identificó hasta nivel de familia como Plexauridae.

Se mantenía sin alimento adicionado, con agua de mar filtrada por filtro de calcetín bombeada de la laguna arrecifal, el rango de temperatura permanecía entre los 29 a 31 °C y se realizaba una limpieza semanal removiendo las algas (Fig. 6). El 14 de septiembre de 2020 se fijó colocándolo en PFA al 4 % y se almacenó a 4 °C.



**Figura 6.** A) Estanque del octocoral Plexauridae. B) Octocoral en el laboratorio.

## 7.2. Disección y observaciones

Con el fin de comprobar la presencia de gónadas y los principales tejidos relacionados con la gametogénesis se hizo la disección de algunos ejemplares de *Acropora palmata*, *Exaiptasia diaphana*, *Aurelia aurita* y una sección del octocoral. En el caso de los organismos con esqueleto calcáreo y/o proteico (*A. palmata* y Plexauridae) se descalcificaron como se indica en la siguiente sección, para después seleccionar algunos pólipos con ayuda de un bisturí número 21 de la marca Glassvan y colocarlos en una caja Petri de plástico con AMF. Todas las disecciones se realizaron bajo un microscopio estereoscópico Marca Leica modelo L2 y se tomaron fotografías con una cámara Sony modelo DSC-H20.

En los pólipos de *A. palmata* se realizó un corte longitudinal, y en el octocoral se realizó un corte transversal para exponer los tejidos teniendo especial cuidado de no afectar

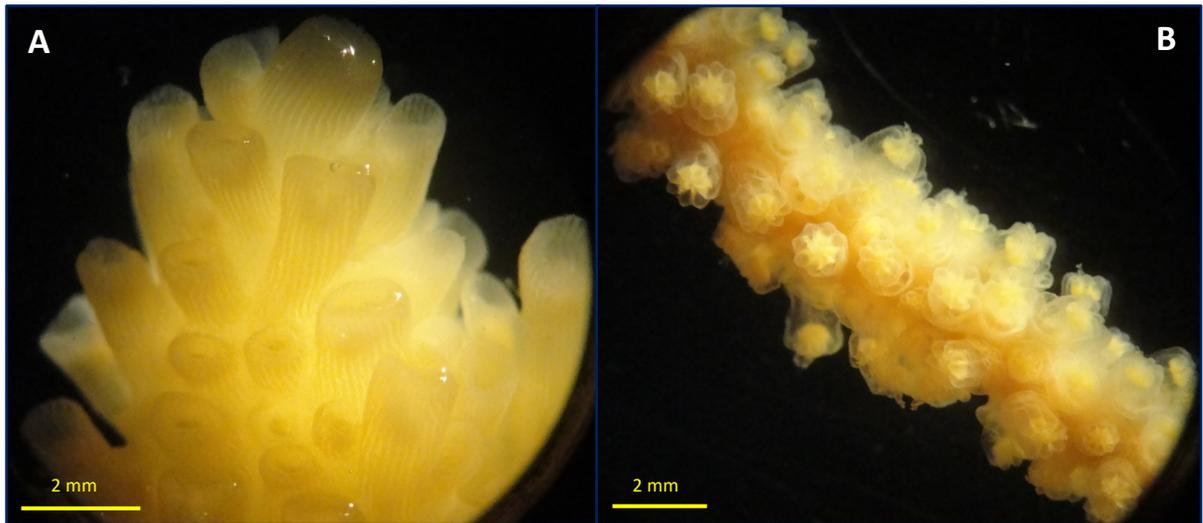
la cavidad gastrovascular. Se buscaron bultos de coloración distinta a los mesenterios que indican la presencia de gónadas o gametogénesis. Por otro lado, se realizó la disección de los pólipos de *E. diaphana* simbiótica y aposimbiótica. Después de anestasiarlas y fijarlas por 24 h se realizaron tres lavados con AMF y se colocaron en cajas Petri de plástico con AMF. Las disecciones se realizaron longitudinalmente para exponer los mesenterios y observar la presencia de abultamientos de coloración amarillenta o blanquecina.

Por último, después de la anestesia y la fijación los tejidos de medusa son mucho más delicados, por lo que cuidadosamente se retiró el fijador del recipiente que las contenía y se realizaron tres lavados con AMF filtrada. A continuación, se tomaron con espátulas para colocarlas en cajas Petri de plástico. En este caso, los tejidos de las medusas son de coloración transparente o ligeramente blanca por lo que los filamentos gástricos y los engrosamientos del pliegue genital son fácilmente reconocibles bajo el microscopio y no fue necesario hacer incisiones. En medusas juveniles y adultas se buscaron estructuras en forma de bolsas de coloración rosado o blanco.

### **7.3. Histología**

El reconocimiento de tejidos y la confirmación de la presencia o ausencia de gónadas se evaluó por métodos histológicos. Para esto, los fragmentos con esqueleto calcáreo (*A. palmata*) y/o proteico (Plexauridae) se descalcificaron para disolver el esqueleto, o escleritas en el caso del octocoral, y exponer los tejidos a una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M, pH 8.0 para posteriormente colocarse en agitación constante a 4 °C con recambios de la solución cada 48 h. El tiempo de descalcificación fue variable dependiendo del espécimen, para el octocoral fue durante 14 días mientras que para *A. palmata* fue de 30 días aproximadamente. Este proceso se detuvo cuando el esqueleto ya no era rígido y tenía aspecto de “esponja húmeda” (Fig. 7). A partir de aquí, el procedimiento para todos los ejemplares fue el mismo. Se llevaron a cabo tres lavados con AMF, después se inició la deshidratación en series de etanol desde 70 % a 100 %, los tejidos se aclararon en xilol y se lavaron dos veces en Paraplast marca Leica por 30 minutos. Posteriormente, se realizaron bloques de tejido embebidos en Parafina Paraplast con ayuda

de moldes de acero inoxidable Tissue-Tek donde se embebió a cada ejemplar, se recubrieron con más Parafina Paraplast y se colocó un cassette de inclusión M480 marca Simport, el cual se rellenó con parafina y se dejó enfriar en una superficie nivelada y fría. Con un micrótopo rotatorio marca Leica modelo RM2145, se realizaron secciones de 5  $\mu$  de grosor, se montaron en portaobjetos Superfrost Plus tratados con Poli-L-lisina al 0.01 % con agua Milli-Q y se dejaron secar por una noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, los tejidos se fijaron al fundir la parafina a 60 °C en una plancha de calentamiento.



**Figura 7.** Fragmento de *Acropora palmata* y el octocoral Plexauridae descalcificados. A) Pólipos de *A. palmata*. B) Ejemplar del octocoral de la familia Plexauridae.

Para algunas secciones histológicas se llevó a cabo una tinción para núcleos y citoplasma Hematoxilina de Harris-Eosina cuyo protocolo ajustamos para estos organismos (Anexo III) y otras secciones histológicas se conservaron a 4 °C hasta el proceso de inmunohistoquímica, descrita en el siguiente apartado. Las secciones teñidas fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia marca Carl Zeiss modelo Axioimager, y se tomaron fotografías en aumentos 10X, 20X y 40X con una cámara AxioCam y las imágenes fueron analizadas usando el software ZEN 2011 blue edition.

#### 7.4. Inmunohistoquímica

Por medio de las inmunotinciones se buscó la presencia de Piwi en los tejidos. Para ello, secciones almacenadas a 4 °C se desparafinaron en xilol y se hidrataron en series de etanol desde 100 % a 70 % y agua Milli-Q. Las secciones se permeabilizaron en acetona fría por 7 min a -20 °C, seguido de dos lavados de 5 min cada uno con Buffer Tris Salino (TBS) 1X (50 mM TrisBase, 150 mM NaCl, pH 7.5). Para, la recuperación antigénica se colocaron las laminillas en un vaso Coplin de plástico con buffer citrato a pH 6.0 con Tween 20 al 0.05 % en baño María y se calentaron en microondas a máxima potencia por 2:30 min dejando enfriar aproximadamente 30 min y se repitió este paso una vez más. Luego de dos lavados de 5 min cada uno en TBS 1X, se llevó a cabo un bloqueo de actividad peroxidasa distribuyendo por toda la superficie de cada laminilla 250 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1 % en metanol, se dejó incubando por 20 min a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda y al terminar se hicieron tres lavados en Buffer TNT (TBS + 0.05 % Tween 20). A continuación, se volvieron a colocar las laminillas en la cámara húmeda y se distribuyó 250 µl de buffer de bloqueo (TNT+BSA al 1 % + Suero de cabra al 10 %), se volvió a colocar parafilm y se incubó por 3 h a temperatura ambiente, al concluir, se drenaron las laminillas.

Posteriormente, sobre las secciones histológicas en la laminilla se incubaron 200 µl del anticuerpo primario por una noche a 4 °C en cámara húmeda. El anticuerpo primario empleado fue PIWI.1 de la marca GeneTex, isotipo IgG, policlonal, hecho en conejo, dirigido a ratón, con reactividad a humano, ratón y rata, y con aplicación en inmunohistoquímica en parafina (IHC-P). En todos los ensayos realizados se usó una concentración 1:100 en TNT+BSA al 1 %. Se usaron dos laminillas por sección de tejido: uno tratado con el anticuerpo primario y otro sin tratamiento de este anticuerpo que se usó como control negativo. Al día siguiente, se lavaron todas las secciones con TNT por 5 min, se drenó un poco cada laminilla y se adicionó 200 µl de la solución del anticuerpo secundario, se cubrió cada laminilla con papel parafilm y se dejaron incubando por 3 h a temperatura ambiente en cámara húmeda, al finalizar, se hicieron tres lavados en TNT cada uno de 5 min. El anticuerpo secundario usado fue de la marca Jackson ImmunoResearch, generado en cabra, anti-conejo, anti-IgG, conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) y con aplicación en IHC-P;

para todos los casos la concentración usada fue 1:1000 en TNT+BSA al 1 %. Para revelar, se usó como sustrato una solución de diaminobenzidina (DAM) del Kit ImmPACT DAB Peroxidase de Laboratorios Vector, que reacciona con HRP y produce una coloración marrón o café. Se preparó la solución de trabajo según lo indica el fabricante (30  $\mu$ l de cromóforo en 1000 $\mu$ l de diluyente) y se distribuyó 200  $\mu$ l a cada laminilla, se dejó incubando por máximo 5 min, se detuvo la reacción al sumergir las laminillas en agua de grifo y se lavaron bajo el chorro de agua por aproximadamente 5 min. Posteriormente se realizó una contratinción, adicionando a cada laminilla 200  $\mu$ l de hematoxilina QS de laboratorios Vector, por 1 min y se enjuagaron con agua de grifo hasta observar el viraje azul.

Finalmente, los tejidos teñidos se deshidrataron en lavados de etanol al 96 %, 100 % y xilol por 5 minutos cada uno, se dejó evaporando el xilol en la campana de extracción por aproximadamente 30 min, y se montó el cubreobjetos con medio de montaje acuoso VectaMount AQ de laboratorios Vector. Las secciones teñidas fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia marca Carl Zeiss modelo Axioimager en el cual se tomaron fotografías en aumentos 10X, 20X y 40X con una cámara AxioCam y las imágenes fueron analizadas usando el software ZEN 2011 blue edition.

### **7.5. Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot**

Se realizó la extracción de proteínas de cinco pólipos de *A. palmata*, una anémona *E. diaphana*, la cavidad gastrovascular y un organismo completo de la medusa *A. aurita*. Con las proteínas extraídas se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE, una tinción de proteínas en gel empleando el colorante Coomassie-azul-R-250, la transferencia de proteínas se hizo a una membrana de nitrocelulosa y por último la inmunodetección de Piwi. Se descongeló cada ejemplar y se colocó inmediatamente en 250  $\mu$ l Buffer Laemmli 1X con el equivalente a 250  $\mu$ l de perlas de vidrio (425- 600  $\mu$ m) de la marca Sigma-Aldrich, esta solución se sometió a agitación a 48 000 rpm por 3 minutos en el equipo Mini-BeadBeater marca BioSpec. Posteriormente, se calentó a 95 °C por 5 minutos, se centrifugó a 10 000 g por 10 minutos, se tomó la fase acuosa que contenía las proteínas y se reservó para cargar el gel de electroforesis.

Para la electroforesis, se preparó un gel discontinuo de acrilamida-bisacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Los reactivos utilizados fueron acrilamida PAGE al 40 % y methylenebisacrilamida al 2 %, ambos de la marca GE Healthcare Bio-Science. Para realizar el gel discontinuo, se preparó un gel de separación a concentración del 10 % de acrilamida y un gel de apilamiento al 4 % de acrilamida siguiendo las instrucciones del fabricante. La preparación detallada de los geles se muestra en el anexo IV. Una vez solidificado el gel, se cargó 5  $\mu$ l de las proteínas extraídas por pozo y 3  $\mu$ l del marcador de peso para proteínas BPG 12-step Protein Ladder, cada muestra por duplicado ya que una parte se usó para la tinción del gel y otra para transferencia de proteínas.

La electroforesis se corrió en el sistema Mini-Protean marca BIO-RAD en Buffer de corrida 1X a 60 V y 100 mA durante la electroforesis del gel de apilamiento (aproximadamente 30 min), y durante el gel de separación se modificaron los parámetros a 150 V y 200 A durante 2 h. Al terminar la separación de proteínas, se tomó el gel para teñirlo, el cual se lavó con agua Milli-Q en agitación por 10 minutos, se adicionó la solución colorante azul brillante de Coomassie-R-250 y se dejó en agitación constante a 4 °C durante una noche. Después de 24 h, se retiró el colorante, se lavó con agua Milli-Q y se adicionó la solución decolorante hasta notar el barrido de separación de las proteínas en color azul y el fondo transparente, finalmente se fotografió con un fotodocumentador marca UVP. Por otro lado, se efectuó la transferencia de proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Protran™ GE Healthcare) con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m, en Buffer de transferencia 1X con corriente constante de 100 V y 350 mA por 1 h. A continuación, esta membrana se bloqueó al sumergirla en BSA al 3 % en PBS (Buffer fosfato Salino) y se dejó en agitación durante 1 h a 50 °C. Se diluyó el anticuerpo primario PIWI.1 en concentración 1:1000 en PBS, se adicionó a la membrana y se dejó incubando en agitación constante a 4 °C durante una noche. Luego de 24 h, se realizaron 5 lavados con PBS cada uno por 5 minutos para después dejar incubando el anticuerpo secundario diluido en PBS por 3 h a temperatura ambiente, la concentración usada fue 1:5000.

Los anticuerpos empleados fueron los mismos descritos en la sección de inmunohistoquímica, con modificación en las concentraciones usadas tal como se indicó

anteriormente. Para revelar se realizaron 5 lavados en PBS por 5 minutos y finalmente se reveló con DAB, usando el kit ImmPACT DAB Peroxidase de laboratorios Vector, se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante (30  $\mu$ l del cromóforo por cada ml de disolvente). Se incubó por aproximadamente 10 minutos y se detuvo la reacción colocando la membrana en agua corriente, se dejó secar y se tomaron fotografías un fotodocumentador marca UVP. Para más detalles acerca de la preparación de soluciones, consultar el anexo IV.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Cultivos

- *Exaiptasia diaphana*

El cultivo de anémonas aposimbióticas requirió establecer las condiciones ideales para mantener una línea clonal que se reprodujeron durante dos años por medio de laceración pedal que es un modo de reproducción asexual. Debido a que estas anémonas carecen de su simbiote fotosintético requiere alimentación continua, de varias veces a la semana. Sin embargo, en estos organismos no se observó formación de gametos (ver abajo), independientemente del tamaño de los organismos y de la disponibilidad de espacio y alimento. Durante el desarrollo de este cultivo se mantuvieron los parámetros necesarios para la inducción a la gametogénesis. La temperatura se mantuvo entre los 21 y 22 °C y los ciclos de luz fueron de 14 h de luz y 10 h de oscuridad.

Aunque los organismos comían adecuadamente, crecían y mantenían la producción de clones, las anémonas de mayor longitud corporal observadas fueron de aproximadamente 2 cm de longitud del cuerpo, a diferencia de los organismos simbióticos en donde se observaron anémonas de hasta 3 a 5 cm aproximadamente. Todos los cuidados descritos en el anexo I fueron adecuados para mantener el cultivo y expandir la población, no obstante, no se logró inducir la gametogénesis. Contrario a lo observado en *Exaiptasia diaphana* simbiótica que sí presentaron gametos en julio del 2021 y que se podían observar a través de la pared del cuerpo (Fig. 3B)

Las anémonas simbióticas de este estanque permanecieron a la intemperie, la temperatura del agua en julio fue de 29 a 30 °C, eran resguardadas de la luz solar directa con una malla sombra y el alimento que recibían era el que llegaba por medio del agua marina bombeada de la laguna arrecifal.

- *Aurelia aurita*

En las medusas en cultivo observamos un crecimiento lento a pesar de los esfuerzos por mantenerlas en las mejores condiciones de alimentación y de calidad del agua marina. Con el fin de obtener medusas adultas se indujo la metamorfosis en los pólipos larvarios, conocida como estrobilación. La estrobilación por descenso de temperatura inició el 25 de octubre del 2020, las primeras éfiras se obtuvieron el 22 de noviembre del mismo año, los organismos juveniles entre julio y agosto del 2021 y se logró observar un único organismo de 7 cm de diámetro con desarrollo evidente de gónadas en diciembre del 2021 (Fig. 8). El cultivo culminó en diciembre del 2021. Durante las primeras etapas de las éfiras de *A. aurita* la alimentación se realizó diariamente y fue más abundante hasta alcanzar diámetros de aproximadamente 7 mm.



**Figura 8.** Medusa de *Aurelia aurita* con gónadas. A) Vista general del organismo, en donde las gónadas son evidentes en dos de las bolsas gástricas. B) Acercamiento a las bolsas gástricas, se señalan gónadas en formación en la bolsa gástrica contigua.

Con la finalidad de optimizar el crecimiento de las éfiras y las medusas juveniles, se probaron diferentes tipos de peceras dependiendo del tamaño y estado de las medusas.

Por ejemplo, los organismos más pequeños se mantenían en peceras chicas sin flujo continuo y con abundante comida, mientras que organismos juveniles y adultos se mantenían en peceras con flujo continuo acopladas al sistema de recirculación de agua marina filtrada y se disminuyó la cantidad de alimento. De esta forma se buscó que cada pecera fuera apropiada para cada etapa de crecimiento. Se observó una mejor maduración de las medusas juveniles en las peceras de 2, 3.5 y 7 L dentro del sistema de recirculación continua, ya que el crecimiento de los organismos en estos recipientes era notablemente mayor que en los otros tipos de peceras, además en la pecera de 7 L fue donde se observó la única medusa que tuvo gónadas. El cultivo se mantuvo entre los 21 y 22 °C, ciclos de 14 h de luz y 10 h de oscuridad. Nuestro cultivo de medusas resultó ser adecuado para el crecimiento de medusas juveniles y adultas, pero no totalmente eficiente para la inducción de la gametogénesis.

## 8.2. Análisis histológicos y de la expresión de Piwi en diferentes Cnidarios

En la tabla 1 se presenta un resumen de los diferentes cnidarios en los cuales se detectó la presencia de gónadas en los tejidos mesentéricos. Estos resultados se describen con más detalle en la siguiente sección en donde se presentan los resultados del análisis histológico e inmunohistoquímico por de cada tipo de cnidario.

<b>Tabla 1. Resumen de ejemplares con gónadas.</b>	
<b>Organismo</b>	<b>Presencia de gónadas</b>
<i>Acropora palmata</i>	X
<i>Exaiptasia diaphana</i> (simbiótica)	✓
<i>Exaiptasia diaphana</i> (aposimbiótica)	X
<i>Aurelia aurita</i> (Cultivo)	✓
<i>Aurelia aurita</i> (Xcaret)	X
Plexauridae	X

✓ = Con gónadas

X = Sin gónadas

### **8.2.1. Coral *Acropora palmata***

#### **Disecciones**

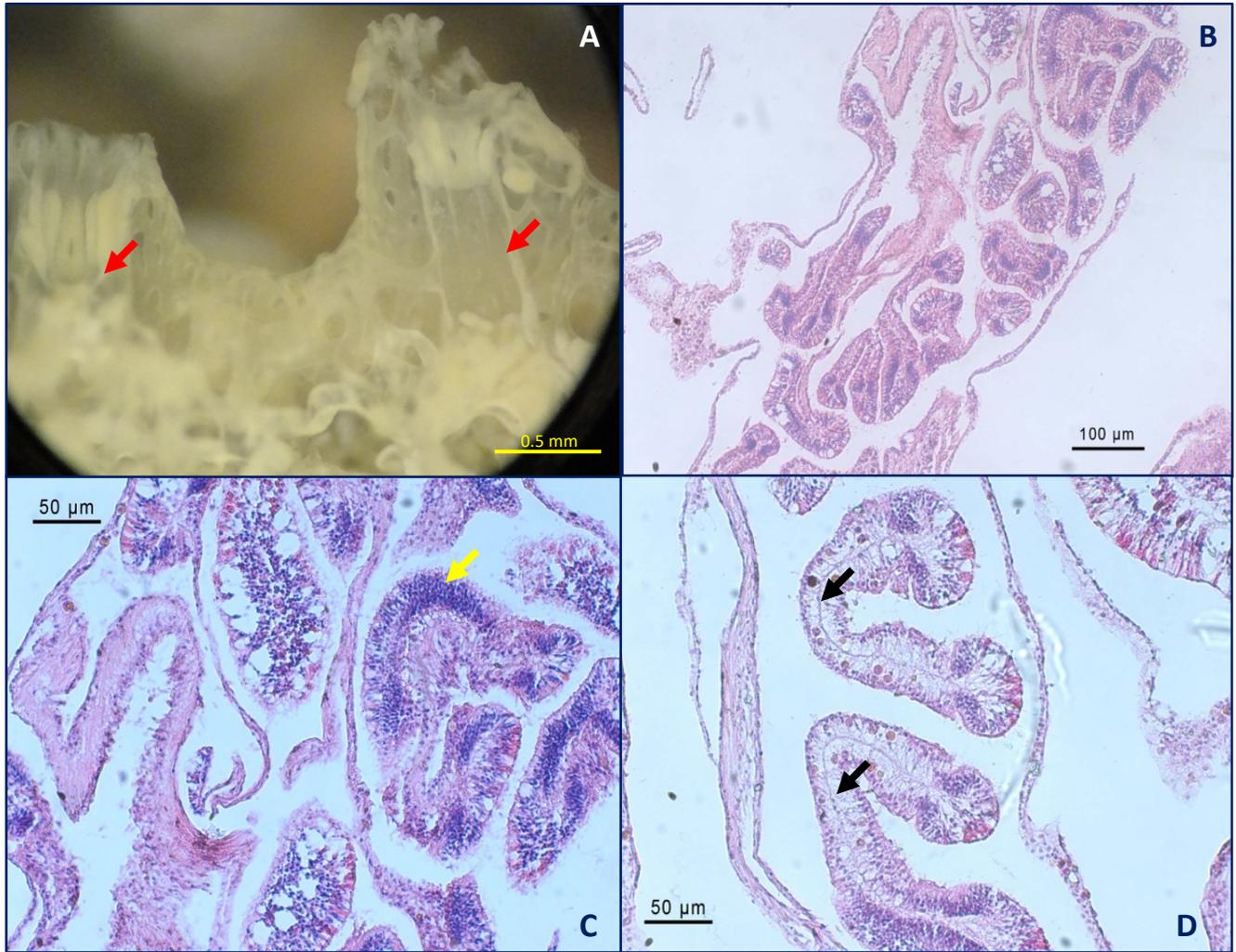
No se notó evidencia de gónadas ni del algún desarrollo gonadal ya que no se encontraron abultamientos de los mesenterios o cambios de coloración, a pesar de que los fragmentos fueron obtenidos en fechas muy cercanas a la época de desove de este coral (Fig. 9A).

#### **Histología**

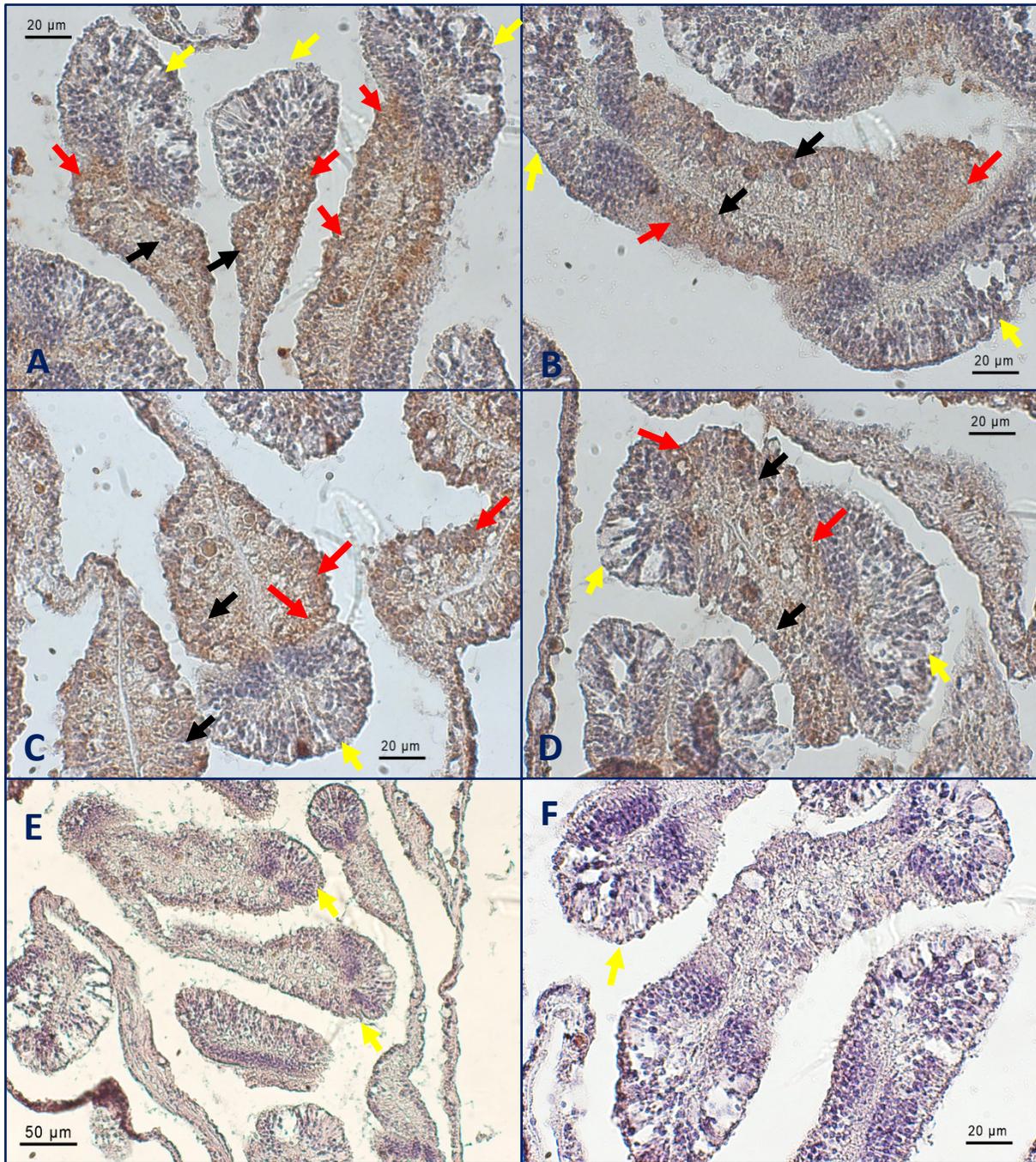
En la figura 9 se presentan las micrografías de la tinción de núcleos y citoplasmas de la cavidad gastrovascular de los pólipos de *A. palmata* en donde se hace énfasis en los mesenterios (Fig. 9 B-D). Los mesenterios y filamentos no presentan gónadas en la región gonadal (Fig. 9A), no se observan rastros de folículos espermáticos u ovocitos en crecimiento de la mesoglea (Fig. 9D); sin embargo, se observan bastantes células somáticas en algunos mesenterios (Fig. 9C). Estas observaciones fueron las mismas independientemente de la fecha y lugar de colecta. Estas características concuerdan con organismos que ya han desovado o que, por lo contrario, no presentaron gametogénesis. Cabe mencionar que en experimentos previos por otros miembros del grupo de investigación se habían detectado tanto ovocitos como espermarios en pólipos de esta misma especie de coral.

#### **Inmunohistoquímica**

La expresión de la proteína Piwi estuvo presente en células somáticas mesentéricas, que coincide con ser la misma zona donde ocurre la formación de gónadas (Fig.10 A-D). Sin embargo, las células somáticas de los filamentos mesentéricos (adyacentes a los mesenterios) no se marcaron con la inmunotinción de anti-Piwi. Junto con las imágenes que muestran la expresión de Piwi, también se presentan fotografías de los tejidos tratados como controles negativos (sin el anticuerpo primario, añadiendo sólo el anticuerpo secundario) en donde no se observa la expresión Piwi (Fig. 10 E y F).



**Figura 9.** Secciones histológicas de pólipos de *Acropora palmata* y tejidos mesentéricos con tinción de H/E para núcleos y citoplasma. A) En flechas rojas se indica la cavidad gastrovascular de pólipos descalcificados. B) Mesenterios en la cavidad gastrovascular. C) Mesenterios sin ovocitos o folículos espermáticos, la flecha amarilla señala la región gonadal con abundantes células somáticas. D) Las flechas en negro apuntan la mesoglea de los mesenterios.



**Figura 10.** Inmunotinciones de mesenterios de *Acropora palmata*. A-D) Mesenterios y filamentos mesentéricos. Se observa una clara señal de Piwi en un gran número de células somáticas, mientras que en los filamentos gástricos no se detectó inmunotinción. E-F) Controles negativos de la inmunodetección. Flechas rojas: células inmunomarcadas con Piwi; Flechas negras: Células somáticas sin marcaje con Piwi; Flechas amarillas= filamentos mesentéricos.

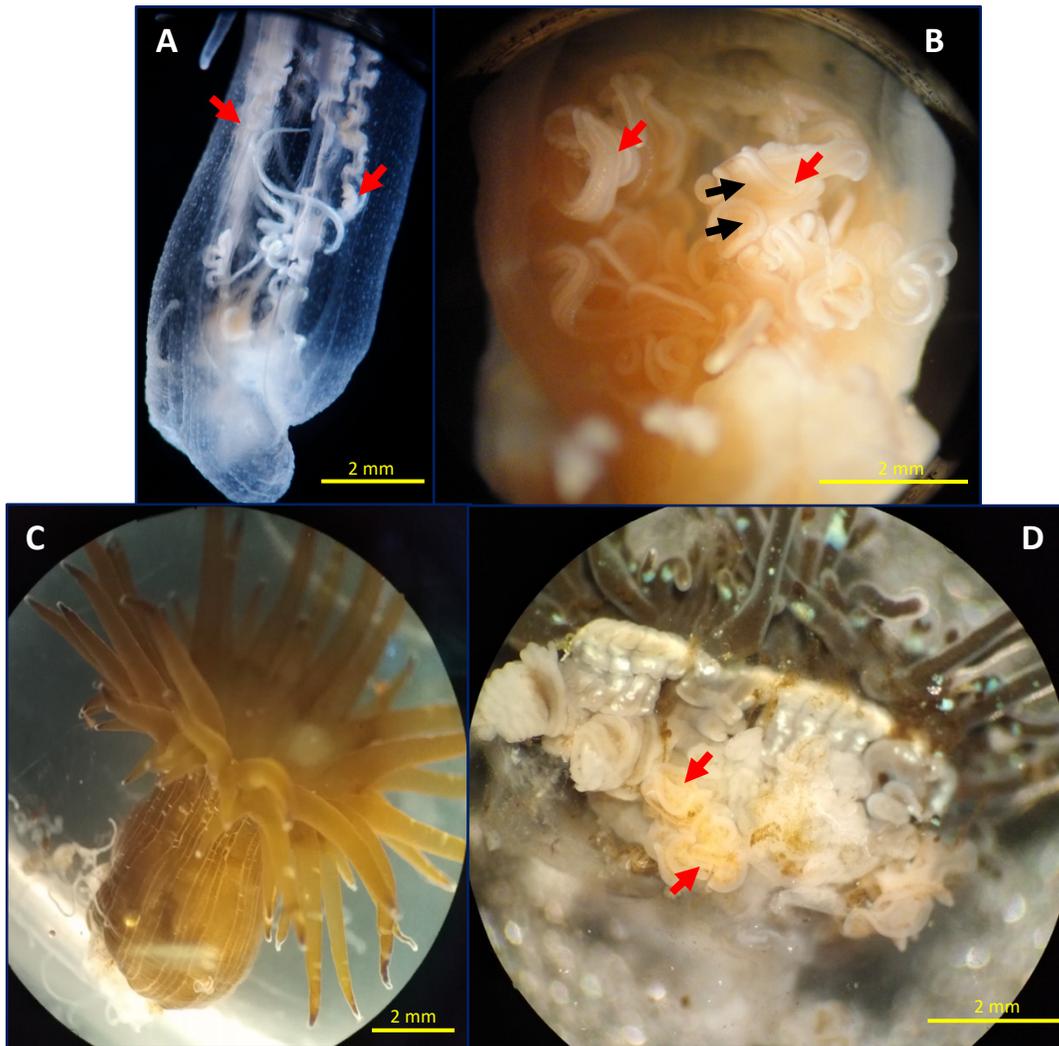
### 8.2.2. Anémona *Exaiptasia diaphana*.

#### Disecciones

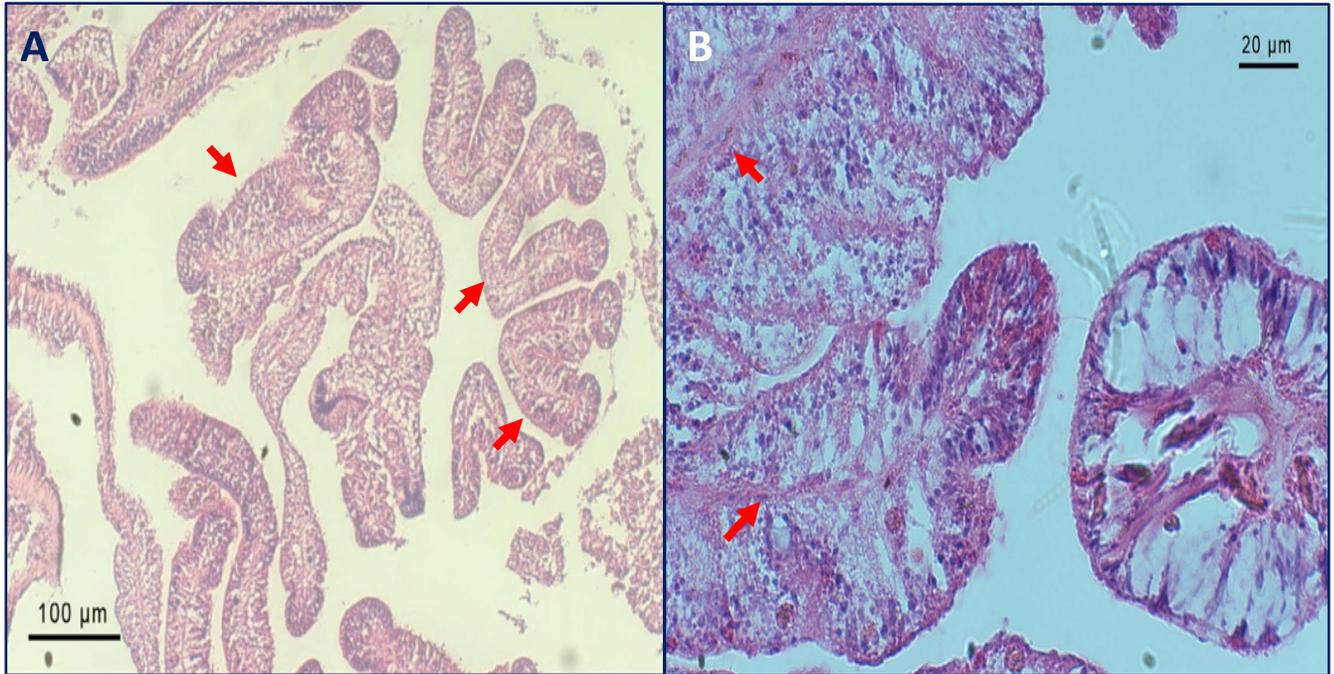
Derivado del cultivo de anémonas aposimbióticas se obtuvieron ejemplares de alrededor de 2 cm de longitud del cuerpo. Debido a la ausencia de simbioses fotosintéticos con altos niveles de pigmentos, la observación de la cavidad gastrovascular a través de las paredes del cuerpo es sencilla, lo que permitió la observación de los mesenterios. No se apreció a simple vista el desarrollo de gónadas (Fig. 11A). Al disectar a las anémonas aposimbióticas y exponer los mesenterios, estos presentaban coloración rosada con un tamaño y grosor muy uniforme entre ellos, más, sin embargo, no fue posible observar gónadas (Fig. 11B). Aunque la longitud promedio de las anémonas simbióticas estaba cerca de los 3 cm, a lo largo del día esto varía observándose organismos incluso más largos en horas específicas del día. A diferencia de los organismos aposimbióticos, en julio del 2021 se observó la presencia de paquetes de gametos a través del cuerpo (Fig. 3B), al exponer los mesenterios se notó que algunos presentaron coloración amarillenta y pequeños bultos lo que sugirió la existencia de gónadas (Fig. 11D).

#### Histología

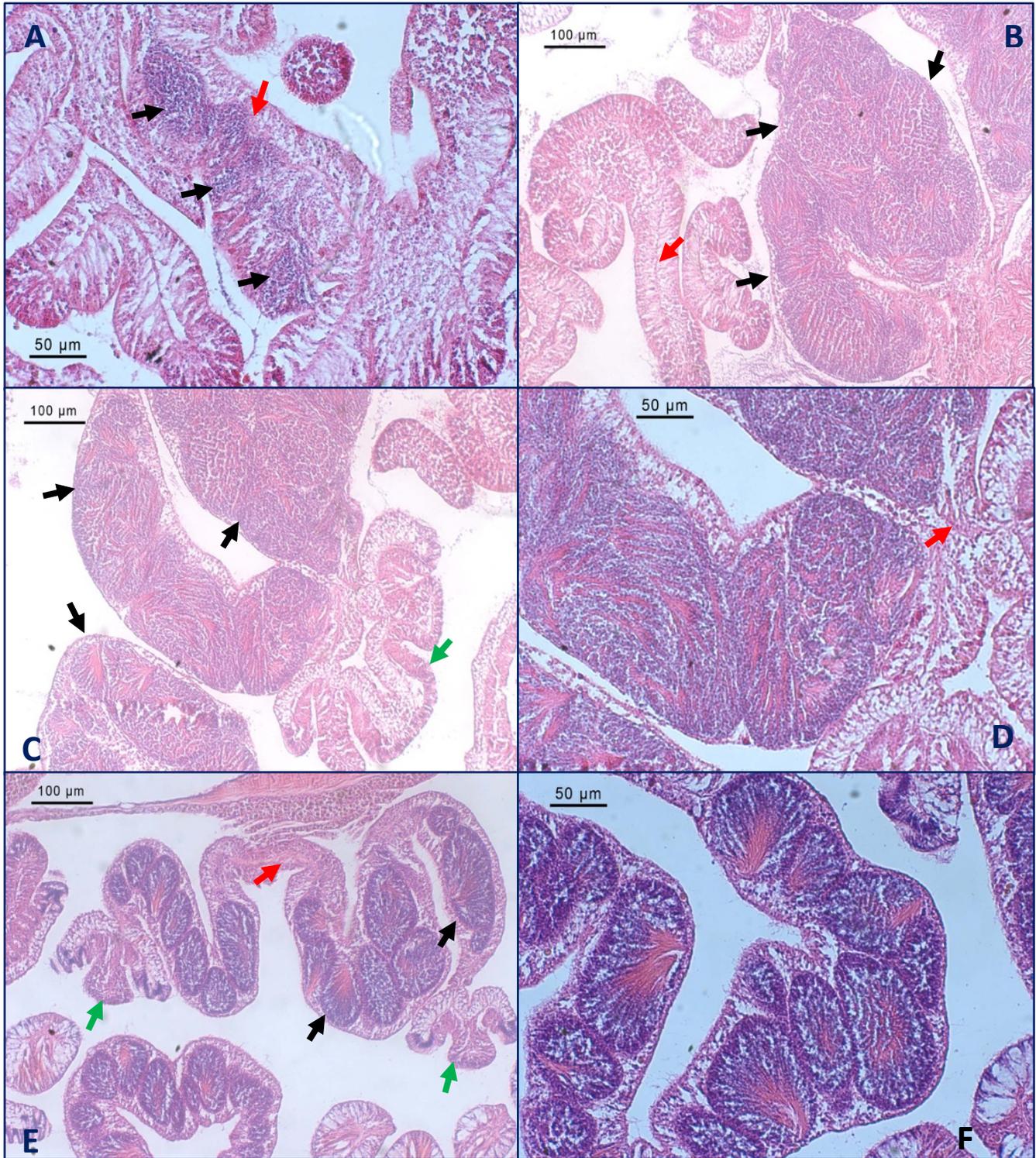
La ausencia de gónadas en anémonas aposimbióticas, en contraste con la presencia de gónadas en las anémonas simbióticas detectadas en las disecciones, fue corroborado por medio de las observaciones histológicas, en donde independientemente del tamaño y la época, los mesenterios de las anémonas aposimbióticas no presentaron folículos espermáticos u ovocitos, ni en la mesoglea, ni en la región de los mesenterios (Fig. 12). Las anémonas de *Exaiptasia diaphana* simbióticas fueron todos machos, estos presentaron folículos espermáticos creciendo desde la mesoglea, se encontraban en estadios de madurez gonádica desde II a V, pero en su mayoría en estadio V, ya que se observan espermatozoides con colas bien definidas (Fig. 13). Los racimos de folículos se formaron a lo largo de los mesenterios llegando hasta la base de los filamentos mesentéricos, se formaron bultos o bolsas de folículos de gran tamaño (Fig. 13). Debido a la ausencia de gónadas en las anémonas aposimbióticas no se continuaron más estudios con ellas.



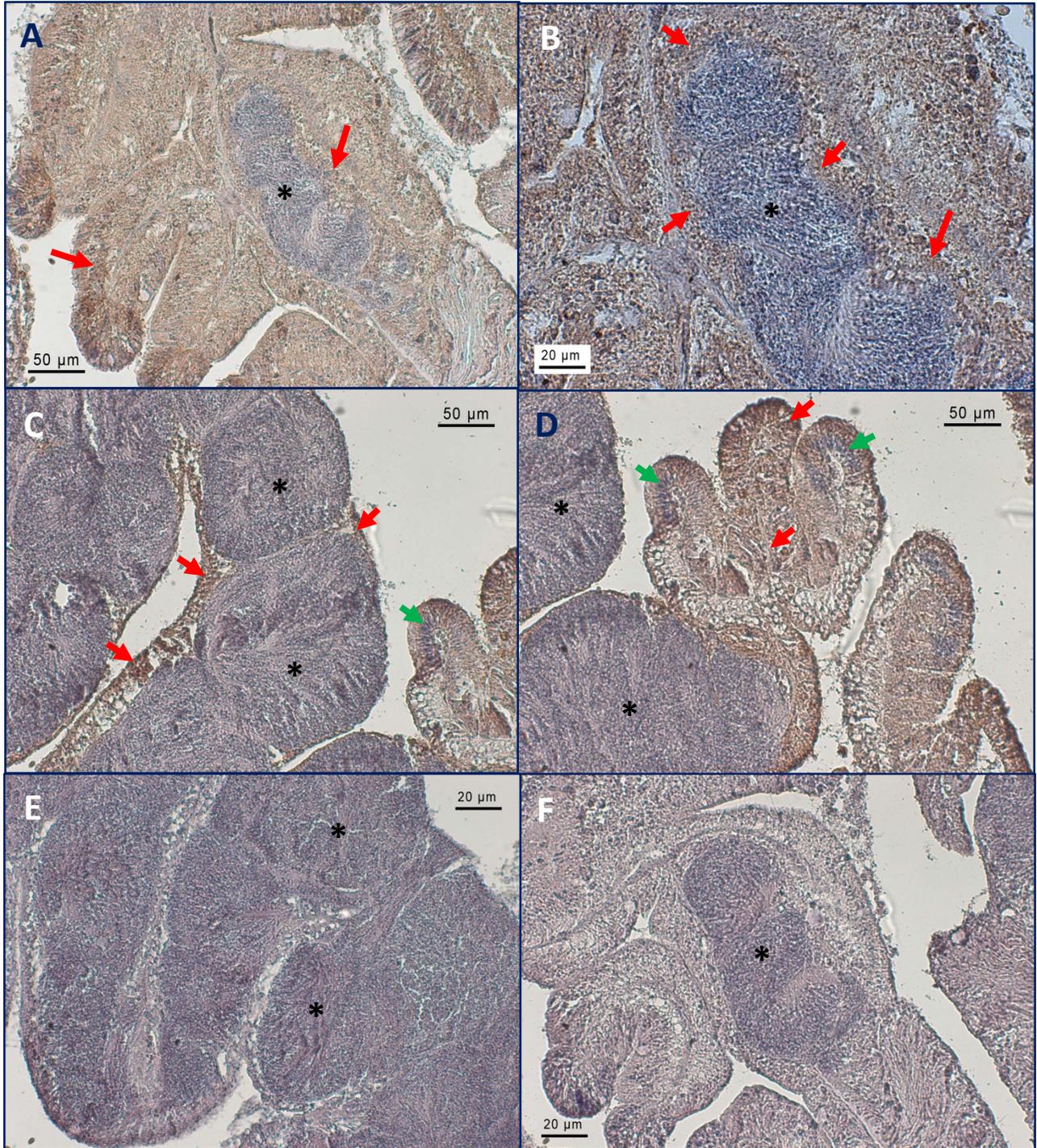
**Figura 11.** Organismos y cavidad gastrovascular de *Exaiptasia diaphana* aposimbiótica y simbiótica. A) Acercamiento del cuerpo de la anémona aposimbiótica, se señalan los filamentos mesentéricos que se observan a través de las paredes del cuerpo. B) Filamentos mesentéricos y mesenterios de una anémona aposimbiótica. En flechas rojas se indican los filamentos mesentéricos y en flechas negras los mesenterios. C) Ejemplar de *Exaiptasia diaphana* simbiótica con el cuerpo retraído. D) Cavidad gastrovascular expuesta de un organismo simbiótico, se hace énfasis en la coloración amarillenta de algunos los mesenterios.



**Figura 12.** Secciones histológicas de los tejidos mesentéricos de *Exaiptasia diaphana* aposimbiótica teñidos con H/E. A) cavidad gastrovascular, se señalan algunos de los mesenterios. Estos organismos carecen de gónadas. B) Acercamiento del mesenterio, las flechas apuntan la mesoglea que carecen de agrupaciones de gametos.



**Figura 13.** Micrografías de secciones histológicas de mesenterios de *Exaiptasia diaphana* simbiótica con folículos espermáticos en diferentes estadios de madurez. A) Mesenterio con folículos espermáticos en estadio II de desarrollo gonadal que crece a partir de la mesoglea. B) Se señalan abundantes folículos espermáticos en estadio IV de desarrollo en uno mesenterios, mientras que en los aledaños no se encuentran rastros de gónadas. C) Mesenterios con folículos espermáticos y la banda cnidoglandular en el filamento mesentérico. D) Acercamiento a los folículos en formación partiendo de la mesoglea. E) Mesenterio con varios folículos en estadio V. F) Acercamiento de los folículos en donde se aprecian espermatozoides con flagelos al centro. Flechas negras: folículos espermáticos; Flechas rojas: mesoglea; Flechas verdes: filamentos mesentéricos.



**Figura 14.** Inmunotinciones de los mesenterios de *Exaiptasia diaphana* simbiótica. A) Folículos espermáticos entre mesenterios inmunomarcados con Piwi. Notar que la expresión se exhibe en las células circundantes a los folículos. B) Acercamiento del folículo en donde se aprecian células anti-Piwi positivas aledañas a los folículos. C) Parte de un mesenterio con folículos grandes rodeados por una capa delgada de células positivas a Piwi. D) Aproximación al filamento mesentérico, se aprecia la expresión de Piwi en gran parte de las células del filamento. E y F) Controles negativos, no se percibe coloración marrón que indique la expresión de Piwi. Asterisco: Folículo espermático; Flecha roja: Región de expresión de Piwi; Flecha verde: Cnidocitos.

## **Inmunohistoquímica**

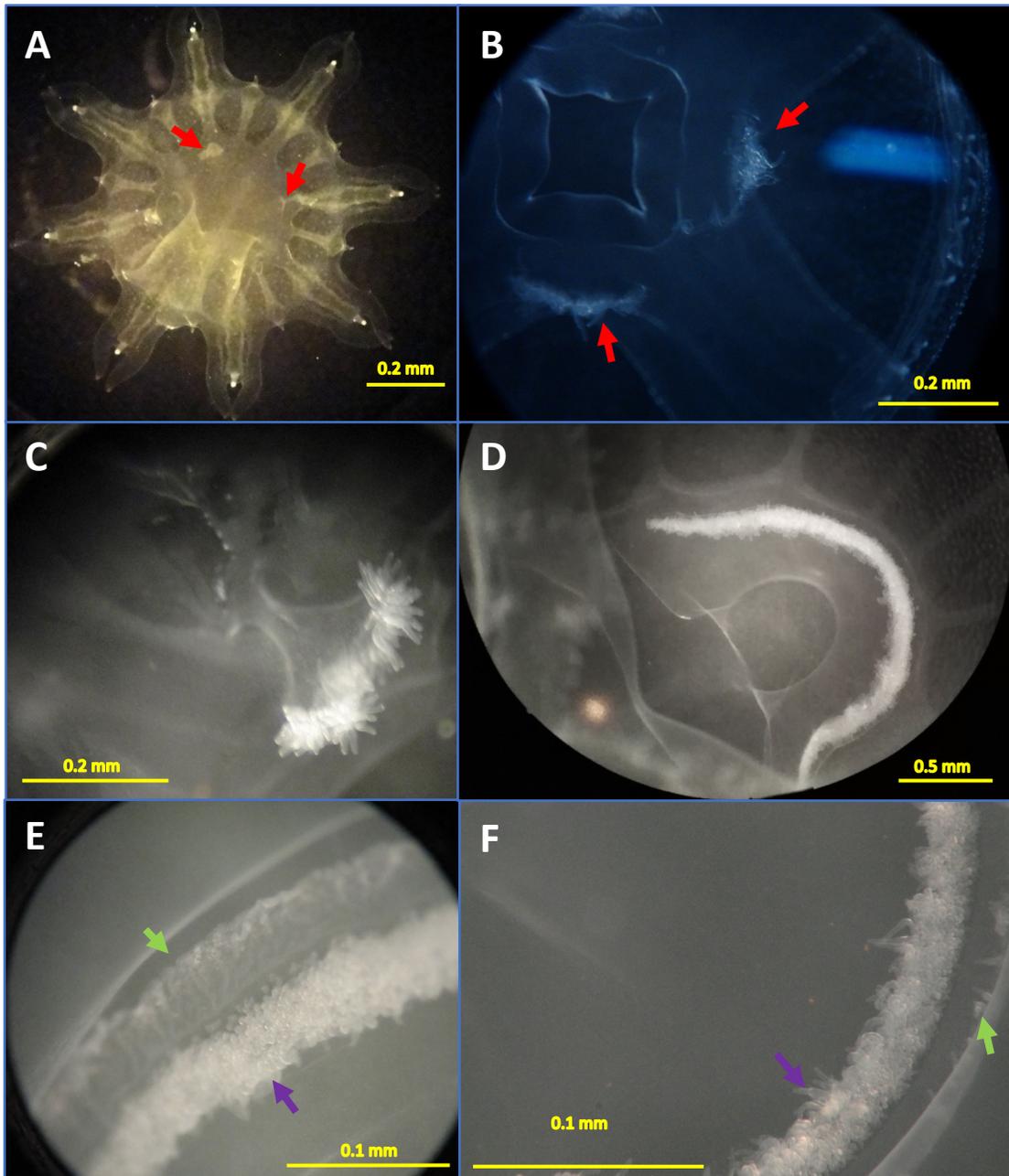
El análisis inmunohistoquímico se realizó para localizar la proteína Piwi en las anémonas *Exaiptasia diaphana* con gametos. Los tejidos que mostraron inmunoreactividad fueron las células somáticas mesentéricas circundantes a los folículos espermáticos, y en gran parte de las células de los filamentos mesentéricos, pero no así las células somáticas de los filamentos gástricos (Fig. 14). La expresión de Piwi es amplia, se presenta prácticamente en todo el mesenterio, aunque se restringe a células espermáticas desde estadios tempranos de desarrollo (Fig. 14 A y B) hasta estadios avanzados (Fig. 14 C y D). A diferencia de lo observado en filamentos mesentéricos del coral *A. palmata*, los filamentos espermáticos de la anémona simbiótica presentaron señal positiva anti-Piwi, a excepción de algunas células que presentan una coloración azul (Fig. 14D). Se observaron folículos de menor desarrollo y tamaño rodeados de abundantes células somáticas, contrario a folículos maduros que ocupan gran parte del tejido mesentérico, mientras que las células circundantes reducen considerablemente su abundancia por lo que se observa una capa muy delgada de tejido mesentérico.

### **8.2.3. Medusa *Aurelia aurita***

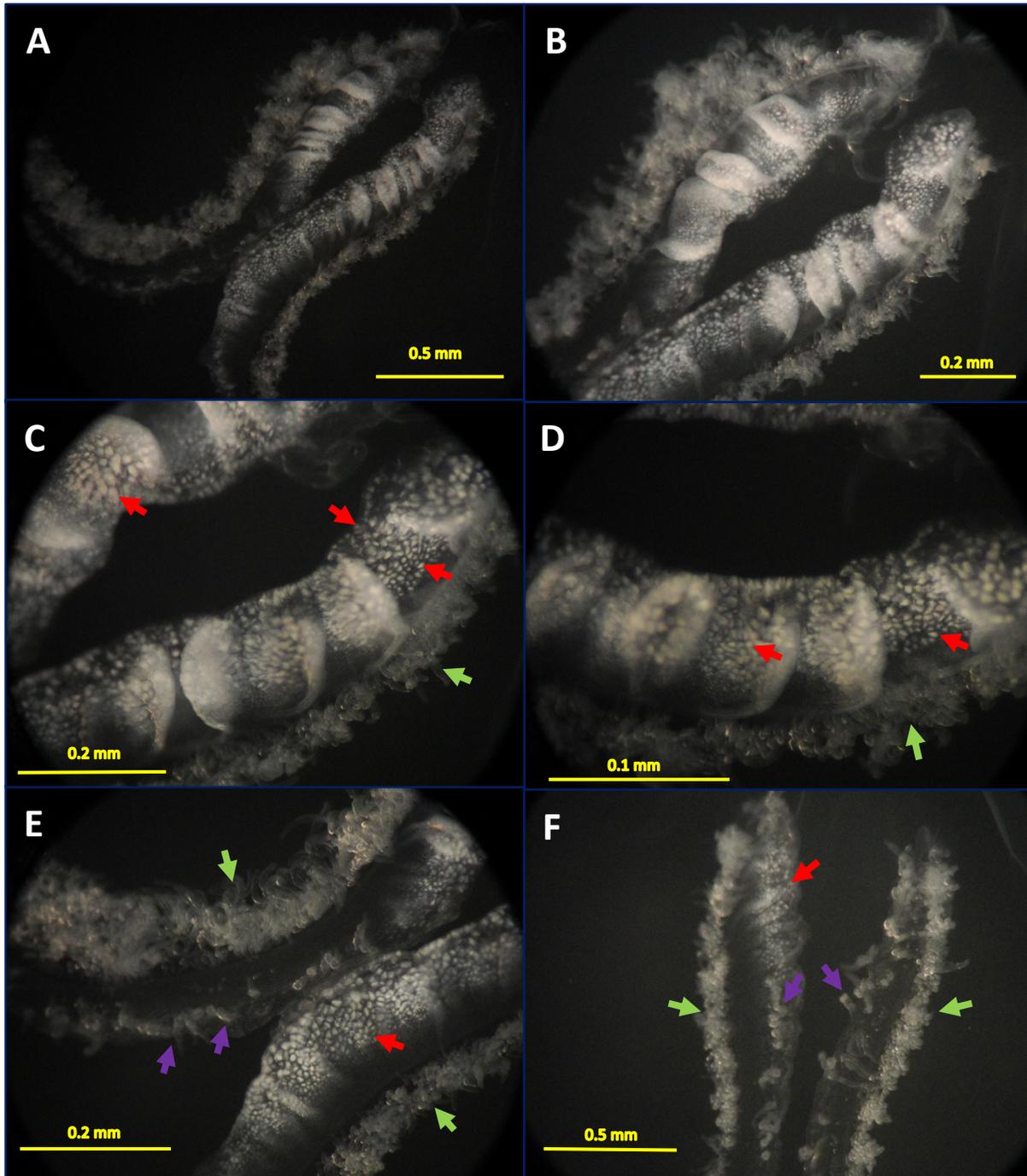
#### **Observaciones**

Durante el cultivo de medusas se monitoreó el desarrollo de gónadas en el pliegue genital (Fig. 15). La formación del pliegue genital se observa por medio de los filamentos gástricos, estos se presentan desde el estadio de éfiras, y aumentan su tamaño y número conforme los organismos crecen (Fig. 15 A-D); sin embargo, el pliegue genital comienza a engrosarse cuando las medusas miden aproximadamente 5 cm de diámetro (Fig. 15E-F). En la figura 15E, se observa la parte exterior e interior del pliegue genital. En la parte interior se encuentran los abundantes filamentos gástricos y en el exterior hay una ligera coloración blanca, mostrando dos secciones bien diferenciadas del pliegue. En la figura 15F se presenta el pliegue de una medusa levemente más grande en donde se aprecian estas secciones, en la parte externa se hallan algunos filamentos gástricos, que es el lugar en donde se forman las gónadas.

Comparando las imágenes de las figuras 15 y 16, se puede ver que, en dos de los pliegues genitales, las gónadas comienzan a formar dobleces ondulados en la zona externa del pliegue genital, y es posible que este organismo fuera un macho ya que se observan pequeñas bolsas de coloración blanca, lo que coincide con la descripción de los folículos espermáticos, no obstante, no se realizaron análisis más detallados para corroborar este dato. En las imágenes de la figura 16 E-F, los filamentos gástricos en la zona externa se vuelven a reconocer en la zona gonadal. Estos tienen lugar a un costado de la gónada, se observan ensanchados y más cortos, y conforme se acercan a la gónada pareciera que llegan a formar parte de las pequeñas bolsas blancas. En la región gonadal ya no es posible observar filamentos gástricos, lo que sugiere que estos filamentos tienen un papel activo durante la gametogénesis.



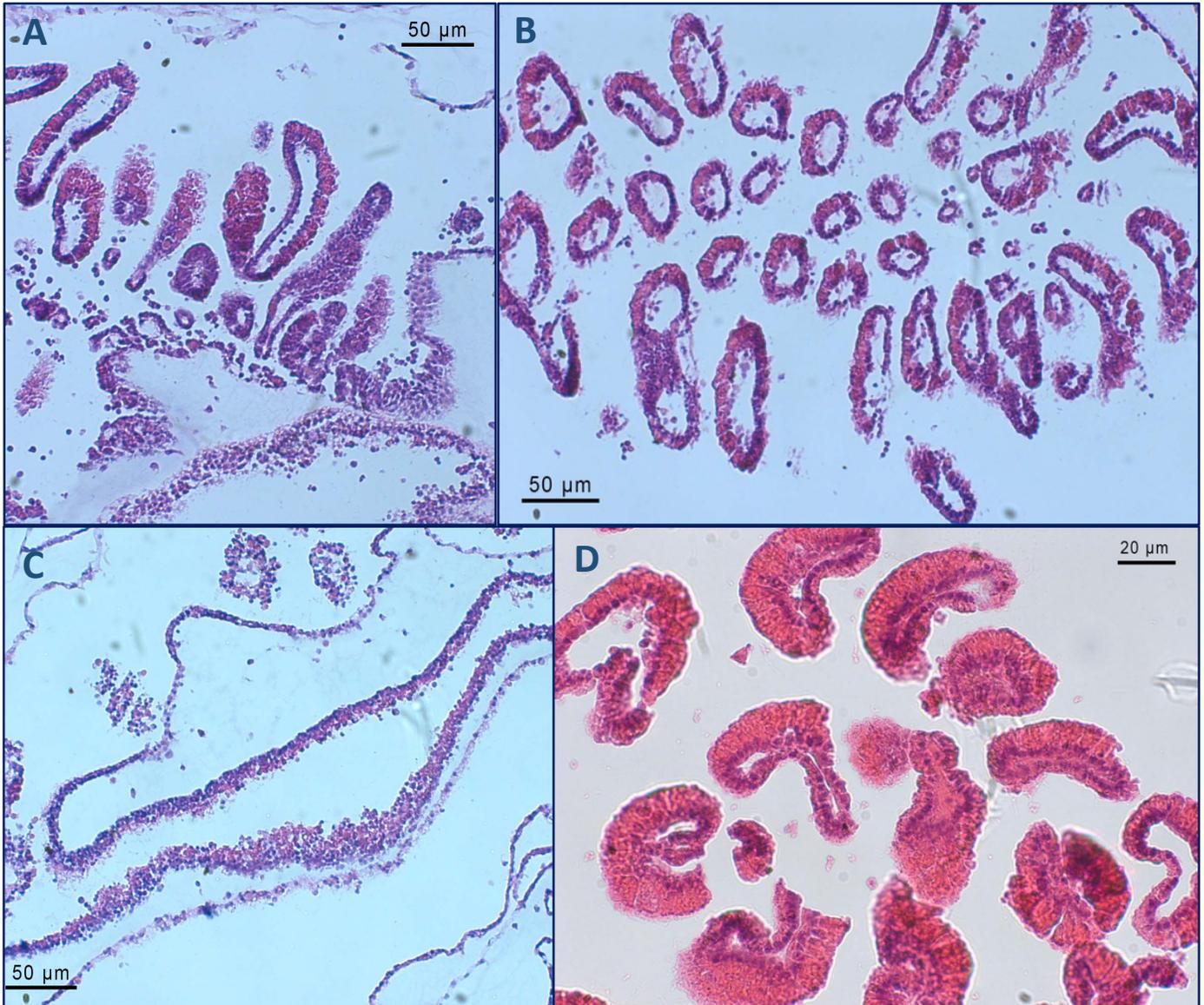
**Figura 15.** Observaciones del pliegue genital en diferentes etapas de *Aurelia aurita*. A) Éfira, se señala las bolsas gástricas con los filamentos gástricos primarios. B) Acercamiento a los filamentos gástricos de una medusa juvenil. C) Acercamiento al pliegue genital y los filamentos gástricos de una medusa juvenil, se observa que el pliegue surge de la gastrodermis de la bolsa gástrica. D) Bolsa gástrica en donde se observan los filamentos gástricos con un delgado pliegue genital. E) Acercamiento al pliegue genital de una medusa adulta se indica la parte externa sin filamentos y la parte interna con abundantes filamentos gástricos. F) Aumento del pliegue genital, se apunta a la parte externa donde se observan algunos filamentos gástricos. Flechas rojas: Filamentos gástricos; Flechas verdes: Zona externa del pliegue genital; Flechas moradas: Zona interna del pliegue genital.



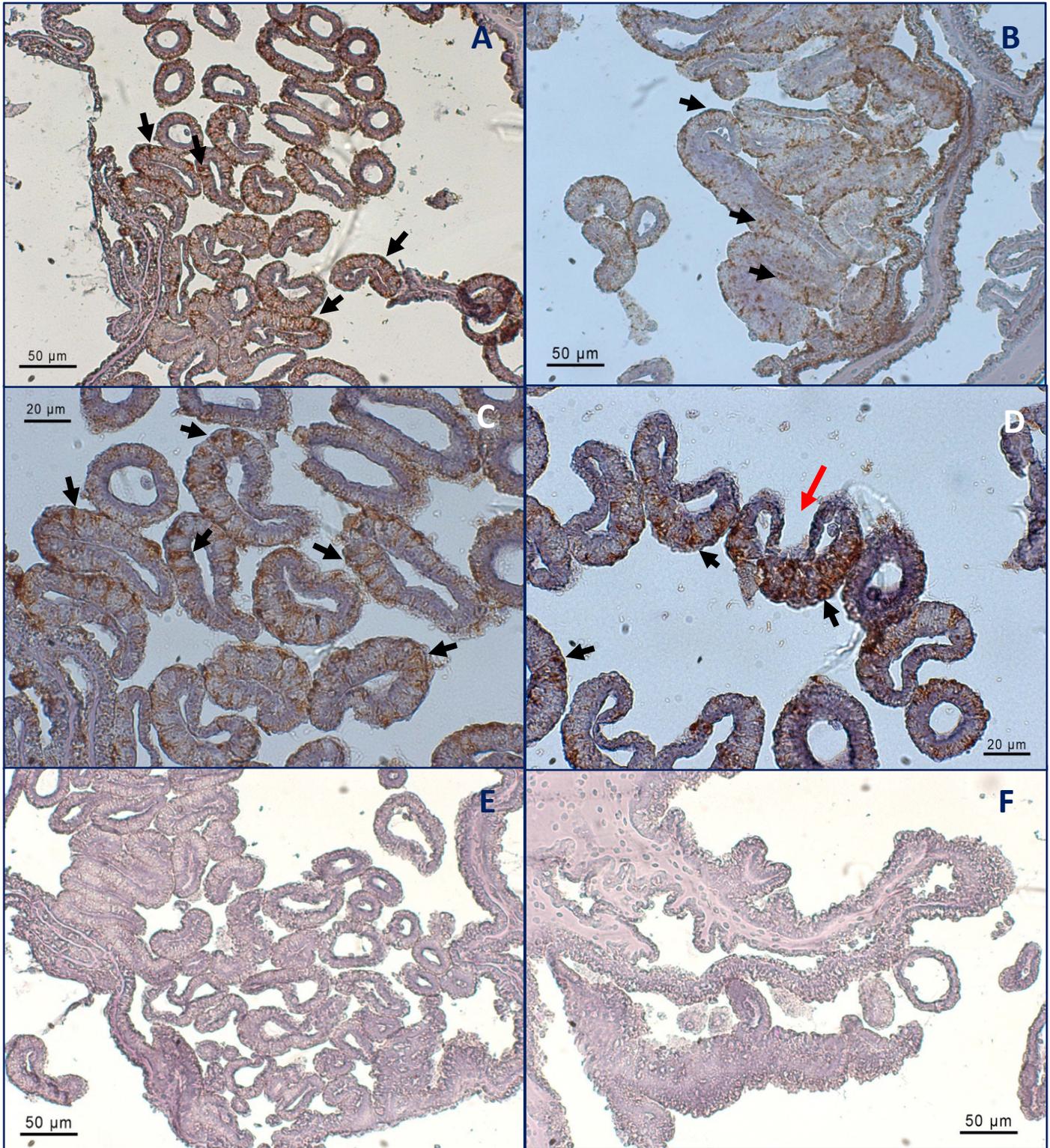
**Figura 16.** Gónada de *Aurelia aurita*. A) Pliegues genitales con gónadas en desarrollo. B) Aumento de A, se aprecian los filamentos gástricos al interior del pliegue y al exterior las gónadas en forma de listones o dobleces que contienen pequeñas bolsas color blanco. C-D) Aumento a las gónadas, se observa que están compuestas por pequeños grupos o bolsas de color blanco. E) Dos pliegues genitales de dos bolsas gástricas distintas, en uno se indica el pliegue con gónadas apenas en formación, en la parte externa del pliegue existen solo algunos filamentos gástricos. F) Se observan dos pliegues genitales, uno con formación de gónada inicial indicado por la flecha roja, pero con filamentos gástricos. Flecha roja: gónada; Flecha verde: Filamentos gástricos internos; Flecha morada: Filamentos gástricos externos.

## Histología

En los tejidos de la medusa *Aurelia aurita* no se observó la formación de folículos espermáticos u óvulos en desarrollo ni en el pliegue genital, ni en la cavidad gastrovascular (Fig. 17 A y C). Se observa, además, una buena cantidad de filamentos gástricos similares a tubos huecos formados por una delgada capa de células columnares (Fig. 17 B y D).



**Figura 17.** Filamentos gástricos y cavidad gastrovascular de *Aurelia aurita*. A) Parte del pliegue genital unido a los filamentos gástricos. B) Filamentos gástricos en corte transversal. C) Cavidad gastrovascular. D) Acercamiento de los filamentos gástricos.



**Figura 18.** Inmuntinciones positivas a Piwi de los filamentos gástricos en la cavidad gastrovascular de *Aurelia aurita*. A) Vista transversal de los filamentos gástricos. B) Vista longitudinal de algunos filamentos unidos al pliegue genital. C) Aumento de los filamentos, la expresión de Piwi está presente en células seleccionadas de los filamentos. D) Filamentos con señal positiva en algunas células, se apuntan con una flecha roja un filamento que exhibe más sitios marcados. E y F) Controles negativos a Piwi, no se observa señal positiva. Flechas negras: Indican algunas de las zonas de señal positiva.

### **Inmunohistoquímica**

La expresión de la proteína Piwi en la medusa *A. aurita* es evidente en células específicas a lo largo de cada filamento gástrico (Fig. 18 A y B). Algunos filamentos pueden presentar un mayor número de células con señal positiva que otras (Fig. 18 C y D), sin embargo, la expresión entre filamentos es similar.

#### **8.2.4. Octocoral Plexauridae**

### **Disecciones**

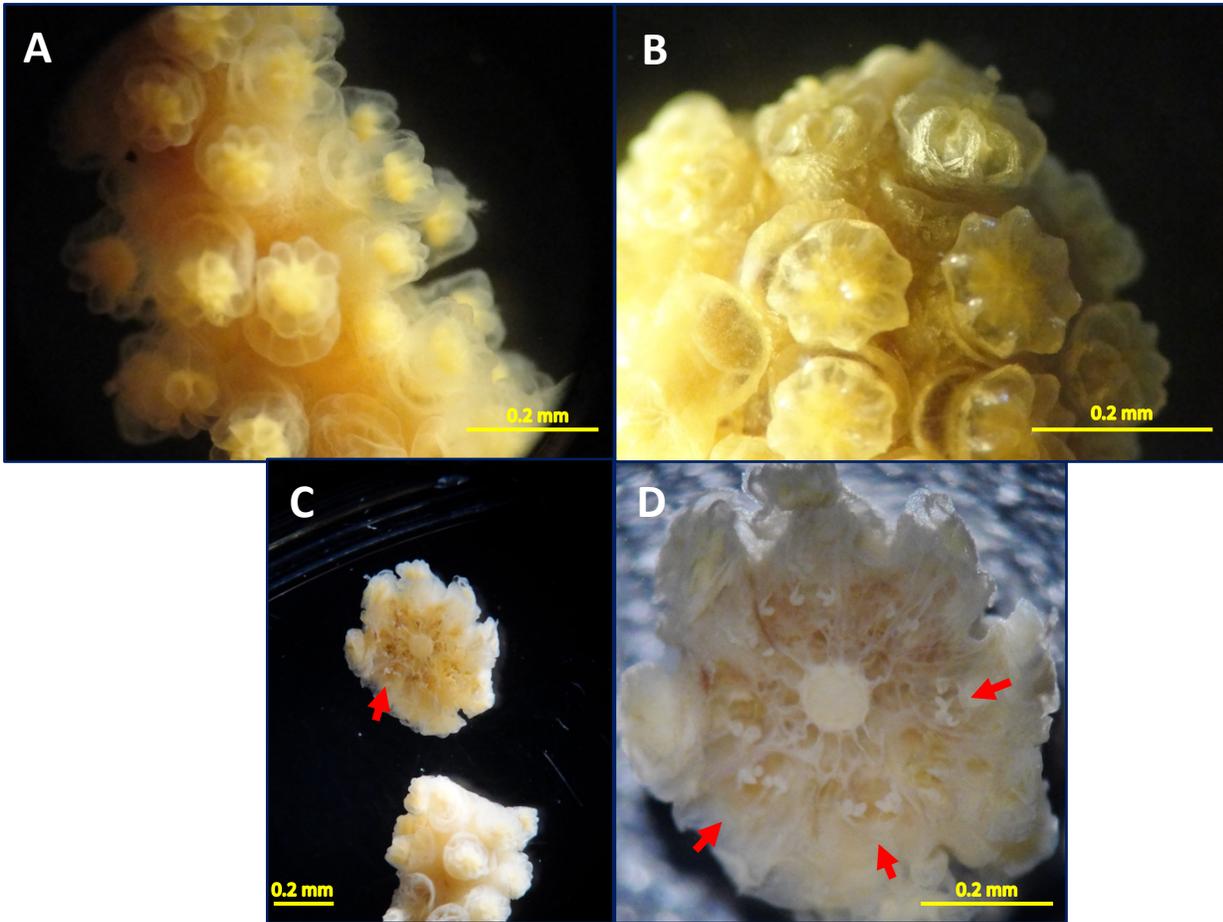
En la figura 19, se muestran pólipos del octocoral, se observan los tentáculos retraídos cerca de la boca del pólipo, pero no se notan bultos que sugieran la existencia de gónadas (Fig. 19 A y B). Se presentan imágenes de la cavidad gastrovascular en donde los mesenterios son bastante delgados y pálidos (Fig. 19 C y D), lo que indica que no había formación de gónadas.

### **Histología**

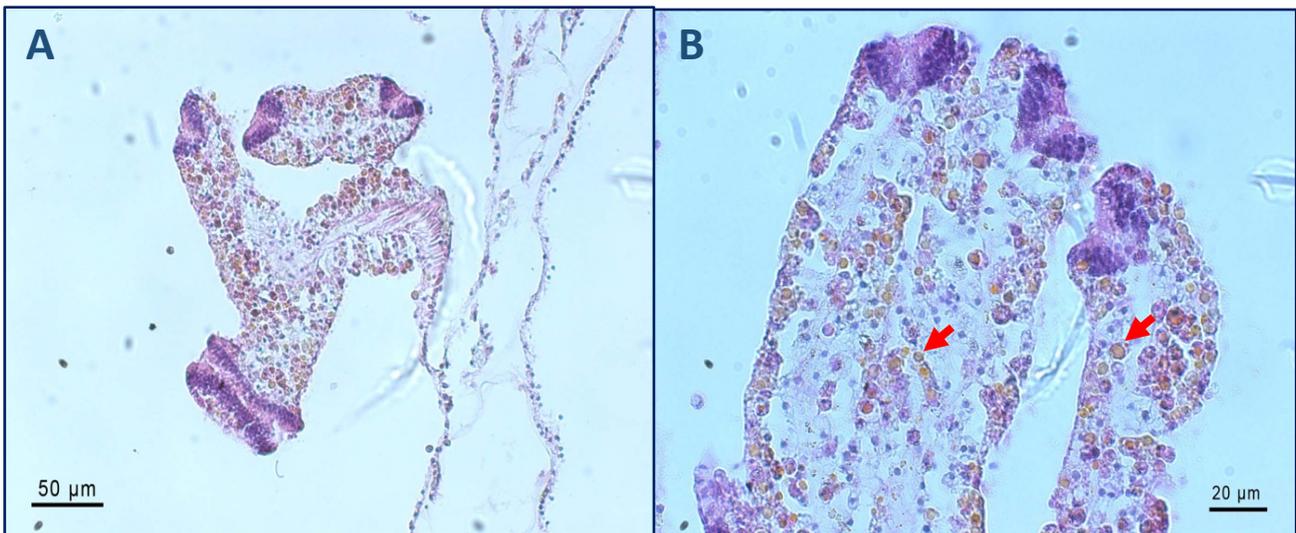
En las imágenes histológicas de los mesenterios se confirma la ausencia de gónadas. En la figura 20: A y B, no hay gónadas, los mesenterios son delgados y se detectó una alta cantidad de simbiontes en la gastrodermis.

### **Inmunohistoquímica.**

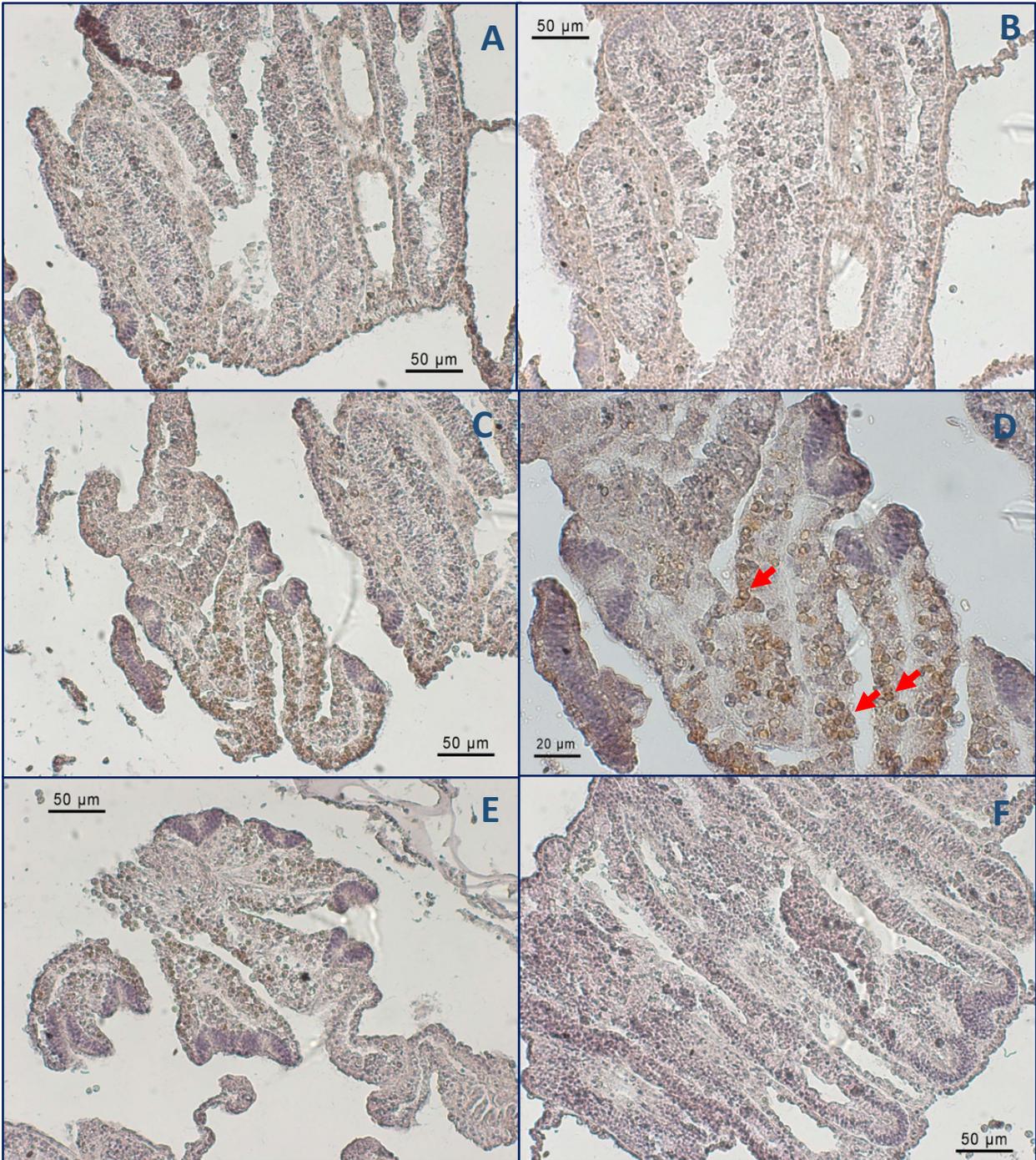
Por medio de las inmunotinciones no fue posible observar una expresión que fuera concluyente de la proteína Piwi. Si bien es cierto que se observa coloración marrón, está únicamente en los simbiontes y no en células del tejido del hospedero (Fig. 21 A-D), lo que puede deberse a una unión inespecífica del anticuerpo y no la interpretamos como una inmunotinción positiva de Piwi ya que esta coloración es notoria incluso con tinciones H/E (Fig. 20).



**Figura 19.** Observación de pólipos y secciones del octocoral Plexauridae. A) Pólipos del octocoral, no se aprecian paquetes de gónadas. B) Acercamiento a los pólipos. C) Corte transversal, se observan los ocho pólipos y la cavidad gastrovascular de cada uno. D) Acercamiento de un corte transversal, no hay evidencia de gónadas. Flechas rojas: cavidad gástrica.



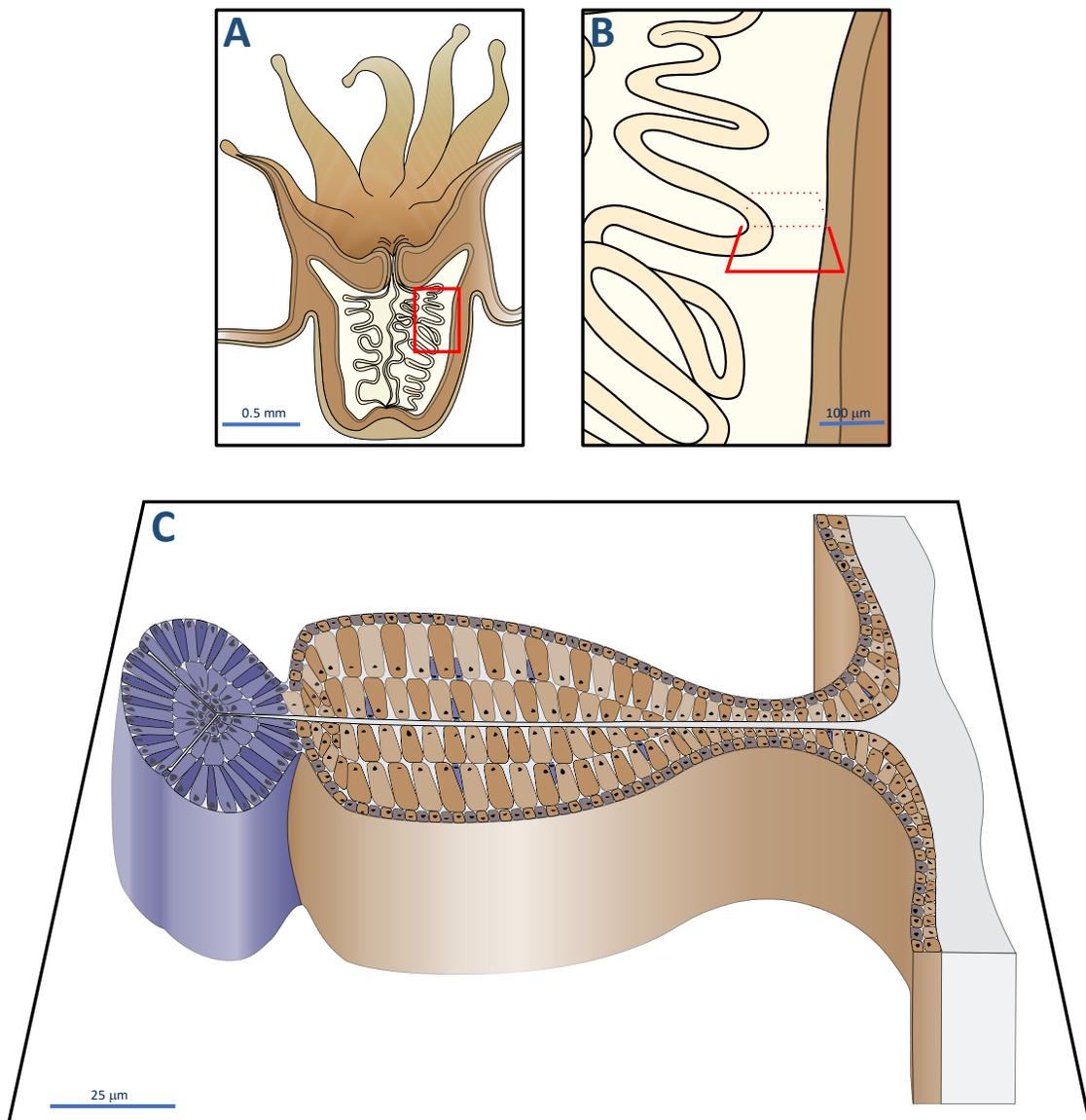
**Figura 20.** Mesenterios del octocoral de la familia Plexauridae. A) Mesenterios sin gónadas y con abundantes simbiontes. B) Acercamiento a los mesenterios, no se observan gónadas y se señalan los simbiontes que se caracterizan por su coloración café.



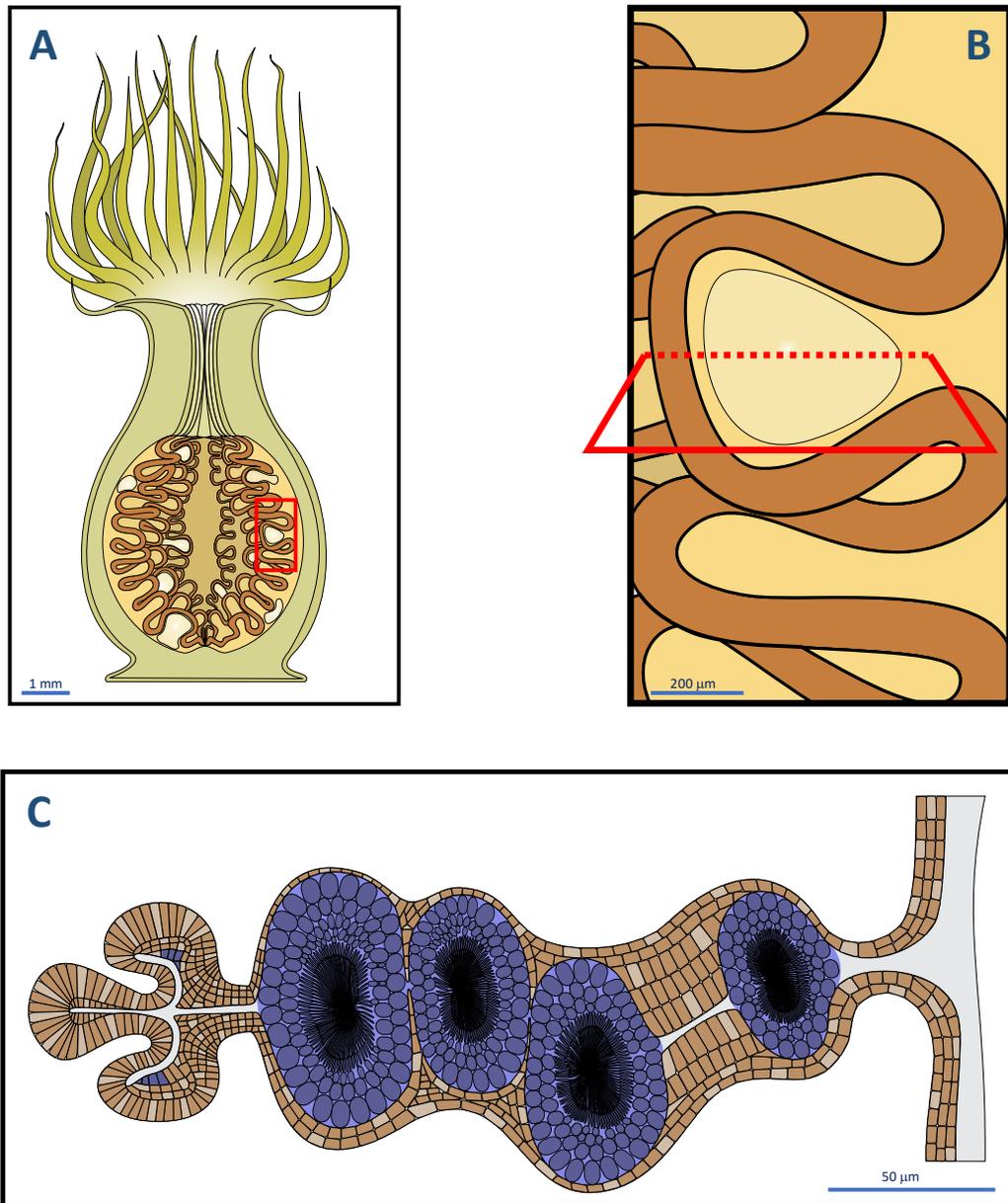
**Figura 21.** Inmunotinciones de la cavidad gastrovascular y mesenterios del octocoral Plexauridae. A-B) Cavidad gastrovascular de Plexauridae, se observa una ligera coloración marrón. C) Acercamiento a los mesenterios, la coloración marrón se observa únicamente en los simbioses. D) Aumento de C, se indican a los simbioses. E-F) Controles negativos.

### 8.3. Esquematzación de la ubicación de Piwi en mesenterios.

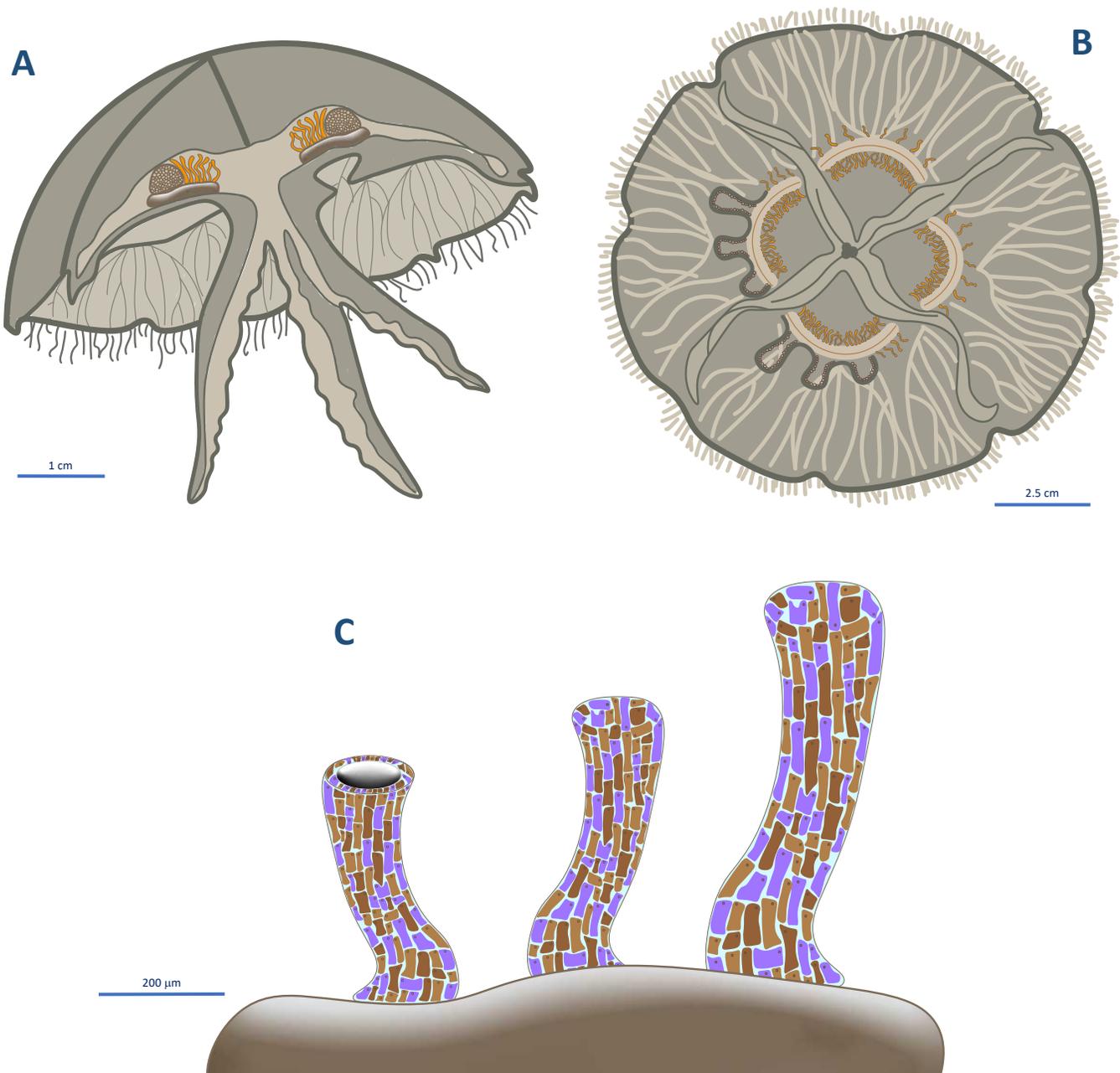
Se presentan representaciones esquemáticas de la expresión de la proteína Piwi observada en cada cnidario estudiado en este trabajo, con el fin de visualizar y correlacionar la localización de los mesenterios y/o las gónadas (en caso de estar presentes) con la expresión de Piwi y señalar la zona de expresión en la región gonadal.



**Figura 22.** Representación de la expresión de Piwi en mesenterios de *Acropora palmata*. A) Pólipo con la cavidad gastrovascular expuesta. B) Acercamiento de A a los mesenterios, se indica un corte transversal. C) Esquema de un mesenterio y un filamento gástrico. En color marrón se señala el mesenterio donde se ubicaron las células que expresan Piwi, mientras que la coloración azul indican células sin dicha expresión, principalmente en el filamento mesenterico.



**Figura 23.** Representación de la expresión de Piwi en *Exaiptasia diaphana*. A) Pólipo con la cavidad gastrovascular expuesta. B) Acercamiento de A a los mesenterios, se indica un corte transversal a un mesenterio en la región gonadal. C) Ilustración del mesenterio y filamento mesenterico con folículos espermáticos en desarrollo. Se indican las células positivas a Piwi, en color marrón, a lo largo del mesenterio y filamento. En cambio, en azul, se observaron las zonas sin la expresión de Piwi, que corresponden principalmente a los folículos espermáticos.



**Figura 24.** Representación de la expresión de Piwi en *Aurelia aurita*. A) Corte longitudinal de una medusa adulta, se muestran los pliegues genitales con gónadas en desarrollo. B) Vista subumbrelar, con énfasis en la cavidad gastrovascular en donde se muestra la región gonadal. C) Ubicación de células positivas a Piwi. Señaladas en color marrón se observan solo algunas células que expresan la proteína a lo largo de los filamentos gástricos.

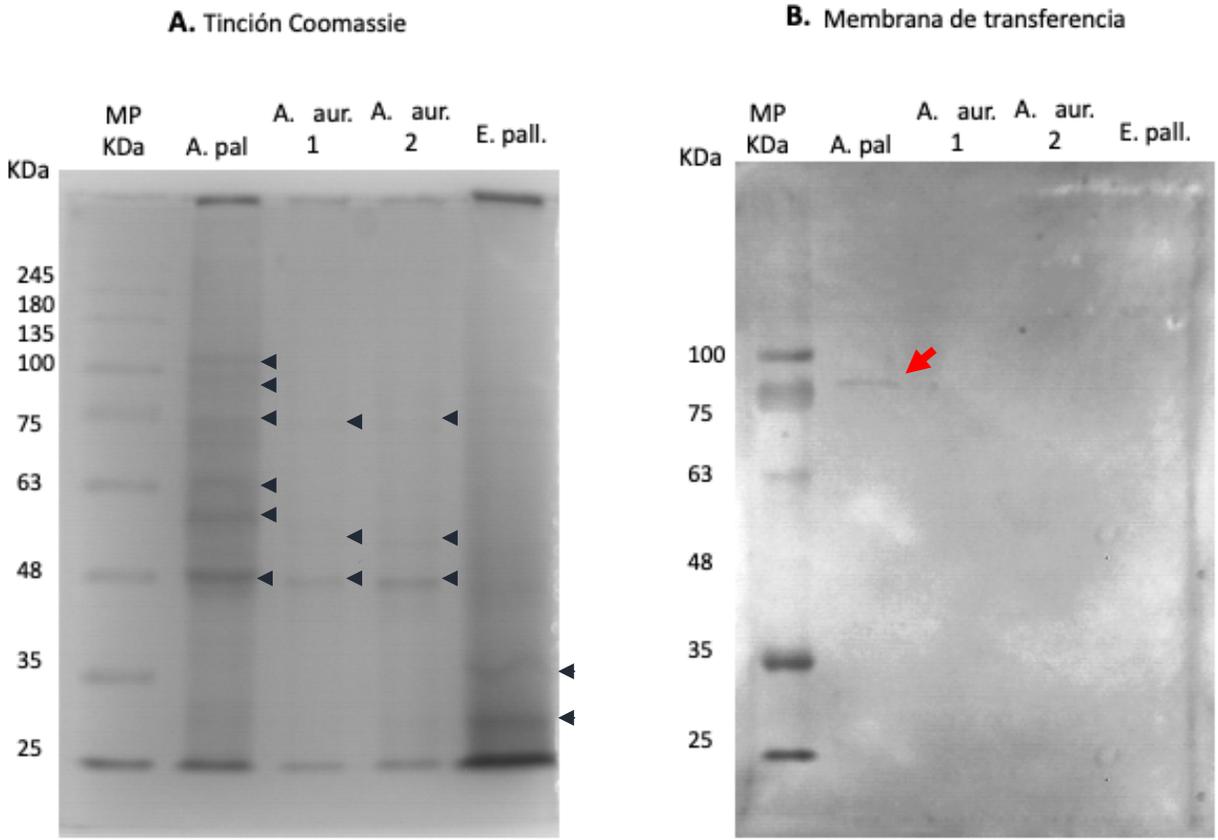
#### 8.4. Análisis SDS-PAGE y Western blot

Con la finalidad de establecer que los experimentos realizados de inmunomarcajes en secciones histológicas realmente corresponden a la expresión de la proteína Piwi, se llevó a cabo un análisis de tipo Western Blot.

En el gel de la electroforesis de proteínas teñido con azul de Comassie (panel A de la figura 25) se observan las principales bandas de proteínas extraídas; en el primer carril los marcadores de peso molecular, en el siguiente carril (señalado como “A. pal”), se notan varias bandas de proteínas de pólipos de *A. palmata* que corresponden a los pesos moleculares de 110, 95, 75, 63, 58 y 48 kDa. En los carriles “A. aur.1” y “A. aur.2” contienen extractos de proteínas de la medusa *A. aurita* a partir de los tejidos de la cavidad gastrovascular y de un organismo completo, respectivamente. En estos carriles las bandas principales solo se observan en 48, 55 y muy ligeramente en 75 kDa, aunque son más evidentes en el carril 3. En el último en el carril “E. pall.” se colocó un extracto de proteínas de la anémona *E. diaphana* simbiótica, a pesar de que el contenido del carril se ve oscuro (posiblemente por la elevada cantidad de simbioses en la muestra) se observan bandas en 30 y 35 kDa aproximadamente.

Una vez que las proteínas fueron transferidas a la membrana (panel B de la figura 25), el anticuerpo anti-Piwi marcó específicamente una banda de 98 kDa de *A. palmata*, que coincide con el peso molecular calculado, lo cual sugiere que los experimentos de inmunohistoquímica para este coral realmente reflejan la expresión de la proteína Piwi.

Sin embargo, para las muestras de la medusa y la anémona, esta banda no se observa. Esto no descarta los resultados de las inmunohistoquímicas, ya que quizás falte ajustar las condiciones en las que se llevó a cabo el ensayo, como la concentración del gel de acrilamida-bisacrilamida, la medición y estandarización de la concentración de proteínas extraídas.



**Figura 25.** Análisis de SDS-PAGE y Western Blot de anti-Piwi en tejidos de mesenterios de *A. palmata*, *A. aurita* y *E. diaphana*. A) Extractos de proteínas de organismos de que fueron separados por SDS-PAGE en un gel al 10 % de poliacrilamida y visualizado con tinción de azul de Coomassie R250. Las flechas indican las principales bandas en los extractos de organismos. B) Análisis de Western Blot con el anticuerpo anti-piwi, la flecha roja indica una banda anti-Piwi inmunoreactiva en aproximadamente 98 kDa en extractos de proteínas de *A. palmata*. El marcador de peso molecular se presenta en la parte e izquierda.

## 9. DISCUSIÓN

En este trabajo se describió la expresión de la proteína Piwi, marcador de CMGs, en tres especies de cnidarios, el coral *Acropora palmata*, la anémona *Exaiptasia diaphana* simbiótica y la medusa *Aurelia aurita*. Aquellas zonas que expresaron Piwi, se encontraron tanto en células circundantes a las gónadas, como en células somáticas de tejidos mesentéricos y en algunos casos en los filamentos mesentéricos, como es el caso de los hexacorales, o en algunas células específicas de los filamentos gástricos para el caso de la medusa. Los resultados muestran sitios de expresión variable entre especies, pero en todos los casos relacionados a células de la línea germinal y/o células somáticas en la región gonadal.

La expresión de la proteína Piwi en el coral *A. palmata* y la anémona *E. diaphana* simbiótica, fue similar entre ambos cnidarios. Sin embargo, si se detectaron algunas diferencias entre ellos.

En el caso del coral Cuerno de Alce (*A. palmata*) Piwi se encontró en células de los mesenterios y no en células del filamento mesentérico (Fig. 10 y 22C), lo cual es diferente con lo observado en la anémona *E. diaphana*, en donde Piwi se detectó en el mesenterio y en el filamento mesentérico, tanto en los lóbulos y en la banda cnidoglandular (Fig. 14 y 23C).

Una posible explicación a estas observaciones, es que la expresión de Piwi se ha correlacionado con un estado pluripotencial de las células, y considerando que, en los cnidarios los filamentos mesentéricos cuentan con células muy especializadas como los nematocistos, células columnares ciliadas, mucocitos y células glandulares (Galloway *et al.*, 2007; Berzins *et al.*, 2021; Peters, 2016) la mayoría de las células están altamente diferenciadas y comprometidas a un linaje específico, y por lo tanto, es improbable la expresión de Piwi.

Esto brinda también, una explicación de la ausencia de expresión de Piwi en los folículos espermáticos de *E. diaphana*, desde espermatogonias avanzadas hasta espermatozoides (Fig. 14 A-D y 23C).

Esto difiere con lo reportado en trabajos anteriores por otros autores, en donde Piwi se expresa tanto en células de nicho somático como en células germinales. En el caso del hidrozoo *Podocoryne carnea* se observó que Piwi (nombrado Cniwi) se expresó tanto en células de nicho somático como en células germinales (Solana 2013; Seipel *et al.*, 2004). Por otro lado, Bosch y colaboradores en 2010 identificaron en *Hydra* que Piwi se expresa en tanto en las CMG como en las CMM.

Un hallazgo similar fue publicado por Shikina y colaboradores en 2015, en donde se observó que, los patrones de distribución de células germinales tempranas en mesenterios del coral *Euphyllia ancora* marcadas con Piwi, muestran que las células germinales tempranas estaban presentes en los mesenterios durante todo el año e independientemente del estadio del ciclo reproductivo, sus observaciones sugieren que estas células probablemente sirven como reservorios de CMGs y que algunas de estas producirían gametos sexuales para los futuros períodos de reproducción sexual.

Lo anterior sugiere que, como en otros cnidarios, las células detectadas con expresión de Piwi en *A. palmata* y *E. diaphana* posiblemente son de CMGs, con capacidad de diferenciarse en gametos o bien sean células nicho que podrían ayudar al mantenimiento de la línea germinal.

La expresión de la proteína en células circundantes a los folículos espermáticos, pero nunca en células masculinas en diferenciación dentro del folículo (Fig. 14), tiene que ver con que el complejo Piwi-piRNAs está implicado en la supresión de la actividad de elemento transponibles (transposones y retrotransposones), en células de la línea germinal (van Wolfswinkel, 2014; Jin *et al.*, 2021; Müller *et al.*, 2020), por lo que la vigilancia es altamente activa en células periféricas a los folículos espermáticos para asegurar la adecuada división de las células antes de iniciar la diferenciación a espermatogonias, y donde una vez comprometidas ya no se requiere dicha vigilancia, de tal manera que Piwi deja de expresarse dentro del folículo espermático.

Además, Piwi tiene un papel en la inhibición de genes de diferenciación, manteniendo así a las células madre en un estado desdiferenciado, y al mismo tiempo se

ha sugerido que es una proteína necesaria para regular los genes implicados en la actividad mitótica (van Wolfswinkel, 2014; Solana 2013; Seipel *et al.*, 2004).

Relacionado con la formación de gónadas en la medusa lunar, una de nuestras observaciones a destacar es la localización de la gametogénesis en los filamentos gástricos. Observamos que ciertos filamentos gástricos ubicados en el pliegue genital externo posiblemente dan origen a las gónadas.

En descripciones realizadas por otros autores se encontró el origen gonadal en el piso de la gastrodermis (Eckelbarger y Larson, 1989), sin embargo, Morandini y Da Silveira, 2001, sugirieron una relación estrecha entre algunos filamentos gástricos y la gametogénesis de la medusa, lo que es relevante para los hallazgos de este estudio sobre la expresión del marcador de Piwi en algunas células de los filamentos gástricos (Fig. 18 y 24).

Cabe la posibilidad de que estas células sean CMGs implicadas en la futura producción de células germinales ya sean óvulos o espermatozoides. Estas observaciones sugieren que solamente ciertas células ubicadas en los filamentos gástricos y presentes en la zona externa del pliegue genital (Fig. 24C) dan origen a las gónadas en la medusa *A. aurita*.

La expresión somática de Piwi en los filamentos gástricos podría estar relacionada con la función de Piwi de evitar la transcripción de retrotransposones para evitar alteraciones de la línea germinal, ya que son estas células las que dan origen a las futuras generaciones. Esto podría ser corroborado en trabajos futuros con inmunotinciones de las gónadas de organismos adultos y empleando otros marcadores de CMGs.

Si bien, Nong y colaboradores en 2020 reportaron la presencia del gen Piwi en tejidos de *A. aurita*, este trabajo es el primero en donde se observa la expresión de Piwi específicamente en tejidos relacionados con la gametogénesis.

En el octocoral no se detectó la expresión de Piwi, sin embargo, si se observó una coloración marrón en los simbioses que puede estar relacionado con un reconocimiento inespecífico, en ningún caso se observó en células de los mesenterios o filamentos mesentéricos. No obstante, en este caso se recomienda una mejor identificación del

organismo que permita la recolección de más organismos en estado natural, para realizar más pruebas que puedan corroborar nuestras observaciones.

Por otra parte, la identidad de Piwi fue corroborada, similar a lo que reportó Shikina *et al.*, en 2015, lo que da la certeza de la presencia de Piwi en las tinciones observadas, sin embargo, no se descartó en *Aurelia aurita* y *Exaiptasia diaphana*, para lo cual se requieren mejores métodos de detección aunado a una mejor estandarización de la concentración de proteína utilizada en nuestros experimentos de Western blot.

Por lo que se refiere a la búsqueda de gónadas, solo se observaron en *E. diaphana* simbióticas y en un ejemplar *A. aurita* proveniente del cultivo. Cabe mencionar que, aunque nuestros muestreos se realizaron en las épocas de desove de *A. palmata* y el octocoral Plexauridae no se detectaron gónadas en los ejemplares recolectados.

En el caso del coral *A. palmata* la ausencia de gónadas puede estar relacionada con la exposición a factores estresantes en el ambiente que alteran procesos fisiológicos esenciales, como es la gametogénesis. Algunos de estos factores, son la exposición a sustancias químicas, aumento en la temperatura del mar, contaminación lumínica, cambios en la salinidad, eutrofización, entre otros (Kramarsky-Winter, 2016; Ward y Harrison, 2000). Todos estos factores están íntimamente relacionados con el desarrollo urbano cercano a las costas del mar Caribe y el Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos no es una excepción.

Se ha hecho énfasis, que de continuar el aumento de los desarrollos urbanos los ciclos reproductivos pueden disminuir, afectando no solo la gametogénesis, como se observó durante este estudio, sino también el rendimiento de desove y la fertilización (Kramarsky-Winter, 2016). Si bien es cierto que, aunque no se vio evidencia de gónadas en los ejemplares usados en este estudio, no se puede generalizar este comportamiento para todos los corales de la especie en el Caribe mexicano.

Relacionado con lo anterior, la ausencia de gónadas en el octocoral, puede estar asociado a la falta de condiciones adecuadas para los procesos metabólicos, que no fueron brindados en el estanque en el que permanecía, ya que el esfuerzo reproductivo depende de una combinación de factores genéticos, fisiológicos y ambientales que incluyen la

disponibilidad de alimento, el tamaño de la colonia y su salud (Kramarsky-Winter, 2016). Por lo tanto, en colonias que no se encuentran en las mejores condiciones fisiológicas probablemente asignan sus reservas celulares y energéticas al mantenimiento y reparación de tejidos en lugar de asignarlos a la gametogénesis que requiere de un aporte considerablemente mayor de recursos.

En contraste a lo anterior, en las anémonas *E. diaphana* simbiótica se hallaron gónadas, independientemente del tamaño del espécimen, mientras que las anémonas aposimbióticas no presentaron gónadas, pero si se reproducían asexualmente y eran más pequeños en comparación con las anémonas simbióticas.

Esto señala un papel fundamental de los simbioses en la gametogénesis y en el tamaño de los organismos, lo que es similar a lo observado por Carlesli y colaboradores en 2007, en donde observaron una relación positiva entre el tamaño del organismo, su estado simbiótico y el desarrollo de gónadas entre *A. pallida* simbiótica y aposimbiótica. Reportaron que mientras el tamaño del cuerpo tiene relación directa con la presencia de gónadas, el estado simbiótico está implicado con el tamaño y cantidad de gónadas, por lo tanto, es más probable que un organismo simbiótico adulto (aproximadamente 2.88 mm de diámetro del cuerpo), presente ovocitos o folículos espermáticos grandes y en mayor cantidad. Por lo tanto, la capacidad reproductiva es mucho menor en organismos aposimbióticos. Sin embargo, realizar un seguimiento más riguroso del tamaño de los organismos podrá aportar más información.

Además, la pérdida de simbioses se ha asociado con una disminución de la expresión de genes, relacionados con los transportadores de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, también es probablemente que, para las actividades reproductivas se requieran esteroides sexuales que en algunos casos son producidos por los simbioses y asignados al hospedero (Carlesli *et al.*, 2007; Lehnert *et al.*, 2014; Kramarsky-Winter, 2016), lo que las anémonas aposimbióticas no tienen oportunidad de recibir.

Si bien no se conoce mucho sobre cómo afecta la presencia o ausencia del simbiote en la capacidad reproductiva de la anémona, es cierto que la simbiosis juega un papel

fundamental en el estado fisiológico general de la anémona, lo cual evidentemente tiene implicaciones relevantes para la producción y supervivencia de la descendencia.

Una parte esencial del trabajo fue desarrollar los protocolos para establecer cultivos de la anémona *E. diaphana* aposimbiótica y la medusa *A. aurita*. Estos se presentan a detalle en la forma de anexos (Anexo I y II). En ambos cultivos se logró criar organismos adultos, se consiguieron adultos aposimbióticos de *E. diaphana* y en un muy bajo porcentaje *A. aurita* madura sexualmente.

Es importante destacar que las condiciones que empleamos para el cultivo de anémonas aposimbióticas posiblemente no resultaron ser las más adecuadas para la inducción a la gametogénesis.

En estudios anteriores se han descrito las condiciones idóneas para la gametogénesis sincrónica en anémonas del género *Aiptasia*, entre las que destacan fotoperiodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, y ciclos circalunares de 28 días llevados a cabo con simulación lunar empleando longitudes de onda entre 400 y 460 nm, alimento abundante cinco días a la semana, poca densidad de organismos por tanque y temperaturas de entre 27 y 30 °C (Grawunder *et al.*, 2015), por lo que para propiciar la gametogénesis y desove de *E. diaphana* en el cultivo que se desarrolló durante este trabajo se debe considerar aumentar la temperatura, hacer un seguimiento del fotoperiodo y establecer ciclos lunares.

Por otra parte, si bien las condiciones descritas en este trabajo fueron adecuadas para el crecimiento, no lo fueron las más eficientes para la inducción a la gametogénesis, después de la estrobilación.

Chunsheng y colaboradores en 2018 criaron medusas luna adultas y maduras sexualmente en tanques de 300 L, se alimentaron con abundante alimento, probaron diferentes temperaturas y detectaron medusas de ambos sexos a temperaturas entre 21-24 °C. En estas condiciones los organismos tuvieron el mismo tamaño independientemente del sexo, aunque los machos se presentan frecuentemente a bajas temperaturas, lo que coincide con el organismo con probables folículos espermáticos que observamos derivado de nuestro cultivo a 21-22 °C.

En el futuro se podrían hacer modificaciones de la abundancia y periodicidad de alimentación en los cultivos, disponibilidad de espacio, rangos de temperatura y la exposición a la luz, parámetros que pueden ser importantes para mejorar la eficiencia y producción de gametos en *A. aurita*.

En este estudio se describieron zonas variables de expresión de Piwi que indican la ubicación de posibles Células Madre Germinales y Células Madre Somáticas principalmente en los mesenterios y en los filamentos mesentéricos de los hexacorales *A. palmata* y *E. diaphana*, mientras que, en el escifozoo *Aurelia aurita*, se encuentra en filamentos gástricos y que posiblemente dan origen a las células germinales.

Este estudio es el primero en hacer una comparación de la posible ubicación de las Células Madre Germinales entre distintos grupos de cnidarios, lo que ayuda a dilucidar mejor lo que puede ocurrir en diferentes organismos de interés como modelos emergentes de EvoDevo (evolución y desarrollo), así como aspectos relevantes para la restauración y conservación de corales arrecifales que forman parte de la alta biodiversidad marina del Caribe Mexicano.

## 10. CONCLUSIONES

- Se detectó la expresión de la proteína Piwi en tres especies de cnidarios (*Acropora palmata*, *Exaiptasia diaphana* y *Aurelia aurita*), pero no en el octocoral Plexaurido.
- La proteína Piwi se detectó únicamente en células de los mesenterios de *Acropora palmata*, en mesenterios y filamentos mesentéricos de *Exaiptasia diaphana* y en células muy específicas de los filamentos gástricos de *Aurelia aurita*.
- La ubicación de la proteína Piwi es variable entre las tres especies, pero en todas con una posible coincidencia con Células Madre Germinales y Células Madre Somáticas.
- Se logró exitosamente el cultivo de organismos de *Exaiptasia diaphana* aposimbiótica y *Aurelia aurita* mediante la adaptación de métodos que permitieron obtener adultos de estas especies.

## 11. PERSPECTIVAS

- La confirmación de la expresión de Piwi en tejidos con desarrollo evidente de gónadas de *Acropora palmata* y *Aurelia aurita*, fortalecerá los datos aquí presentados.
- Hacer observaciones de *Exaiptasia diaphana* hembras complementarán los datos de ubicación de las Células Madre Germinales.
- Se recomienda un análisis de escleritas del octocoral para tener una identificación certera del organismo lo que ayudará a la recolección de más organismos en estado natural, para realizar más pruebas que puedan corroborar nuestras observaciones.
- El seguimiento de variación de expresión de Piwi en las células germinales y tejidos mesentéricos durante todo un ciclo de gametogénesis aportará un entendimiento más completo a las observaciones que se presentan en este documento.
- Los hallazgos sobre la ubicación de Células Madre Germinales por la observación de la proteína Piwi pueden ser apoyadas por otros marcadores de la línea germinal, como Nanos, Vasa, Oskar, PL1, etc.
- Hacer ajustes en los cultivos de *Exaiptasia diaphana* y *Aurelia aurita* ayudará a mejorar la eficiencia y producción de gametos.

## 12. REFERENCIAS

- Adonin, L. S., Shaposhnikova, T. G. y Podgornaya, O. 2012. *Aurelia aurita* (Cnidaria) Oocytes' Contact Plate Structure and Development. PLoS ONE 7(11): e46542. doi:10.1371/journal.pone.0046542
- Baums, I. B., Miller, M. W. y Hellberg, M. E., 2005. Regionally isolated populations of an imperiled Caribbean coral, *Acropora palmata*. Molecular Ecology. 14: 1377–1390. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02489.x
- Berzins, I. K., Yanong, R. P. E., LaDouceur, E. E. B. y Peters, E. C. 2021. Cnidaria. En: Invertebrate Histology. Primera Edición. Editado por: Elise E.B. LaDouceur, 2021. John Wiley & Sons, Inc. Pág. 55 – 86.
- Bocharova, E. S. y Kozevich, A. I. 2011. Modes of Reproduction in Sea Anemones (Cnidaria, Anthozoa). Biology bulletin. 38 (9): 849-860.
- Bosch, T. C. G., Anton-Erxleben, F., Hemmrich, G., y Khalturin, K. 2010. The Hydra polyp: Nothing but an active stem cell community. Develop. Growth Differ. 52, 15–25. doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01143.x
- Brusca, R. C. y Brusca, G. J. 2005. Invertebrados. 2ª Edición ed. España: McGRAW-HILL Interamericana, pp. 237-291.
- Cairns, S. D., Gershwin, L., Brook, F. J., Pugh, P., Dawson, E. W., Ocaña, O. V, Vervoort, W., Williams, G., Watson, J. E., Opresko, D.M., Schuchert, P., Hine, M., Gordon, D. P., Campbell, H. J., Wright, A. J., Sánchez, J. A. y Fautin, D. G. 2009. Phylum cnidaria; corals, medusae, hydroids, myxozoa. New Zealand Inventory of Biodiversity. Vol. 1. Kingdom Animalia: Radiata, Lophotrochozoa, Deuterostomia.
- Carlisle, J. F., Murphy G. K. y Roark A., M. 2017. Body size and symbiotic status influence gonad development in *Aiptasia pallida* anemones. Symbiosis 71:121-127. doi: 10.1007/s131999-016-0456-1.
- Chiu Y., Chang. C y Shikina S. 2021. Development of an in vitro tissue culture system for hammer coral (*Fimbriaphyllia ancora*) ovaries. Scientific reports 11: 24338.
- Chunsheng L., Zhifeng G., Mengxin X., Yun S., Siqing C. y Zhaoting C. 2018. Sex determination and differentiation in *Aurelia* sp. 1: the absence of temperature dependence. Journal of Oceanology and Limnology. Vol. 36 No. 2. Pág. 457-464.
- Clulow. J., Vance. L. T. y Kouba. A. J. 2014. Amphibian Declines in the Twenty-First Century: Why We Need Assisted Reproductive Technologies. En: W.V. Holt et al. (eds.). Reproductive Sciences in Animal Conservation, Advances in Experimental Medicine and Biology. © Springer Science+Business Media New York. Pág. 275 – 316. DOI 10.1007/978-1-4939-0820-2\_13.
- Collins, A. G. 2009. Recent insights into Cnidarian Phylogeny. Smithsonian contributions to the marine sciences. 38: 139-149.
- Comizzoli, P. y Holt, W. V. 2014. Recent Advances and Prospects in Germplasm Preservation of Rare and Endangered Species. En: W.V. Holt et al. (eds.). Reproductive Sciences in Animal Conservation, Advances in Experimental Medicine and Biology. © Springer Science+Business Media New York. Pág. 331 – 356. DOI 10.1007/978-1-4939-0820-2\_13

- Drury, C., Manzello, D. y Lirman D. 2017. Genotype and local environment dynamically influence growth, disturbance response and survivorship in the threatened coral, *Acropora cervicornis*. PLoS ONE. 12(3): e0174000.
- Dungan, A. M., Hartman, L.M., Tortorelli, G., Belderok, R., Lamb, A. M., Pisan, L., McFadden, G.I., Blackall, L.L. y van Oppen, M. J. H. 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>
- Eckelbarger, K. J. y Larson, R. I. 1988. Ovarian morphology and oogenesis in *Aurelia aurita* (Scyphozoa: Semeaostomae): ultrastructural evidence of heterosynthetic yolk formation in a primitive metazoan. Marine Biology. 100:103-115.
- Eckelbarger, K. J., Hand, C. y Uhlinger K. L. 2008. Ultrastructural features of the trophonema and oogenesis in the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis* (Edwardsiidae). Invertebrate Biology 127 (4):381-395. DOI: 10.1111/j.1744-7410.2008.00146.x
- Fogarty, N. D., Vollmer, S. V. y Levitan, D. R. 2012. Weak Prezygotic Isolating Mechanisms in Threatened Caribbean *Acropora* Corals. PLoS ONE 7(2): e30486. doi:10.1371/journal.pone.003048
- Galloway SB, Work TM, Bochsler VS, Harley RA, Kramarsky-Winters E, McLaughlin SM, Meteyer CU, Morado JF, Nicholson JH, Parnell PG, Peters EC, Reynolds TL, Rotstein DS, Sileo L, and Woodley CM. 2007. Coral Disease and Health Workshop: Coral Histopathology II. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 56 and NOAA Technical Memorandum CRCP 4. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD. pp. 84.
- Gao, M. y Arkov, A. 2013. Next Generation Organelles: Structure and Role of Germ Granules in the Germline. Molecular Reproduction & Development 80:610–623.
- Genzano, G. N., Schiariti, A., y Mianzan, H. W. 2014. Cnidaria. Los Invertebrados Marinos. Fundación Félix de Azara, Buenos Aires. pp.67- 85.
- Grawunder, D., Heambleton, E. A., Bucher, M., Wolfowicz, I., Bechtoldt, N. y Guse A., 2015. Induction of gametogenesis in the Cnidarian endosymbiosis model *Aiptasia* sp. Scientific reports 5:15677. DOI: 10.1038/srep15677
- Hagedorn, M. y Spindler, R. 2014. The Reality, Use and Potential for Cryopreservation of Coral Reefs. En: W.V. Holt et al. (eds.). Reproductive Sciences in Animal Conservation, Advances in Experimental Medicine and Biology. © Springer Science+Business Media New York. Pág. 317 – 330. DOI 10.1007/978-1-4939-0820-2\_13.
- Hellström, M., Kavanagh, K. D. y Benzie J. A. H. 2010. Multiple spawning events and sexual reproduction in the octocoral *Sarcophyton elegans* (Cnidaria: Alcyonacea) on Lizard Island, Great Barrier Reef. Mar Biol. 157:383–392. DOI 10.1007/s00227-009-1325-8
- Holt, W. V., Brown, J. L. y Comizzoli, P. 2014. Reproductive Science as an Essential Component of Conservation Biology. En: W.V. Holt et al. (eds.). Reproductive Sciences in Animal Conservation, Advances in Experimental Medicine and Biology. © Springer Science+Business Media New York. Pág. 3 – 14. DOI 10.1007/978-1-4939-0820-2\_13.
- Jin, S., Zhan, J. y Zhou, Y. 2021. Argonaute proteins: structures and their endonuclease activity. Molecular Biology Reports 48:4837-4849. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06476-w>.

- Jordán-Dahlgren, E. y Rodríguez-Martínez, R. E. 2003. The Atlantic coral reefs of Mexico. Latin American corral reefs. Elsevier Amsterdam. 131-158 pp.
- Juliano, C., Wang, J. y Lin, H. 2011. Uniting germline and stem cells: the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms. *Annu Rev Genet*; 45. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132541.
- Kahng, S. E., Benayahu, Y. y Lasker, H. R. 2011. Sexual reproduction in octocorals. *Mar Ecol Prog Ser.* 443: 265–283. doi: 10.3354/meps09414.
- Kayal, E., Bentlage, B., Pankey, M. S., Ohdera, A. H., Medina, M., Plachetzki, D. C., Collins, A. G., Rayan J. F. 2018. Phylogenomics provides a robust topology of the major cnidarian lineages and insights on the origins of key organismal traits. *BMC Evolutionary Biology.* 18:68. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1142-0>
- Kramarsky-Winter, E. 2016. Morphological, Physiological and Cytological Aspects of reproduction in Scleractinian Corals. En: *Diseases of Coral*. Primera edición. Eitado por: Woodley, C. M., Downs, C. A., Bruckner, A. W., Porter J. W. y Galloway S. W. 2016. John Wiley & Sons, Inc. pág. 108-124.
- Kulkarni, A. y Extavour, C. G. 2017. Convergent evolution of germ granule nucleators: A hypothesis. *Stem Cell Research.* 24: 188-194. dx.doi.org/10.1016/j.scr.2017.07.018
- Kumar, J. S. Y., Geetha, S., Raghunathan, C. y Sornaraj, R. 2018. Diversity and distribution of gorgonians (Octocorallia) in the Long Island and it's adjacent areas in Middle Andaman, India. *Ind. Jour. Geo. Mar. Sci.* 47(01): 96-102.
- Lehnert, E. L., Mouchka, E. M., Burriesci, M. S., Gallo, N. D., Schwarz, J. A. y Pringle, J. R. 2014. Extensive differences in gene expression between symbiotic and aposymbiotic cnidarians. *G3: Genes, Genomes, Genetics.* 4(2): 277-295. doi: 10.1534/g3.113.009084
- Lin, H. y Spradling, C., 1997. A novel group of *pumillio* mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in *Drosophyla* ovary. *Development.* 124.2463-2476.
- Maldonado, E., Barbosa, V., Bezares-Calderón, L. A., Castillo-Robles, J., Franco-Cea, A., Hansberg, V., Lásarez-Laguna, L. I., Paz-Gómez, D., Salinas, L. S., Silva-García, C. G. y Navarro, R. E. 2011. Germ granules: Vehicles for germ cell determination. En: Chimal-Monroy, J. Ed. *Topics in Animal and Plant Development: From Cell Differentiation to Morphogenesis.* 1-37.
- Morandini, A. C. y Da Silveira, F. L. 2001. Sexual reproduction of *Nausithoe aurea* (Seyphozoa, Coronatae). Gametogenesis, egg release, embryonic development, and gastrulation. *Sci. Mar.* 65(2): 139-149.
- Müller, M., Fazi, F. y Ciaudo, C. 2020. Argonaute Proteins: From Structure to Function in Development and Pathological Cell Fate Determination. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 7:360. DOI: 10.3389/fcell.2019.00360.
- Nong W., Cao J., Li Y., Qu X., Sun J., Swale T., Yip H., Qian P., Qiu J., Kwan H., Bendena W., Tobe S., Chan T., Yip K., Chu K., Ngai S., Tsim K, Holland P. y Hui J. 2020. Jellyfish genomes reveal distinct homeobox gene clusters and conservation of small RNA processing. *Nature communications.* 11:3051.
- Pakes, M. J. y Woollacott, R. M. 2008. Reproduction of the gorgonian *Plexaura flexuosa* in Bermuda. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 357: 121–127.
- Pandolfi, J.M., Connolly S. L., Marshall D. J., y Cohen A. L. 2011. Projecting Coral Reef Futures Under Global Warming an Ocean Acidification. *Science* 333: 418-422.

- Petes E., C., 2016. Anatomy. En: Diseases of Coral. Primera edición. Editado por: Woodley, C. M., Downs, C. A., Bruckner, A. W., Porter J. W. y Galloway S. W. 2016. John Wiley & Sons, Inc. pág. 85-107.
- Rangel-Huerta, E., Avila-Soria, G. y Maldonado, E. 2017. Evolution of the Marine Animal Forest: EvoDevo of Corals, Sea Anemones, and Jellyfishes. In: Rossi, S., Bramanti, L., Gori, A., Orejas, C. (eds) Marine Animal Forest. Springer. Cham. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-21012-4\\_49](https://doi.org/10.1007/978-3-319-21012-4_49)
- Rebscher, N., Volk, C., Teo, R. y Plickert, G. 2008. The Germ Plasm Component Vasa Allows Tracing of the Interstitial Stem Cells in the Cnidarian *Hydractinia echinata*. *Developmental Dynamics*. 237: 1736-1745 pp.
- Rodríguez-Martínez, R. E., Banaszak, A. T., McField, M. D., Beltrán-Torres, A. U. y Álvarez-Filip, L. 2014. Assessment of *Acropora palamata* in the Mesoamerican Reef System. *PLoS ONE*. (4): 96-140 pp. doi:10.1371/journal.pone.0096140
- Schlesinger, A., Kramarsky-Winter, E., Rosenfeld, H., Armoza-Zvoloni, R. y Loya, Y. 2010. Sexual plasticity and self-fertilization in the sea anemone *Aiptasia diaphana*. *PLoS one*. 5(7): e11874. doi:10.1371/journal.pone.0011874
- Seipel K., Yanze N. y Shmid V. 2004. The germ line an somatic stem cell gene Cniwi the jellyfish *Podocoryne carnea*. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 1-7.
- Shikina S., Chen C., Liou J., Shao Z., Chung Y., Lee Y., Chang C. 2012. Germ Cell Development in the Scleractinian Coral *Euphyllia ancora* (Cnidaria, Antozoa). *PLoS one* 7(7): e41569. doi:10.1371/journal.pone.0041569.
- Shikina, S., Chen, C. C., Chiu, Y. L., Tsai, P. H. y Chang, C. F. (2020). Apoptosis in gonadal somatic cells of scleractinian corals: implications of structural adjustments for gamete production and release. *Proc. R. Soc. B* 287: 20200578. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2020.0578>.
- Shikina, S., Chung, Y., Wang, H., Chiu, Y., Shao, A., Lee, Y. y Chang, C. 2015. Localization of early germ cells in stony coral, *Euphyllia ancora*: potential implications for germline stem cell system in coral gametogenesis. *Coral Reefs*. 34: 639-653 pp.
- Siomi A. y Kuramochi-Miyagawa S. 2009. RNA silencing in germlines- exquisite collaboration of Argonaute proteins with small RNAs for germline survival. *Current Opinion in Cell Biology*. 21:246-434.
- Sokolowski, A., Brulinska, d., Olenyev, M. y Wolowicz, M. 2016. Does temperature and salinity limit asexual reproduction of *Aurelia aurita* polyps (Cnidaria: Scyphozoa) in the Gulf of Gdan'sk (southern Baltic Sea)? An experimental study. *Hydrobiologia*. 773:49–62. DOI 10.1007/s10750-016-2678-x.
- Solana, J. 2013. Closing the circle of germline and stem cells: the Primordial Stem Cell hypothesis. *EvoDevo*. 4(2):1-16.
- Sunagawa, S., Wilson, E. C., Thaler, M., Smith, M. L., Caruso, C., Pringle, J. R., Weis, V. M., Medina, M. y Schwarz, J. A. 2009. Generation and analysis of transcriptomic resources for a model system on the rise: the sea anemone *Aiptasia pallida* and its dinoflagellate endosymbiont. *BMC Genomics*. 10(1). DOI:10.1186/1471-2164-10-258
- Szmant, A., M. 1986. Reproductive ecology of Caribbean reef corals. *Coral Reefs* 5:43-54 pp.
- Tan, E., Izumi, R., Takeuchi, Y., Isomura, N. y Takemura, A. 2020. Molecular aproches underlying the oogenic cycle of the scleractinian coral, *Acropora tenuis*. *Scientific reports*. 10: 9914.

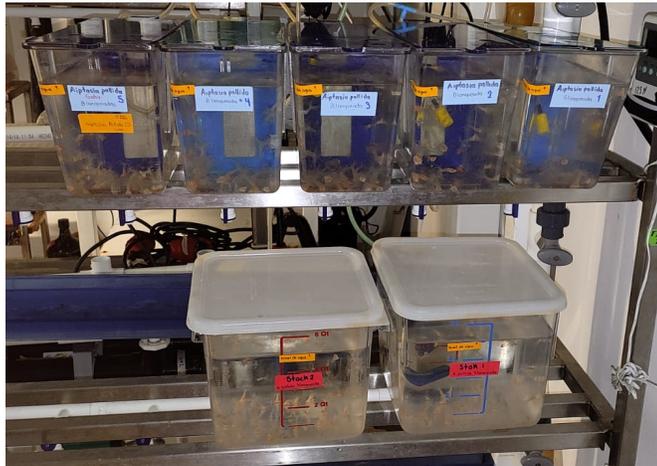
- van Wolfswinkel, J. C. 2014. Piwi and potency: PIWI proteins in animal stem cells and regeneration. *American Zoologist*, 54(4), 700-713.
- Vargas-Ángel, B., Colley, S. B., Hoke, S. M. y Thomas, J. D. 2006. The reproductive seasonality and gametogenic cycle of *Acropora cervicornis* off Broward County, Florida, USA. *Coral Reefs* 25:110-122.
- Ward, S. y Harrison, P. 2000. Changes in gametogenesis and fecundity of acroporid corals that were exposed to elevated nitrogen and phosphorus during the ENCORE experiment. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 246 179-221.
- Watanabe T., Chuma S., Yamamoto Y., Kuramocho-Miyagawa, Totok Y., Toyoda A., Hoki Y., Fujiyama A., Shibata T., Sado T., Noce T., Nakano T., Nakatsuji N., Lin H. Y Sasaki H. 2011. MITOPLD Is a Mitochondrial Protein Essential for Nuage Formation and piRNA Biogenesis on the Mouse Germline. *Developmental Cell* 20, 364-375.
- Woodhead A. J., Hicks C. C., Norström A.V., Williams G. J. y Graham N.A. 2019. Coral reef ecosystem services in the Anthropocene. *Functional Ecology* 33:1023-1034. Doi: 10.1111/1365-2435.13331
- Wylie, C. 2000. Germ cells. *Current Opinion in Genetics and Development*. 10:410-413.
- Yajima, M. y Wessel, G. M. 2012. Autonomy in specification of primordial germ cells and their passive translocation in the sea urchin. *Development* 139: 3786-3794. doi:10.1242/dev.0822

## 13. ANEXOS

### 13.1. ANEXO I Manual de cuidado y mantenimiento del cultivo de anémonas *Exaiptasia diaphana* aposimbióticas.

En el Acuario de Medusas y Anémonas se mantuvo en cultivo una línea de clones de anémonas aposimbióticas *Exaiptasia diaphana* que se expandieron de dos stocks. Se conservaron cinco peceras de 3 L y dos stocks de peceras de 6 L (Fig. A). Se alimentaron dos veces y se limpiaron una vez por semana.

Los cuidados necesarios, alimentación, limpieza y procedimiento de expansión se describen en las siguientes secciones.



**Figura A.** Peceras con *Exaiptasia diaphana* aposimbiótica. Arriba peceras de 3 L y abajo peceras stock de 6 L.

#### **Notas generales:**

- *Exaiptasia diaphana* es una anémona que se puede reproducir asexualmente por medio de laceración pedal, puede vivir sin simbioses y en este caso la principal forma de reproducción es asexual que es muy frecuente y rápida por lo que se debe considerar al expandir o mantener el tamaño de la población deseada.
- Aunque las peceras se encuentran en un sistema de recirculación no se conectaron a este ya que los pequeños pies pueden atravesar la pared de malla y podrían llegar a crecer anémonas en las tuberías impidiendo el funcionamiento adecuado de las tuberías. Por lo anterior, no se recomienda conectar las peceras al sistema de recirculación.

- Para evitar la presencia de organismos o contaminantes dañinos, el agua usada para todos los cambios de agua y limpieza, provenía de la laguna arrecifal que era filtrada antes de ingresar al acuario, después irradiada con una lámpara de UV y filtrada por filtro de calcetín.
- Todas las peceras contaban con un difusor de aire y tapas, estas permanecieron siempre con ellos a excepción del momento de alimentación y limpieza.
- De las peceras de 3 L se tomaban anémonas para ensayos, mientras que los organismos en peceras stock no se usaron para ensayos ya que estas estaban disponibles en caso de pérdida considerable de organismos por contratiempos.
- Las peceras permanecieron en ciclos de 14 h de luz y 10 h de oscuridad.

#### ***Alimentación:***

- Desconectar la bomba de aire, quitar las tapas y mangueras con difusores, lavarlas con agua dulce y dejar secar. En caso de encontrar anémonas incrustadas en los difusores, retirarlas y regresarlas a las peceras.
- Con ayuda de una pipeta de transferencia, dejar caer el contenido de al menos 5 pipetas por las paredes y centro de cada pecera. Si existe alguna región en donde se notó que las anémonas no lograron obtener alimento, adicionar nauplios en esa zona.
- Al pasar al menos 3 h seguir el procedimiento para limpieza o volver a conectar los difusores a la bomba de aire o distribuidor de aire, verificar el flujo y tapar cada pecera.

#### ***Limpieza:***

- La limpieza se puede realizar una vez por semana, sin embargo, si se alimenta frecuentemente se recomienda hacerlo dos veces por semana.
- Esperar de tres a cuatro horas después de la alimentación para limpiar.
- Tomar una pecera y colocarla en la mesa de trabajo. Buscar pies de anémonas en el fondo y las cuatro paredes, con ayuda de una pipeta de transferencia de punta ancha desprenderlos de la base, al retirar el agua estos se desecharán. En caso de expandir seguir lo indicado en el apartado de expansión por reubicación de pies de este anexo.

Un exceso de pies en la pecera impide el crecimiento de los organismos de mayor tamaño.

- Si se notan restos de alimento en las esquinas o la formación de un biofilm opaco por las paredes, se puede limpiar raspando las superficies con una espátula de plástico o una pipeta de transferencia de punta ancha, teniendo cuidado de no desprender o lastimar anémonas. Esta limpieza es importante ya que de no realizarla la calidad del agua baja.
- Desechar suavemente toda el agua de la pecera en la tarja evitando perder alguna anémona, si es el caso, esta se deberá tomar con la pipeta de transferencia y colocar en un vaso con AMF, hasta volver a llenar la pecera y regresar a la misma.
- De inmediato volver a llenar la pecera con AMF, es muy importante dejar caer el chorro de agua suavemente evitando desprender o dañar algún organismo. Se observó que pueden reducir su tamaño si se agrega el agua con demasiada fuerza. Se recomienda no llenar la pecera hasta el nivel final, esto para facilitar su traslado al sistema.
- Ya en el sistema, llenar la pecera hasta el nivel indicado, conectar de nuevo cada difusor al distribuidor de aire o bomba de aire y conectar. Observar que las burbujas no sean demasiado turbulentas para mover una anémona o que impidan que adopten la forma alargada o expandida característica de estos organismos.
- Colocar las tapas de las peceras, observar que el flujo de aire esté en cada una de las peceras y que el nivel de agua sea el indicado, antes de terminar, reiterar cada uno de estos pasos ya que de lo contrario las anémonas pueden deshidratarse y morir.

***Expansión:***

La expansión puede ser de dos tipos. El primero es dejar desarrollar organismos desde los pies, estos alcanzarán las tallas grandes en más tiempo, pero pueden agregarse a la población para no perder la cantidad de organismos disponibles para ensayos.

El segundo tipo de expansión es para dejar crecer a las anémonas a las tallas más grandes, dejándolas en peceras con pocos organismos para disponer de más espacio y alimento, esto se realizará en caso de requerirse.

- Reubicación de pies
- Colocar en la mesa de trabajo una nueva pecera de 3 L con AMF y una pared de malla.

- Al desprender cada uno de los pies se deben tomar con otra pipeta de transferencia y colocar en la pecera anteriormente preparada, colocar máximo 20 pies y tratar de mantenerlos separados.
- Ubicar esta pecera en un espacio disponible dentro del sistema, colocar un difusor de aire y conectar a una bomba o al distribuidor de aire. Es importante que el flujo sea el menor ya que de lo contrario este impedirá que los pies se adhieran a las paredes de la pecera.
- Monitorear el crecimiento de estos organismos, no será necesario alimentarlos ya que no cuentan aún con las estructuras necesarias para la alimentación (tentáculos y boca), pero será necesario alimentar después de aproximadamente dos semanas cuando estas estructuras ya comiencen a observarse.
- Hacer un recambio del 50 % de AMF una vez a la semana, evitando desprender, tocar o agregar el AMF con mucha fuerza, mantener el flujo mínimo hasta que se comience a alimentar, entonces, se podrá aumentar el flujo y se deberá modificar a la par del crecimiento de las anémonas.
  - Organismos de tallas mayores.
- Colocar en la mesa de trabajo una pecera nueva de 3 L con AMF y una pared de malla.
- Identificar en cada una de las peceras, los organismos de talla mediana (aproximadamente 3cm de longitud del cuerpo) o grande (>5cm), esta medida se toma desde la base del pie hasta la boca cuando se encuentran extendidas y sin contemplar los tentáculos.
- Con ayuda de una espátula plástica desprender al organismo desde la base del pie en un solo movimiento firme en forma de pala. Se debe tener especial cuidado en no dañar la pared del cuerpo ya que este es un tejido bastante delgado y frágil que puede rasgarse con facilidad.
- Con una pipeta de transferencia de boca ancha, tomar al organismo desde el pie y trasladarlo a la nueva pecera.
- Por pecera se recomienda colocar de cinco a diez organismos, lo que les permitirá tener el espacio suficiente y alimento abundante para crecer.

- Colocar un difusor de aire conectado a una bomba o distribuidor de aire. El flujo debe ser el menor por al menos un día, hasta observar que todos los organismos estén adheridos a las paredes de las peceras.
- Se deberán alimentar y limpiar como se indica en la sección de alimento y limpieza dos o tres veces por semana, se recomienda no alimentar en días consecutivos ya que la digestión puede durar hasta 24 h.
- Se deberán eliminar los pies que se encuentren para evitar la pérdida de espacio.

**Parámetros necesarios:**

Los parámetros a monitorear se presentan en la Tabla A. Estos no se modificaron durante todo el desarrollo del cultivo.

Se deben medir cada semana con un multiparámetro YSI Pro DSS o hidrómetro para acuario, potenciómetro, termómetro y un test colorimétrico para amonio, nitrito y nitratos de la marca API.

Para corregir los valores fuera de rango de salinidad, pH, amonio, nitritos y nitratos se deben realizar cambios del AMF de las peceras cada 48 h. Por otro lado, la temperatura se mantiene en los rangos deseados ya que la temperatura ambiente se regula con aire acondicionado del acuario.

<b>Tabla A. Parámetros del agua aceptables para el cultivo de anémonas aposimbióticas.</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Rango aceptable</b>
<b>Salinidad</b>	34 – 35 ppm
<b>pH</b>	7.8 – 8.5
<b>Temperatura</b>	21-22 °C
<b>Amonio</b>	< 0.1 ppm
<b>Nitrito</b>	< 0.2 ppm
<b>Nitrato</b>	< 0.2 ppm

### **13.2. ANEXO II Manual para desarrollo y mantenimiento del cultivo de medusas *Aurelia aurita*.**

En este anexo se describen todos los cuidados necesarios para el mantenimiento y crecimiento de *Aurelia aurita* desde éfiras hasta medusas de > 7 cm de diámetro de la campana.

Para este trabajo se realizó la inducción a estrobilación de pólipos por descenso de temperatura, se colocaron en una incubadora a 10 °C por aproximadamente un mes hasta obtener todas las éfiras de los estróbilos. Durante este tiempo se alimentaron dos veces por semana hasta que se observaron los primeros segmentos.

#### ***Notas generales:***

- En cualquiera de sus fases, las éfiras y medusas son organismos frágiles y delicados por lo que deben manipularse cuidadosamente, evitando flujos turbulentos, tocarlas con objetos punzocortantes, comprimirlas, dejarlas por varios segundos fuera del agua o en una profundidad menor al del grosor la campana.
- Para garantizar el crecimiento de los organismos, es importante mantener una alimentación constante y abundante. La frecuencia de alimentación dependerá de la talla de los organismos.
- Debido a que la alimentación consiste en la captura y expulsión de los desechos, la limpieza del agua es de vital importancia ya que la descomposición de los restos puede afectar la calidad del agua y provocar la degradación de los tejidos en menos de 24 h.
- Cada organismo tiene un ritmo de crecimiento individual por lo que es importante dar seguimiento continuo para trasladarlos a los recipientes correspondientes dependiendo del tamaño o ser descartados en caso de no ser viables.
- Es importante que el sistema de circulación se encuentre aclimatado y funcionando con anticipación, por lo que se recomienda acondicionarlo antes de obtener las éfiras.

- Considerar que durante el desarrollo del cultivo se observó que los organismos más próximos a las fuentes de luz del acuario crecieron considerablemente mejor que los que no se encontraban cerca de las fuentes de luz.
- Los parámetros monitoreados que se presentan en la tabla B, se midieron con un multiparámetro YSI Pro DSS o hidrómetro para acuario, potenciómetro, termómetro y un test colorimétrico para amonio, nitritos y nitratos de la marca API.

### ***Acondicionamiento y mantenimiento del sistema de recirculación***

En esta sección, se describen los pasos necesarios para iniciar y mantener el sistema de recirculación en estado óptimo.

Es importante que el ciclado de nitrógeno y los parámetros que se presentan en la tabla B estén estandarizados antes de introducir a los primeros organismos.

- Hacer una lectura inicial de salinidad, pH y temperatura. En caso de detectar algún parámetro fuera de rango se deben realizar cambios de agua del depósito al menos cuatro veces a la semana. Una vez corregido el problema, esta lectura se deberá tomar cada semana.
- Para corregir exceso de salinidad, se puede realizar un recambio diario del 10 % de AMF del depósito, agregando aproximadamente 5 % de agua dulce.
- Después de cada limpieza se debe asegurar que el nivel del depósito de agua sea el adecuado para prevenir la falta de agua o algún daño en la bomba.
- Durante el tiempo de ciclado se observa un aumento de amonio seguido de un aumento de nitrato que se estabilizan al aumentar nitritos. Las dos especies iniciales pueden ser tóxicas para los organismos por lo que deben ser constantemente monitoreadas, se recomiendan lecturas cada dos semanas.
- Cada semana se debe hacer un cambio del filtro de calcetín del depósito, se debe agregar Nutrafin Cycle y cambiar el filtro de cilindro cada mes.
- Una vez que los organismos se encuentren en el sistema, se debe monitorear el flujo de cada pecera, ya que es variable dependiendo de la etapa de los organismos. El flujo más bajo es para en éfiras pequeñas y se aumenta a la par de su crecimiento. Los rangos de flujo van de los 80 ml/seg hasta 190 ml/seg aproximadamente. El flujo

adecuado se determinará al observar que los organismos no modifiquen la forma de la campana o no se golpeen bruscamente contra las paredes de la pecera y que mantengan el movimiento suficiente para nadar por la columna de agua. Lo anterior es importante ya que de lo contrario los organismos pueden invertir la campana, disminuir el tamaño o perder tentáculos si el flujo es muy turbulento, por el contrario, si el flujo es muy bajo, pueden hundirse, no nadar y perder movilidad.

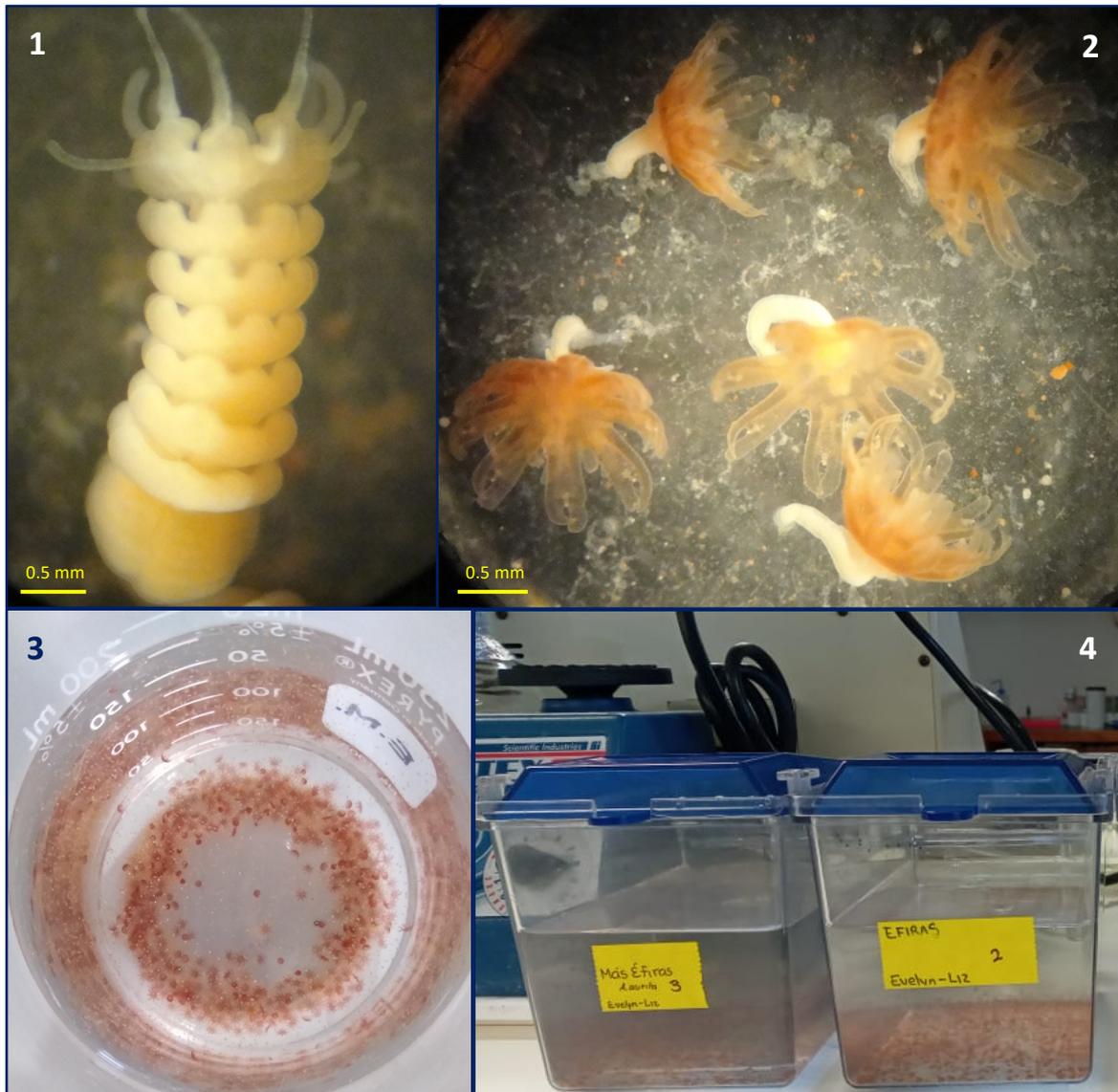
<b>Parámetro</b>	<b>Rango aceptable</b>
Salinidad	34 – 35 ppm
pH	7.8 – 8.5
Temperatura	21-22 °C
Amonio	< 0.1 ppm
Nitrito	< 0.2 ppm
Nitrato	< 0.2 ppm

#### ***Colecta de las éfiras provenientes de los estróbilos***

En la estrobiación por inducción térmica, las éfiras suelen liberarse lentamente y al desprenderse sus pulsos no son muy constantes hasta que se trasladan a temperatura ambiente. Se recomienda usar peceras pequeñas o cristalizadores con aproximadamente 300 ml de AMF, sin difusores de aire y con una tapa que no sea hermética para permitir el intercambio de gases.

Colectar las éfiras con ayuda de una pipeta de transferencia y trasladarlas suavemente a los cristalizadores o peceras en un lapso no mayor a 24 h después del desprendimiento, esto para alimentarlas a la brevedad (Fig. B 3 y 4).

En algunos casos puede haber éfiras que presenten un número de brazos mayor o menor al usual de 8 brazos esto no parece representar un problema mientras las éfiras logren reacomodar sus brazos de una manera equidistante para mantener una simetría y un equilibrio.



**Figura B.** Estróbilos y éfiras recuperadas de *A. aurita*. 1) Estróbilus con siete segmentos que serán éfiras. 2) Éfiras listas para desprenderse del estróbilus. 3) Éfiras recientemente recuperadas y alimentándose en un cristalizador de vidrio. 4) Éfiras alimentándose en peceras pequeñas.

### ***Cuidados de éfiras en los primeros días (2mm – 7mm)***

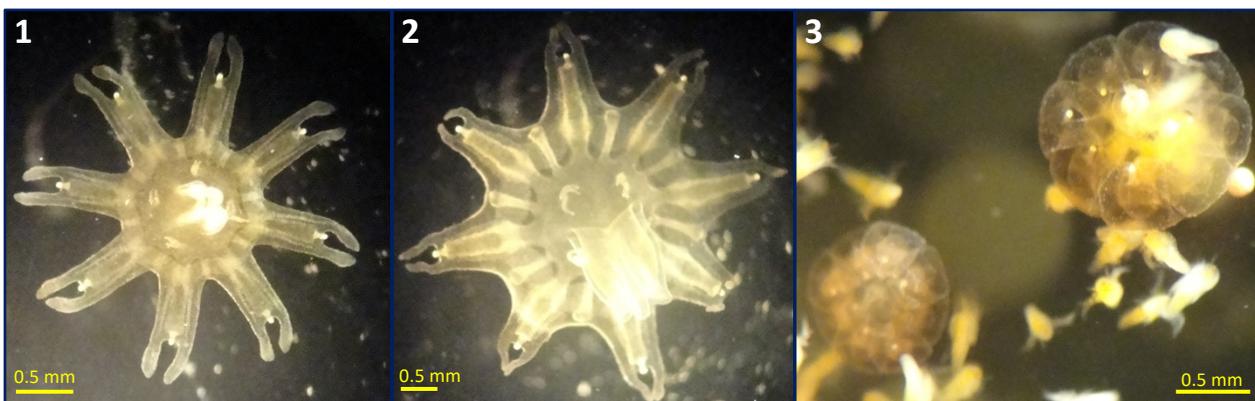
La alimentación en esta etapa es crucial para su crecimiento y supervivencia, de ser posible, se recomienda alimentarlas diario o como mínimo 6 días a la semana.

Es conveniente monitorear el orden de desprendimiento, ya que las primeras éfiras en desprenderse del estróbilus suelen ser las más grandes y competentes, mientras que las últimas, suelen ser más pequeñas, menos competentes y suelen tener una alta tendencia a presentar malformaciones o menor número de brazos que les impide alimentarse

adecuadamente, por lo que al detectar alguna anomalía estos organismos deben descartarse para permitir que el alimento sean aprovechados por otros organismos

En los primeros días de vida, una de las principales amenazas para las éfiras, es permanecer en el agua sucia con restos de alimento. Es importante identificar el momento en el que debe hacerse el cambio de agua, si se realiza antes de que las éfiras terminen de alimentarse, es probable que expulsen el alimento en el agua limpia y si se demora demasiado, las éfiras pueden degradarse debido a la descomposición del alimento.

Aunque en esta etapa puede resultar difícil percibir si los organismos han terminado de alimentarse debido su reducido tamaño y la similitud de su coloración con el alimento, se recomienda realizar el cambio por agua limpia alrededor de 3 h después de haber suministrado el alimento (Fig. C).



**Figura C.** Éfiras de *A. aurita* de 2 a 7 mm de diámetro. 1) Éfira de aproximadamente 3 mm de diámetro. 2) Éfira de aproximadamente 5 mm de diámetro. 3) Éfira alimentándose, los tentáculos están plegados hacia la boca ayudando a llevar el alimento a la boca.

#### *Alimentación:*

- Con ayuda de una pipeta de transferencia agregar directamente el alimento por todo el cristalizador.

#### *Limpieza:*

- Después de 3 h, preparar un recipiente con AMF limpia.
- Para trasladar a los organismos, se recomienda usar pipetas de transferencia o en caso de tener muchos organismos se puede usar un colador de malla fina, verter

completamente el contenido del cristizador haciendo pasar a los organismos a través del colador.

- En el nuevo recipiente desplazar el colador horizontalmente de adelante hacia atrás en la superficie del agua, de tal forma que los organismos se desprendan de la malla con el flujo del agua.
- En caso de que algunas éfiras se queden adheridas al colador, sumergirlo nuevamente en el agua sucia y rescatar a las éfiras con una pipeta de transferencia.

Nota: En caso de utilizar pipetas de transferencia, se debe cortar la punta de la pipeta según vayan creciendo los organismos esto con el fin de evitar maltratarlas si la apertura de la pipeta es reducida.

### ***Cuidados de éfiras en crecimiento (7mm – 1cm)***

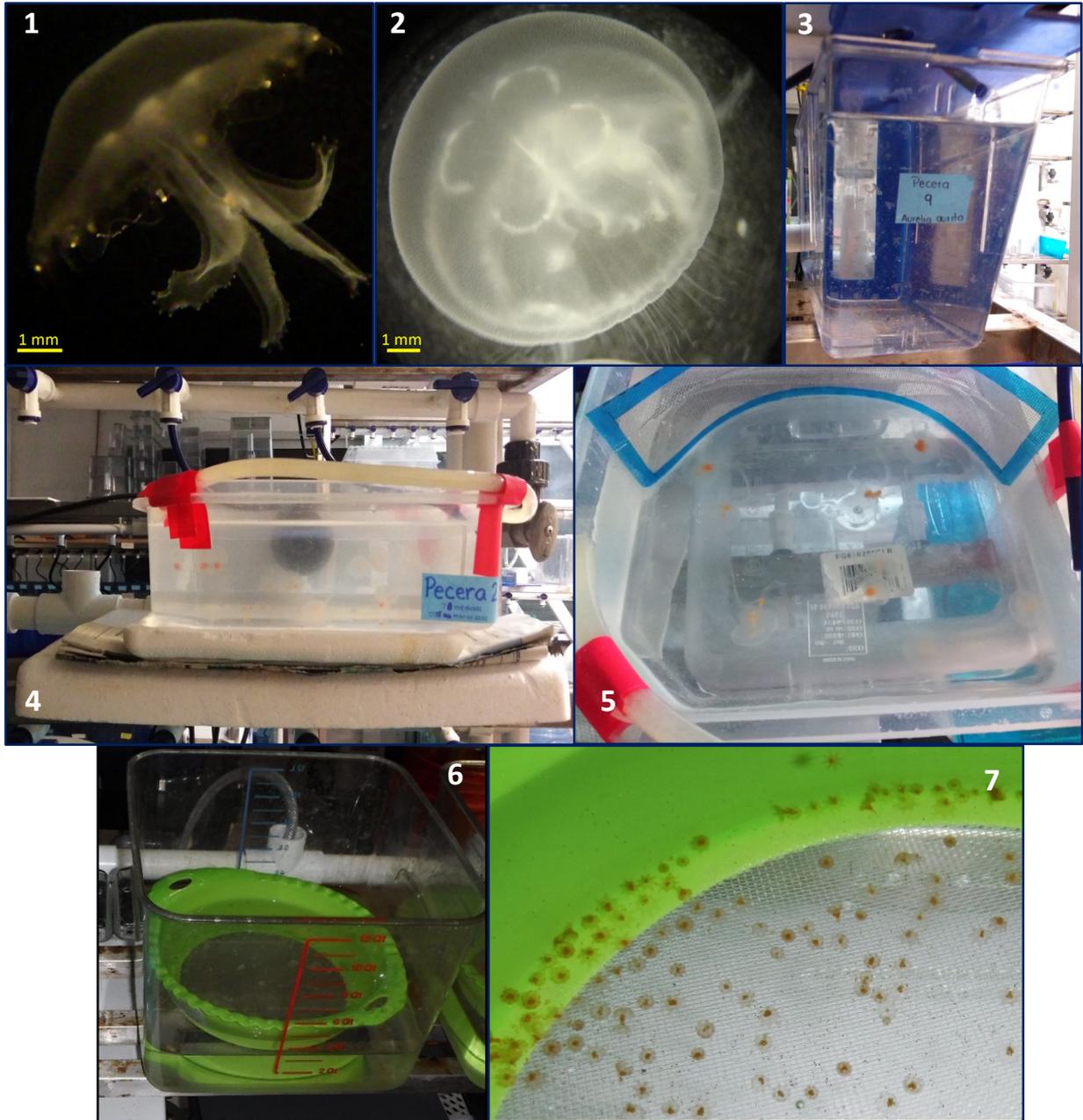
Al alcanzar una talla de aproximadamente 7mm de diámetro de la campana, las éfiras se trasladan a uno de los tres tipos de peceras que se muestran en la figura D; peceras de 12 L con fondo de red sin flujo, peceras de 3 L con flujo y adaptadas al sistema de recirculación y peceras con flujo semicircular de 2 L también adaptadas al sistema de recirculación.

En esta etapa se recomienda alimentar al menos 5 veces por semana, sin embargo, al estar conectadas al sistema de recirculación o tener fondo con red el proceso de limpieza se facilita.

La limpieza es recomendable después de 3 a 4 horas. En caso de usar pipetas de transferencia con punta ancha, cuidar de no absorber a las éfiras de forma oral/aboral, sino de forma aboral/oral para evitar dañarlas.

En caso de que sean muchos organismos, se puede usar un colador, evitando pasar la menor cantidad de residuos del alimento al nuevo recipiente.

A continuación, se describen los cuidados necesarios en cada caso.



**Figura D.** Éfiras de *A. aurita* de 7 mm a 1 cm de diámetro y los tres tipos de peceras usadas para su mantenimiento. 1) Éfira de aproximadamente 7 mm en donde ya logra observar la formación bien definida de la campana y sus brazos orales. 2) Medusa juvenil de aproximadamente 1 cm de diámetro. 3) Pecera de 3 L con éfiras de entre 7 mm y 1 cm de diámetro. 4) Pecera de 2L con flujo semicircular. 5) Vista superior de la imagen 4 con medusas alimentándose. 6) Pecera de 12 L con fonde de malla. 7) Vista superior de la imagen 6, en donde se obserban éfiras de aproximada 7 mm de diámetro. Fotos 6 y 7 fueron proporcionadas por Rodríguez Salazar M. E.

- Peceras de fondo de red sin flujo (12 L).

Estos recipientes facilitan la limpieza, debido a que la red del recipiente deja pasar residuos de alimento y retiene a las éfiras de 7mm o más grandes (Fig. D 6 y 7). Sin embargo, debe considerarse esta opción sólo como un recurso de crianza masivo, con el fin de descartar progresivamente a los organismos no viables por lo que es temporal, ya que, al alcanzar una talla mayor a 1 cm, se vuelve necesario trasladarlas a un recipiente con flujo semicircular.

#### *Montaje y alimentación:*

- En peceras de 12 L agregar aproximadamente 4 L de AMF.
- Colocar el recipiente de red al fondo y trasladar a las éfiras de >7mm de diámetro.
- Para alimentar, agregar los nauplios de *Artemia salina* con una pipeta de transferencia distribuyendo alrededor del diámetro del recipiente redondo.

#### *Limpieza:*

- Después de 3 o 4 h, trasladar el recipiente a la mesa de trabajo teniendo cuidado de no perturbar a las éfiras que permanecen en el fondo.
- Preparar otra pecera de 12 L con AMF limpia con la misma cantidad de agua.
- Con un vaso de plástico, retirar la capa superficial de agua ya que se suele formar un biofilm que acumula quistes de artemia que pueden afectar la calidad del agua en el nuevo recipiente con AMF limpia.
- Agitar suavemente de arriba a abajo el recipiente de red, para enjuagar los restos de alimento.
- Sacar suavemente el recipiente de red del agua y limpiar las paredes con una sanita para eliminar el resto de quistes antes de colocarlo en la pecera con AMF limpia.
- Colocar el recipiente lentamente y ligeramente inclinado en la nueva pecera, evitando la formación de burbujas de aire bajo la red.
- En caso de que las éfiras se queden flotando en la superficie, debido a la tensión superficial, se puede remover un poco el agua con pipetas de transferencia para que estas regresen a la columna de agua.

- *Peceras de 3 L dentro del sistema.*

Se debe considerar que, aunque las éfiras de esta talla pueden permanecer en estas peceras, es difícil regular el flujo de forma que todas estén circulando sin que sea tan agresivo (Fig. D3). También, debe tomarse en cuenta que a medida que crezcan, será conveniente trasladarlas a otro tipo de peceras con más espacio.

#### *Montaje y alimentación:*

Inicialmente, se pueden colocar hasta 90 organismos por pecera, sin embargo, se recomienda depurar continuamente los organismos que no sean viables, para dejar cada vez menos organismos por pecera (idealmente entre 10 y 20) y que estos aprovechen mejor el alimento y el espacio para crecer.

- Preparar una pecera de 3 L con aproximadamente 2 L de AMF, colocar la pared de malla, una tapa y colocarla en un espacio dentro del sistema que coincida con una salida de agua y cercana a las fuentes de luz.
- Colocar preferentemente una sola manguera al centro, con un flujo bajo (~10ml/seg).
- Ya en su sitio agregar AMF hasta el nivel más alto de la pecera, al nivel de la salida de agua hacia la tubería de desagüe.
- Colocar a las éfiras dentro de la pecera con pipetas de transferencia cortadas, y observar durante unos minutos la circulación, con el fin de regular el flujo.
- Para alimentar, cerrar el flujo desde la válvula que alimenta a toda la fila de peceras del sistema para mantener el flujo que se reguló anteriormente y agregar el alimento usando pipetas de transferencia.

#### *Limpieza:*

Debido a que los restos de alimento podrían ensuciar los filtros del sistema con rapidez, y alterar los parámetros del agua, se recomienda realizar la limpieza trasladando los organismos a peceras con AMF limpia y colocarlos nuevamente dentro del sistema.

- Después de 3 a 4 h retirar la pecera del sistema, descartando ahí mismo una pequeña cantidad de agua para evitar derrames en el traslado a la mesa de trabajo.

- Colocar la pecera en la mesa de trabajo y preparar otra pecera con aproximadamente 2 L de AMF limpia.
- Retirar la pared de red de la pecera sucia, enjuagar con agua de grifo para retirar residuos de alimento, y colocarla en la nueva pecera antes de trasladar a los organismos.
- Pasar a los organismos a la pecera limpia usando pipetas de transferencia.
- Al terminar de pasar a los organismos a la pecera limpia, regresarla a su lugar correspondiente en el sistema. Colocar nuevamente la tapa y la manguera.
- En caso de que sean varias peceras en una misma fila, no se debe abrir la válvula del flujo de ese nivel hasta que todas las peceras hayan sido limpiadas y de asegurarse que las mangueras estén correctamente colocadas.
  - Peceras con flujo semicircular de 2L.

Aunque estos recipientes son los más eficientes, y sirven para mantener medusas de tallas grandes, pueden colocarse éfiras desde 7mm de diámetro (Fig. D 4 y 5). Es recomendable dejar en estos recipientes a las éfiras más grandes, con el propósito de favorecer su crecimiento sin ser perturbadas ya que la limpieza en estas peceras no implica el traslado a otras. Inicialmente se pueden colocar hasta 50 organismos, aunque también se debe depurar organismos que pueden presentar algún daño.

*Montaje y alimentación:*

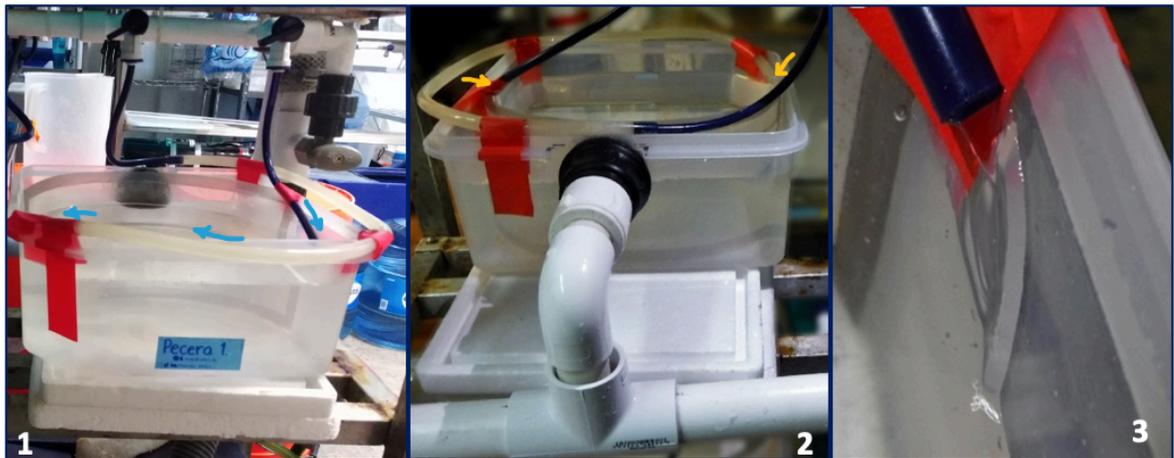
- Para colocar por primera vez estas peceras en el sistema, primero se debe asegurar que el recipiente quede lo suficientemente elevado para que el tubo de salida de agua alcance el tubo de descarga del sistema, se pueden usar láminas de unicel para ajustar la altura requerida. Se debe tener cuidado de que el recipiente no quede inclinado (Fig. E1).
- Para simular el flujo semicircular se usan dos tipos de mangueras; las propias del sistema (azules) y para aumentar la longitud de una de estas mangueras se

conectará con una manguera de plástico para acuario. Estas se colocarán en dos de las paredes de la pecera de tal forma que estarán opuestas (Fig.E2).

Es importante colocarlas con el flujo directo hacia la pared promoviendo un flujo laminar que no golpee directamente a los organismos (Fig. E3). Las mangueras se fijan al recipiente con cinta adhesiva por lo que al colocarlas se debe tener especial cuidado de realizarlo completamente en seco y evitar así un desprendimiento posterior, además se debe confirmar que el nivel de agua no toque las cintas para evitar humedecerlas.

De no tener suficiente cuidado las mangueras pueden desprenderse y el agua del sistema puede derramarse dejando sin agua a los organismos.

- Llenar la pecera con AMF hasta tocar el tubo de salida del agua, abrir las llaves de paso del sistema y ajustar un flujo lento.
- Colocar los organismos con un vaso o pipeta de transferencia.
- Después de colocarlos, se sugiere monitorearlos unos minutos, y regular la intensidad del flujo de acuerdo a la necesidad.
- Para alimentar, cerrar la válvula de paso de agua de la fila correspondiente del sistema, y agregar el alimento con pipetas de transferencia.



**Figura E.** Peceras de 2 L con flujo semicircular acopladas al sistema de recirculación. 1) Pecera nivelada con láminas de unicel, se señala con flechas azules el trayecto de las mangueras que fueron colocadas con cinta adhesiva roja. 2) Una presentación trasera de la pecera, se observa el ensamblaje a la tubería de desagüe del sistema de recirculación. Se marca con flechas naranjas la caída del agua en paredes opuestas de la pecera. 3) Se muestra la caída de agua en la pared, permitiendo un flujo laminar. Las fotografías 2 y 3 fueron proporcionadas por Rodríguez Salazar M. E.

### *Limpieza:*

- Cuando se tiene a varios organismos de tallas entre 7mm y 1cm, se recomienda primero abrir la válvula de paso de agua a la mitad del flujo, para que al cabo de unos minutos de la circulación del agua, se acumule el alimento al centro del recipiente.
- Mientras los organismos se encuentren circulando y flotando, retirar los restos de alimento con una pipeta de transferencia, cuidando de no tocar a los organismos en movimiento.

Se sugiere realizar una limpieza de la pecera cada mes y medio (o cuando se detecten demasiados residuos acumulados al fondo), primero trasladando cuidadosamente a los organismos a otro recipiente y luego desmontando completamente la pecera para lavarla, colocar nuevas mangueras, llenarla con agua limpia y regresar a los organismos.

### ***Cuidado de medusas juveniles (>1cm)***

Al alcanzar una talla de 1 cm o más, las éfiras pueden considerarse medusas juveniles.

Las diferencias más importantes a considerar en comparación con las etapas anteriores, son: que su cuidado se vuelve menos intenso (aunque conviene mantener una alimentación constante y abundante para favorecer su crecimiento), será conveniente mantenerlas siempre con flujo (por lo que el uso de recipientes de fondo de red ya no es posible), los traslados entre recipientes por limpieza deberán realizarse con vasos y no con pipetas de transferencia adecuadas a su tamaño, se deberá suspender el uso de peceras de 3 L y usar peceras de 10 L o peceras de flujo semicircular de 3.5 o 7 L.

Se recomienda bajar la densidad de organismos a un máximo de 10 medusas por pecera.

- Peceras semicirculares adaptadas al sistema (3.5 L y 7 L)

El montaje y mantenimiento son los mismos mencionados en la sección de cuidados de éfiras de 2 a 7mm de diámetro. Por lo que a continuación se mencionan los cuidados necesarios para la alimentación y limpieza.

*Alimento:*

- Se debe continuar con la alimentación abundante (mínimo 5 días por semana en organismos de 1 cm; al menos 4 veces por semana en organismos de 2 a 3 cm; y un mínimo de 3 veces por semana en organismos de 5 cm o mayores).
- Cerrar las válvulas de paso de agua antes de agregar el alimento.
- Agregar el alimento con ayuda de pipetas de transferencia.

*Limpieza:*

- En tallas más grandes es cada vez más fácil observar el proceso de alimentación de los organismos, así como el momento en que estos terminan después de aproximadamente 2 a 3 h. Es común observar que dejan pequeños montones de alimento, mismos que pueden ser retirados con pipetas de transferencia aún sin flujo.
  - Nunca retirar los restos de alimento directo de la boca de las medusas, también se debe tener extremo cuidado de nunca jalar los brazos orales (se ha observado que esto es lo que ocasiona que la campana se cierre y/o pierda sus brazos orales impidiendo que se alimenten y posteriormente mueran).
  - Al terminar de retirar los residuos de alimento, abrir nuevamente la válvula de paso de agua y corroborar el flujo adecuado de agua.
- Peceras de 10 L del sistema de recirculación.

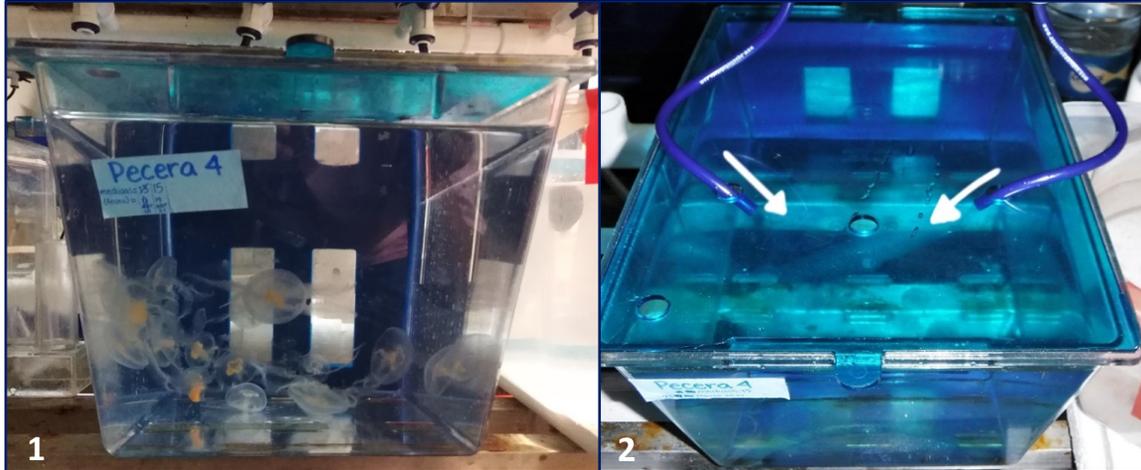
Estas peceras deben tener dos mangueras de flujo de agua, una frente a otra (Fig. F). El uso de estas peceras permite tener hasta 15 organismos dependiendo de su tamaño, sin embargo, después de cada alimento se deben retirar y trasladar a los organismos a una nueva pecera con agua limpia para evitar la contaminación del agua por residuos de alimento que el flujo de agua no logra eliminar.

*Alimento:*

- Agregar el alimento con pipetas de transferencia, preferentemente en dirección opuesta a la luz, para que las medusas tengan oportunidad de capturar a los nauplios

mientras estos se desplazan a través de toda la columna de agua en búsqueda de la fuente de luz.

- No olvidar cerrar la válvula de paso de agua antes de agregar el alimento.



**Figura F.** Peceras de 10 L con medusas de 7 cm de diámetro o más. 1) Medusas en movimiento. 2) Pecera con las mangueras encontradas una frente a la otra, es señalado con flechas azules. La fotografía 2 fue proporcionada por Rodríguez Salazar M. E.

#### *Limpieza:*

- Antes de retirar la pecera del sistema después de 2 o 3 h, se recomienda descartar un poco de agua para evitar derrames.
- Trasladar la pecera a la mesa de trabajo.
- Colocar una nueva pecera en el sitio que quedó vacío y llenar con AMF casi hasta el límite del nivel de agua usual.
- Retirar la pared de red de la pecera a limpiar y enjuagar con agua dulce antes de colocarlo en la pecera limpia.
- Si las medusas se quedan al fondo, se recomienda retirar una parte de agua de la pecera con el fin de que sea más fácil colectarlas.
- Si las medusas aún permanecen en el fondo, se puede introducir el vaso en el agua de manera que cause un flujo que lleve a la medusa al interior del vaso (se puede colectar a más de una medusa a la vez, siempre y cuando no se produzcan flujos muy agresivos).

- Una vez colectada(s) la(s) medusa(s) en el vaso, se puede descartar una parte del volumen de agua, si está aún contiene residuos de alimento.
- Introducir a las medusas en la pecera limpia del sistema, introduciendo el vaso a la mitad e inclinándolo lentamente para que las medusas puedan salir lentamente (nunca depositarlas vertiendo el contenido desde arriba, en forma de cascada, y cuidar nunca crear burbujas).
- Al terminar de pasar a todas las medusas, colocar nuevamente la tapa y las mangueras.
- Abrir la válvula de paso de agua de la fila correspondiente, hasta haber terminado de limpiar todas las peceras de la misma fila. Ajusta el flujo de agua si es necesario.

### ***Otras observaciones***

La falta de alimento o limpieza, un flujo elevado o deficiente, alteraciones en los parámetros del agua o una mala manipulación, son los principales factores que afectan la forma y tamaño de la campana de las medusas y/o la pérdida de brazos orales. En algunos casos la campana puede reducirse quedando los brazos orales desproporcionadamente largos, o bien, la campana puede invertirse, ocasionando un movimiento aberrante en las medusas, dificultando su desplazamiento y alimentación.

Aunque el crecimiento rápido de las éfiras se relaciona principalmente con la cantidad de alimento suministrado, parece haber cierta influencia positiva con el espacio que comparten las medusas en un mismo recipiente y con la luz a la que se encuentran expuestas.

Como se comentó anteriormente, el flujo es importante durante la etapa de crecimiento, sin embargo, no se observó un flujo determinado para las peceras o los recipientes extendidos, se probaron flujos desde 20 ml/10:59 seg a 20 ml/15 seg. Generalmente los flujos bajos suelen ser adecuados en organismos pequeños y aumentan al crecer. Sin embargo, esto será determinado por la observación de la reacción de los organismos.

### **13.3. ANEXO III Protocolo de tinción hematoxilina de Harris-eosina para tejidos de cnidarios.**

Modificado de Grosso-Becerra 2017-2018.

Usar en todo momento guantes y al manipular xilol hacerlo en la campana de extracción.

1. Para desparafinar hacer tres lavados en xilol cada uno por 10 min.
2. Sumergir las láminas durante 10 minutos en la serie de etanoles. La serie usada fueron etanol al 100 %, 96 %, 80 % y 70 %.
3. Hacer un lavado de 5 minutos en agua Milli-Q y drenar la laminilla en papel absorbente cuidando de no tocar y secar el tejido.
4. Colocar las laminillas en Hematoxilina de Harris (solución comercial de la marca Hycel) filtrada durante 4 minutos.
5. Colocar rápidamente en alcohol ácido (HCl al 1 % en etanol) durante 20 segundos.
6. Pasar todas las laminillas a un copling con agua de grifo y lavar bajo el chorro de agua hasta el viraje a azul (aproximadamente 5 min).
7. Hacer un lavado rápido en agua Milli-Q y drenar.
8. Colocar las laminillas en eosina Y\*, durante 3 minutos.
9. Hacer un lavado con agua corriente durante 15 segundos
10. Drenar y deshidratar realizando lavados de 3 min etanol al 96 %, 100 % y Xilol.
11. Dejar evaporar el xilol y montar con el medio de montaje Organo/Limonene de la marca Sigma-Aldrich. Poner pequeñas gotas a lo largo del tejido cuidando de no dejar burbujas, cubrir con cubreobjetos, dejar que se disperse en toda la lámina y se solidifique. Dejar secar un día.

\*Para preparar Eosina Y solución de trabajo, se debe preparar una solución stock como sigue:

- En 20 ml de agua Milli-Q disolver 1 g de Eosina Y
- Agregar 80 ml de alcohol absoluto

Preparar solución de trabajo:

- Tomar 25 ml de la solución stock
- Agregar 75 ml de alcohol al 80 %
- Aforar a 100 ml con agua Milli-Q
- Agregar 2 o 3 gotas de ácido acético

### 13.4. ANEXO IV Protocolo de preparación de reactivos para electroforesis SDS-PAGE y Western blot

En este anexo se presentan los protocolos para preparar las soluciones usadas para la extracción de proteínas, electroforesis SDS-PAGE y Western Blot.

- **Buffer Laemmli 1X**

a) Primero, se debe preparar una solución stock al 4X para 8 ml como se indica a continuación:

TrisBase (1M, pH:6.8) ..... 2.5 ml  
SDS .....0.8 g  
Glicerol .....3 – 3.5 ml  
Azul Bromofenol (1mg/ml).....20 µl  
Agua MQ .....aforar a 8 ml

Esta solución debe repartirse en alícuotas en varios tubos de microcentrífuga de 1 ml y almacenarse a -20 °C.

b) Preparar solución de trabajo Buffer Laemmli 1X:

- Descongelar una alícuota de solución stock 4X.
- Agregar 280 µl de 2-mercaptoethanol por cada 1 ml de solución stock 4X.
- Dar vortex, tomar 250 µl y colocarlo en un nuevo tubo de microcentrífuga.
- Agregar 750 µl de agua Milli-Q.
- La solución está lista para usar.

- **Gel discontinuo de acrilamida-bisacrilamida.**

- Se realizaron dos soluciones stock de acrilamida-bisacrilamida, una para el gel de apilamiento y otra para el gel de separación como se indica en la siguiente tabla y siguiendo las indicaciones del fabricante:

<b>Tabla C. Reactivos y cantidades para stock del gel de separación y apilamiento.</b>		
	Stock Apilamiento (ml)	Stock Separación (ml)
<b>Acrilamida 40 %</b>	1.35	4.5
<b>Bisacrilamida 2 %</b>	0.675	2.4
<b>Buffer apilamiento 8X*</b>	1.875	--
<b>Buffer separación 4X**</b>	--	4.5
<b>Glicerol 87 %</b>	--	1.8
<b>Agua Milli-Q</b>	11.1	4.8
<b>Total</b>	15	18

\*Buffer apilamiento: 0.125 M TrisHCL pH: 6.8, 0.1 % SDS.

\*\* Buffer separación: 0.375 M TrisHCL PH. 8.8, 0.1 % SDS.

- Desgasificar cada solución al menos 15 minutos antes de usarla. Esto se realizó colocando la solución en un matraz Kitasato con tapón y con ayuda de una bomba de vacío se desgasificó por 15 min.
- Preparar el gel de separación, tomar 4ml del stock del gel de separación y agregar lo siguiente:

10 % APS.....26.66 µl

TEMED.....2.66 µl

Mezclar bien.

- Con una punta de 1 ml, adicionar lo antes posible la mezcla por las paredes de las placas de vidrio.
- Colocar por encima una capa de etanol al 70 %, mientras el gel polimeriza.
- Desechar cualquier punta que haya estado en contacto con la mezcla, ya que algunos componentes son tóxicos por lo que deben ser desechados en residuos peligrosos.
- Cuando el gel este sólido decantar el etanol y eliminar los restos con papel filtro.
- Preparar el gel de apilamiento, tomar 1.5 ml del stock del gel de apilamiento y adicionar lo siguiente:

10 % APS .....11.25 µl

TEMED .....1.125  $\mu$ l

- Colocar el gel de apilamiento con una punta del 1 ml por las paredes de las placas de vidrio, colocar el peine, cuidando de no tener burbujas y dejar secar.
- Desechar en residuos peligrosos las puntas que hayan tenido contacto con la mezcla.

- **Buffer de corrida 10X**

Para 500 ml de Buffer de corrida 10 X:

TrisBase (25 mM, pH: 8.8) .....15 g

Glicina (192 mM) .....75 g

SDS (0.1 %) .....5 g

Agua MQ .....Aforar a 500 ml

Preparar solución de trabajo al 1X con agua Milli-Q.

- **Solución colorante azul brillante de Coomassie-R-250.**

La solución colorante se prepara de la siguiente manera para 1L, considerar que este colorante se reutiliza y se puede preparar menos considerando las proporciones:

-Disolver 2.5 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 en 450 ml de metanol, dejar en agitación una noche.

-Agregar 450 ml de agua Milli-Q.

- Agregar 100 ml de ácido acético glacial.

-Si es necesario, filtrar con papel Whatman.

- **Solución decolorante.**

De igual forma, considerar que si es necesario es posible preparar menos de esta solución, tomando en cuenta las proporciones.

-En 450 ml de metanol agregar 450 ml de agua Milli-Q.

- Adicionar 100 ml de ácido acético glacial.

- **Buffer de transferencia 1X**

Para 1 L adicionar lo siguiente:

- 100 ml de Buffer de corrida 10x
- 800 ml de agua Milli-Q
- 100 ml de 2-propanol (isopropanol)
- Aforar a 1 L con agua Milli-Q

- **Buffer Fosfato Salino (PBS) 10X.**

- Disolver los siguientes componentes en 800 ml de agua Milli-Q:
  - NaCl (137 mM).....80 g
  - KCl (27 mM).....2g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (100 mM) .....14.4 g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....2.4 g
- Ajustar pH : 7.5
- Aforar a 1 L
- Esterilizar por 20 min, 120 °C y 15 psi.
- Almacenar a 4 °C
- Preparar una solución al 1X que servirá como solución de trabajo.