

**Efecto de la translocación de glucosa sobre el metabolismo de *Exaiptasia diaphana*
(Phylum: Cnidaria), en estado aposimbiótico y simbiótico**

.

William Augusto Macías Villabona

Departamento de biología, Facultad de Ciencias Básicas

Universidad de Pamplona

Pamplona, Colombia

2023

**Efecto de la translocación de glucosa sobre el metabolismo de *Exaiptasia diaphana*
(Phylum: Cnidaria), en estado aposimbiótico y simbiótico**

William Augusto Macías Villabona

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Biólogo

Directores:

Dr. Luis Parmenio Suescún Bolívar

Facultad de Ciencias Básicas – Universidad Santiago de Cali

Dr. Daniel Cerqueda García

Instituto de Ecología, A.C.

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas

Universidad de Pamplona

Pamplona, Colombia

2023

A mi familia y amigos

Al Dr. Daniel Cerqueda-García y Dr. Luis Parmenio Suescún-Bolívar

Abreviaturas

EFM: Modo de flujo elemental
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
GS: Glutamina sintetasa
GOGAT: Glutamina-oxoglutarato aminotransferasa
NADP: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina
GDH: Glutamato deshidrogenasa
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SER: Serina
GLU: Glutamato
GLN: Glutamina
GLI: Glicina
ALA: Alanina
ASN: Asparagina
ASP: Aspartato
μM: micromolar

Glosario

Cnidaria: Filo de animales invertebrados, algunos con relaciones simbióticas con microalgas
Anémona: Invertebrado marino que pertenece al filo Cnidaria, el mismo filo de los corales.
Microalga: Microorganismo microscópico fotosintético
Hospedero: organismo que alberga a otro organismo.
Modelo: representación simplificada de un sistema
Estrés: Alteraciones que se producen en un organismo en respuesta a presiones externas e internas.
Blanqueamiento coralino: Fenómeno en el que los corales expulsan las microalgas simbióticas.

Tabla de contenido

Tabla de contenido	5
1. 7	
2. Abstract	8
3. 9	
4. Marco teórico y antecedentes	11
4.1 Relación simbiótica Cnidario-microalga.	11
4.2 <i>Exaiptasia</i> como sistema modelo.	12
4.3 Características morfológicas, fisiológicas y genómicas del Cnidario <i>Exaiptasia</i>	13
4.4 Ubicación de Symbiodiniaceae en la simbiosis Cnidario-microalga	14
4.5 Metabolismo general de <i>Exaiptasia</i> .	15
4.6 Modelos estequiométricos de redes metabólicas	18
5. 20	
6. 20	
6.1 Objetivo general	20
6.2 Objetivo específico	20
7. 21	
7.1 Búsqueda del genoma <i>Exaiptasia diaphana</i>	20
7.2 Reconstrucción y curación de la red metabólica	21
7.3 Evaluación de efectos de la glucosa sobre el metabolismo de <i>Exaiptasia</i>	21
8. Resultados	22
8.1 Reconstrucción metabólica de <i>Exaiptasia diaphana</i>	22
8.2 Evaluación de efectos de la translocación de la glucosa sobre el metabolismo de <i>Exaiptasia diaphana</i> .	23
9. 27	
9.1 Efecto de la traslocación de glucosa en el hospedero	27
10. 30	
11. 31	
12. Anexos	41

Índice de figuras

Figura 1: Características externas e internas de <i>Exaiptasia diaphana</i>	13
Figura 2: Organización de la simbiosis cnidario-dinoflagelado.	14
Figura 3: Interacciones nutricionales cnidario-microalga	16
Figura 4: Reconstrucción metabólica o resumen celular de <i>Exaiptasia diaphana</i> .	22
Figura 5: Esquema del modelo en estado aposimbiótico de <i>Exaiptasia diaphana</i>	23
Figura 6: Esquema del modelo en estado simbiótico de <i>Exaiptasia diaphana</i>	24
Figura 7: Histograma sobre la comparación de la productividad de biomasa de aminoácidos y carbohidratos. Fold-change, cambio entre el estado simbiótico y aposimbiótico.	26

Índice de tablas

Tabla 1: Espectro completo de las capacidades biosintéticas de una célula de <i>Exaiptasia diaphana</i>	22
--	----

1. Resumen

Algunos corales, animales del filo Cnidaria, se caracterizan por tener una asociación con microalgas fotosintéticas de la familia Symbiodiniaceae. Esta relación simbiótica es la base fundamental para que estos animales puedan vivir en aguas marinas oligotróficas tropicales y subtropicales, y construir el colorido y biodiverso ecosistema arrecifal coralino. Sin embargo, su lento crecimiento, su dificultad y alto costo de reproducción en cautiverio, han dificultado algunos estudios experimentales que aborden preguntas claves de su relación simbiótica. Por ello, la anémona *Exaiptasia diaphana* de la clase Anthozoa, es uno de los mejores modelos para el estudio de simbiosis por tener ventajas como realizar estudios a escala genómica. Con el fin de comprender un poco más su interacción simbiótica, esta investigación se basó en el análisis de Modos de Flujo Elemental para evaluar los efectos de la glucosa sobre la red metabólica de la anémona. Se tuvo en cuenta el estado aposimbiótico, bloqueando la entrada de glucosa y amonio, y el simbiótico, con flujo normal de estos metabolitos. Los resultados muestran que la condición aposimbiótica provoca una disminución en las reacciones de biomasa de algunos aminoácidos no esenciales y carbohidratos, en comparación con la condición simbiótica. Esto se debe a que la glucosa translocada por los simbioses es utilizada por el hospedero para reciclar el amonio y posteriormente incorporarlo a los aminoácidos. Además, la desactivación de algunas reacciones implicadas en el metabolismo de *Exaiptasia* y la heterotrofia (obtención de nutrientes de fuentes externas) explica la disminución del potencial metabólico de los metabolitos de biomasa, fundamental en procesos como la respiración, el crecimiento y la reproducción del hospedero.

Palabras clave: Simbiosis, Modo de flujo elemental (EFM), modelo, genoma, Symbiodiniaceae

2. Abstract

Some corals, animals of the Cnidaria phylum, are characterized by having an association with photosynthetic dinoflagellates of the Symbiodiniaceae family. This symbiotic relationship is the fundamental basis for these animals to be able to live in tropical and subtropical oligotrophic marine waters, and build the colorful and biodiverse coral reef ecosystem. However, its slow growth, its difficulty and high cost of reproduction in captivity, have made it difficult for some experimental studies that address key questions of their symbiotic relationship. For this reason, the *Exaiptasia diaphana* anemone of the Anthozoa class is one of the best models for the study of symbiosis because it has advantages such as carrying out studies on a genomic scale. In order to better understand their symbiotic interaction, this research relied on Elemental Flow Modes analysis to assess the effects of glucose on the anemone's metabolic network. The aposymbiotic state was taken into account, blocking the entry of glucose and ammonium, and the symbiotic state, with normal flow of these metabolites. The results show that the aposymbiotic condition causes a decrease in the biomass reactions of some non-essential amino acids and carbohydrates, compared to the symbiotic condition. This is due to the fact that the glucose translocated by the symbionts is used by the host to recycle the ammonium and subsequently incorporate it into amino acids. In addition, the deactivation of some reactions involved in the metabolism of *Exaiptasia* and heterotrophy (obtaining nutrients from external sources) explains the decrease in the metabolic potential of biomass metabolites, essential in processes such as respiration, growth, and reproduction of the host.

Keywords: Symbiosis, Elemental Flow Mode (EFM), model, genome, Symbiodiniacea

3. Introducción

El sistema arrecifal, formado por corales escleractinios hermatípicos (Filo Cnidaria), proporcionan una serie de beneficios, como protección costera y albergue de una gran diversidad de vida marina (Ahmed et al., 2007). Estos animales forman una asociación simbiótica mutualista con microalgas dinoflageladas de la familia Symbiodiniaceae, que se localizan en una estructura transmembranal al interior de las células gastrodérmicas, denominada simbiosoma (Wakefield & Kempf, 2001). Las microalgas proporcionan moléculas orgánicas producto de la fotosíntesis conocidas en su conjunto como fotosintetatos; entre estos fotosintetatos transferidos al hospedero se encuentra el glicerol, la glucosa, algunos aminoácidos y algunos lípidos, los cuales son utilizados en diferentes rutas metabólicas. El cnidario, por su parte, le ofrece a su huésped protección, nutrientes inorgánicos como fósforo y nitrógeno (principalmente en forma de amonio, NH_4^+) (Burriesci et al., 2012; Yellowlees et al., 2008) y un ambiente lumínico idóneo (Enríquez et al., 2005).

Por otro lado, esta asociación es sensible a distintos factores provocados por el hombre, como el cambio climático global (Baker et al., 2008), la acidificación de los océanos (Kroeker et al., 2010) y los excesos de nutrientes (Tomascik & Sander, 1985). Estas condiciones de estrés provocan que el animal expulse al dinoflagelado, un evento conocido como blanqueamiento coralino (Gates et al., 1992).

El reciclaje de nutrientes en la simbiosis Cnidaria-microalga ha permitido el éxito de los arrecifes de coral durante millones de años en aguas oceánicas oligotróficas sub- y tropicales. Sin embargo, se desconocen algunos efectos del desequilibrio de este reciclaje sobre el metabolismo del hospedero, en parte, por la dificultad y el costo de trabajar con corales en condiciones de laboratorio. Por tanto, *Exaiptasia diaphana* -primo- cercano de los corales, es un organismo modelo que posee diferentes ventajas, como su alta información genómica, metabolómica, fisiológica y molecular, que la hacen ideal para experimentos en cualquier parte del mundo (Rädecker et al., 2017).

La comprensión de la ruta del reciclaje de nutrientes se debate con gran interés en la actualidad, puesto que la asimilación de nitrógeno la realiza principalmente el simbiote. Sin embargo, en otros estudios han demostrado que el hospedero es quien controla la disponibilidad de nitrógeno en forma de amonio, y a su vez la densidad de la microalga (Cui et al., 2019; Falkowski et al., 1993). Por consiguiente, es importante estudiar estos mecanismos metabólicos para entender la

regulación del reciclaje de nutrientes en la simbiosis Cnidaria-microalga, bajo diferentes estados simbióticos de la anémona. Se conoce que la glucosa translocada hacia el hospedero es fundamental en la asimilación de nitrógeno a través de la síntesis de aminoácidos, lo cual compromete su supervivencia en condiciones que inducen la pérdida de sus simbiontes (Cui et al., 2019). Por tal razón, se requiere abordar desde la biología de sistemas y estudios *in silico*, el estudio de la configuración metabólica en el sistema modelo de simbiosis *Exaptasia*, bajo los estados simbiótico y aposimbiótico

Los sistemas modelo ayudan a conocer cómo funciona la biología de la simbiosis, para que después sean aplicadas a los estudios de organismos en laboratorio. *Exaptasia* como uno de los sistemas modelo mejor estudiado, ha ayudado a los biólogos a comprender de manera experimental un poco más la biología y los mecanismos moleculares de la simbiosis Cnidario-microalga (Weis et al., 2008).

En este estudio, se investigó el impacto de la glucosa translocada en el metabolismo de la anémona *Exaptasia diaphana* en su estado simbiótico y aposimbiótico. Se utilizó el análisis de Modo de Flujo Elemental (EFM) para determinar el potencial máximo de metabolitos, incluyendo algunos aminoácidos no esenciales y carbohidratos, y se compararon las diferencias cuando se bloqueó la principal fuente de carbono (glucosa) y nitrógeno (amonio), en contraste con un flujo normal de estos metabolitos.

4. Marco teórico y antecedentes

4.1 Relación simbiótica Cnidario-microalga.

La relación mutualista donde ambos socios se benefician, es la característica fundamental en los arrecifes de coral (Sheppard et al., 2018). Algunos corales del Filo Cnidaria, del Orden Actiniaria, albergan algas unicelulares de la familia Symbiodiniaceae, y al igual que cualquier fotoautótrofo, usan la energía solar para sintetizar fotosintetatos, lo cual les permite colonizar ambientes oligotróficos (Roth, 2014). En esta asociación su éxito se da por el movimiento bilateral de metabolitos, el alga le proporciona el carbono fijado al hospedero para su crecimiento, y este a su vez le brinda nutrientes, ambiente lumínico idóneo y protección, dejando un trato que les cuesta la independencia, puesto que la mayoría de los corales no pueden vivir sin estos dinoflagelados (Sheppard et al., 2018). Se tiene registro que la simbiosis comenzó hace aproximadamente 240 millones de años en el Triásico, según lo indica el fósil *Pachythecalis major* (Muscatine et al., 2005), lo que demuestra la antigüedad y la estabilidad de esta relación a lo largo de la historia evolutiva.

La relación no es del todo obligada, dado que puede llevar a la expulsar a sus simbiontes en ciertas condiciones de estrés. Este evento se le conoce como blanqueamiento, debido a la disminución tanto de la densidad de dinoflagelados, como la concentración de pigmentos (Fitt et al., 2001). Son varios los elementos que por hechos humanos tienen en riesgo la supervivencia de los corales. Estos riesgos son principalmente el calentamiento global inducido por el aumento de gases efecto invernadero; la acidificación de los océanos, producto del incremento en la concentración de CO₂ en la atmósfera; la eutrofización debido al incremento de nutrientes como el nitrato (NO₃⁻), amonio (NH₄⁺) y fósforo inorgánico (Fabricius et al., 2005); así como otros factores como el turismo y la sobrepesca (Morais et al., 2018).

En el caso del Cnidario *Exaiptasia pulchella*, se ha evidenciado que la liberación de microalgas es provocada por el estrés térmico, obligando a la expulsión de su simbionte (Gates et al., 1992). La concentración de microalgas en corales juveniles puede llegar al 8% cuando se someten a una temperatura de 31 °C, mientras que a 28 °C esta concentración de simbiontes incrementa a 87% (Abrego et al., 2012). Además, el aumento de la temperatura también afecta negativamente la fisiología de la calcificación del hospedero (Dellaert et al., 2022). De igual modo, la acidificación del océano no solo podría afectar negativamente los organismos calcificantes sino a

muchos otros, y de la misma forma ocasionar cambios ecológicos irreversibles (Kroeker et al., 2010).

Los arrecifes no perturbados viven en ambientes donde las concentraciones de los nutrientes del agua circundante son relativamente bajas, por lo que su estrategia es tener alta capacidad para reciclarlos (Roth, 2014). El exceso de nutrientes en el sistema, provoca inestabilidad con las relaciones simbióticas y con el reciclaje natural de nitrógeno y fósforo, ocasionando un desequilibrio que provoca daños abruptos a los corales. En relación con lo anterior, otros organismos como algas, esponjas y bivalvos crecerán en estos ambientes ricos en nutrientes, en consecuencia, pasarán a competir por el espacio con los corales escleractinio que antes dominaban allí (Bell et al., 2014). Conjuntamente, el incremento del ion PO_4^- tiende a afectar o inhibir la formación de cristales de aragonita, importante proceso calcificación en corales duros (Simkiss, 1964).

Los peces son los responsables en gran parte de controlar el crecimiento de algas (Rasher et al., 2012), para que los corales generen un hábitat complejo donde tengan un lugar de reproducción, alimentación y crecimiento (Mumby, 2016). La sobrepesca disminuye la densidad poblacional y da vía libre que las algas y las esponjas compitan por el espacio con los corales (Burkepile & Hay, 2006; Loh et al., 2015). El turismo no controlado afecta claramente a los corales, ya sea por contacto directo con ellos, las anclas de las embarcaciones o por contaminantes o toxinas que llevan los turistas, se ha visto que degrada el arrecife y va perdiendo su valor ecosistémico (Dearden et al., 2007; Hasler & Ott, 2008).

4.2 *Exaiptasia* como sistema modelo.

La pequeña anémona de mar *Exaiptasia* es un modelo fundamental en el estudio de las simbiosis y de las interacciones metabólicas entre corales y microalgas (Rädecker et al., 2017; Weis et al., 2008). Algunas de sus ventajas son las siguientes: I) permite la inducción de la reproducción asexual, para obtener poblaciones clonales suficientes para realizar experimentos (Grawunder et al., 2015); II) se pueden mantener libres de simbiosis y ser reinfectadas con la microalga, lo que facilita otros estudios sobre la adaptación y evolución de la simbiosis, así como el conocimiento de los mecanismos de flexibilidad y especificidad del simbiote; III) cuenta con una amplia gama de información molecular y celular; se ha secuenciado su genoma lo que ha permitido comprender la función y evolución de la endosimbiosis Cnidario-dinoflagelado (Baumgarten et al., 2015; Bucher et al., 2016)

4.3 Características morfológicas, fisiológicas y genómicas del Cnidario *Exaiptasia*

El género de anémonas *Exaiptasia* vive principalmente en etapa de pólipo sésil y habita en aguas poco profundas subtropicales (Muller-Parker & Davy, 2001). Esta anémona se caracteriza por poseer tentáculos largos y simples (hasta 96 en número), que pueden medir hasta 20 mm; columna principalmente lisa de hasta 30 mm; cíncldes notables a mitad de columna, su disco pedial de hasta 10 mm de diámetro con forma ancha-regular, disco oral de 10 mm de diámetro, posee seis pares de mesenterios con el mismo número distal y proximal (Grajales & Rodríguez, 2014). En cuanto a su anatomía interna dispone de un músculo esfínter marginal mesogleal difuso; músculos retractores fuertes y mesenterios organizados en cuatro ciclos hexaméricamente (Grajales & Rodríguez, 2014) (Fig. 1).

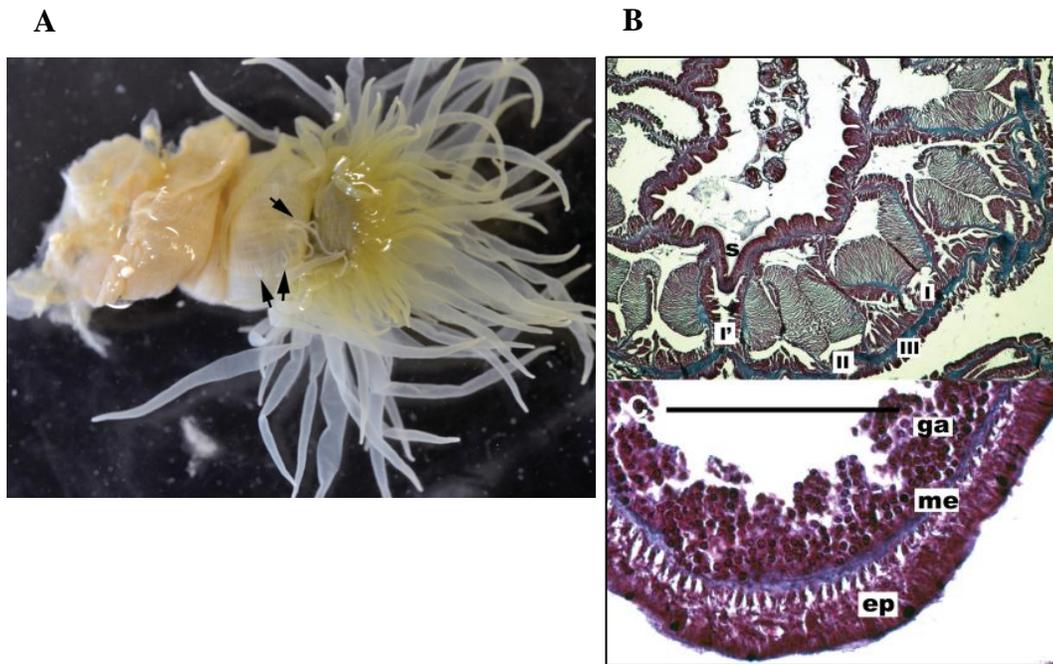


Figura 1: *Exaiptasia diaphana*. **A)** características externas de la anémona, las flechas indican los cíncldes **B)** anatomía interna, (parte superior) se observa los mesenterios y (parte inferior) corte transversal de un tentáculo, se muestra estructuras como la **ep:** epidermis, **me:** mesoglea y **ga:** gastrodermis (parte inferior). Tomado de Grajales & Rodríguez, 2014.

Las anémonas por su naturaleza permanecen solitarias, al igual que otros invertebrados que afrontan desafíos al alimentarse, protegerse, y adherirse a un sustrato (Clarke et al., 2020). Cuentan con orgánulos específicos conocidos como cnidocistos que le permiten cumplir las dos primeras acciones mencionadas anteriormente; además, le proporcionan veneno para su

mecanismo de defensa (Marino et al., 2004). Respecto a su adhesión, se ha identificado material propio del disco pedal en el que se destacan cuatro clases de células secretoras de material adhesivo que se componen de proteínas, glicanos y quinonas secretadas por el ectodermo del disco del pie (Clarke et al., 2020)

El tamaño del genoma de *Exaiptasia* es haploide y es de ~260 millones de pares de bases (Mb), casi la mitad del tamaño de *Acropora digitifera*, que es diploide con ~420 Mb (Shinzato et al., 2011) y *Nematostella vectensis*, que es haploide con ~450 Mb (Putnam et al., 2007). En *Exaiptasia* se han reconocido 29.269 modelos de genes, cerca del 94% de los cuales están respaldados con evidencias de ARN y el 89% tienen homólogos con otros eucariotas. Su diferencia de tamaño se le atribuye a la presencia baja de intrones cortos, además, alrededor del 26% de su genoma son secuencias repetidas (Baumgarten et al., 2015).

4.4 Ubicación de Symbiodiniaceae en la simbiosis Cnidario-microalga

La simbiosis entre invertebrados marinos y microalgas de la familia Symbiodiniaceae es común en diferentes miembros del filo Cnidaria, como corales pétreos y blandos (Ferrier-Pagès et al., 2022), anémonas de mar (Voolstra, 2013) y medusas (Colley et al., 1983). En *Exaiptasia*, como en todos los cnidarios, hay dos capas celulares: la ectodermis y la gastrodermis. Estas capas están separadas por una capa acelular llamada mesoglea (Kazandjian et al., 2008; Weis et al., 2008) (Fig. 2). Sin embargo, en *Exaiptasia*, la epidermis carece de acceso directo a los alimentos y de simbiontes (Bucher et al., 2016). Los dinoflagelados son fagocitados por las células gastrodémicas o endodémicas, lo que da lugar a un complejo membranal que consiste en una membrana de origen algal, una membrana que se desprende del simbionte y otra membrana adicional que proporciona el huésped. Este conjunto se denomina simbiosoma (Kazandjian et al., 2008; Weis et al., 2008).

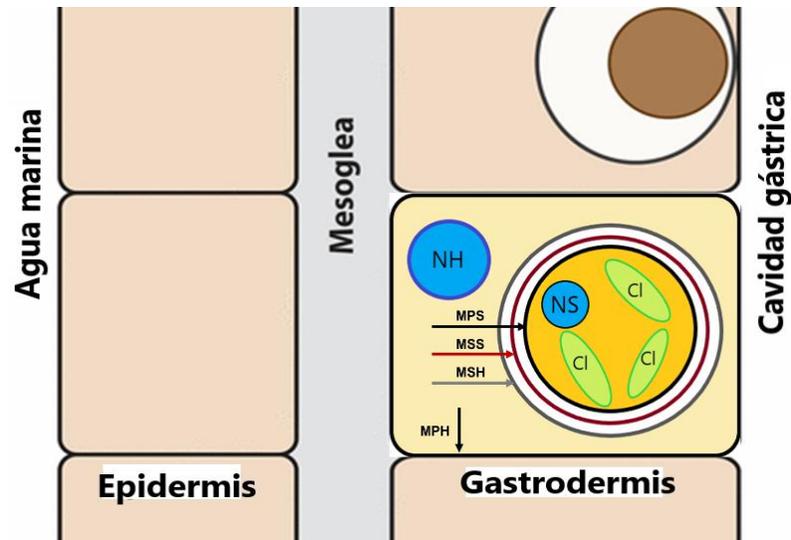


Figura 2: Organización de la simbiosis Cnidario-dinoflagelado. El simbionte vive en el simbiosoma que conforman varias membranas. MPS: Membrana plasmática del simbionte, MSS: Membrana por desprendimiento de la membrana externa del simbionte, MSH: Membrana del simbiosoma. NS: núcleo del simbionte, Cl: cloroplasto, NH: núcleo del hospedero MPH: membrana plasmática del hospedero. Modificado de Garrett et al., 2013; Lehnert et al., 2014.

4.5 Metabolismo general de *Exaiptasia*.

El carbono orgánico que obtienen los Cnidarios simbióticos proviene principalmente de los fotosintetatos traslocados por el dinoflagelado. Granparte de los fotosintetatos son de bajo peso molecular, como la glucosa y el glicerol (Burriesci et al., 2012; Starzak et al., 2020). De igual manera, se liberan aminoácidos (casi todos esenciales), lípidos y ácidos orgánicos, en conjunto, el carbono transferido puede suministrar hasta el 95% de la energía total a su hospedero (Fig. 3) (Muscatine et al., 1984). Se presumía que la liberación de carbono está regulada por una molécula llamada Factor de Liberación del Huésped (HRF) (Davy et al., 2012), este factor aparentemente, induce principalmente la producción de glicerol (Muscatine & Porter, 1977). Sin embargo, no se sabe cómo es el modo de acción de este factor, llegando a sugerirse que es un artefacto producto de un estrés provocado por el aislamiento del simbionte de su hospedero (Suescún-Bolívar et al., 2012; Suescún-Bolívar & Thomé, 2015). Las moléculas que se transportan al cnidario, son utilizadas para la respiración del organismo y para almacenarlos como el glucógeno y lípidos, o para usarlos en su crecimiento y reproducción cuando hay nitrógeno disponible (Sheppard et al., 2018).

El hospedero adquiere el nitrógeno de diferentes maneras, bien sea orgánico (aminoácidos de glicina y alanina) e inorgánico (en forma de amonio NH_4^+) disuelto en el agua de mar, o de manera heterotrófica (consumo de plancton) y de material particulado atrapado en los pólipos (Fig. 3. Mills & Sebens, 2004). Estas fuentes de nitrógeno son fundamentales para el crecimiento y reproducción del animal, no obstante, en ocasiones suele ser escaso y su estrategia simbiótica está en conservarlo y reciclarlo, mecanismo exitoso para la sobrevivencia en lugares pobres en nutrientes (Fig. 3. Sheppard et al., 2018).

Los corales asimilan el amonio a través de la vía NADP-glutamato deshidrogenasa, donde anaboliza su conversión en glutamato y este a su vez se usa como precursor para sintetizar otros aminoácidos (Cui et al., 2019). En la simbiosis es probable que exista una relación entre el metabolismo del carbono y el nitrógeno. De acuerdo con Cui y col (2019), en estado completamente simbiótico, la cantidad de glucosa traslocada al hospedero mejora su capacidad para captar amonio. Este “secuestro” del amonio le permite al cnidario controlar la disponibilidad de nitrógeno transferido hacia el simbionte, lo cual regula la densidad de las microalgas.

Por otro lado, se ha sugerido que la liberación de metabolitos del simbionte hacia su hospedero, impulsa la síntesis de algunos aminoácidos en él (Cui et al., 2019; Sheppard et al., 2018). En el catabolismo de aminoácidos del cnidario, los desechos de amonio vuelven a estar disponibles para ser asimilado tanto por el hospedero como el simbionte. Conjuntamente, hay evidencias que indican que los Cnidarios solo sintetizan 8 de los 20 aminoácidos que componen las proteínas, los restantes son transferidos por el dinoflagelado o son obtenidos a través de los alimentos (Lehnert et al., 2014). En conjunto, se sustenta la dependencia metabólica entre ambos socios.

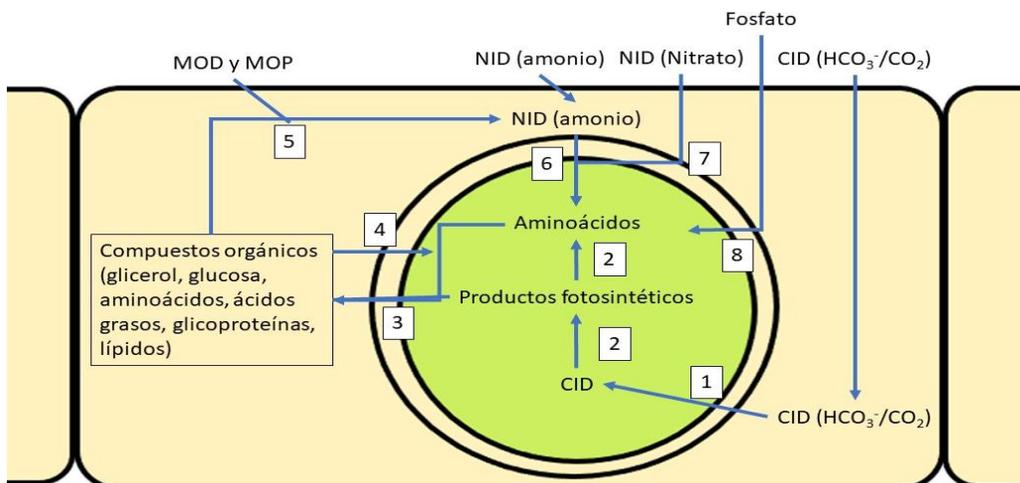


Figura 3: Interacciones nutricionales Cnidario-microalga. 1) Absorción de carbono inorgánico disuelto (CID) en forma de bicarbonato o CO₂ del agua de mar. 2) Fotosíntesis, el carbono fijado a través del ciclo de Calvin, donde se sintetizan biomoléculas como aminoácidos. 3) translocación de productos fotosintéticos. 4) translocación inversa 5) Los productos translocados, la materia orgánica disuelta (MOD) y la materia orgánica en partículas (MOP) los usan para el metabolismo del hospedero. 6) asimilación de amonio-nitrógeno inorgánico disuelto (NID), tanto por el hospedero como por el simbiote. 7) asimilación del nitrato por parte del simbiote. 8) asimilación del fosfato por parte del simbiote. Modificado de Davy et al., 2012.

Por otra parte, el metabolismo de la anémona varía cuando se encuentra en estrés térmico (Main et al., 2010; Rådecker et al., 2017). En investigaciones de Hiller et al., 2016, se han identificado alrededor de 50 compuestos de los perfiles metabólicos de la simbiosis; constan de 11 ácidos grasos y amidas, 18 aminoácidos, 5 ácidos grasos saturados, 12 poliinsaturados y un péptido. En estado óptimo se encuentra una gran diversidad y cantidad de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturado (Hillyer et al., 2016). En condiciones de estrés, la fotoinhibición reduce la energía celular (ATP y NADPH) y se da el aumento de las especies reactivas de oxígeno (Smith et al., 2005), afectando las reservas lipídicas y las membranas de ambos socios. Las biomoléculas como los lípidos y los ácidos grasos son fundamentales en la simbiosis porque son parte del metabolismo primario y en su intercambio mutuo (Dunn et al., 2012), participan en la homeostasis celular y en la construcción de las membranas celulares (Díaz-Almeyda et al., 2011).

La temperatura elevada induce estrés térmico en los cnidarios simbiotes, lo que altera el metabolismo de los aminoácidos en el simbiosoma (Cui et al., 2019). Bajo condiciones normales, los aminoácidos se translocan entre el simbiote y el hospedero (Wang & Douglas, 1999), pero bajo estrés térmico, se observa una acumulación de aminoácidos específicos, como glutamina, isoleucina y valina, en el simbiote (Hillyer et al., 2016). Esta respuesta podría estar relacionada con la fotoinhibición de la microalga, que reduce su demanda energética y su capacidad de sintetizar proteínas, así como su transferencia de carbono orgánico al hospedero (Whitehead & Douglas, 2003). Estos cambios metabólicos podrían comprometer la estabilidad y la funcionalidad de la simbiosis.

4.6 Modelos estequiométricos de redes metabólicas

Los modelos son representaciones simplificadas y precisas de los fenómenos naturales, que permiten explicarlos y comprenderlos mejor, incorporando los detalles relevantes de cada caso (Machado & Fernandes, 2021). Mediante la investigación empírica, los modelos pueden describir las dinámicas clave de un sistema y predecir eventos futuros. Asimismo, los modelos ofrecen puntos de partida para la toma de decisiones basada en las predicciones que generan (Bryce et al., 2016) (Svoboda & Passmore, 2013).

El metabolismo es el conjunto de procesos químicos que ocurren en las células, mediante los cuales los nutrientes se transforman en moléculas orgánicas esenciales para la vida, como nucleótidos, ácidos grasos, proteínas y carbohidratos. Estos procesos son catalizados por enzimas, que facilitan y aceleran las reacciones químicas. En cada reacción, los reactivos o sustratos se convierten en productos, manteniendo el balance de átomos y cargas eléctricas entre ambos lados de la ecuación (Maarleveld et al., 2013). El modelo estequiométrico utiliza sistemas de ecuaciones lineales para representar y analizar los balances de masa del metabolismo celular, basándose en las redes metabólicas reconstruidas a partir de la información genómica (Kuepfer, 2014). Reconstruir las redes metabólicas tiene varios beneficios, ya que permite integrar datos ómicos, orientar el descubrimiento basado en hipótesis y además revelar las propiedades emergentes del sistema (Oberhardt & Palsson, 2009).

Reconstruir las redes metabólicas trae consigo varios beneficios, puesto que contextualizan datos ómicos, direcciona el descubrimiento basado en hipótesis y además descubre las propiedades del sistema mismo (Oberhardt & Palsson, 2009).

Se han realizado trabajos utilizando modelos metabólicos para evaluar simbiosis. Por ejemplo, se ha demostrado a través de los modos de flujo elementales (EFM) que la *Chlorochromatium* CaD3 fija el nitrógeno por la vía de Alanina deshidrogenasa cuando está en estado libre, mientras que en simbiosis con la β -proteobacteria, asimila el nitrógeno por la vía GS/GOGAT (Cerqueda-García et al., 2014). Además, se ha investigado la relación mutualista entre las leguminosas y bacterias rizobianas mediante reconstrucciones metabólicas a escala del genoma, analizando sus rutas de fijación simbiótica del nitrógeno y el intercambio de nutrientes planta-bacteria (diCenzo et al., 2020).

Los EFM son vectores o conjuntos de reacciones mínimas que conducen a una red metabólica factible en estado estacionario (Trinh et al., 2009). Es decir, no se puede "eliminar" una reacción

mientras exista un flujo estable y, además, no contiene ningún bucle en la red. Todos los EFM evaluados describen los posibles caminos que se pueden tomar, es decir, todas las rutas probables que un determinado sustrato puede seguir para convertirse en un producto en condiciones estacionarias (Volkova et al., 2020).

El análisis de los EFM puede ser útil para determinar si una célula es apta para producir un metabolito a partir de un determinado sustrato; si hay al menos un EFM, significa que es posible. Además, el rendimiento estequiométrico se calcula a través de la cadena de reacciones de los EFM, lo que permite conocer el modo con la eficiencia máxima (Zanghellini et al., 2013). En resumen, los EFM se utilizan para identificar vías metabólicas en estado estacionario, analizar el rendimiento óptimo para la síntesis de biomasa y predecir propiedades de la red (Klamt et al., 2017).

Por consiguiente, el presente estudio pretende por medio del análisis de Modos de flujo elemental (EFM) evaluar la relación entre el genoma y la fisiología de *Exaiptasia diaphana* con el fin de aclarar los efectos de la entrada de glucosa translocado en el estado simbiótico y a la expulsión del simbiote, simulando el efecto del estrés térmico que ocasiona este fenómeno.

5. Hipótesis

Los flujos de glucosa transferida desde el simbiote hacia su hospedero afectan la red metabólica de *Exaiptasia* modelada

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Modelar el efecto de los flujos de entrada de glucosa sobre la red metabólica del cnidario *Exaiptasia diaphana* bajo las condiciones de simbiosis y aposimbiosis, utilizando modelos de flujos elementales (EFM) .

6.2 Objetivos específicos

- Reconstruir la red metabólica de *Exaiptasia diaphana* por medio del software Pathway-Tools.
- Evaluar el flujo metabólico de la red establecida de *Exaiptasia diaphana* bajo el estado simbiótico y aposimbiótico, mediante el análisis de EFM.

7. Materiales y método

Para alcanzar los objetivos propuestos, los métodos se ejecutaron en tres fases. La primera fase, se llevó a cabo la búsqueda de bases de datos sobre la información genómica de *Exaiptasia diaphana*. Se buscó información de secuencias genómicas de la anémona en diferentes bancos de ADN, principalmente de la Colaboración Internacional de Bases de Datos de Secuencias de Nucleótidos, es decir, de GenBank

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_001417965.1/). A partir de allí, se descargó de las bases de datos de Refseq el formato genómico GenBank (.gbff).

En la segunda fase, se realizó la reconstrucción de la red metabólica de *Exaiptasia*. En el software Pathway-tools, se reconstruyó la red metabólica del objeto de estudio, a partir de su anotación funcional. Una vez obtenidas las rutas, se procedió a curarlas manualmente en el mismo programa, teniendo en cuenta las vías metabólicas de *Exaiptasia* en la plataforma Kegg (<https://www.kegg.jp/pathway/epa01100+110243311>).

La tercera fase del estudio consistió en evaluar el efecto de la entrada y salida de metabolitos en la estructura de la red metabólica en estados simbiótico y aposimbiótico. Para ello, se seleccionaron algunas reacciones necesarias para cumplir con los objetivos, incluyendo la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), y reacciones de biosíntesis de algunos aminoácidos no esenciales como L-serina, L-glutamina, L-glutamato, L-alanina, L-glicina, L-asparagina, y L-aspartato. Estas reacciones se exportaron en formato SBML al programa CNApy (<https://cnapy-org.github.io/CNApy/>).

En CNApy, se agregaron reacciones artificiales a algunos metabolitos (los externos), con el fin de que tuvieran su ruta y evitar los callejones sin salida. Asimismo, se crearon reacciones de intercambio (EX_) para metabolitos como el H₂O; CO₂, Pi, NH₄; NAD, NADH, etc. (ver tabla 6 en anexos).

Con el propósito de visualizar los efectos de la translocación de la glucosa, se crearon reacciones de salida o de biomasa de los aminoácidos y carbohidratos a evaluar. En la primera condición, aposimbiótica, se bloqueó la entrada del metabolito glucosa y amonio a la estructura de la red y en la segunda condición simbiótica, se dejó la entrada libre de la glucosa como metabolito externo. En ambos casos, en el software CNApy, se realizó el análisis de Modo Elemental de Flujo (EFM). Los resultados del análisis, que incluyen los flujos de reacción y el listado de reacciones en formato Numpy, fueron cargados en Python y guardados en formato .txt. En R, se

visualizaron los datos, mostrando el potencial metabólico de las reacciones para luego ser guardados en archivo. tsv.

8. Resultados

8.1 Reconstrucción metabólica de *Exaiptasia diaphana*

El tamaño del genoma de la anémona *Exaiptasia diaphana* es de 256.132.296 pb y su reconstrucción metabólica ha revelado la presencia de 242 rutas, 24.711 genes, 20.132 genes de proteínas, 1.991 genes de ARN y 371 pseudogenes. En la figura 4 se muestran las principales vías metabólicas reconstruidas por el software Pathway-tools.



Figura 4: Reconstrucción metabólica o resumen celular de *Exaiptasia diaphana*.

En los anexos se incluyen tablas que contienen los nombres de todas las rutas identificadas en la reconstrucción metabólica de la anémona. A continuación, se presenta una tabla que muestra las principales rutas y la cantidad correspondiente:

Tabla 1: Capacidades biosintéticas de una célula de *Exaiptasia diaphana*.

Rutas	Cantidad
Biosíntesis de aminas y poliaminas	3
Biosíntesis de aminoácidos	20
Carga de aminocil-tRNA	1
Biosíntesis de compuestos aromáticos	2
Biosíntesis de carbohidratos	20
Biosíntesis de cofactores, transportadores y vitaminas	27
Otras biosíntesis	3
Biosíntesis de poliprenilo	4
Biosíntesis de metabolitos secundarios	12
Biosíntesis de tetrapirrol	2

8.2 Evaluación *in silico* de efectos de la translocación de la glucosa sobre el metabolismo de *Exaiptasia diaphana*.

En el estado aposimbótico, se observa la entrada de alimento del mar, que es posteriormente transformado en colina, precursor para la síntesis de aminoácidos. Se observa la utilización energética de las reacciones en el modelo. Como productos de salida, las reacciones de biomasa de los aminoácidos y algunos carbohidratos (Figura 5).

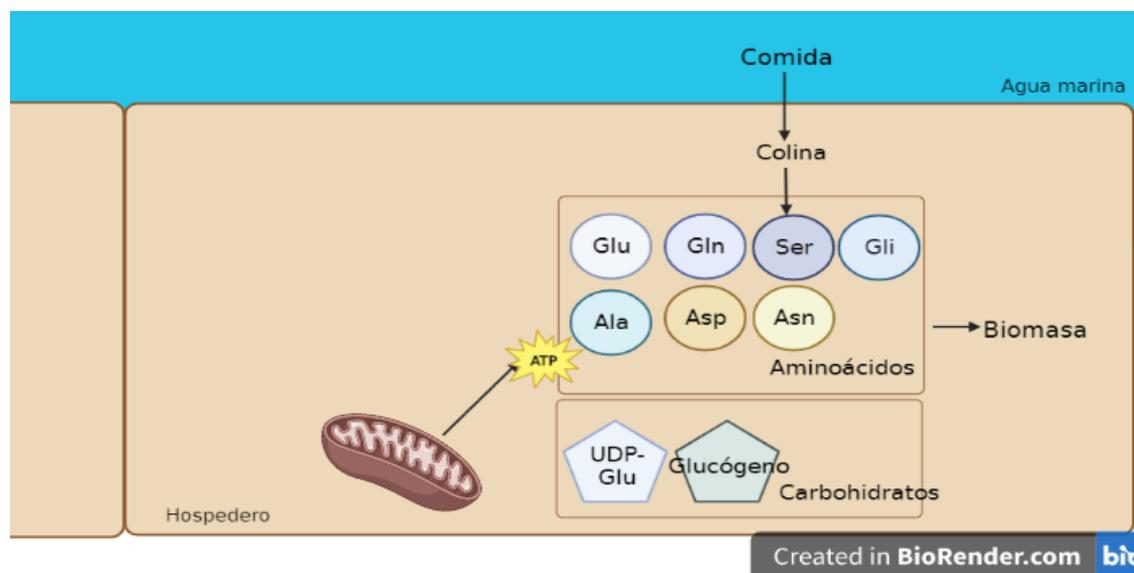


Figura 5: Esquema del modelo en estado aposimbótico utilizado para el análisis en el software CNApy. GLU (glutamato), Gln (glutamina), Ser (serina), Gli (glicina), Ala (alanina), Asp

(aspartato) y Asn (asparagina); mientras que los carbohidratos incluyen UDP-Glu (UDP-glucosa) y glucógeno.

En el estado simbiótico, se observa la entrada de glucosa a través del transportador GLUT, la entrada de amonio externo y la utilización energética de las reacciones en el modelo. Como productos de salida, las reacciones de biomasa de los aminoácidos y algunos carbohidratos.

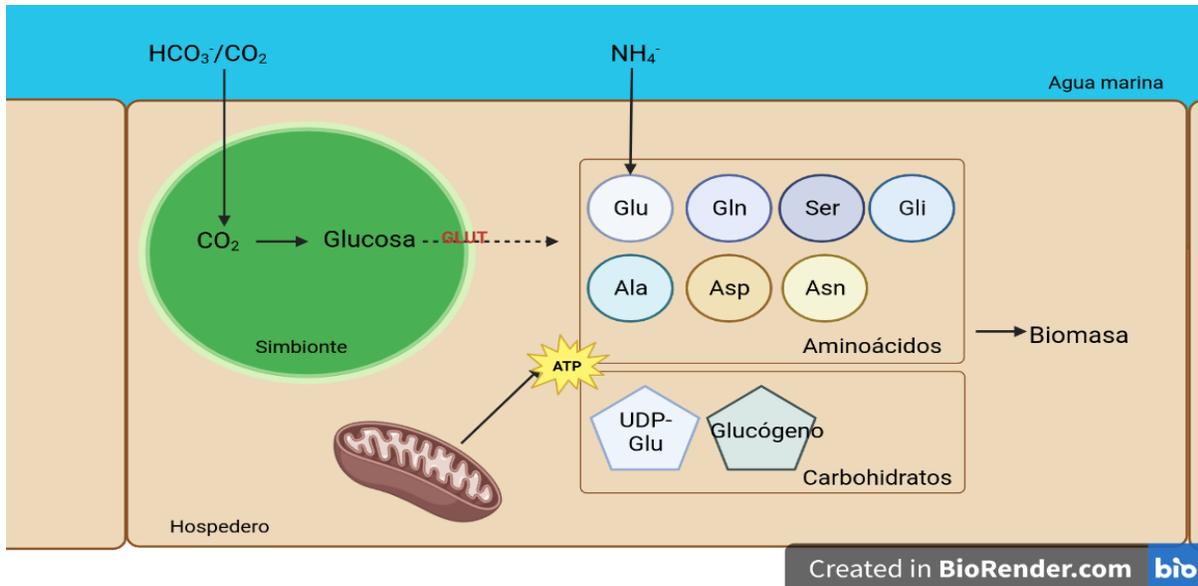


Figura 6: Esquema del modelo en estado simbiótico. GLU (glutamato), Gln (glutamina), Ser (serina), Gli (glicina), Ala (alanina), Asp (aspartato) y Asn (asparagina); mientras que los carbohidratos incluyen UDP-Glu (UDP-glucosa) y glucógeno.

Con el fin de evaluar la translocación de glucosa asimilada por el simbiote, se tomaron en cuenta dos condiciones: la simbiótica, que se refiere a la interacción biológica entre el alga y el cnidario, y la aposimbiótica, que ocurre cuando hay expulsión del simbiote y que puede ser causado por ciertos tipos de estrés, originando el blanqueamiento coralino.

Los cálculos del Modo de Flujo Elemental realizados en el software CNApy arrojaron 50264 EFM en el estado aposimbiótico y 988906 EFM en el simbiótico. Estas unidades representan la cantidad mínima de unidades funcionales en estado estacionario de la red metabólica.

El histograma muestra la comparación del flujo máximo de las reacciones en concentración micromolar (μM). En el estado aposimbiótico, se calcularon los siguientes valores en biomasa:

glutamina 34 μM , glutamato 29 μM , serina 40 μM , glicina 21 μM , alanina 16 μM , aspartato 11 μM y asparagina 29 μM . En el estado simbiótico, se obtuvieron los siguientes valores: glutamina 88 μM , glutamato 88 μM , serina 206 μM , glicina 292 μM , alanina 124 μM , aspartato 122 μM y asparagina 122 μM . En cuanto a los carbohidratos, en el estado aposimbiótico se registraron valores de UDP-glucosa 44 μM y glucógeno 13 μM , mientras que en el estado simbiótico se encontraron valores de UDP-glucosa 152 μM y glucógeno 52 μM . (Figura 7 (A)).

El fold change muestra la comparación entre ambos estados. El aminoácido con mayor decremento fue la glicina, casi cuatro veces en el estado aposimbiótico que en el simbiótico. Le siguieron el aspartato y la alanina, con 3.5 y 3 veces más, respectivamente. En cuanto a los carbohidratos, el glucógeno mostró una disminución dos veces mayor en el estado aposimbiótico que en el simbiótico (Figura 7 (B))

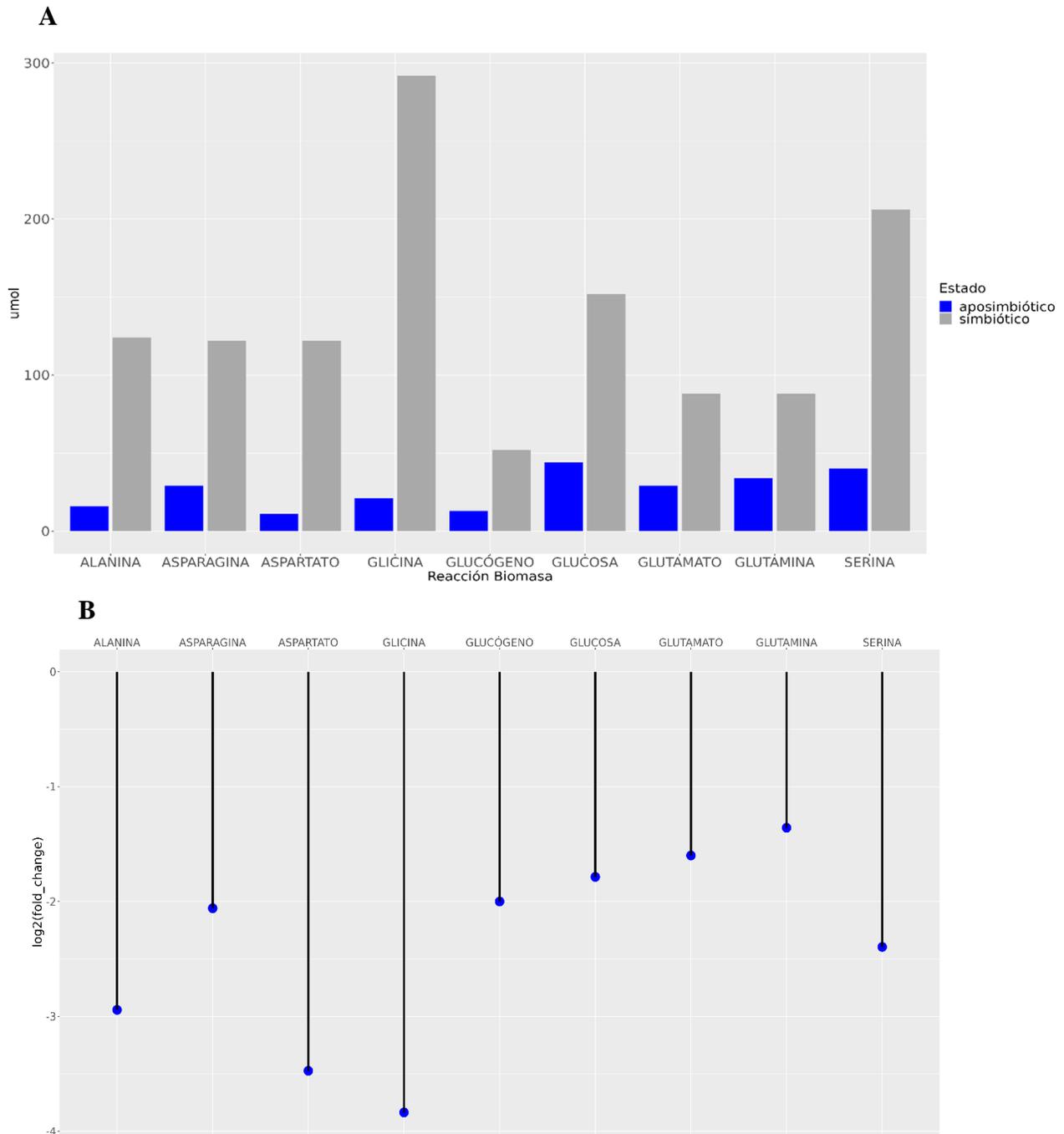


Figura 7: A. Histograma sobre la comparación del flujo máximo de las reacciones de biomasa de los aminoácidos y carbohidratos. **B.** Fold change, muestra el cambio entre el estado simbiótico y aposimbótico

9. Discusión

9.1 Efecto de la translocación de glucosa sobre el hospedero

El incremento en la producción de aminoácidos no esenciales, efecto de la entrada de glucosa, según el modelo obtenido en este estudio, coincide con datos experimentales que han mostrado la capacidad de *E. diaphana* para incorporar carbono derivado de la glucosa para la biosíntesis de aminoácidos (Cui et al., 2019). Además, se ha demostrado que este mecanismo regula la proliferación de simbioses, donde el hospedero utiliza la glucosa para reciclar el amonio residual a través del ciclo GS/GOGAT y posteriormente incorporarlo a los aminoácidos (Cui et al., 2022).

La utilización de glucosa en *Exaiptasia diaphana* es diferente a la de los corales. Esta anémona utiliza el carbono derivado de la glucosa principalmente para la asimilación de amonio y la subsiguiente síntesis de aminoácidos (Cui et al., 2022). Por su parte, *Stylophora pistillata*, aunque tiene una mayor capacidad de absorción de ¹³C-glucosa, su menor incorporación en metabolitos que contienen nitrógeno indica que los corales utilizan una parte significativa de la glucosa para satisfacer las necesidades energéticas que demanda la calcificación (Cui et al., 2022).

En este sentido, se plantea que *Exaiptasia diaphana*, al no calcificar, utiliza los fotosintatos trasladados por el simbionte principalmente para procesos de crecimiento, desarrollo y reproducción (Burriesci et al., 2012; Matthews et al., 2018). También, se observó un aumento en la biomasa de glucógeno, un carbohidrato de reserva identificado en células móviles llamadas glucocitos, que migran a sitios de alta demanda energética durante la gametogénesis, regeneración y reproducción asexual en anémonas (Shick, 2012).

La serina y la glicina fueron los aminoácidos que registraron mayor potencial metabólico. La formación de serina comienza en el ácido 3-fosfoglicérico, un intermediario de la glucólisis. De igual forma, la serina es precursora de la síntesis de glicina (Carbonero, 1976), lo cual explica el aumento de su biomasa ante la adición de glucosa en el metabolismo de *Exaiptasia diaphana*. Se ha planteado que la serina tiene una gran influencia en la proliferación celular, ya que su ausencia puede afectar el metabolismo mitocondrial, los niveles esenciales de aminoácidos y la formación de lípidos de membrana (Gao et al., 2018).

La glicina es un aminoácido que tiene un papel importante en la estructura de ciertos péptidos, ya que sus residuos pueden ocupar posiciones que otros aminoácidos no podrían, debido a su

carácter no polar. Esto le permite dar flexibilidad a las cadenas peptídicas y adaptarse al medio hidrofóbico de las proteínas. Además, se ha sugerido que la glicina actúa como osmoprotector contra el estrés generado por altas temperaturas y como antioxidante, protegiendo a las células de los radicales libres (Matilla et al., 2002).

Según Hillyer (2017), en estudios experimentales de *E. diaphana* sobre los perfiles metabólicos, se observó una acumulación de varios aminoácidos durante la exposición a una elevación de la temperatura a 32°C, entre ellos la serina y la alanina. En comparación con el modelo de nuestro estudio, la glicina y la serina disminuyeron 3.7 y 2.3 veces, respectivamente, mientras que, en el experimental, la glicina aumentó 0.3 veces y la serina 0.7 veces.

Otro de los aminoácidos que mostró un aumento significativo en su biomasa fue el ácido aspártico. Se ha determinado que este aminoácido es el más extendido en los tejidos animales y juega un papel fundamental en la formación del sistema nervioso tanto en vertebrados como invertebrados (Aniello, 2007).

El ácido glutámico, otro metabolito que aumentó su biomasa, es un precursor de aminoácidos a través de la vía NADP-glutamato deshidrogenasa (NADP-GDH) (Roberts et al., 2001). La glutamina, está relacionada con funciones metabólicas, como el intercambio de nitrógeno entre tejidos y el mantenimiento de la homeostasis (Newsholme et al., 2003).

El aumento de la biomasa en estos dos aminoácidos (Gln, Glu) es un indicador de la asimilación de nitrógeno en estado simbiótico, ya que el amonio es asimilado a través del ciclo glutamina sintetasa/glutamina:2-oxoglutarato aminotransferasa, donde se agrega amonio a la glutamina para la síntesis de glutamato (Pernice et al., 2012).

En general, se ha determinado que los aminoácidos no esenciales tienen diferentes funciones metabólicas como la síntesis de sustancia peptídicas y no peptídicas, regulación de la expresión génica, regulación de las vías de señalización celular, regulación del metabolismo energético y regulación de la función inmune (Hou et al., 2015).

La complejidad funcional de estas sustancias resalta la importancia de la relación simbiótica que establece *Exaiaptasia diaphana* con dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae, además de aumentar el interés por el estudio del comportamiento metabólico ante eventos estresantes que pueden inducir a blanqueamiento e inestabilidad en la producción de metabolitos esenciales para el desarrollo del hospedero.

9.2 Bloqueo de la entrada de glucosa y amonio sobre la red de *E. diaphana*

Exaiptasia diaphana presenta cambios generalizados en su proteoma cuando se encuentra en estado simbiótico y aposimbióticos. Se ha demostrado que en estado aposimbiótico, las anémonas presentan una mayor expresión de proteínas involucradas en la mediación del estrés oxidativo, además de proteasas y quitinasas que indican cambios metabólicos de autotrofia a heterotrofia (Oakley et al., 2016). Las anémonas simbióticas tienen una expresión significativamente mayor de proteínas involucradas en el almacenamiento y transporte de lípidos, transporte de carbono inorgánico, tráfico intracelular y endocitosis, transporte y ciclo del nitrógeno. En particular, se encontró un aumento de transportadores de amonio y múltiples enzimas que participan en el metabolismo de los aminoácidos. (Oakley et al., 2016) Los resultados obtenidos en este modelo junto con los hallazgos experimentales mencionados, permiten presumir que la simbiosis está direccionada a satisfacer requisitos metabólicos del hospedero, entre los cuales se encuentra el reciclaje de nitrógeno para síntesis de aminoácidos (Cui et al., 2019). De igual forma, este sistema de retroalimentación metabólica permite establecer la estabilidad del endosimbionte y controla su capacidad de proliferación.

Una de las amenazas para la simbiosis funcional es el estrés térmico. Se ha demostrado que este estresor abiótico provoca la fotoinhibición del simbiote, lo que causa la disfunción de la simbiosis y finalmente su expulsión (Gates et al., 1992). En un estudio de Hillyer et al. (2017) en *Exaiptasia diaphana*, se determinó que el estrés térmico induce a una reducción en la transferencia de carbono a grupos metabólicos centrales como galactosa, fructosa y maltosa. Sin embargo, en condiciones de estrés, el simbiote mantiene la fijación de carbono en compuestos como la glucosa, lo que puede representar la continuación de la translocación y una compensación ante la pérdida de otros simbiotes (Hillyer et al., 2017).

Otros estudios han demostrado que la tolerancia térmica de los simbiotes es un mecanismo que regula los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, por lo tanto, el estrés oxidativo que sufre el hospedero (Cziesielski et al., 2018). En este sentido, la tolerancia del simbiote frente a eventos estresantes tiene un papel fundamental en el mantenimiento funcional de la simbiosis y en la adaptación a cambios en la temperatura.

De igual forma, se han encontrado cambios en vías de redes centrales y homeostáticas inducidos por estrés térmico, que muestran disminución en la actividad de la vía de la glucólisis y en el metabolismo del piruvato (Hillyer et al., 2016). También, se ha evidenciado cambios en las

reservas de aminoácidos en el hospedero, específicamente en el aminoácido glutamato, el cual se acumula mayormente en el simbiote ante eventos de estrés térmico (Matthews et al., 2018). A diferencia de la glucólisis, vías vinculadas a la generación de energía a través de la glucogenólisis como el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la biosíntesis de coenzima A y la fosforilación oxidativa, aumentan su actividad, donde las reservas de energía se catabolizan para producir ATP, lidiando de esta forma con la pérdida de energía que implica la fotoinhibición en la relación hospedero-simbiote (Hillyer et al., 2016).

Por otra parte, *Exaiptasia diaphana* como organismo modelo tiene la ventaja de sobrevivir aposimbióticamente, limitado de carbohidratos ricos en energía en periodos prolongados. Sin embargo, a partir de la absorción del carbono orgánico proporcionado por el agua, tiene la capacidad de sintetizar aminoácidos y generar desechos que son liberados al mar (Cui, et. Al 2019).

Como lo indica la evidencia y los resultados de este modelo, el establecimiento de la simbiosis y su rompimiento implican cambios en la red metabólica del hospedero cnidario, encaminados a mantener la relación simbiótica funcional y el equilibrio metabólico ante factores estresantes. Estos estudios de perfiles metabólicos en organismos modelo permiten tener mayor conocimiento de la incidencia de factores estresantes, producto de la intervención antrópica, en el desarrollo y adaptabilidad de los cnidarios.

10. Conclusión

El modelo metabólico a escala genómica, usando el análisis EFM, permitió evaluar el efecto de la translocación de glucosa sobre el metabolismo de *Exaiptasia diaphana*. Al bloquear la entrada de glucosa y amonio, simulando la expulsión del simbiote, se observó una disminución en la cantidad de reacciones de biomasa en aminoácidos y carbohidratos. Esto se debió, probablemente, a las diferentes reacciones que se desconectaron en el estado aposimbiótico, lo que llevó al bloqueo de vías implicadas en la biosíntesis. Sin embargo, la heterotrofia a través de la colina, permitió la síntesis de glicina/serina, precursores para la producción de otros aminoácidos.

La translocación de glucosa favorece el reciclaje de nutrientes, como la incorporación de amonio en los aminoácidos glutamato/glutamina a través de la vía GS/GOGAT. Además, la transferencia

de fotosintetatos, en su impacto en las redes metabólicas, es importante, ya que contribuye a la respiración, el crecimiento y la reproducción del hospedero.

11. Referencias

- Abrego, D., Willis, B. L., & Oppen, M. J. H. van. (2012). Impact of Light and Temperature on the Uptake of Algal Symbionts by Coral Juveniles. *PLOS ONE*, 7(11), e50311.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050311>
- Ahmed, M., Umali, G. M., Chong, C. K., Rull, M. F., & Garcia, M. C. (2007). Valuing recreational and conservation benefits of coral reefs—The case of Bolinao, Philippines. *Ocean & Coastal Management*, 50(1), 103-118.
<https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2006.08.010>
- Baker, A. C., Glynn, P. W., & Riegl, B. (2008). Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80(4), 435-471.
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.09.003>
- Baumgarten, S., Simakov, O., Esherick, L. Y., Liew, Y. J., Lehnert, E. M., Michell, C. T., Li, Y., Hambleton, E. A., Guse, A., Oates, M. E., Gough, J., Weis, V. M., Aranda, M., Pringle, J. R., & Voolstra, C. R. (2015). The genome of *Aiptasia*, a sea anemone model for coral symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(38), 11893-11898.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1513318112>
- Bell, P. R. F., Elmetri, I., & Lapointe, B. E. (2014). Evidence of Large-Scale Chronic Eutrophication in the Great Barrier Reef: Quantification of Chlorophyll a Thresholds for Sustaining Coral Reef Communities. *Ambio*, 43(3), 361-376.
<https://doi.org/10.1007/s13280-013-0443-1>
- Bryce, C. M., Baliga, V. B., De Nesnera, K. L., Fiack, D., & Goetz, K. (2016). Exploring Models in the Biology Classroom. *The American Biology Teacher*, 78(1), 35-42.

- Bucher, M., Wolfowicz, I., Voss, P. A., Hambleton, E. A., & Guse, A. (2016). Development and Symbiosis Establishment in the Cnidarian Endosymbiosis Model *Aiptasia* sp. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep19867>
- Burkepile, D. E., & Hay, M. E. (2006). Herbivore Vs. Nutrient Control of Marine Primary Producers: Context-Dependent Effects. *Ecology*, 87(12), 3128-3139. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[3128:HVNCOM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[3128:HVNCOM]2.0.CO;2)
- Burriesci, M. S., Raab, T. K., & Pringle, J. R. (2012). Evidence that glucose is the major transferred metabolite in dinoflagellate-cnidarian symbiosis. *The Journal of Experimental Biology*, 215(Pt 19), 3467-3477. <https://doi.org/10.1242/jeb.070946>
- Carbonero, Z. (1976). *Metabolismo de aminoácidos*. ETSI Agrónomos. <https://oa.upm.es/54762/1/METABOLISMO.pdf>
- Cerqueda-García, D., Martínez-Castilla, L. P., Falcón, L. I., & Delaye, L. (2014). Metabolic analysis of *Chlorobium chlorochromatii* CaD3 reveals clues of the symbiosis in ‘*Chlorochromatium aggregatum*’. *The ISME Journal*, 8(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.207>
- Clarke, J. L., Davey, P. A., & Aldred, N. (2020). Sea anemones (*Exaiptasia pallida*) use a secreted adhesive and complex pedal disc morphology for surface attachment. *BMC Zoology*, 5(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40850-020-00054-6>
- Colley, N. J., Trench, R. K., & Smith, D. C. (1983). Selectivity in phagocytosis and persistence of symbiotic algae by the scyphistoma stage of the jellyfish *Cassiopeia xamachana*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 219(1214), 61-82. <https://doi.org/10.1098/rspb.1983.0059>
- Cui, G., Liew, Y. J., Li, Y., Kharbatia, N., Zahran, N. I., Emwas, A.-H., Eguiluz, V. M., & Aranda, M. (2019). Host-dependent nitrogen recycling as a mechanism of symbiont control in *Aiptasia*. *PLOS Genetics*, 15(6), e1008189. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008189>
- Cui, G., Mi, J., Moret, A., Zhong, H., Hung, S.-H., Al-Babili, S., & Aranda, M. (2022). *Nitrogen competition is the general mechanism underlying cnidarian-Symbiodiniaceae symbioses* (p. 2022.06.30.498212). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.06.30.498212>
- Cziesielski, M. J., Liew, Y. J., Cui, G., Schmidt-Roach, S., Campana, S., Maronedze, C., & Aranda, M. (2018). Multi-omics analysis of thermal stress response in a zooxanthellate

- cnidarian reveals the importance of associating with thermotolerant symbionts. *Proceedings. Biological Sciences*, 285(1877), 20172654.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2654>
- Davy, S. K., Allemand, D., & Weis, V. M. (2012). Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 229-261.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.05014-11>
- Dearden, P., Bennett, M., & Rollins, R. (2007). Perceptions of Diving Impacts and Implications for Reef Conservation. *Coastal Management*, 35(2-3), 305-317.
<https://doi.org/10.1080/08920750601169584>
- Dellaert, Z., Vargas, P. A., La Riviere, P. J., & Roberson, L. M. (2022). Uncovering the Effects of Symbiosis and Temperature on Coral Calcification. *The Biological Bulletin*, 242(1), 62-73. <https://doi.org/10.1086/716711>
- Díaz-Almeyda, E., Thomé, P. E., El Hafidi, M., & Iglesias-Prieto, R. (2011). Differential stability of photosynthetic membranes and fatty acid composition at elevated temperature in Symbiodinium. *Coral Reefs*, 30(1), 217-225. <https://doi.org/10.1007/s00338-010-0691-5>
- diCenzo, G. C., Tesi, M., Pfau, T., Mengoni, A., & Fondi, M. (2020). Genome-scale metabolic reconstruction of the symbiosis between a leguminous plant and a nitrogen-fixing bacterium. *Nature Communications*, 11, 2574. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16484-2>
- Dunn, S. R., Thomas, M. C., Nette, G. W., & Dove, S. G. (2012). A Lipidomic Approach to Understanding Free Fatty Acid Lipogenesis Derived from Dissolved Inorganic Carbon within Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *PLOS ONE*, 7(10), e46801.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046801>
- Enríquez, S., Méndez, E. R., & -Prieto, R. I. (2005). Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. *Limnology and Oceanography*, 50(4), 1025-1032. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.4.1025>
- Fabricius, K., De'ath, G., McCook, L., Turak, E., & Williams, D. McB. (2005). Changes in algal, coral and fish assemblages along water quality gradients on the inshore Great Barrier Reef. *Marine Pollution Bulletin*, 51(1), 384-398.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.10.041>

- Falkowski, P. G., Dubinsky, Z., Muscatine, L., & McCloskey, L. (1993). Population Control in Symbiotic Corals. *BioScience*, 43(9), 606-611. <https://doi.org/10.2307/1312147>
- Ferrier-Pagès, C., Bednarz, V., Grover, R., Benayahu, Y., Maguer, J.-F., Rottier, C., Wiedenmann, J., & Fine, M. (2022). Symbiotic stony and soft corals: Is their host-algae relationship really mutualistic at lower mesophotic reefs? *Limnology and Oceanography*, 67(1), 261-271. <https://doi.org/10.1002/lno.11990>
- Fitt, W. K., Brown, B. E., Warner, M. E., & Dunne, R. P. (2001). Coral bleaching: Interpretation of thermal tolerance limits and thermal thresholds in tropical corals. *Coral Reefs*, 20(1), 51-65. <https://doi.org/10.1007/s003380100146>
- Gao, X., Lee, K., Reid, M. A., Sanderson, S. M., Qiu, C., Li, S., Liu, J., & Locasale, J. W. (2018). Serine Availability Influences Mitochondrial Dynamics and Function through Lipid Metabolism. *Cell Reports*, 22(13), 3507-3520. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.017>
- Gates, R. D., Baghdasarian, G., & Muscatine, L. (1992). Temperature Stress Causes Host Cell Detachment in Symbiotic Cnidarians: Implications for Coral Bleaching. *The Biological Bulletin*, 182(3), 324-332. <https://doi.org/10.2307/1542252>
- Grajales, A., & Rodríguez, E. (2014). Morphological revision of the genus *Aiptasia* and the family Aiptasiidae (Cnidaria, Actiniaria, Metridioidea). *Zootaxa*, 3826(1), 55. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3826.1.2>
- Grawunder, D., Hambleton, E. A., Bucher, M., Wolfowicz, I., Bechtoldt, N., & Guse, A. (2015). Induction of Gametogenesis in the Cnidarian Endosymbiosis Model *Aiptasia* sp. *Scientific Reports*, 5, 15677. <https://doi.org/10.1038/srep15677>
- Hasler, H., & Ott, J. A. (2008). Diving down the reefs? Intensive diving tourism threatens the reefs of the northern Red Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 56(10), 1788-1794. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.06.002>
- Hillyer, K. E., Dias, D. A., Lutz, A., Roessner, U., & Davy, S. K. (2017). Mapping carbon fate during bleaching in a model cnidarian symbiosis: The application of ¹³C metabolomics. *New Phytologist*, 214(4), 1551-1562. <https://doi.org/10.1111/nph.14515>
- Hillyer, K. E., Tumanov, S., Villas-Bôas, S., & Davy, S. K. (2016). Metabolite profiling of symbiont and host during thermal stress and bleaching in a model cnidarian–

- dinoflagellate symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 219(4), 516-527.
<https://doi.org/10.1242/jeb.128660>
- Hou, Y., Yin, Y., & Wu, G. (2015). Dietary essentiality of “nutritionally non-essential amino acids” for animals and humans. *Experimental Biology and Medicine*, 240(8), 997-1007.
<https://doi.org/10.1177/1535370215587913>
- Kazandjian, A., Shepherd, V. A., Rodriguez-Lanetty, M., Nordemeier, W., Larkum, A. W. D., & Quinnell, R. G. (2008). Isolation of symbiosomes and the symbiosome membrane complex from the zoanthid *Zoanthus robustus*. *Phycologia*, 47(3), 294-306.
<https://doi.org/10.2216/PH07-23.1>
- Klamt, S., Regensburger, G., Gerstl, M. P., Jungreuthmayer, C., Schuster, S., Mahadevan, R., Zanghellini, J., & Müller, S. (2017). From elementary flux modes to elementary flux vectors: Metabolic pathway analysis with arbitrary linear flux constraints. *PLoS Computational Biology*, 13(4), e1005409. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005409>
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R. N., & Singh, G. G. (2010). Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecology Letters*, 13(11), 1419-1434. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01518.x>
- Kuepfer, L. (2014). Stoichiometric Modelling of Microbial Metabolism. En J. O. Krömer, L. K. Nielsen, & L. M. Blank (Eds.), *Metabolic Flux Analysis* (Vol. 1191, pp. 3-18). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1170-7_1
- Lehnert, E. M., Mouchka, M. E., Burriesci, M. S., Gallo, N. D., Schwarz, J. A., & Pringle, J. R. (2014). Extensive Differences in Gene Expression Between Symbiotic and Aposymbiotic Cnidarians. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 4(2), 277-295.
<https://doi.org/10.1534/g3.113.009084>
- Loh, T.-L., McMurray, S. E., Henkel, T. P., Vicente, J., & Pawlik, J. R. (2015). Indirect effects of overfishing on Caribbean reefs: Sponges overgrow reef-building corals. *PeerJ*, 3, e901. <https://doi.org/10.7717/peerj.901>
- Maarleveld, T. R., Khandelwal, R. A., Olivier, B. G., Teusink, B., & Bruggeman, F. J. (2013). Basic concepts and principles of stoichiometric modeling of metabolic networks. *Biotechnology Journal*, 8(9), 997-1008. <https://doi.org/10.1002/biot.201200291>

- Machado, J., & Fernandes, B. L. P. (2021). Model Conceptions in Science Education Research: Features and trends. *Ciência & Educação (Bauru)*, 27, e21014. <https://doi.org/10.1590/1516-731320210014>
- Main, W. P. L., Ross, C., & Bielmyer, G. K. (2010). Copper accumulation and oxidative stress in the sea anemone, *Aiptasia pallida*, after waterborne copper exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 151(2), 216-221. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.10.008>
- Marino, A., Valveri, V., Muià, C., Crupi, R., Rizzo, G., Musci, G., & La Spada, G. (2004). Cytotoxicity of the nematocyst venom from the sea anemone *Aiptasia mutabilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 139(4), 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.12.008>
- Matilla, B., Mauriz, J. L., Culebras, J. M., & González-Gallego, J. (2002). La glicina: Un nutriente antioxidante protector celular. *Nutr. Hosp.*
- Matthews, J. L., Oakley, C. A., Lutz, A., Hillyer, K. E., Roessner, U., Grossman, A. R., Weis, V. M., & Davy, S. K. (2018). Partner switching and metabolic flux in a model cnidarian–dinoflagellate symbiosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1892), 20182336. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2336>
- Morais, J., Medeiros, A. P. M., & Santos, B. A. (2018). Research gaps of coral ecology in a changing world. *Marine Environmental Research*, 140, 243-250. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.06.021>
- Muller-Parker, G., & Davy, S. K. (2001). Temperate and tropical algal-sea anemone symbioses. *Invertebrate Biology*, 120(2), 104-123. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2001.tb00115.x>
- Mumby, P. J. (2016). Stratifying herbivore fisheries by habitat to avoid ecosystem overfishing of coral reefs. *Fish and Fisheries*, 17(1), 266-278. <https://doi.org/10.1111/faf.12078>
- Muscatine, L., Falkowski, P. G., Porter, J. W., Dubinsky, Z., & Smith, D. C. (1984). Fate of photosynthetic fixed carbon in light- and shade-adapted colonies of the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 222(1227), 181-202. <https://doi.org/10.1098/rspb.1984.0058>
- Muscatine, L., Goiran, C., Land, L., Jaubert, J., Cuif, J.-P., & Allemand, D. (2005). Stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of organic matrix from coral skeleton. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences*, 102(5), 1525-1530.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0408921102>
- Muscantine, L., & Porter, J. W. (1977). Reef Corals: Mutualistic Symbioses Adapted to Nutrient-Poor Environments. *BioScience*, 27(7), 454-460. <https://doi.org/10.2307/1297526>
- Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M. M. R., Pithon-Curi, T. C., & Curi, R. (2003). Glutamine and glutamate—Their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochemistry and Function*, 21(1), 1-9. <https://doi.org/10.1002/cbf.1003>
- Oakley, C. A., Ameismeier, M. F., Peng, L., Weis, V. M., Grossman, A. R., & Davy, S. K. (2016). Symbiosis induces widespread changes in the proteome of the model cnidarian *Aiptasia*. *Cellular Microbiology*, 18(7), 1009-1023. <https://doi.org/10.1111/cmi.12564>
- Oberhardt, M., & Palsson, B. (2009). Applications of genome-scale metabolic reconstructions. *Molecular Systems Biology*, 5(1), 320. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.77>
- Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V. V., Jurka, J., Genikhovich, G., Grigoriev, I. V., Lucas, S. M., Steele, R. E., Finnerty, J. R., Technau, U., Martindale, M. Q., & Rokhsar, D. S. (2007). Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5834), 86-94.
<https://doi.org/10.1126/science.1139158>
- Rädecker, N., Raina, J.-B., Pernice, M., Perna, G., Guagliardo, P., Kilburn, M. R., Aranda, M., & Voolstra, C. R. (2017). *Aiptasia as a model to study metabolic diversity and specificity in cnidarian-dinoflagellate symbioses* (p. 223933). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/223933>
- Rasher, D. B., Engel, S., Bonito, V., Fraser, G. J., Montoya, J. P., & Hay, M. E. (2012). Effects of herbivory, nutrients, and reef protection on algal proliferation and coral growth on a tropical reef. *Oecologia*, 169(1), 187-198. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2174-y>
- Roberts, J. M., Fixter, L. M., & Davies, P. S. (2001). Ammonium metabolism in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. *Hydrobiologia*, 461(1), 25-35.
<https://doi.org/10.1023/A:1012752828587>
- Roth, M. S. (2014). The engine of the reef: Photobiology of the coral-algal symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 5, 422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00422>
- Sheppard, C., Davy, S., Pilling, G., & Graham, N. (2018). *The Biology of Coral Reefs* (Vol. 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198787341.001.0001>

- Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., Hamada, M., Hisata, K., Tanaka, M., Fujie, M., Fujiwara, M., Koyanagi, R., Ikuta, T., Fujiyama, A., Miller, D. J., & Satoh, N. (2011). Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature*, 476(7360), 320-323. <https://doi.org/10.1038/nature10249>
- Simkiss, K. (1964). PHOSPHATES AS CRYSTAL POISONS OF CALCIFICATION. *Biological Reviews*, 39(4), 487-504. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1964.tb01166.x>
- Smith, D. J., Suggett, D. J., & Baker, N. R. (2005). Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching in corals? *Global Change Biology*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2003.00895.x>
- Starzak, D. E., Quinnell, R. G., Cook, C. B., & Davy, S. K. (2020). Influence of Symbiont Species on the Glycerol and Glucose Pools in a Model Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *The Biological Bulletin*, 239(2), 143-151. <https://doi.org/10.1086/710349>
- Suescún-Bolívar, L. P., Iglesias-Prieto, R., & Thomé, P. E. (2012). Induction of Glycerol Synthesis and Release in Cultured Symbiodinium. *PLoS ONE*, 7(10), e47182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047182>
- Suescún-Bolívar, L. P., & Thomé, P. E. (2015). Osmosensing and osmoregulation in unicellular eukaryotes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 435-443. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1811-8>
- Svoboda, J., & Passmore, C. (2013). The Strategies of Modeling in Biology Education. *Science & Education*, 22(1), 119-142. <https://doi.org/10.1007/s11191-011-9425-5>
- Tomascik, T., & Sander, F. (1985). Effects of eutrophication on reef-building corals. *Marine Biology*, 87(2), 143-155. <https://doi.org/10.1007/BF00539422>
- Trinh, C. T., Wlaschin, A., & Srienc, F. (2009). Elementary Mode Analysis: A Useful Metabolic Pathway Analysis Tool for Characterizing Cellular Metabolism. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(5), 813-826. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1770-1>
- Volkova, S., Matos, M. R. A., Mattanovich, M., & Marín de Mas, I. (2020). Metabolic Modelling as a Framework for Metabolomics Data Integration and Analysis. *Metabolites*, 10(8), 303. <https://doi.org/10.3390/metabo10080303>
- Voolstra, C. R. (2013). A journey into the wild of the cnidarian model system *Aiptasia* and its symbionts. *Molecular Ecology*, 22(17), 4366-4368. <https://doi.org/10.1111/mec.12464>

- Wakefield, T. S., & Kempf, S. C. (2001). Development of Host- and Symbiont-Specific Monoclonal Antibodies and Confirmation of the Origin of the Symbiosome Membrane in a Cnidarian–Dinoflagellate Symbiosis. *The Biological Bulletin*, 200(2), 127-143. <https://doi.org/10.2307/1543306>
- Wang, J. T., & Douglas, A. E. (1999). Essential amino acid synthesis and nitrogen recycling in an alga–invertebrate symbiosis. *Marine Biology*, 135(2), 219-222. <https://doi.org/10.1007/s002270050619>
- Weis, V. M., Davy, S. K., Hoegh-Guldberg, O., Rodriguez-Lanetty, M., & Pringle, J. R. (2008). Cell biology in model systems as the key to understanding corals. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(7), 369-376. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.03.004>
- Whitehead, L. F., & Douglas, A. E. (2003). Metabolite comparisons and the identity of nutrients translocated from symbiotic algae to an animal host. *The Journal of Experimental Biology*, 206(Pt 18), 3149-3157. <https://doi.org/10.1242/jeb.00539>
- Yellowlees, D., Rees, T. A. V., & Leggat, W. (2008). Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant, Cell & Environment*, 31(5), 679-694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01802.x>
- Zanghellini, J., Ruckerbauer, D. E., Hanscho, M., & Jungreuthmayer, C. (2013). Elementary flux modes in a nutshell: Properties, calculation and applications. *Biotechnology Journal*, 8(9), 1009-1016. <https://doi.org/10.1002/biot.201200269>