



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

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL MUCUS DE CNIDARIOS
SIMBIÓTICOS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

JACQUELINE RIVERA ORTEGA

TUTOR(A) O TUTORES PRINCIPALES:

DRA PATRICIA ELENA THOMÉ ORTIZ

UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, PUERTO MORELOS, ICMyL,
UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. ERIC JORDÁN DAHLGREN

(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, PUERTO MORELOS, ICMyL,
UNAM)

DRA ALEJANDRA PRIETO DAVÓ

(FACULTAD DE QUÍMICA, UNIDAD SISAL, UNAM)

DRA. LUISA FALCÓN ÁLVAREZ

(INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM)

DRA. TANIA ISLAS FLORES

(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, PUERTO MORELOS, ICMyL,
UNAM)

Puerto Morelos, Quintana Roo. Agosto de 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE MUCUS DE CNIDARIOS SIMBIÓTICOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
JACQUELINE RIVERA ORTEGA

TUTOR(A) O TUTORES PRINCIPALES:
DRA. PATRICIA ELENA THOMÉ ORTIZ
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, PUERTO MORELOS, ICMyL,
UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. ERIC JORDÁN DAHLGREN
(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, PUERTO MORELOS, ICMyL,
UNAM)
DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ
(FACULTAD DE QUÍMICA, UNIDAD SISAL, UNAM)
DRA. LUISA FALCÓN ÁLVAREZ
(INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM)
DRA. TANIA ISLAS FLORES
(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, PUERTO MORELOS, ICMyL,
UNAM)

Puerto Morelos, Quintana Roo. Agosto de 2018

AGRADECIMIENTOS

A mi máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha albergado en sus aulas desde 2007.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, especialmente a la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales Puerto Morelos donde desarrollé mi trabajo de maestría

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para los estudios de maestría

A mi directora de tesis, la Dra. Patricia Thomé y a los miembros de mi comité, Dr. Eric Jordán, Dra. Tania Islas, Dra. Alejandra Prieto y Dra. Luisa Falcón.

A la Dra. Patricia Thomé, que no sólo estuvo cuando tenía dudas en mi experimentación, sino también cuando necesitaba un respiro y palabras de aliento, que creyó en mi trabajo a pesar de lo loca que ésta sonaba, que me abrió las puertas de su laboratorio y su corazón, que siempre tuvo un abrazo y muchas porras para cuando necesitaba salir adelante, la quiero Doctora, ¡muchas gracias!

Al Dr. Eric Jordán, gracias introducirme al mundo de las enfermedades coralinas, por creer en mi trabajo y por enseñarme lo maravilloso de la estadística.

Al Dr. Marco Villanueva, gracias por el interés que siempre mostró en mi desarrollo académico, por las recomendaciones y enseñanzas, gracias por permitirme trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Tania Islas, gracias por estar siempre pendiente, por el apoyo y las enseñanzas en el laboratorio.

A la Dra. Victoria Grosso, Vicky, gracias por estar hombro a hombro a todas horas en el laboratorio, gracias por todas las enseñanzas buenas prácticas, gracias por todas las charlas sobre conceptos que no entendía, gracias por resolver todas y cada una de mis dudas y por toda la paciencia, gracias por ser mi amiga y estar conmigo en mis momentos felices y muy tristes, te quiero y te llevo en mi corazón.

Al Dr. Luis Parmenio Suescún, gracias por todas tus enseñanzas, dentro y fuera del laboratorio, por todas las risas y horas de canciones, gracias por hacerme más llevadera mi estancia en Puerto Morelos.

A la Dra. Yislem Beltrán, gracias por introducirme en el mundo del PCR y la biología molecular, gracias por siempre ser mi salvavidas, gracias por tu apoyo y amistad.

A la M. en C. Emma Rangel por creer en mí y echarme porras, gracias por ser una buena hermana mayor de laboratorio y por todas las puertas que me abriste.

A los M. en C. Paty Cabrales, M. en C. Raúl Castillo, por sus consejos y enseñanzas en el laboratorio.

Al Dr. Ernesto Maldonado y el laboratorio de Evolución y Desarrollo, gracias por las charlas tan interesantes y por todo el material y equipo proporcionado.

A la Dra. Judith Sánchez y el laboratorio de Toxinología por proporcionarme equipo de laboratorio.

A todos los que me acompañaron a campo, Biol. Víctor Piñón, M. en C. Sergio Guendulain y Biol. Eduardo Ávila, gracias.

Gracias a los capitanes Amauri y Mario, sin ustedes jamás habría podido recolectar mis muestras.

A la Dra. Anastasia Banaszak, por ser mi hada madrina y abrirme paso en mi carrera como científica.

A los amores de mi vida:

Gibran, Yolanda y Jorge, fue difícil, más difícil de lo que habría imaginado, pero sin ustedes esto no habría sido posible. Gracias por hacerme sentir su amor más allá de la distancia, gracias por estar siempre ahí y tomarme y reconstruir mis pedazos cada que era necesario.

A mi cone, por las horas de felicidad que pasé a tu lado y por estar hasta altas horas de la madrugada saltando por ahí, con toda tu felicidad y tu rabo.

A Guille, Sharon, Shei, Manolo, el Gordito y Ferzito, por siempre asegurarse de mi bienestar, por hacerme siempre saber que no estoy sola, los amo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACIÓN	10
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	11
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS PARTICULARES	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
<i>SITIO DE MUESTREO</i>	13
<i>DISEÑO METODOLÓGICO</i>	13
RECOLECCIÓN DE MUCUS.	14
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	15
DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.....	16
1. <i>Presencia/ausencia de colágeno total</i>	16
2. <i>Presencia/ausencia de melanina</i>	17
3. <i>Presencia/ausencia de la vía de la Profenoloxidasa (PO)</i>	17
ANÁLISIS BIOQUÍMICO BÁSICO	17
1. <i>Proteínas totales</i>	17
2. <i>Lípidos totales</i>	17
3. <i>Carbohidratos totales</i>	18
ANÁLISIS DE RESULTADOS	18
RESULTADOS	20
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	20
DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.....	23
ANÁLISIS BIOQUÍMICO BÁSICO	26
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	42

RESUMEN

El aumento en la temperatura de los océanos y la descarga de desechos hacia el mar ponen en riesgo la salud de los corales. Por esta razón los eventos de blanqueamiento y los brotes de enfermedades coralinas cada vez son más frecuentes y letales. Por lo tanto, es importante conocer las vías inmunológicas que utiliza el coral para defenderse ante estas amenazas. Una de las herramientas con las que cuentan los corales para su protección es la capa superficial de mucus (CSM). Esta capa, que es secretada por el coral, separa al pólipo del ambiente que lo rodea. Además, la CSM alberga un complejo microbiano que defiende al coral de patógenos oportunistas. Sin embargo, el potencial de la actividad antimicrobiana de la CSM per se no ha sido ampliamente explorada. Por lo tanto, en este trabajo se determinó la actividad antimicrobiana de la CSM de *P. strigosa* sanos y enfermos de banda negra, y de *Exaiptasia pallida* y *Cassiopea xamachana* sanos y blanqueados contra dos agentes potencialmente patógenos, *Serratia marcescens* y *Aurantimonas* sp. En conjunto, la actividad antimicrobiana de la CSM (mucus sin bacterias) se comparó con la actividad de las bacterias asociadas al mucus (BAM) y del complejo mucus (CM) o mucus con bacterias. Así mismo, se determinó la presencia de colágeno, melanina y fenoloxidasa en el mucus de coral, sustancias involucradas en la inmunidad innata de los cnidarios. Finalmente se realizó un análisis bioquímico básico del mucus de los cnidarios sanos, enfermos y blanqueados. Los resultados mostraron que la CSM de *P. strigosa*, *E. pallida* y *C. xamachana* presentan actividad antimicrobiana contra *S. marcescens* y *Aurantimonas* sp. de forma especie específica. *E. pallida* presentó una mayor actividad antimicrobiana contra *Aurantimonas* sp., mientras que *P. strigosa* y *C. xamachana* presentaron actividad antimicrobiana similar contra ambos patógenos. En las colonias de coral afectadas por la enfermedad de banda negra disminuyó la actividad antimicrobiana de la CSM, pero no de las BAM. Así mismo, disminuyó la actividad antibacteriana de la CSM de *E. pallida* y *C. xamachana* blanqueadas. Sin embargo, las BAM de *E. pallida* no disminuyeron su actividad antibacteriana sobre ninguna de las dos cepas. Por su parte, el CM de *C. xamachana* blanqueada mostró un aumento en la actividad antimicrobiana contra *Aurantimonas* sp., la cual puede estar asociada a una bacteria en particular. Los resultados mostraron también que la hidroxiprolina y la fenoloxidasa incrementaron en *P. strigosa* enfermos en la zona cercana a la enfermedad. Mientras que *E. pallida* y *C. xamachana* blanqueadas presentaron valores ligeramente más altos de hidroxiprolina y fenoloxidasa que los organismos sanos. En ningún caso se encontró melanina. El análisis bioquímico básico mostró diferencias entre los organismos sanos y enfermos o blanqueados, pero no se encontró ninguna tendencia entre ellos. En este trabajo se demostró que la CSM por sí misma presenta actividad antimicrobiana y dicha actividad no está asociada con las bacterias que viven en el mucus. Esta actividad antimicrobiana disminuye cuando los cnidarios se encuentran enfermos o blanqueados. Sin embargo, cuando *P. strigosa*, *E. pallida* y *C. xamachana* se encuentran enfermos o blanqueados presentan una mayor respuesta inmune.

ABSTRACT

Coral reefs are affected by the deterioration of the world's oceans due to global warming and anthropogenic perturbations. Associated to these perturbations, bleaching and disease have increased in frequency and severity. To overcome some of these conditions, reef corals and other symbiotic cnidarians rely on the surface mucus layer that houses a diverse community of beneficial microorganisms, and mechanisms of innate immune response. Antimicrobial defence has been associated to the bacterial community in these organisms, but the potential antimicrobial activity of the surface mucus layer itself has not been explored fully. In this study we tested this capability by challenging the bacteria-free mucus layer against two potentially pathogenic bacteria. Complementary immunological assessments included the determination of collagen (hydroxyproline), melanin and phenoloxidase. Results clearly showed that the surface mucus layer of healthy cnidarians has the capability of inhibiting the growth of *Serratia marcescens* and *Aurantimonas* sp. in a species-specific way, differing also in the potency of the response. The anemone *Exaiptasia pallida* was specifically potent against *Aurantimonas* sp. while the coral *Pseudodiploria strigosa* and the medusa *Cassiopea xamachana* had similar capabilities against both strains. In coral colonies affected by black band disease, this antibacterial capability of the surface mucus layer diminished but not for the associated bacteria. Bleaching of the anemone and the medusa also diminished the antibacterial capability of the mucus layer but in the anemone, the associated bacteria did not show a significant reduction in growth inhibition over the bacterial strains. The mucus of bleached medusae showed an increased inhibitory activity against *Aurantimonas* sp. that may be associated to a specific, isolated bacterial strain. Results also showed that hydroxyproline and phenoloxidase increased in the transition zone of diseased corals, although melanin was not detected in any of the animals tested. Bleaching of the anemones and medusae resulted in slightly higher values for hydroxyproline. In this work, we show that the mucus layer itself has antibacterial properties not associated to the bacteria this layer houses that diminish due to disease or bleaching, while immunological responses increase in unhealthy animals.

INTRODUCCIÓN

Los arrecifes de coral son uno de los ecosistemas más importantes y actualmente más vulnerables del planeta. A pesar de que cubren menos del 1% de la superficie terrestre, se encuentran entre los ecosistemas más biodiversos, productivos y de mayor complejidad. Económicamente, los arrecifes coralinos son una fuente importante de recursos alimenticios, productos medicinales y proveen ingresos importantes en el rubro turístico. Además, protegen las costas y asentamientos contiguos de los daños ocasionados por las tormentas, inundaciones y tsunamis. Debido económica y ecológicamente los arrecifes de coral son un ecosistema invaluable para el ser humano (Marris, 2005; Tunell, 2007; Bikerland, 2015; Ferrario et al, 2014).

A pesar de la importancia de los arrecifes de coral, constantemente son amenazados por causas naturales y principalmente antropogénicas. La descarga de efluentes, los encallamientos de grandes embarcaciones, la sobrepesca y el cambio global son algunas de las causas que desafían constantemente a este ecosistema. Estas amenazas comprometen la salud de los organismos, provocando, por ejemplo, que la cobertura de coral vivo haya disminuido hasta un ochenta por ciento en los últimos treinta años. Sin corales que den estructura al arrecife, la compleja comunidad de los organismos que ahí habitan podría colapsar. Por lo tanto, los arrecifes de coral podrían considerarse como el ecosistema marino en mayor peligro de extinción del planeta (Loya y Rinkevich, 1980; Rogers et al, 2004; Wilkinson, 2004; Tunell, 2007).

Los corales formadores de arrecife o hermatípicos pertenecen al orden Madreporaria o Scleractinia. Estos organismos se caracterizan por tener un esqueleto calcáreo el cual da estructura a los arrecifes. La tasa de crecimiento de los corales varía entre especie, pudiendo ser de hasta tres centímetros por año en el caso de *Acropora palmata*. Los corales escleractinios son organismos en forma de pólipo que forman grandes colonias. Dichas características le permiten servir como refugio a diversas especies que viven dentro de los arrecifes de coral (Schuhmacher y Zimbrowius, 1985).

Además de interactuar con los macroorganismos que viven dentro del arrecife, los corales presentan simbiosis con una gran diversidad de microorganismos. Una de las relaciones simbióticas más estrechas que presentan los corales es con *Symbiodinium* spp, microalga endosimbiótica que provee a los corales hasta el 80% de su energía basal. Por otro lado, en el mucus que se encuentra en la superficie de la colonia, así como en su esqueleto, hospeda hongos, bacterias, arqueas y virus. En conjunto, el coral y todos estos organismos que habitan dentro del tejido, en el esqueleto o fuera del coral (en el mucus), forman al holobionte coralino (Muscatine 1958; Ducklow y Mitchell, 1979; Rohwer et al, 2002; Kellogg, 2004; Pantos y Bythell, 2010; Tremblay et al, 2012; Sweet y Bythell, 2017).

El holobionte coralino es un sistema dinámico, cuyos miembros fluctúan dependiendo de las condiciones ambientales que lo rodean, quedando así

vulnerable ante todos los disturbios a los que se enfrentan constantemente. Debido a estos disturbios, una de las consecuencias más graves que sufren los corales son las enfermedades coralinas. Dichas enfermedades son afectaciones detectables a simple vista, asociadas a bandas o manchas con coloración diferente. Causan la pérdida de tejido y pueden ser delimitadas por una interfaz entre el tejido saludable y el no saludable. Las enfermedades coralinas a su vez están relacionadas con el cambio de la microbiota asociada a la superficie del holobionte coralino (Richardson 1998; Harvell, 2008; Ainsworth et al, 2011).

Otra de las afectaciones a las que se enfrenta el holobionte coralino es el blanqueamiento. El blanqueamiento coralino consiste en la disminución de las zooxantelas o pigmentos fotosintéticos dentro del hospedero. Dicha pérdida de simbiontes está asociada, en general, a una exposición del holobionte ante condiciones de estrés, lo que provoca una pérdida en la coloración de la colonia. En algunas ocasiones el coral puede recuperarse del blanqueamiento, ya que no necesariamente hay pérdida de tejido. A pesar de ello, se ha demostrado que posterior a un evento de blanqueamiento, los corales pueden volverse más susceptibles y posteriormente contraer diversas enfermedades. Por lo tanto, el blanqueamiento y las enfermedades coralinas son resultado de la disminución de la salud del holobionte, ocasionada por las perturbaciones ambientales (Hoegh-Guldberg, 1999; Hoegh-Guldberg et al, 2007; Scheufen et al, 2017).

Desafortunadamente, poco se sabe acerca de los procesos inmunes que se llevan a cabo en el coral cuando su salud está comprometida. Esto es debido a que la determinación de la salud, enfermedad o blanqueamiento de los corales es mediante signos visibles en la superficie de la colonia. El mucus coralino, parte importante de la inmunidad innata en los seres vivos, es una capa que protege a los corales del ambiente que lo rodea. Este mucus es la primera parte expuesta ante todas las perturbaciones antropogénicas. Por lo tanto, es importante estudiar al mucus como parte de la inmunidad innata cuando los corales son afectados por disturbios antropogénicos (Brown y Bythell, 2005; Bythell y Wild, 2011).

Hasta ahora, la mayoría de los estudios sobre inmunidad innata en los corales se han realizado en tejido. Entre estos estudios se han determinado componentes clave en la defensa de los cnidarios como la melanina, que es catalizada por la vía de la fenoloxidasas; y la regeneración de tejidos, parte del proceso de coagulación de heridas, en donde se propone al colágeno como formador de coágulos. Por otra parte, los estudios que han evaluado la capacidad antimicrobiana del mucus se han enfocado en las bacterias presentes en el mucus de coral, a quienes desafían contra diferentes patógenos. En conjunto, estos estudios nos presentan un mapa de las herramientas inmunológicas con las que cuenta el holobionte coralino para defenderse del medio en el que vive (Cerenius y Soderhall, 2004; Palmer et al, 2008, 2011, 2012).

El estudio de la inmunidad innata en corales es complicado debido a su lenta tasa de crecimiento. La extracción de las colonias del arrecife implica sacar del ambiente a un individuo que tardó varios años en llegar a una talla adulta. Además, el mantenimiento de corales en laboratorio es complicado debido a su alto costo y las

necesidades del organismo. Por ello es importante trabajar con “organismos modelo” que sean más fáciles de mantener dentro del laboratorio y que permitan entender la biología de los corales con mayor rapidez. En este estudio se eligieron a *Exaiptasia pallida* y *Cassiopeia xamachana* como organismos modelo. Estos organismos además de pertenecer al filum Cnidaria, presentan simbiosis con dinoflagelados del género *Symbiodinium* (Weis *et al*, 2008; Ohdera *et al*, 2018).

Hasta ahora la actividad antimicrobiana de la capa superficial de mucopolisacáridos (CSM) secretada por el coral no ha sido ampliamente explorada. En vez de eso, se ha evaluado el mucus en conjunto con las bacterias que ahí habitan. Así mismo, se tiene muy poca información de las sustancias inmunes que están inmersas en el mucus. Además, existe un solo trabajo en donde se evalúa la actividad antimicrobiana del mucus de corales sanos y blanqueados, pero no hay ningún registro que compare dicha actividad entre corales sanos y enfermos. Por lo tanto, es importante poner especial énfasis en todos estos huecos de conocimiento sobre mucus de coral como parte de la inmunidad innata del organismo.

Antecedentes

El mucus como primera línea de defensa química de la inmunidad innata

El mucus juega un papel importante como barrera química, física y biológica en todos los organismos. Es una sustancia con actividad antimicrobiana que defiende el tejido subyacente de un ataque bacteriano, protegiéndolo de infecciones. En un estudio realizado en mucus de caracol se encontró un “factor antibacteriano” probablemente proveniente de la fracción proteica de una glicoproteína, la cual inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas. En otro estudio, el mucus de la trucha arcoíris *Salmo gairdneri* presentó compuestos que inhibían todas las bacterias probadas en el ensayo. Con todos estos avances, se han realizado extractos para purificar sustancias específicas que incluso podrían tener importancia médica en el uso y mejoramiento de antibióticos de fuentes naturales (Iguchi *et al*, 1982; Austin y McIntosh, 1988; Subramanian *et al*, 2008; Alcántara Santana *et al*, 2012; Pitt *et al*, 2015).

En invertebrados marinos se han realizado pocos estudios para identificar la actividad antimicrobiana del mucus. En un estudio realizado en el zoantideo *Palythoa caribaeorum* desafiado contra 15 cepas patógenas de humanos, el mucus no reveló actividad antibacteriana contra ninguna de estas cepas. Así mismo, se realizó un estudio en el mucus del coral *Acropora palmata* en donde se probó la actividad antimicrobiana de colonias sanas en dos épocas del año, una de ellas relacionada con un evento de blanqueamiento. Los resultados mostraron que el mucus de *A. palmata* durante la temporada de blanqueamiento no inhibió las cepas bacterianas contra las que fueron muestreadas. En otro estudio realizado en mucus de corales del género *Montipora* sp. donde se probó la actividad antibacteriana contra las cepas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, el mucus no logró inhibir

el crecimiento de ninguna de las dos cepas (Ritchie, 2006; Zimmerman et al, 2017; Camargo GM et al, 2018).

Finalmente, se han realizado algunos estudios en el mucus del coral *A. palmata*, juntos con algunas de sus BAM y el patógeno *Serratia marcescens*. En dichos estudios describen las diferencias en como estas bacterias utilizan ciertos polímeros del mucus, la regulación catabólica de ciertos azúcares, las preferencias en la utilización de fuentes de carbono, la actividad enzimática durante el crecimiento de las bacterias en el mucus, y como dependiendo de la actividad de glicosidasas y N-acetyl-glucosaminidasas, *S. marcescens* puede ser menos virulenta para el coral (Krediet et al, 2009, 2009a, 2013).

Capa Superficial de Mucopolisacáridos de corales

La CSM secretada por los corales es una compleja mezcla de proteínas, mucopolisacáridos y lípidos localizada sobre la superficie de los pólipos, cuyo grosor va de 145 a 700 μm . Esta capa varía dependiendo de la especie, la profundidad, la zona arrecifal donde se encuentre, la irradiación a la que se someta el pólipo y la contaminación del ambiente marino. Los mucopolisacáridos que la conforman son macromoléculas ácidas compuestas por unidades repetidas de N-acetil-d-hexosamina y ácido hexurónico. Está compuesto también de mucinas, glicoproteínas poliméricas (0.5-20 MDa) altamente heterogéneas, responsables de dar al mucus su consistencia espesa o de gel. Dichas mucinas están formadas por un núcleo proteico filamentoso con cadenas laterales fuertemente glicosadas, compuestas con alrededor del 80% de carbohidratos. Así mismo, su núcleo proteico contiene residuos de cisteína, los cuales son susceptibles a romperse, proceso que se cree ocurre durante la dispersión del mucus. (Goreau, 1956; Ducklow y Mitchell, 1979, 1979a; Peters, 1984; Crossland, 1987; Verdugo, 1990; Bansil y Turner, 2006; Jatkar et al, 2010; Bythell y Wild, 2011).

La CSM es secretada por los mucocitos o células secretoras de mucus (Figura 1). Estas células ovoides se extienden alrededor de casi toda la superficie epidérmica del coral (el disco oral, la pared columnar y las zonas más externas del mismo), o en el ectodermo, sin un patrón de distribución particular. Los mucocitos se caracterizan por tener un núcleo celular en la base de la célula y un citoplasma con una red basofílica granular de densidad variable, o vacía. A través de los mucocitos y el tejido celular, hay un intercambio de agua y electrolitos que modifican constantemente la cantidad y calidad de la CSM, engrosando o reduciendo su volumen. Con ello, y de acuerdo con las investigaciones realizadas sobre la reología de la CSM, es probable que los mucocitos puedan producir al menos dos tipos diferentes de CSM (Goreau, 1956, Peters, 1984, Brown y Bythell, 2005, Jatkar, 2010).

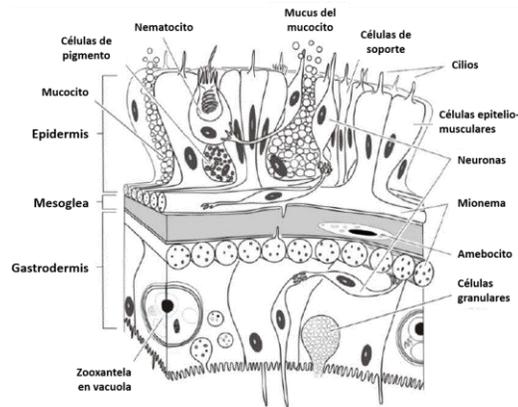


Figura 1. Diagrama tridimensional de la superficie del cuerpo de un pólipo de coral escleractinio. Muestra el mucus siendo expulsado por los mucocitos. Tomada de Galloway et al (2007).

La CSM cumple con diversas funciones que contribuyen en el bienestar del coral. Entre estas funciones se encuentran:

- a) Alimentación, ya que los cilios utilizan al mucus como un medio para transportar partículas y contribuir a la alimentación heterotrófica (Brown y Bythell, 2005); *
- b) Protección contra rayos UV, debido a que el mucus contiene micosporinas tipo aminoácidos (MAAs, por sus siglas en inglés) que absorben los rayos UV (Drollet et al, 1993);
- c) Remoción de partículas, ya que el coral limpia su superficie mediante la remoción de las partículas que no representan nutrientes alimenticios (Duerden, 1906);
- d) Resistencia a la desecación y humectación, reduciendo el roce del viento sobre los arrecifes de coral en marea baja (Deacon, 1979).
- e) Reproducción y asentamiento larval en octocorales y corales blandos, donde los huevos fecundados y las larvas desarrollan un mucus alrededor de sí mismos, que sirve de protección mientras pasan a la siguiente fase de desarrollo (Braseau y Lasker, 1990; Gutierrez-Rodriguez y Lasker, 2004; Brown y Bythell, 2005).
- f) Eliminación de carbono, ya que funciona como una vía de excreción de carbono producido en exceso debido a la fotosíntesis de las zooxantelas simbiote (Davies, 1984).
- g) Calcificación, ya que en el día el mucus funciona como una matriz que facilita la adquisición de Ca^2 , por lo tanto, las células ectodérmicas orales contienen una concentración mayor de calcio que el medio, lo que ayuda a cumplir con las demandas de calcio para la calcificación (Clode y Marshall, 2002).
- h) Defensa en contra de patógenos, el mucus hospeda comunidades microbianas que presentan actividades antimicrobianas que impiden el crecimiento de patógenos oportunistas en el coral (Ritchie, 2006; Glasl et al, 2016).

Los estudios realizados sobre la actividad antibacteriana del CM confieren dicha actividad a las BAM. Estos estudios se refieren a las bacterias cultivables, las cuales corresponden al 20% de las bacterias totales presentes en el mucus. Por lo que,

debido a que el mucus en otros organismos cumple la función de barrera química como parte del sistema inmune innato, es importante explorar si la actividad antibacteriana del CM proviene también de las sustancias secretadas por el coral en la CSM. Existe un estudio que evaluó las sustancias antimicrobianas generadas por el coral. Este estudio demostró que corales estresados previamente por un daño físico suave, tal como la mordida de un depredador, presentan actividad antibacteriana contra 13 patógenos provenientes de corales y humanos (Geffen y Rosenberg en 2005; Kelman et al, 2006; Ritchie, 2006; Abbas et al, 2008; Shnit-Orland y Kushmaro, 2008).

Condiciones que podrían afectar la efectividad del mucus coralino como primera línea de defensa

Al hablar del mucus como una barrera de defensa inmunológica, nos referimos a la función que desempeña el mucus protegiendo la salud del cnidario. Desafortunadamente en la actualidad no existen parámetros que nos ayuden a identificar con toda certeza un coral sano de uno enfermo, o con salud comprometida. A pesar de ello, uno de los indicadores que tenemos para determinar si un coral se encuentra aparentemente saludable o no es mediante signos visuales. Dos signos visibles de que la salud de un cnidario está comprometida son las enfermedades y el blanqueamiento coralino.

Es importante mencionar que hasta ahora no hay registros en campo de *E. pallida* o *C. xamachana* enfermos, pero, por otro lado, si hay estudios en los que *E. pallida* y *C. xamachana* en condiciones controladas expulsan sus simbiontes, lo que nos facilita obtener organismos blanqueados en condiciones controladas.

Enfermedades coralinas

Las enfermedades coralinas son alteraciones en la superficie de la colonia detectables a simple vista (Figura 2). Estas afectaciones de diámetro variable presentan pérdida de tejido y están asociadas a bandas con coloración diferente o manchas aisladas. Normalmente, están delimitadas por una interfaz entre el tejido saludable y no saludable. Desde el primer registro de enfermedades coralinas en 1977 y hasta la fecha, se han reportado diversas enfermedades con signos similares en todos los océanos. Hasta ahora, el número de enfermedades coralinas que se tienen registradas para el Caribe y el Golfo de México son entre 7 y 12 enfermedades. Entre las enfermedades coralinas registradas para el Caribe podemos encontrar las enfermedades de banda negra, mancha blanca y plaga blanca (Antonius, 1977; Richardson 1998; Sutherland, 2004; Weil, 2004; Jordán-Dahlgren y Rodríguez-Martínez, 2007; Harvell, 2008; Gil-Agudelo et al, 2009; Carricart-Ganivet et al, 2011).

La enfermedad de banda negra se identifica como una banda de coloración oscura en la superficie de la colonia, discreta o borrosa que rodea al tejido necrosado. Mientras avanza esta banda sobre el tejido sano va dejando el esqueleto expuesto,

el cual puede o no presentar crecimiento secundario de algas. Es causada por un consorcio bacteriano integrado principalmente por cianobacterias del género *Geitlerinema* spp (antes *Phormidium* spp). Así mismo, dentro de la capa microbiana también se encuentran organismos de los géneros *Desulfovibrio* spp, *Beggiatoa* spp, *Leptolyngbya* spp, (Antonius, 1981; Weil y Hooten, 2008; Glas et al, 2010).

La enfermedad de plaga blanca se caracteriza por presentar una amplia banda de color blanco de esqueleto expuesto, el cual limita claramente al tejido del coral saludable. El esqueleto desnudo es colonizado gradualmente por algas, lo que ayuda a diferenciar si la enfermedad es reciente o no. La plaga blanca comienza en la base de la colonia y de depresiones y grietas sobre la colonia. Su agente causal es el patógeno *Aurantimonas corallícida* (Richardson et al, 1998a; Weil y Hooten, 2008).

Aurantimonas corallícida es una bacteria aislada por primera vez de *Dichocoenia stokesi* enfermo. Es una bacteria gram negativa, en forma de vara, halófila y estrictamente aerobia. Forma colonias pigmentadas de coloración naranja a dorado, en forma de ramas (Richardson et al, 1998a; Denner et al, 2003).

La enfermedad de mancha blanca, viruela blanca o serriatosis en Acróporas, se caracteriza por presentar lesiones de forma irregular donde desaparece el tejido coralino, dándole una coloración blanca, a través de la superficie coralina de forma ubicua. Esta enfermedad se presenta únicamente en *Acropora palmata* y su potencial agente causante es *Serratia marcescens* (Patterson et al, 2001).

Serratia marcescens es una bacteria gram negativa en forma de bacilo, clasificada como miembro de las enterobacterias. Ha sido reconocida por causar infecciones nosocomiales, infecciones que se adquieren dentro de un hospital). Es una bacteria saprófita, inocua y acuática, que es fácilmente reconocida ya que al cultivarla presenta coloración roja. El primer reporte en corales fue en los cayos de Florida, USA, cumpliendo los postulados de Koch (Hejazi y Falkiner, 1997; Patterson, 2010).



Figura 2. (Izq) Enfermedad de banda negra; (Centro) enfermedad de plaga blanca; (Der) enfermedad de mancha blanca, viruela blanca o serriatosis

Blanqueamiento coralino

Los corales escleractinios al igual que *E. pallida* y *C. xamachana* son organismos que presentan una simbiosis mutualista con *Symbiodinium*. *Symbiodinium* le provee hasta el 80% de energía de metabolismo basal al hospedero, mientras que el cnidario a su vez, le sirve como fuente de nitrógeno. El término blanqueamiento es una observación visual de la superficie de la colonia debido a la coloración blanca que presenta el coral cuando expelle a la mayoría de sus simbioses. Algunos estudios han demostrado que, dependiendo de la especie, algunos cnidarios después de perder cierto porcentaje de zooxantelas dejan de ser funcionales. En algunos casos se ha reportado que pueden presentar adelgazamiento de la epidermis y apoptosis de las células gastrodermales. La expulsión de las zooxantelas puede ser debido a que los cnidarios se encuentran en condiciones de estrés, tales como el aumento en la temperatura de los océanos, daño físico o enfermedad. En condiciones de laboratorio se ha detectado que también los cnidarios se deshacen de *Symbiodinium* cuando se disminuye la temperatura del medio o añadiendo glucosa o mentol al agua que los rodea (Hoegh-Guldberg, 1999; Hoegh-Guldberg et al, 2007; Ainsworth et al, 2008; Palmer et al, 2011; Scheufen et al, 2017).

En condiciones de salud, los corales escleractinios, *E. pallida* y *C. xamachana* presentan una simbiosis mutualista con *Symbiodinium*. En corales, dependiendo de la especie y el tiempo que el cnidario permanezca sin *Symbiodinium*, el estado de blanqueamiento puede resultar en la muerte del organismo. En el caso de *C. xamachana*, el estado de blanqueamiento resulta en una disminución drástica en el diámetro de su campana. Por su parte, *E. pallida* no presenta una disminución evidente ni un cambio en su microbioma, incluso se puede mantener en estado aposimbiótico. Con todo lo anterior, es posible considerar que la falta de simbioses dentro de estos organismos simbióticos representa un estado de salud comprometida o vulnerabilidad del cnidario (Brown y Howard, 1985; Muscatine et al, 1991; McGill y Pomory, 2008; Mydlarz et al, 2009).

Justificación

El aumento en la temperatura de los océanos y la descarga de desechos hacia el mar alteran drásticamente a los ecosistemas marinos, en particular a los arrecifes de coral. Estos disturbios ponen en riesgo la salud de los corales, ocasionando que los eventos de blanqueamiento y los brotes de enfermedades coralinas cada vez sean más frecuentes y también más letales. Por ello, es urgente entender cuáles son las vías de defensa que el coral utiliza para conservar su estado de salud.

Existen algunos estudios que se enfocan en la actividad antibacteriana conferida por las bacterias que habitan en el mucus del coral. Otros estudios evalúan las vías de inmunidad innata que se desarrollan dentro del tejido coralino cuando la salud del coral se ve comprometida. Sin embargo, aun cuando la CSM es el primer

contacto que el coral tiene con el ambiente que lo rodea, no existen estudios que evalúen si la CSM presenta actividad antimicrobiana. Aunado a ello, tampoco hay estudios que comprueben si dentro la CSM hay sustancias resultantes de las vías de inmunidad innata de los corales que puedan ayudar a conservar el estado de salud de la colonia. Finalmente, hacen falta estudios que determinen la efectividad de la CSM cuando el coral ya se encuentra enfermo o blanqueado.

Lo anterior, nos llevó a conducir esta investigación, la cual se realizó en tres cnidarios simbióticos, el coral *Pseudodiploria strigosa*, la anémona *Exaiptasia pallida* y la medusa *Cassiopea xamachana*. Este trabajo evaluó la actividad antimicrobiana de la capa superficial de mucopolisacáridos (CSM) y se comparó contra la actividad antimicrobiana conferida por las bacterias asociadas al mucus (BAM) y el mucus (formado por la CSM y las BAM) que en este trabajo trataremos como “Complejo Mucus” (CM). Estos tres tratamientos fueron probados contra dos patógenos asociados a enfermedades coralinas, *Serratia marcescens* y *Aurantimonas* sp. Así mismo, se evaluó la presencia de colágeno (en forma de su principal aminoácido “hidroxiprolina”), melanina y fenoloxidasa en el CM, como sustancias pertenecientes a la inmunidad innata de los cnidarios. Se realizó una caracterización bioquímica básica del CM. Y finalmente se evaluó si existían diferencias según el estado de salud del cnidario, por lo que se trabajó con *P. strigosa* sanos y enfermos de banda negra, y *E. pallida* y *C. xamachana* sanas y blanqueadas.

Pregunta de investigación

- 1- ¿La capa superficial de mucopolisacáridos de los cnidarios sirve como barrera inmune?
- 2- En caso de que lo anterior sea correcto, ¿Disminuye la efectividad de la capa superficial de mucopolisacáridos cuando la salud del cnidario está comprometida?

Hipótesis

- 1- Si la capa superficial de mucopolisacáridos presenta actividad antibacteriana, entonces existirá inhibición del crecimiento de bacterias patógenas.
- 2- Si la capa superficial de mucopolisacáridos se ve afectada en los cnidarios enfermos o blanqueados, entonces no existirá inhibición del crecimiento de bacterias patógenas.

- 3- Si la capa superficial de mucus actúa como barrera inmune, entonces habrá una mayor cantidad de colágeno, melanina y fenoloxidasa en los cnidarios enfermos y blanqueados con respecto a los sanos

Objetivo General

Determinar la actividad antimicrobiana de la capa superficial de mucopolisacáridos en *Pseudodiploria strigosa*, *Exaíptasia pallida* y *Cassiopea xamachana*

Objetivos Particulares

- Determinar la actividad antimicrobiana del complejo mucus como barrera inmune
- Determinar la actividad antimicrobiana de las bacterias asociadas al mucus
- Comparar la actividad antimicrobiana de la capa superficial de mucus, el complejo mucus y las bacterias asociadas al mucus de cnidarios sanos y enfermos o blanqueados
- Determinar la presencia de colágeno, melanina y fenoloxidasa en el complejo mucus
- Realizar una caracterización bioquímica básica del complejo mucus

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo

En *P. strigosa* el mucus se recolectó de colonias sanas y enfermas de banda negra (5 colonias por cada condición), de talla mediana (mayores a 50 cm de diámetro máximo y 25 cm de altura mínima), presentes a lo largo de la zona arrecifal posterior del arrecife Petempich en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos (Figura 3), entre los 3 y 5 m de profundidad.

La recolección del mucus se llevó a cabo en los meses de octubre y noviembre de 2017.

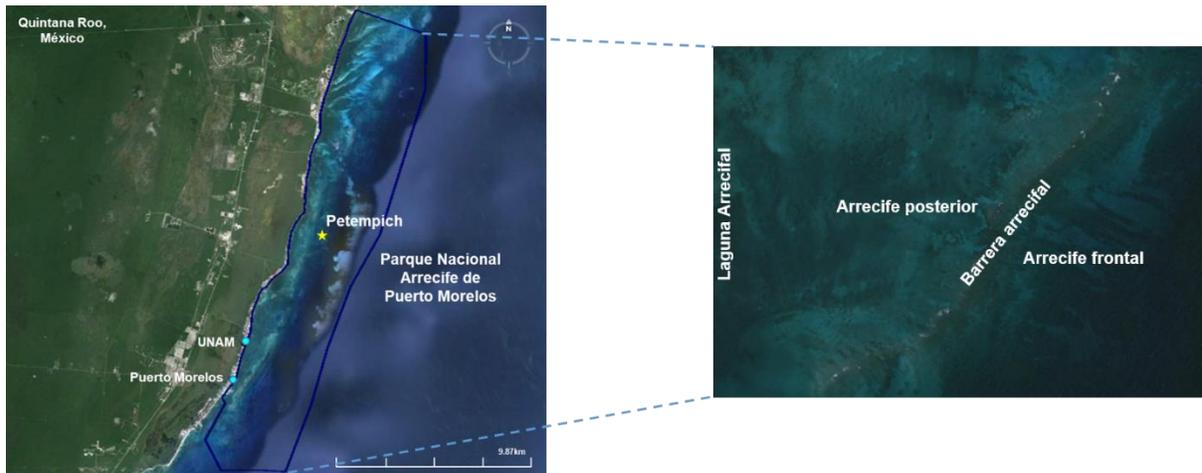


Figura 3. (Izq.) Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. (Der.) Zonas marcadas de una barrera arrecifal común.

Para los organismos modelo, la anémona *E. pallida* se colectó en el sistema de acuarios de la UASAPM. En el caso de *C. xamachana* los organismos (simbióticos y blanqueados) fueron donados por el Laboratorio de medusas del Parque Xcaret.

Diseño Metodológico

Al salir a campo se recolectaron muestras de mucus de *P. strigosa*. Mientras que el mucus de *E. pallida* y *C. xamachana* se recolectó en el laboratorio. Todas las muestras tienen 3 replicados muestrales.

Posterior a la extracción de mucus por medio de jeringas estériles, las muestras se vertieron en tubos falcon de 20 mL y se procedió a la separación del mucus y agua de mar por medio de 2 ciclos de centrifugación. El primer ciclo de centrifugación se realizó en una centrifuga clínica por 20 min a 1,425 x g. Posterior a la centrifugación se decantó el agua de mar de forma manual en una campana de flujo laminar y se vertió el contenido a tubos eppendorf. Los tubos eppendorf se centrifugaron en una

micro centrifuga por 5 min a 16,873 x g y se decantó el agua de mar restante. Finalmente, la muestra se agitó en vórtex por un minuto.

Con lo anterior, se obtuvieron tres tipos de tratamiento/muestra diferentes: 1) BAM, bacterias inoculadas en medio marino; 2) CSM, mucus sin bacterias; y 3) CM, mucus fresco. Para obtener CSM se sometió por 20 min a luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm) (Krediet et al, 2009) y para corroborar que la esterilización fuera exitosa, se inoculó en agar marino y se incubó a 27°C, por 16 horas y al día siguiente se evaluó la ausencia de crecimiento de cualquier organismo. En el caso de las BAM se inocularon 10 μ L de mucus coralino de cada muestra, en 1 mL de medio marino, se incubó a 27°C, por 16 horas y al día siguiente se utilizó para realizar los análisis. Finalmente, el CM, junto con la CSM (después de la exposición a luz UV), se guardaron a 4°C hasta el día siguiente.

Posteriormente cada tipo de muestra se sometió a las siguientes pruebas:

- 1) Prueba de evaluación de actividad antimicrobiana;
- 2) Determinación de la respuesta inmune;
- 3) Pruebas de análisis bioquímico básico.

Finalmente, los resultados se capturaron en una base de datos y se sometieron a diversos análisis estadísticos.

Recolección de mucus.

Con un instrumento de barrido se raspó ligeramente la superficie del coral para inducir la liberación del mucus y posteriormente el mucus se recolectó en una jeringa de 20 mL sin aguja. Ya en la superficie las jeringas se depositaron en una hielera a temperatura ambiente para su posterior análisis.

En las colonias sanas el mucus coralino se recolectó en la parte superior de la colonia, mientras que en las colonias enfermas se tuvieron dos zonas diferentes de recolección de mucus (Figura 4).

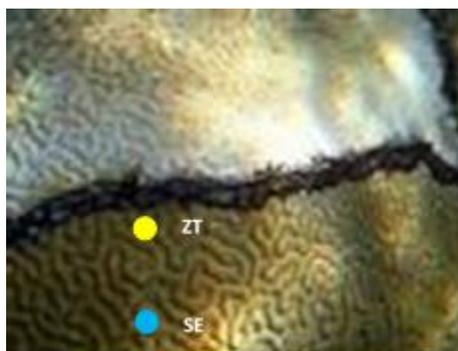


Figura 4. *Pseudodiploria strigosa* con signos visibles de banda negra, donde (Amarillo) Zona de Transición; y (Azul) tejido aparentemente sano.

- 1) Cerca de la enfermedad, que se encuentra entre los 2 a 4 cm de la enfermedad (Weil et al, 2009 y Morgan et al, 2015); y
- 2) Lejos de la enfermedad o en el tejido aparentemente sano, a 15 cm de la enfermedad.

Se escogieron únicamente colonias con síntomas visibles de banda negra en la parte superior de la colonia.

En el caso de *C. xamachana* y *E. pallida* sanas, cada organismo se retiró del estanque, se enjuago en agua de mar filtrada y se depositó en un vaso de precipitados lleno de igual forma con agua de mar estéril. Por los siguientes 20 y 10 min, respectivamente para *C. xamachana* y *E. pallida*, con ayuda de una jeringa se extrajo el mucus liberado, en el caso de *C. xamachana*, dentro del vaso de precipitados, mientras que *E. pallida*, fue retirada del agua, se le limpió el excedente de agua con un filtro estéril y se extrajo el mucus. *E. pallida* fue rehidratada continuamente. Todos los organismos fueron mantenidos en observación para asegurarnos de que se encontraban en buenas condiciones después de la extracción.

Para obtener mucus de *E. pallida* blanqueada, se indujo el blanqueamiento por choque frío, de acuerdo con lo reportado por Estes et al, (2003) modificado y Muscatine et al, (1991). Los organismos se extrajeron de la pecera (Temperatura $\approx 28^{\circ}\text{C}$) y se introdujeron a agua de mar a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$, por 4 horas. Posteriormente se colocaron en una pecera oscura para su recuperación, durante 2 y 3 semanas.

Evaluación de la actividad antibacteriana.

Para evaluar la actividad antibacteriana, se realizó el ensayo de swarming combinado con el ensayo de agar de doble placa. En donde en una caja Petri se depositó una primera capa de medio marino con agar (15 g agar/L) y se dejó gelificar por 12 horas. Por otro lado, en un tubo de ensayo se prepararon 3 mL de medio marino (7 g agar/L) por caja y se dejó reposar también por 12 horas a temperatura ambiente. En la capa de abajo o la de agar más concentrado, se depositaron 2 o 3 filtros de vidrio, con 10 μL de CSM y CM, y 7 μL de muestra BAM, para saturar el filtro. Paralelamente, los tubos de ensayo con el agar suave se calentaron de nuevo hasta punto de ebullición y posteriormente se dejaron enfriar hasta los 48°C . Con ello, ya que los tubos llegaban a la temperatura adecuada, uno a la vez, se depositaron 100 μL de la cepa testigo y finalmente se virtieron sobre la primera capa de agar marino. Finalmente, las cajas se dejaron semiabiertas en la campana de flujo laminar por 30 min, y al terminar, se incubaron a 27°C , por 16 horas en el caso de *S. marcescens* y 48 horas en el caso de *Aurantimonas* spp. Pasado el tiempo de incubación, se determinó si la cepa testigo había crecido alrededor del filtro o si existía una zona de inhibición, la cual fue determinada por la ausencia (representada con un 0), o presencia (1) de la misma (Figura 5).



Figura 5. Ensayo de “swarming” en la técnica de agar de doble placa, donde se muestra el filtro con CSM y la zona de inhibición formada (flecha blanca).

Como blanco, se tomaron los agares y medios marinos con y se dejaron crecer de la misma forma por 16 horas a 27°C en la incubadora, para descartar que existiera algún tipo de contaminación.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado utilizando como control negativo agua de mar filtrada; mientras que como control positivo se utilizaron dos antibióticos de amplio espectro, ciprofloxacino y ceftriaxona (100 µg/mL).

Determinación de la respuesta inmune

1. Presencia/ausencia de colágeno total.

Para determinar la presencia de colágeno se utilizó el método de cuantificación de hidroxiprolina (Hyp), de Hofman et al, (2011), aminoácido único del colágeno. Para realizar dicha prueba se utilizaron 10 µL de muestra a los que se añadieron 100 µL de HCl (6 N) y se incubó la solución por 1 hora a 99°C en el calentador de bloque. Posteriormente se recuperó el hidrolizado vertiendo 100 µL de agua mili Q en la muestra y después se centrifugó por 1 min a 16,873 x g. Se agregaron 100 µL de cloramina T (140 mg Cloramina T, 1 mL de 1-propanol, 1 mL de agua mili Q y 8 mL de buffer acetato citrato [364.8 mg de ácido cítrico anhidro, 34.27 µL de agua mili Q, 96 µL de ácido acético glacial, 960 mg de acetato de sodio trihidratado y 272 mg de hidróxido de sodio, a pH 6]), se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min y posteriormente se agregaron 100 µL de reactivo de Erlich (1.5 g DMAB, 6.6 mL de 1-propanol y 3.3 mL de ácido perclórico). Se incubó la muestra por 20 min a 65°C y al enfriar se midió a 540 nm en el espectrofotómetro.

Se utilizó como estándar trans-4-Hydroxy-L-prolina (Sigma) y se trató de acuerdo con el protocolo descrito arriba (Hofman et al, 2011).

2. Presencia/ausencia de melanina.

Para determinar si existe melanina como parte de una reacción inmune innata, se realizó una cuantificación colorimétrica de melanina, de acuerdo a Mydlarz y Palmer (2011). Para la extracción de la melanina se utilizaron 10 μL de mucus. Posteriormente se le añadieron 20 μL de buffer PBS (50 Mm, pH 7.5) y se dejó 5 min en hielo. La muestra se agitó en vórtex por 20 seg a 16,873 x g y se dejó de nuevo en hielo. Finalmente se centrifugó 5 min a 2,400 x g y se recuperaron 20 μL del extracto. Éste se guardó por una noche en el ultra congelador a -80°C y posteriormente se liofilizó por 4 horas.

Para medir melanina el extracto liofilizado se resuspendió en 30 μL de NaOH 10M y se agitó en vórtex a 300 rpm, posteriormente se centrifugó a 7,000 x g por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se dejó evaporar en el calentador de bloque por una hora a 99°C y se resuspendió la muestra en 60 μL de agua milli Q esterilizada. Para determinar la cantidad de melanina presente se leyó en el espectrofotómetro a 410 y 490 nm.

Se utilizó como estándar melanina (Sigma) y se trató de acuerdo con el protocolo descrito arriba (Mydlarz y Palmer, 2011).

3. Presencia/ausencia de la vía de la Profenoloxidasa (PO)

Con la finalidad de determinar si se encuentra activa la vía de síntesis de melanina, se midió la actividad de la PO, de acuerdo a lo descrito por Mydlarz y Palmer (2011), donde se vertió en una cubeta 40 μL de buffer fosfato (50 mM, pH 7.5), 10 μL de mucus, 25 μL de tripsina y 30 μL de L-tirosina. Finalmente se leyó a 490 nm, cada muestra se hizo una por una y estandarizó a mg de proteína.

Análisis bioquímico básico

Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

1. **Proteínas totales.** Se realizó un microensayo de Bradford (1976), en donde se utilizaron 65 μL de CM, 75 μL de reactivo de Bradford y se llevaron a 300 μL con agua destilada, finalmente se leyó en el espectofotómetro a 595 nm y se interpoló en una curva estándar realizada con BSA.
2. **Lípidos totales.** Se realizó el ensayo de Mishra et al, (2014), o sulfo-fosfovanilina, en donde se utilizaron 10 μL de CM en 100 μL de agua y se virtieron 2 mL de H_2SO_4 al 98%. La muestra se calentó por 10 min a 100°C y después se enfrió por 5 min en baño maría con hielo. Finalmente, la muestra se incubó por 15 min a 37°C a 200 rpm y se leyó a 530 nm.

Previo al inicio del ensayo, se preparó el reactivo fosfo-vanilina, para el cual se agregaron 0.3 g de vanilina a 5 mL de etanol absoluto, los cuales se diluyeron en 45 mL de agua desionizada y se mezcló. Posteriormente se le agregaron 200 mL de H₃PO₄ al 100% y se guardó en obscuridad hasta su uso.

3. **Carbohidratos totales.** Se realizó el método de Dubois et al, (1951), con modificaciones, conocido como fenol-sulfúrico, utilizando 10 µL de CM, llevado a 20 µL con agua destilada, al cual se le agregó 130 µL de fenol al 5%, posteriormente se le añadió a cada muestra 850 µL de H₂SO₄ y se agitó y se dejó en reposo durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente se leyó en el espectrofotómetro a 490 nm y se interpoló en una curva estándar realizada con glucosa (Dubois et al, 1951).

Análisis de resultados

Los test que se realizaron para analizar los datos obtenidos por el ensayo de swarming el cual midió la actividad antibacteriana del mucus de los cnidarios, nos arrojaron resultados ya sea de presencia (1) o ausencia (0) de la Zona de Inhibición, lo que los hace datos nominales y restringe la posibilidad de realizar pruebas paramétricas. Por lo tanto y debido a que el número de muestras que obtuvimos por tratamiento (BAM, CSM y CM) es pequeño (n=6), en el caso de la comparación de mucus sano y enfermo (en *P. strigosa*), así como sano y blanqueado (para *E. pallida* y *C. xamachana*) se realizó el test exacto de Fisher, el cual nos permite determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos con una muestra pequeña. Para determinar si existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos (BAM, CSM y CM) se realizó el análisis de Q de Cochran (Lemeshko y Mirkin, 2004).

En el caso del análisis inmunológico y el análisis bioquímico básico, se realizó una evaluación gráfica de normalidad, para determinar la distribución de los datos, dado que la n≤6 no se optó por aplicar un test formal de normalidad para el que se recomienda que la n≥30 (Razali y Wah, 2011).

Resultado de dicho análisis gráfico de distribución (histograma), realizado en el software R Project, se determinó que la distribución de los datos no era normal, consecuencia de ello se eligió realizar la prueba de Wilcoxon ya que era la más conveniente para determinar si existen diferencias significativas entre la cantidad de proteínas, lípidos, carbohidratos, hidroxiprolina y fenoloxidasas presentes en *E. pallida* y *C. xamachana*, debido a que es un método “libre de distribución”, lo que significa que no requiere que los datos presenten una distribución normal (Wilcoxon, 1945).

Finalmente, para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre *P. strigosa* sanos, enfermos (cerca y lejos), se decidió usar el test de Kruskal

Wallis, el cual, del mismo modo que las pruebas anteriores es un test no paramétrico, en el que se compara si las poblaciones presentan la misma distribución de probabilidades o si tienen la misma mediana (Kruskal y Wallis, 1952).

RESULTADOS

Evaluación de la actividad antibacteriana

Pseudodiploria strigosa

Al realizar el ensayo de swarming con mucus de *Pseudodiploria strigosa* contra *S. marcescens* (Tabla 1), el único tratamiento que mostró diferencias estadísticamente significativas fueron las colonias sanas (n=6), donde $Q_0 > \chi^2$, ($Q_0=6$; $\chi_{0.05, 2}=5.99$), por lo tanto, como podemos apreciar en la tabla, en este caso la CSM es el que logró inhibir el crecimiento de *S. marcescens* (Frecuencia=3), mientras que BAM y CM no presentaron ningún efecto de inhibición para la cepa.

En el caso de *P. strigosa* enferma (n=6), BAM y CM mostraron la misma capacidad de inhibir el crecimiento de *S. marcescens*, mientras que CSM no presentó ningún efecto de inhibición.

Así mismo, en las colonias enfermas, lejos de la enfermedad, las BAM y el CM inhibieron más *S. marcescens* (frecuencia=2), que CSM (frecuencia=1), aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Finalmente, al comparar si existían diferencias entre *P. strigosa* sanos y enfermos, cerca y lejos de la enfermedad para inhibir el crecimiento de *S. marcescens*, el test exacto de Fisher no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los casos: BAM p= 0.27; CSM p= 0.25; y CM p=0.27.

Cuando probamos *P. strigosa* contra *Aurantimonas* sp. (Tabla 1), en comparación con *S. marcescens* en todos los casos (en las colonias sanas y enfermas, cerca y lejos) el comportamiento de BAM, CSM y CM es igual. Aunque es conveniente resaltar que aun cuando no haya diferencias estadísticamente significativas, en el único caso que las CSM funcionó como barrera inmunológica química es en el caso de las colonias sanas, mientras que las colonias enfermas, en ambos casos (cerca y lejos de la enfermedad), no hay efecto de la misma, siendo las BAM y la CSM las que presentan una mayor frecuencia de inhibición del patógeno.

Cuando comparamos sanos contra enfermos, cerca y lejos de la enfermedad (Tabla 1), el test de Fisher no arrojó diferencias estadísticamente significativas; pero es importante mencionar que únicamente en *P. strigosa* sanos, la CSM (p=1), logró inhibir a *Aurantimonas* sp. Mientras que CM (p=0.25), logró inhibir a *Aurantimonas* sp. en las colonias sanas enfermas lejos de la enfermedad. Mientras que BAM (p=0.77), siempre tuvo actividad presente, aunque con un menor efecto cerca de la enfermedad.

Exaiptasia pallida

En el caso de *E. pallida*, en ninguno de los casos la CSM presentó alguna actividad antimicrobiana, por tanto, no formó zona de inhibición, mientras que las BAM y el CM en ambos casos presentaron el mismo comportamiento, lo cual se puede ver reflejado en la prueba de Cochran, la cual demostró que había diferencias estadísticamente significativas, en al menos uno de los tratamientos, en este caso CSM (Tabla 2).

Lo anterior resultó acorde al estadístico aplicado, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sanos y blanqueados ($p=1$)

Cuando se realizó el swarming contra *Aurantimonas* sp. (Tabla 2) el test de Cochran no arrojó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre BAM, CSM o CM, en sanos ni en blanqueados. En el caso de los sanos, podemos ver que los tres tratamientos (BAM, CSM y CM), inhibieron el crecimiento de *Aurantimonas* sp, pero en el caso de *E. pallida* blanqueadas BAM presentó una mayor frecuencia ($f=4$) que la CSM ($F=3$) y el CM ($f=2$).

Cuando se realizó el test exacto de Fisher, se encontró que, aunque ni BAM ($p=0.45$), ni CSM ($p=0.18$), ni CM ($p=0.06$), presentaron diferencias estadísticamente significativas, este último presentó un valor de p cercano a 0.05, por lo que se podría decir que sí hay una diferencia notable, acerca de la efectividad del CM en *E. pallida* sanos y blanqueados.

Cassiopea xamachana

En el caso de *C. xamachana* únicamente las medusas sanas inhibieron el crecimiento de *S. marcescens* siendo la CSM ($f=2$) el único tratamiento que logró presentar una zona de inhibición. Cuando se aplicó la prueba de Cochran, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre BAM, CSM y CM. Seguido de esto, se aplicó el Test Exacto de Fisher, el cual también arrojó no haber diferencias entre sanos y blanqueados (Tabla 2).

De la misma forma que cuando *C. xamachana* se probó contra *S. marcescens*, cuando se probó contra *Aurantimonas* sp. la CSM ($f=2$) fue quien formó una zona de inhibición en las colonias sanas. En los organismos blanqueados, el CM ($f=5$) formó zona de inhibición contra *Aurantimonas* sp. Al realizar la prueba de Cochran, en los organismos sanos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre BAM ($f=0$), CSM ($f=2$) y CM ($f=0$), mientras que en blanqueados sí, en este caso en el CM ($f=5$). Congruente con los estadísticos anteriores, cuando realizamos el test exacto de Fisher, encontramos que únicamente en el CSM mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=1$) entre *C. xamachana* sanas y blanqueadas, mientras que BAM ($p=1$) y CM ($p=0.4$) no presentó diferencia alguna (Tabla 2).

Tabla 1. Frecuencia de la presencia de la zona de inhibición (n= 5-6) en mucus de *Pseudodiploria strigosa*. El mucus tratado fue ofrecido a los cultivos de cepa testigo *Serratia marcescens* y *Aurantimonas* sp., la zona de inhibición fue medida a las 16 y 48 h de la inoculación, respectivamente.

Sp	Condición	<i>Serratia marcescens</i>				<i>Aurantimonas</i> sp.			
		BAM	CSM	CM	Q ₀	BAM	CSM	CM	Q ₀
<i>P. strigosa</i>	S	0/6	3/6	0/6	6*	4/5	1/5	2/5	4.6
	EC	3/6	0/6	3/6	15*	2/5	0/5	0/5	4
	EL	2/6	1/6	2/6	1.5	3/5	0/5	3/5	4.5
	p=	0.27	0.25	0.27		0.77	1	0.25	

S: Sanos, EC: Enfermos Cerca (2-4 cm de la enfermedad), EL: Enfermos Lejos (15 cm de la enfermedad), BAM: Bacterias cultivables Asociadas al Mucus, CSM: Capa Superficial de Mucus (sin bacterias), CM: Complejo Mucus (mucus + bacterias). El número de frecuencia de inhibición se calculó sobre 5-6 replicados biológicos, con 3 replicados técnicos cada uno. El * indica la muestra estadísticamente significativa, con relación a $p < 0.05$ (calculada por la prueba de Fisher), que compara sanos contra enfermos/blaqueados; y $Q_0 > 5.99$ (calculada por la prueba de Q de Cochran), que compara BAM, CM y CSM.

Tabla 2. Frecuencia de la presencia de la zona de inhibición (n= 5-6) en mucus de *Exaíptasia pallida*, *Cassiopea xamachana*. El mucus tratado fue ofrecido a los cultivos de cepa testigo *Serratia marcescens* y *Aurantimonas* sp., la zona de inhibición fue medida a las 16 y 48 h de la inoculación, respectivamente.

Sp	Condición	<i>Serratia marcescens</i>				<i>Aurantimonas</i> sp.			
		BAM	CSM	CM	Q ₀	BAM	CSM	CM	Q ₀
<i>E. pallida</i>	S	5/6	0/6	5/6	10*	6/6	6/6	6/6	0
	B	5/6	0/6	5/6	10*	4/6	3/6	2/6	1.5
	p=	1	1	1		0.45	0.18	0.06*	
<i>C. xamachana</i>	S	0/6	2/6	0/6	4	0/6	2/6	0/6	4
	B	0/6	0/6	0/6	0	0/6	0/6	5/6	12*
	p=	1	0.45	1		0.77	1	0.25	

S: Sanos, B: Blanqueadas, BAM: Bacterias cultivables Asociadas al Mucus, CSM: Capa Superficial de Mucus (sin bacterias), CM: Complejo Mucus (mucus + bacterias).

El número de frecuencia de inhibición se calculó sobre 5-6 replicados biológicos, con 3 replicados técnicos cada uno. El * indica la muestra estadísticamente significativa, con relación a $p < 0.05$ (calculada por la prueba de Fisher), que compara sanos contra enfermos/blaqueados; y $Q_0 > 5.99$ (calculada por la prueba de Q de Cochran), que compara BAM, CM y CSM.

Determinación de la respuesta inmune

Pseudodiploria strigosa

Al realizar la cuantificación de hidroxiprolina total (n=5), encontramos que el CM de *P. strigosa* sanos tienen, en general, una menor concentración de hidroxiprolina con relación al CM de *P. strigosa* enfermos, en la zona cerca de la enfermedad, mientras que la cantidad total de hidroxiprolina que presenta *P. strigosa* lejos de la enfermedad se encuentra en un punto intermedio entre *P. strigosa* sanos y enfermos, cercana de la enfermedad (Figura 6). El test de Kruskal Wallis, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos (p=0.406).

La reacción enzimática de PO no se presentó en el CM de *P. strigosa* sanos (n=5), mientras que en *P. strigosa* cerca de la enfermedad (n=3) presentó valores más altos que en *P. strigosa* enfermos, lejos de la enfermedad (n=4) (Figura 7). El test de Kruskal Wallis no mostró diferencias estadísticamente significativas (p=0.367).

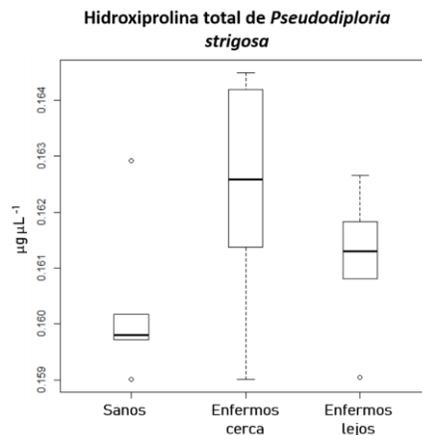


Figura 6. Cuantificación de hidroxiprolina total en *Pseudodiploria strigosa* sanos, enfermos (cerca y lejos). La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos. Los puntos muestran datos atípicos.

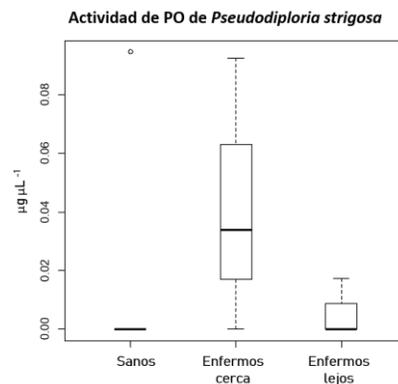


Figura 7. Cuantificación de la actividad de PO en *Pseudodiploria strigosa* sanos y enfermos, cerca y lejos de la enfermedad. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos. Los puntos muestran datos atípicos.

Exaíptasia pallida

En el CM de *E. pallida* (n=6) los organismos sanos presentaron una menor cantidad de hidroxiprolina con respecto a los enfermos, aunque esto no es estadísticamente significativo ($p=0.172$) (Figura 8).

La actividad de PO en el CM de *E. pallida* sanas y blanqueadas (n=6) presentó resultados similares, lo cual se vio reflejado en el test de Wilcoxon donde $p=0.9372$ (Figura 9).

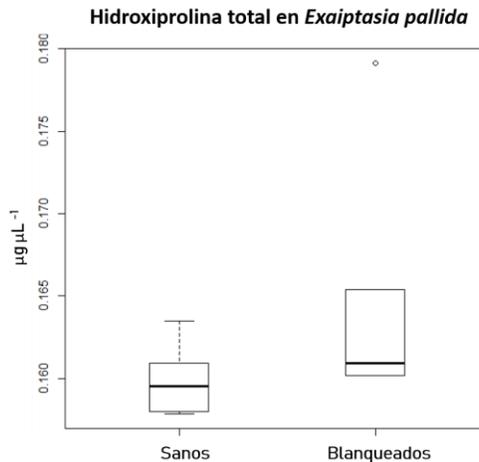


Figura 8. Cuantificación de hidroxiprolina total en *Exaíptasia pallida* sanas y blanqueadas. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos. Los puntos muestran datos atípicos.

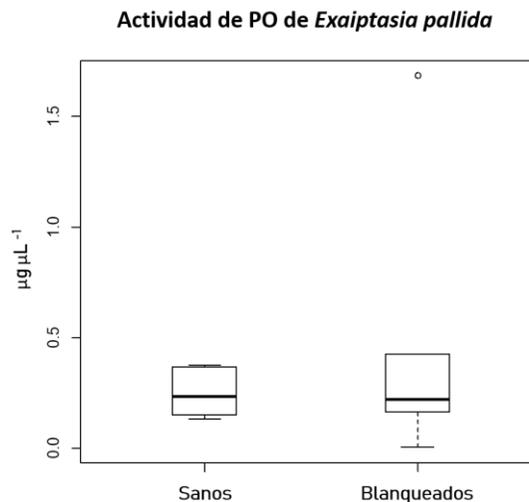


Figura 9. Cuantificación de la actividad de PO en *Exaíptasia pallida* sanas y blanqueadas. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos. Los puntos muestran datos atípicos.

Cassiopea xamachana

El CM de *C. xamachana* sanas (n=6) presentó los valores más bajos de hidroxiprolina en relación con el CM de *C. xamachana* blanqueadas (n=6), aunque no muestra diferencias estadísticamente significativas (p=0.077) (Figura 10).

Por su parte, el CM de *C. xamachana* sanas (n=6) presentará resultados más altos de PO en el CM de *C. xamachana* blanqueadas (n=6), así como una dispersión de los datos mayor. El test de Wilcoxon no reflejó diferencias estadísticamente significativas (p=0.0410) (Figura 11)

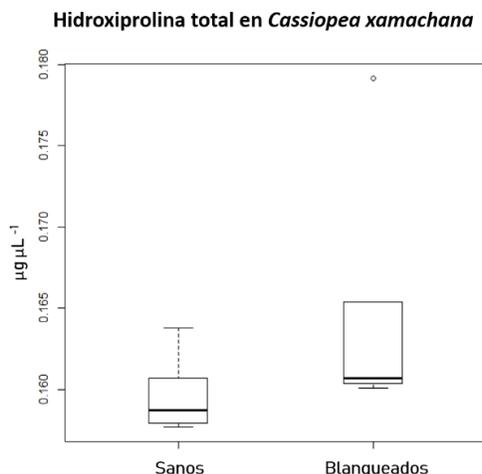


Figura 10. Cuantificación de hidroxiprolina total en *Cassiopea xamachana* sanas y blanqueadas. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos. Los puntos muestran datos atípicos.

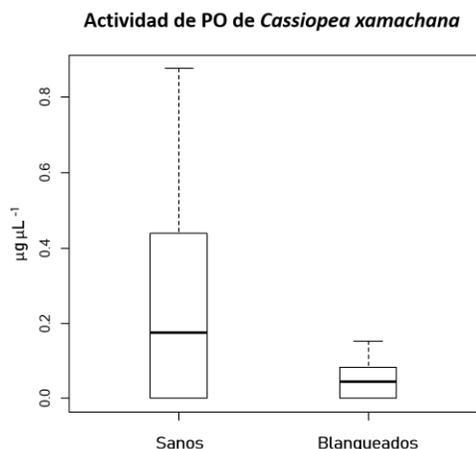


Figura 11. Cuantificación de la actividad de PO en *Cassiopea xamachana* sanas y blanqueadas. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos.

Análisis bioquímico básico

Pseudodiploria strigosa

Los valores de proteína total presente en el CM de *P. strigosa* sanos (n=5) y enfermos, cerca (n=3) y lejos (n=4) de la enfermedad son muy similares. Por su parte, dispersión de los datos, en el CM de *P. strigosa* sanos presenta una menor distribución de los datos con respecto a los enfermos cerca de la enfermedad. Sin embargo, el CM de *P. strigosa* enfermos lejos de la enfermedad presentan una distribución muy amplia. Al aplicar el test de Wilcoxon no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.415$) (Figura 12).

En cuanto a la cantidad de lípidos totales presentes en el CM *P. strigosa*, la dispersión de datos de las colonias sanas (n=5) y enfermas lejos de la enfermedad (n=4) es muy amplia con relación CM de *P. strigosa* enfermos cerca de la enfermedad (n=3). El test de Wilcoxon no reveló diferencias estadísticamente significativas ($p=0.367$) (Figura 13).

La cantidad de carbohidratos totales presentes en el CM de *P. strigosa* sanos (n=6) y lejos de la enfermedad (n=4) son similares entre sí. Ambos, *P. strigosa* sanos y enfermos lejos de la enfermedad presentan valores máximos y mínimos similares y la dispersión de sus datos es pequeña en relación con el CM de *P. strigosa* cerca de la enfermedad (n=4). El CM de *P. strigosa* enfermos cerca de la enfermedad presenta valores mínimos más altos con respecto al CM de *P. strigosa* sanos y enfermos lejos de la enfermedad. El test de Kruskal Wallis no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.391$). Sin embargo, debido a que los datos reales no se trasponían unos con otros, se aplicó el test de Wilcoxon, que sí reveló diferencias estadísticamente significativas entre *P. strigosa* sanos y enfermos cerca de la enfermedad ($p=0.028$), así como entre *P. strigosa* enfermos cerca y lejos ($p=0.028$) de la enfermedad. Por su parte, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sanos y enfermos lejos de la enfermedad ($p=2$) (Figura 14).

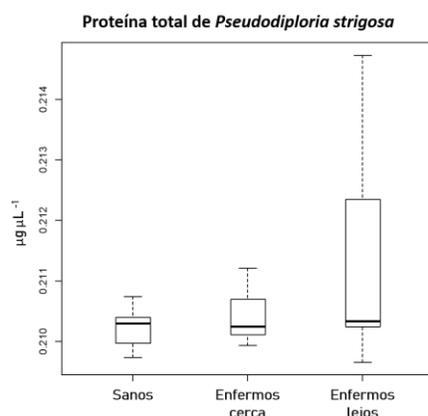


Figura 12. Cantidad de proteína total en *Pseudodiploria strigosa* sanos y enfermos, cerca y lejos de la enfermedad. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos.

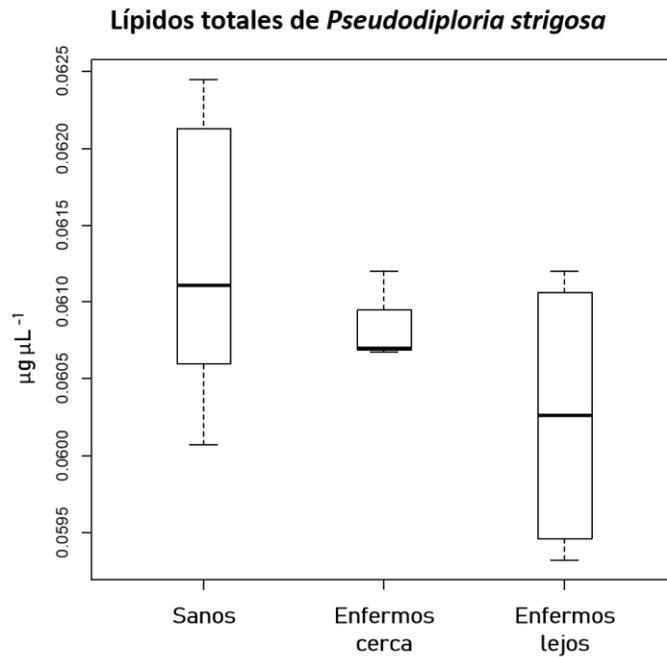


Figura 13 Cantidad de lípidos totales en *P. strigosa* sanos y enfermos cerca y lejos de la enfermedad. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos.

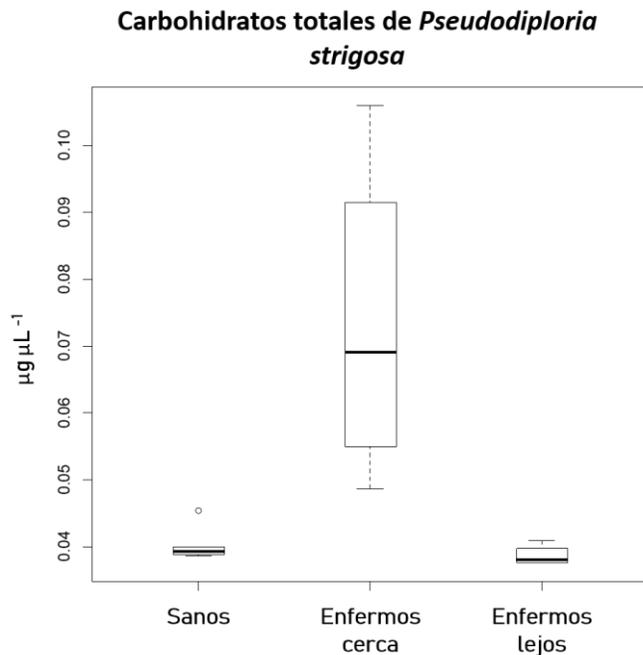


Figura 14. Cantidad de carbohidratos totales en *P. strigosa* sanos y enfermos cerca y lejos de la enfermedad. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos. Los puntos muestran datos atípicos.

Exaíptasia pallida

La cuantificación de proteínas totales mediante el ensayo de Bradford reveló que el CM de *E. pallida* sanas (n=6), presenta significativamente ($p=0.002$) una mayor concentración de proteína total que en el CM de *E. pallida* blanqueadas (n=6) (Figura 15).

Por su parte, la cantidad de lípidos totales en el CM de *E. pallida* sanas (n=6) tuvieron una menor dispersión de los datos que las blanqueadas (n=6), pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre si ($p=0.329$) (Figura 16).

La cantidad de carbohidratos totales en el CM de *E. pallida* sanas (n=6) fue significativamente mayor ($p=0.017$) que las blanqueadas (n=6) (Figura 17).

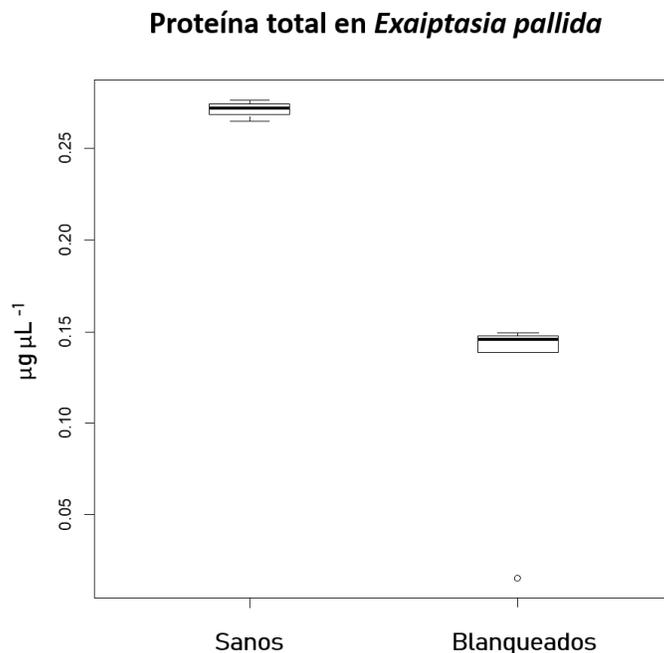


Figura 15. Cantidad de proteína total en *Exaíptasia pallida* sanas y blanqueadas. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos. Los puntos muestran datos atípicos.

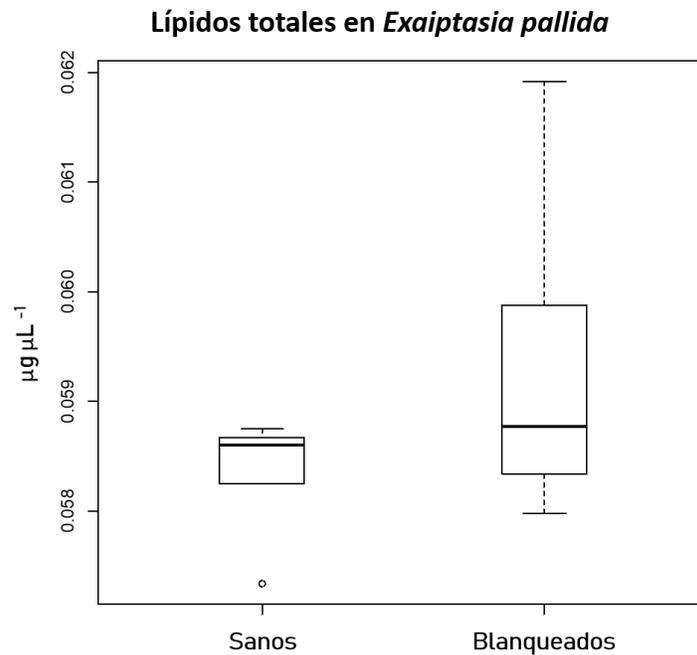


Figura 16. Cantidad de lípidos totales en *Exaiptasia pallida* sanas y blanqueadas. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos. Los puntos muestran datos atípicos.

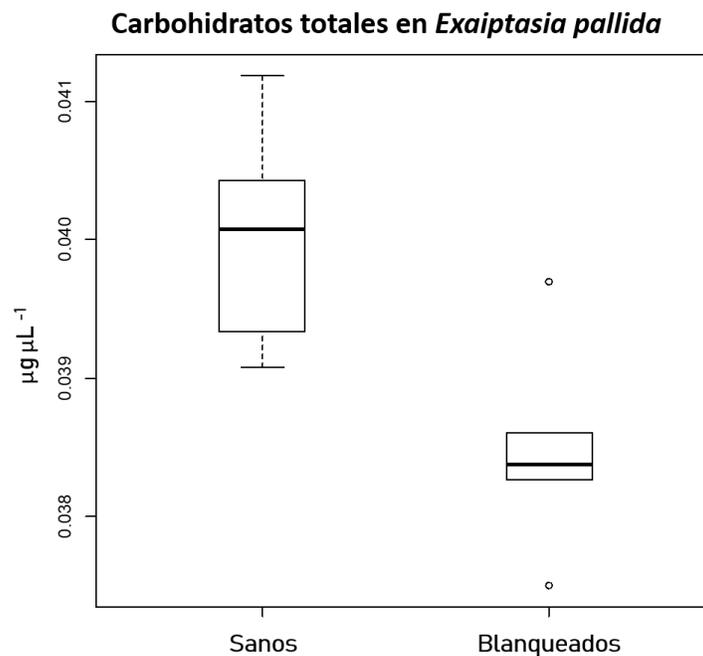


Figura 17. Cantidad de carbohidratos totales en *Exaiptasia pallida* sanas y blanqueadas. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos. Los puntos muestran datos atípicos.

Cassiopea xamachana

La concentración de proteínas totales en el CM de *C. xamachana* sanas (n=6) fue significativamente mayor (p=0.002) que en el CM de *C. xamachana* blanqueadas (n=6). Además, el CM de *C. xamachana* sanas presentó una desviación de los datos mayor que la de las blanqueadas (Figura 18).

Al realizar la cuantificación de lípidos totales en el CM de *C. xamachana* se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p=0.002) entre el CM de *C. xamachana* sanas (n=6) y blanqueadas (n=6). Esto indica que el CM de *C. xamachana* sanas tuvieron una mayor cantidad de lípidos que el CM de *C. xamachana* blanqueadas (Figura 19).

Por su parte, el CM de *C. xamachana* sanas (n=6) mostró una dispersión de los datos de mayor en el CM de *C. xamachana* blanqueadas. Sin embargo, los valores de carbohidratos totales del CM de *C. xamachana* sanas entró dentro de la dispersión de los datos del CM de *C. xamachana* blanqueadas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p=1) (Figura 20).

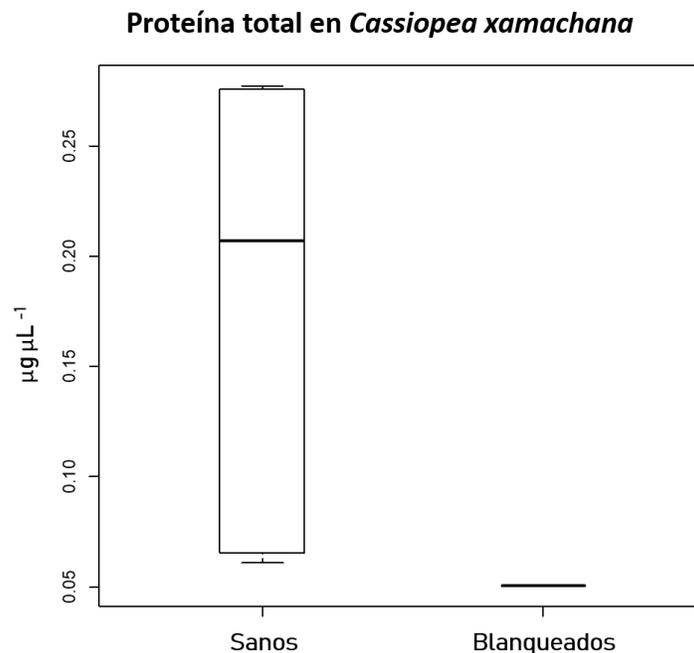


Figura 18. Cantidad de proteínas totales en *Cassiopea xamacha* sanas y blanqueadas. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos.

Lípidos totales en *Cassiopea xamachana*

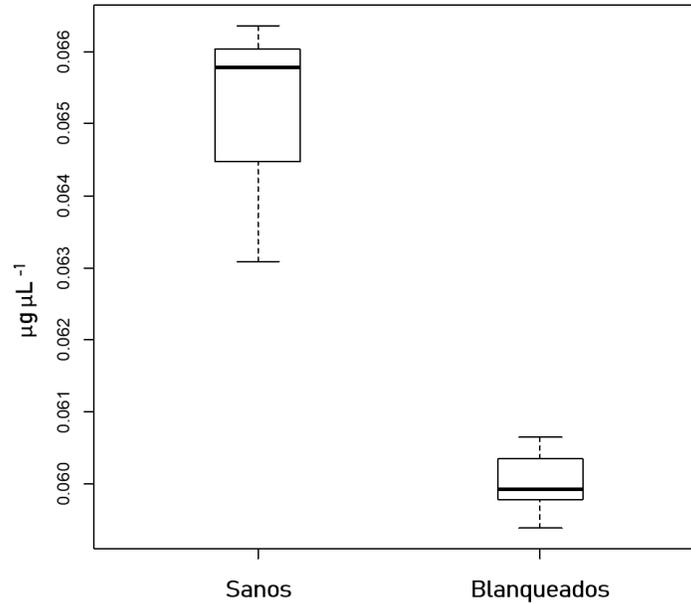


Figura 19. Cantidad de lípidos totales en *Cassiopea xamachana* sanas y blanqueadas. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos. Los puntos muestran datos atípicos.

Carbohidratos totales en *Cassiopea xamachana*

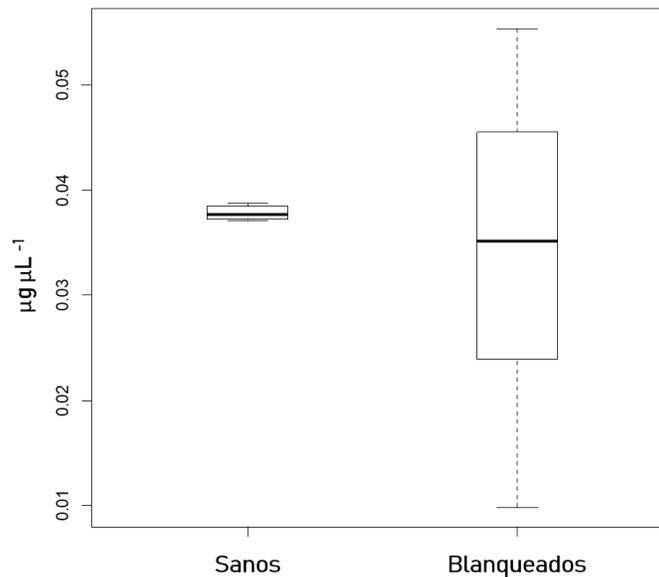


Figura 20. Cantidad de carbohidratos totales en *Cassiopea xamachana* sanas y blanqueadas. La línea dentro de la caja representa la mediana de los datos, la cual divide los cuartiles 2 y 3 que representan el 50% de los datos; mientras que cada una de las líneas punteadas (cuartiles 1 y 3) representan el 25% de los datos. Los puntos muestran datos atípicos.

DISCUSIÓN

Los cnidarios poseen una CSM que los protege y delimita del ambiente exterior. Esta capa alberga una comunidad microbiana compuesta principalmente por bacterias que varían entre organismos sanos, enfermos y blanqueados (Koh, 2007, Glasl et al, 2016, Röthig et al, 2016), por lo tanto, podríamos suponer que dentro del mucus existen propiedades que contribuyen a la selección de los microorganismos residentes (Ritchie, 2006). Y en conjunto, los microorganismos y la CSM juegan un papel importante en la protección de corales, medusas y anémonas.

Existen pocos estudios que prueben la disminución de las propiedades de defensa del mucus en cnidarios enfermos o blanqueados (Ritchie, 2006, Glasl et al, 2016). Sin embargo, se sabe que los patógenos provocan alteraciones en los corales enfermos y hay un cambio el microbioma del mucus. Así mismo, cuando los corales, medusas anémonas pierden sus zooxantelas se han reportado daños estructurales y fisiológicos que pueden conducir a la pérdida de la funcionalidad del holobionte (Caldwell et al, 2017, Scheufen et al, 2017, Meyer, 2016, Ainsworth et al, 2008, McGill y Pomory, 2008, Richardson et al, 1998). Lo que indica que el mucus es una barrera que se modifica constantemente dependiendo del estado del organismo y las condiciones ambientales y por ello su capacidad de defensa pudiese verse afectada.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Este trabajo es el primer reporte que compara la actividad antibacteriana de la CSM, las BAM y el CM. Se encontró que la CSM de *P. strigosa* y *C. xamachana* sanos inhiben el crecimiento de *S. marcescens* y *Aurantimonas* sp., mientras que la CSM de *E. pallida* inhibe únicamente a *S. marcescens*. Este hallazgo muestra que esta capa de mucopolisacáridos secretada por los cnidarios presenta una actividad antimicrobiana que protege al holobionte de diferentes patógenos, y, por lo tanto, las bacterias no son las principales responsables de mantener sano al organismo (Resefh et al, 2006), sino que en conjunto la CSM y las bacterias mantienen saludables a los cnidarios simbióticos aquí estudiados.

Pseudodiploria strigosa

Los resultados obtenidos mostraron que la CSM de *P. strigosa* cerca de la enfermedad no inhibió el crecimiento de ninguna de las dos cepas. Esto puede deberse a diversas razones, una de ellas es que el mucus está siendo consumido por las bacterias patógenas debido a que es un sustrato rico en nutrientes (Ritchman et al, 1975), en cuyo caso, el coral se quedaría desprovisto de la actividad antimicrobiana que es proporcionada por el mucus. Otra de las razones podría ser que las propiedades antimicrobianas del mucus están variando como resultado de un cambio del estado de salud a enfermedad del coral (Ritchie, 2006). Finalmente, debido a que no existe un registro sobre el cambio en la tasa de secreción del mucus

cuando los corales se enferman (Brown y Bythell, 2005) también se debería de considerar que la falta de inhibición de la CSM ante *S. marcescens* y *Aurantimonas* sp. se deba a una disminución en la tasa de secreción del mucus.

Por su parte, el CM y las BAM de los corales enfermos en la zona cercana a la enfermedad sí inhiben el crecimiento de *S. marcescens* y *Aurantimonas* sp. Richardson (1996) y Rützler et al (1983) demostraron que las bacterias que forman la banda negra son altamente activas y pueden migrar a través del tejido vivo hasta 4 cm al día (Richardson, 1998, Rützler et al, 1983). Por ello, al desafiar el CM y las BAM contra las dos cepas testigo, se podría estar generando una competencia por el nicho entre el microbioma asociado a la enfermedad de banda negra y el patógeno.

La CSM de *P. strigosa* sanos inhibe el crecimiento de *S. marcescens* y *Aurantimonas* sp. De la misma forma, Ritchie (2006) encontró que la CSM de *A. palmata* sanos inhiben el crecimiento de *S. marcescens* y otras cepas bacterianas. Dichas evidencias nos llevan a suponer que la CSM juega un papel activo dentro de la defensa química del coral como la primera barrera de protección del holobionte.

El CM y las BAM de *P. strigosa* no inhibieron el crecimiento de *S. marcescens*, pero sí el de *Aurantimonas* sp. Similar a lo encontrado por Zimmerman et al (2017) donde probaron la actividad antimicrobiana del CM de *Montipora* sp. contra 15 patógenos humanos. Como resultado, el CM de *Montipora* sp. no inhibió el crecimiento de ninguna de estas cepas. Ya que *S. marcescens* es el patógeno que presuntamente provoca la enfermedad de banda blanca, la cual enferma sólo a *A. palmata* (Patterson et al, 2001), mientras que *Aurantimonas coralllicida* presuntamente provoca la enfermedad de plaga blanca, la cual se ha encontrado en diversos corales de crecimiento masivo como *P. strigosa* y *Montipora* sp. podemos suponer que en el CM y las BAM no actúan de forma directa contra patógenos a los que no han sido expuestos o que no representan un riesgo para el organismo, sino que su protección podría ser más específica hacia sus patógenos potenciales

Finalmente, al comparar la respuesta de la CSM, el CM y las BAM, se esperaría que la zona lejana a la enfermedad presentara un comportamiento similar a los corales sanos. En vez de eso, la zona alejada de la enfermedad no presentó una tendencia clara. Lo que nos lleva a cuestionarnos ¿qué tan enfermos o vulnerables se encuentran los pólipos que visualmente son considerados aparentemente sanos? Así como si en todas las enfermedades el comportamiento salud/enfermedad del pólipo es igual o éste depende de la capacidad del patógeno de colonizar y enfermar el tejido aparentemente sano. Finalmente es necesario aclarar que para conocer si el comportamiento del tejido aparénteme sano en corales enfermos, se recomienda realizar un gradiente desde la banda de la colonia ya que la distancia de 5 cm no es un proxy adecuado.

Exaíptasia pallida

La CSM de *E. pallida* sanas y blanqueadas no inhibió el crecimiento de *S. marcescens*. Sin embargo, el CM y las BAM sí mostraron un efecto inhibitorio. Con ello podríamos resaltar la importancia de la comunidad microbiana de *E. pallida* como primera barrera de defensa, aun cuando estudios recientes han demostrado que no presenta una comunidad bacteriana núcleo. Dicha comunidad bacteriana varía entre organismos sanos y blanqueados, además de entre cepas y a lo largo de las diferentes regiones donde se localiza (Brown et al, 2017, Röthig et al, 2016). Entonces, ¿cómo pueden las bacterias desempeñar un papel tan importante dentro de la defensa de *E. pallida* contra patógenos?

Por su parte, la CSM, el CM y las BAM sí inhibieron a *Aurantimonas* sp. Siendo el CM quien presentó la mayor diferencia con respecto a la CSM y las BAM ($p= 0.06$). En conjunto, la respuesta que tuvo *E. pallida* contra *S. marcescens* y *Aurantimonas* sp. no posicionan a la CSM como una sustancia antimicrobiana que los defienda de patógenos. Sin embargo, *E. pallida* activa o apaga otras vías de la inmunidad innata cuando se enfrenta ante patógenos potenciales. Tales vías son la melanización, el priming inmunológico, y la activación del sistema complemento (Poole et al, 2016, Brown y Rodríguez-Lanetty, 2015, Zaragoza et al, 2014).

Uno de los hallazgos importantes dentro de esta investigación fue encontrar una bacteria dentro de las BAM de *E. pallida* sanas, que inhibe el crecimiento de *S. marcescens*. Al aislar esta bacteria crece con una bacteria “acompañante” o bacteria blanca con la cual, después de varias resiembras al parecer, presenta una simbiosis y que, sin ella, la bacteria roja después de varias resiembras no puede crecer (Figura 21).

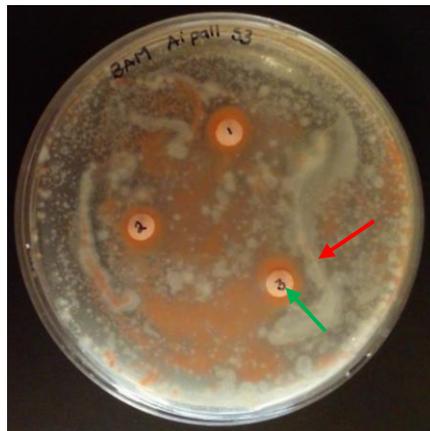


Figura 21. Bacteria roja de las BAM de *Exaíptasia pallida* sanas inhibe el crecimiento de *Serratia marcescens*. En la caja se encuentran las 3 repeticiones técnicas de la muestra 3 (de 6 muestras) de *Exaíptasia pallida*; la flecha verde señala el filtro en donde está embebido el complejo mucos (10 μ L); y la flecha roja señala el crecimiento de *Serratia marcescens*.

Cassiopea xamachana

La CSM de *C. xamachana* sanas inhibieron el crecimiento de *S. marcescens* y *Aurantimonas* sp., lo que habla de la importancia que tiene el mucus como barrera inmunológica química de estos organismos sanos. Por su parte CM y BAM no inhibieron el crecimiento de ninguna de las dos cepas testigo utilizadas. Mientras que en *C. xamachana* blanqueadas, únicamente el CM mostró inhibición de *Aurantimonas* sp. Dicha zona de inhibición es ocasionada por una bacteria amarilla en particular. Esta bacteria provoca zonas de inhibición mayores a las que se encontraron comúnmente en los ensayos de swarming realizados (Figura 22).

Los resultados anteriores resaltan la importancia de la CSM dentro de la inmunidad innata de *C. xamachana*. Además, es posible sugerir que la actividad antimicrobiana disminuye cuando *C. xamachana* no se encuentra saludable. Dicha disminución en la actividad antimicrobiana puede estar disminuida debido al cambio en la composición del mucus (Ritchie, 2006).

Finalmente, es importante resaltar que este es el primer reporte que se tiene sobre el mucus de *C. xamachana* y su función dentro del organismo como actividad antibacteriana. Así mismo, es importante mencionar que el papel que juega la CSM más similar a la que presentó *P. strigosa*, con comparado con *E. pallida*. Por esta razón, se recomienda utilizar a *C. xamachana* como organismo modelo para estudiar la actividad antimicrobiana del mucus en cnidarios.



Figura 22. Bacteria amarilla del complejo mucus de *Cassiopea xamachana* blanqueada inhibe el crecimiento de *Aurantimonas* sp. Dentro del recuadro azul se muestran las 3 repeticiones técnicas de la muestra 1 (de 6 muestras) de *Cassiopea xamachana*; la flecha verde señala el filtro en donde está embebido el complejo mucus (10 μ L); y la flecha roja señala el crecimiento de *Aurantimonas* sp.

Determinación de la respuesta inmune

En este trabajo se reporta por primera vez la presencia de colágeno (en forma de hidroxiprolina) y PO en el CM de *P. strigosa*, *E. pallida* y *C. xamachana*, sustancias involucradas en vías de la inmunidad innata de los cnidarios (Palmer et al, 2008, 2011). Sin embargo, no se encontró melanina en el CM de ninguno de los cnidarios estudiados. La causa de esto puede ser debido a que no existe melanina dentro del CM o a que la concentración de melanina presente en el CM es muy baja y el método que se realizó no es tan sensible. Otra causa puede ser que el método para cuantificar melanina en tejido de coral (Mydlarz y Palmer, 2011) no es el adecuado para medir melanina en el CM de cnidarios.

Células similares al colágeno se detectaron en el proceso de reparación de heridas en tejido de corales (Palmer et al, 2011). Así mismo, la hidroxiprolina es un aminoácido único en el colágeno, que forma parte del 30% de su composición (Hofman et al, 2011). Por lo tanto, la presencia de hidroxiprolina en el CM probablemente se deba a que el organismo está asegurándose de no perder continuidad en el tejido. Por lo tanto, el cnidario envía continuamente cierta cantidad de colágeno a la superficie del organismo como parte del proceso de reparación de heridas.

Por su parte, la PO presente en el CM de *P. strigosa*, *E. pallida* y *C. xamachana* puede ser restos de la PO que resulta del proceso de melanización dentro del tejido del cnidario (Palmer et al, 2008, 2011; Mydlarz y Palmer, 2011). Otra opción podría ser que la PO se encuentra libre en el CM y fuera de las células de forma activa. En algunos invertebrados marinos como el molusco bivalvo *Crassostrea virginica* se ha encontrado PO en la hemolinfa de forma activa. Así mismo, en la ostra *Saccostrea glomerata*, se encontró PO libre en la hemolinfa cuando el organismo estaba enfermo de QX (Smith y Söderhall, 1991; Jordan y Deaton, 2005; Butt y Raftos, 2007).

Respuesta inmune ante enfermedad de banda negra

Pseudodiploria strigosa

Los resultados obtenidos en este estudio muestran *P. strigosa* cerca de la enfermedad presenta una mayor concentración de hidroxiprolina total y también una mayor actividad de PO. Por su parte, *P. strigosa* sanos son los que presentan una menor concentración de hidroxiprolina y actividad de PO. Finalmente *P. strigosa* alejado de la enfermedad muestra valores intermedios. En ninguno de los casos hay diferencias estadísticamente significativas.

En este estudio se encontró que la concentración de hidroxiprolina total y la actividad de PO se comportan similarmente en todos los tratamientos. Dicho comportamiento es posible ya que ambas sustancias son secretadas por el mismo tipo de célula. En el caso del colágeno forma parte de las células granulares que, en respuesta a una herida, se degranulan y migran para formar coágulos (Palmer

et al, 2011). Mientras tanto, la PO forma parte del contenido bioquímico de las células granulares (Palmer et al, 2008).

Las colonias de *P. strigosa* cerca de la enfermedad presentaron una mayor actividad de PO. Por el contrario *P. strigosa* sanos presentaron la menor actividad de PO de las 3 muestras. Resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado en el tejido de *Acropora millepora* sanos y enfermos de síndromes blancos (Palmer et al, 2011). En este estudio *A. millepora* presentó una actividad de PO mayor en el borde del síndrome. Sin embargo, en contraste con nuestros resultados, los corales sanos mostraron tanta actividad de PO como en el borde del síndrome. Estas diferencias podrían deberse a las diferentes formas de crecimiento de ambos corales, por lo tanto, los recursos que tienen los invierten de forma diferente (Palmer et al, 2008). Por lo tanto, *P. strigosa* aumenta la actividad de PO cuando su salud está comprometida, como es el caso de una infección patógena. Mientras que, tanto en la zona alejada de la enfermedad, como en los corales sanos no es necesario que haya gran actividad de PO.

Debido al comportamiento mostrado por *P. strigosa* es necesario cuestionarnos ¿Qué vías inmunes se están activando dentro de los pólipos que aún no desarrollan signos de enfermedad de banda negra adyacentes a la banda negra?; por otro lado, ¿Qué tan enfermos se encuentran los pólipos que están a 15 cm de la enfermedad? o ¿Hasta qué punto podríamos considerar que el pólipo sin signos visibles de enfermedad (en un coral enfermo) se encuentra realmente “sano”? Estas preguntas van de acuerdo a lo estudiado por Weil et al (2009) y Morgan et al (2015) en donde encontraron que a 15 cm de la enfermedad los pólipos no se pueden considerar saludables ya que tienen activas vías inmunes, aun cuando visiblemente no se muestren signos de enfermedad. Por su parte, en corales sanos estas vías de inmunidad innata no se encuentran activas en el mucus (tal es el caso de la actividad de PO) o se encuentran en menor proporción que en los corales enfermos, cerca o lejos de la enfermedad (como en la producción de colágeno).

Respuesta inmune ante blanqueamiento

A pesar de que *E. pallida* y *C. xamachana* fueron sometidos a estrés por blanqueamiento, ambos tienen diferentes historias de vida y la asociación óptima con sus simbiosis varía entre ambas especies. Es por ello que, la respuesta inmune que mostraron ambos cnidarios fue diferente entre ellos. En ambos cnidarios la hidroxiprolina total fue mayor en los organismos blanqueados que en los sanos, y aunque no tuvo significancia estadística, esto podría responder en ambos casos a la necesidad de conservar la integridad del tejido que está siendo consumida por los cnidarios ante la falta de nutrientes.

Exaiptasia pallida

A pesar de que la hidroxiprolina total presenta valores menores en los organismos sanos que en los blanqueados, la actividad de PO no varía. Esto puede deberse a que la pérdida de simbiosis en *E. pallida* no representa un desafío inmunológico para el organismo. De hecho, *E. pallida* es un organismo resistente, cuya simbiosis no es obligada para su desarrollo. Debido a esta característica, *E. pallida* es un organismo modelo que puede permanecer en aposimbiosis, y que, por lo tanto, sirve para entender la simbiosis entre *Symbiodinium* y los cnidarios.

Finalmente, de acuerdo con los resultados observados en este estudio, *E. pallida* no se sugiere como organismo modelo para entender la actividad de PO en el mucus, ya que no presenta diferencias entre *E. pallida* sanas y blanqueadas. Sin embargo, otros cnidarios como *Montastraea faveolata* presentan una mayor actividad de PO cuando el coral está blanqueado (Mydlarz et al, 2009). Por su parte, *A. millepora* al blanquearse presenta una menor actividad de PO (Palmer et al, 2011). En ambos casos, a pesar de que son contrarios, la PO siempre se ve afectada, mientras que en *E. pallida* no pasa así. Por ello se recomienda que se consideren otros organismos como organismos modelo si se quiere estudiar la vía de la PO.

Cassiopea xamachana

La hidroxiprolina total en *C. xamachana* blanqueadas fue mayor que en las medusas sanas, pero estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Se han hecho algunos estudios sobre la cuantificación y caracterización de colágeno en las medusas *Chrysaora* sp., *Stomolophus meleagris* y *Rhopilema asamushi* con el fin de buscar fuentes de colágeno diferentes a las que se tienen actualmente en la industria cosmética y alimentaria (Nagai et al, 1999, 2000; Barzideh et al, 2013). Sin embargo, a pesar de que las medusas mencionadas anteriormente presentan colágeno, ninguno de estos estudios relaciona la cantidad de colágeno total con la salud del organismo. Por su parte, la actividad de PO de *C. xamachana* sanas es mucho mayor que cuando se encuentra blanqueada. Este resultado es similar al mostrado por *A. millepora* blanqueada, en cuyo caso, también muestra una actividad de PO mayor que las colonias sanas (Palmer 2011). Por lo tanto, podemos concluir que cuando *C. xamachana* pierde *Symbiodinium*, esto desencadena efectos adversos en la fisiología y desarrollo del organismo, comprometiendo su supervivencia.

Análisis bioquímico básico

El objetivo de realizar un análisis bioquímico básico de la composición del CM fue para determinar si al cambiar la salud del hospedero, este cambio podría verse reflejado en la composición del CM. Y ya que el mucus es la primera barrera física con la que los patógenos se encuentran antes de alcanzar al tejido (Rohwer et al, 2002), entonces los cambios en la composición bioquímica del CM pueden resultar en un cambio en el microbioma (Brown y Bythell, 2005). Con nuestros resultados podemos concluir que existen diferencias en el CM de los 3 cnidarios sanos, enfermos y blanqueados. Así mismo, estos cambios se dan en diferentes proporciones de acuerdo con cada especie.

Pseudodiploria strigosa

El aumento en la concentración de proteína en el CM de *P. strigosa* enfermos, lejos de la enfermedad puede relacionarse con un aumento en el número de amebocitos granulares eosinofílicos que migran hacia la herida provocada por los patógenos de la enfermedad de banda negra. Una respuesta similar se encontró en *A. millepora* varias horas después de exponerse a un daño físico (Palmer et al, 2011). Por su parte, el CM de *P. strigosa* sanos presenta una mayor cantidad de lípidos totales que de los enfermos. En relación con nuestros resultados, Thurber et al (2009) registraron un aumento en la utilización de lípidos en tejido en respuesta a un cambio en el microbioma. Finalmente, el CM de *P. strigosa* sanos y enfermos, lejos de la enfermedad, tuvieron una cantidad similar de carbohidratos. Mientras que cerca de la enfermedad la cantidad de carbohidratos fue mayor, presentado diferencias estadísticamente significativas. Aunque no se han realizado estudios al respecto, este aumento en la cantidad de tejidos del CM de *P. strigosa* cerca de la enfermedad podría estar relacionado con los patógenos que ocasionan la banda negra o como una respuesta del sistema inmune del coral.

Exaiptasia pallida

El CM de *E. pallida* blanqueados presentaron una menor cantidad de proteínas totales con respecto a los sanos. Dicho comportamiento puede estar relacionado con la cantidad de colágeno total registrado en este estudio (Palmer et al, 2011). La cantidad de proteína total en el CM de *E. pallida* es inversamente proporcional a la cantidad de colágeno total registrado en *E. pallida*. Por su parte, no se registraron diferencias en la cantidad de lípidos totales presentados en el CM de *E. pallida* sanas y blanqueadas. Sin embargo, al realizar un perfil metabólico en *Aiptasia* sp. y *Symbiodinium minutum*, Hillyer et al (2016) reportaron una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados. Esta disminución significa que hay modificaciones en la lipogénesis y lisis de la membrana estructural y la asimilación de nitrógeno. La falta de diferencias entre *E. pallida* sanas y blanqueadas podría ser debido a que *E. pallida* puede vivir sin *Symbiodinium*, y esto no representa que se esté comprometiendo su salud. Así mismo, es importante considerar que al hacer las pruebas bioquímicas *E. pallida* sólo pasó una semana sin *Symbiodinium*, por lo

tanto, las reservas energéticas del organismo podían no haber estado comprometidas aún.

Finalmente, el CM de *E. pallida* blanqueada, presenta menos carbohidratos totales que *E. pallida* sanas, similar a lo reportado en *Anthopleura elegantissima* blanqueada bajo condiciones de laboratorio (Zamer y Malcom, 1989). En este estudio la pérdida de simbiontes bajo condiciones de laboratorio estuvo relacionado con la pérdida de carbohidratos. Esto puede ser debido a que los carbohidratos fueron movilizados para apoyar a diversas demandas metabólicas.

Cassiopea xamachana

Al igual que en el CM de *E. pallida*, *C. xamachana* blanqueadas presentaron menos proteínas totales que las sanas. Esto puede estar respondiendo a la relación inversa que existe entre el colágeno y las proteínas en ambos organismos (Palmer et al, 2011). Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias en la cantidad de carbohidratos totales en *C. xamachana* sanos y blanqueados, a pesar de que los organismos blanqueados presentaron una mayor dispersión de los datos. Esto podría deberse a que el tiempo que *C. xamachana* permaneció blanqueada dentro del estanque de Xcaret varió entre cada organismo. Por lo tanto, es probable que las medusas que estuvieron blanqueadas durante más tiempo son las que presentan una menor cantidad de carbohidratos totales, mientras que aquellas que recién alcanzaron su estado de blanqueamiento, no presentan aún un cambio en la cantidad de carbohidratos totales.

Finalmente, de acuerdo con Patton et al (1977) *Pocillopora capitata* presenta una mayor síntesis de lípidos al ser estimulada con luz, mientras que en presencia de *Symbiodinium* se estimula la lipogénesis. Similar a los resultados que encontramos en *C. xamachana*, ya que las blanqueadas tuvieron también una menor cantidad de lípidos totales. Esto también podría explicarse ya que sin *Symbiodinium*, *C. xamachana* pierde rápidamente tejido (McGill y Pom, 2008).

CONCLUSIONES

- La CSM presentó actividad antimicrobiana en *P. strigosa*, *C. xamachana* y *E. pallida*.
- Las BAM juegan un papel importante y complementario en la defensa de los cnidarios simbióticos.
- La actividad antimicrobiana del mucus de cnidarios sanos fue especie específica contra *S. marcescens* en *P. strigosa* y contra *Aurantimonas* sp. En *C. xamachana* la actividad fue similar para ambas cepas.
- La CSM de *P. strigosa* enfermos cerca de la enfermedad mostró poca actividad antimicrobiana, pero mostró también valores altos de hidroxiprolina y la actividad de PO. Esto sugiere que la actividad inmune de la CSM es insuficiente para defender efectivamente al coral contra el consorcio microbiano de banda negra.
- Las BAM de *E. pallida* sanas y el CM de *C. xamachana* blanqueadas presentaron dos bacterias responsables de inhibir el crecimiento de *S. marcescens* y *Aurantimonas* sp. respectivamente
- Los valores de hidroxiprolina y PO en el CM de *P. strigosa*, *E. pallida* y *C. xamachana*, son mayores en los organismos sanos.
- El análisis bioquímico básico mostró diferencias entre los organismos sanos y enfermos, más no se encontró ninguna tendencia entre ellos.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, AH Litchman y S Pillai, 2008. Inmunología celular y molecular, Elsevier, EU. p 19-46.

Alcantara Santana W, C Moura De Melo, J Cordero Cardoso, RN Pereira-Filho, A Silva Rabelo, F Prado Reis y RL Cavalcanti de Albuquerque-Junior. Assessment of antimicrobial activity and healing potential of mucous secretion of *Achatina fulica*. International Journal of Morphology, 30 (2): 365-373.

Ainsworth TD, O Hoegh-Guldberg, SF Heron, WJ Skirving y W Leggat, 2008. Early cellular changes are indicators of pre-bleaching thermal stress in the coral host. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 364: 63-71. DOI: 10.1016/j.jembe.2008.06.032

Ainsworth TD, K Wasmund, L Ukani, F Seneca, D Yellowlees, D Miller y W Leggat, 2011. Defining the tipping point. A complex cellular life/death balance in corals in response to stress. Scientific Reports, 1: 60. DOI: 10.1038/srep00160.

Antonius A, 1977. Coral mortality in reefs: a problem for science and management. Proceedings of the 3rd International Coral Reef Symposium, 2:617-623.

Antonius A, 1981. The "Band" diseases in coral reefs. Proceedings of the 4th International Coral Reef Symposium, 18:7-14.

Austin B y D McIntosh, 1988. Natural antibacterial compounds on the Surface of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Diseases, 11: 275-277. DOI: 10.1111/j.1365-2761.1988.tb00550.x

Bansil R y BS Turner, 2006. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. Science 11:164-170. DOI: 10.1016/j.cocis.2005.11.001

Barzideh Z, AA Latiff, CY Gan, S Benjakul y AA Karim, 2013. Isolation and characterization of collagen from the ribbon jellyfish (*Chrysaora* sp.). International Journal of Food Science and Technology. DOI: 10.1111/ijfs.12464.

Bikerland C, 2015. Coral reefs in the Anthropocene. En: C Bikerland (eds.). Coral reefs in the Anthropocene, Springer, EU. p 1-15.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72:248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brazean DA y HR Lasker, 1990. Sexual reproduction and external brooding by the Caribbean gorgonian *Briareum asbestinum*. Marine Biology, 104: 465-474.

Brown BE y JC Bythell, 2005. Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Marine Ecology*, 296:291-309. DOI: 10.3354/meps296291

Brown BE y LS Howard, 1985. Assessing the effects of "stress" on reef corals. *Advances in Marine Biology*, 22: 1-63. DOI: 10.1016/S0065-2881(08)60049-8

Brown T, C Otero, A Grajales, E Rodriguez y M Rodriguez-Lanetty, 2017. Worldwide exploration of the microbiome harbored by the cnidarian model. *Exaiptasia pallida* (Agassiz in Verrill, 1864) indicates a lack of bacterial association specificity at a lower taxonomic rank. *PeerJ*, 5: e3235. DOI: 10.7717/peerj.3235

Brown T y M Rodriguez-Lanetty, 2015. Defending against pathogens-immunological priming and its molecular basis in a sea anemone, cnidarian. *Scientific Reports*, 5: 17425. DOI: 10.1038/srep17425

Bruno JF, ER Selig, KS Casey, CA Page, BL Willis, CD Harvell, H Sweatman y AM Melendy, 2007. Thermal stress and coral corev as drivers of coral disease outbreaks. *Plos one*. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050124

Butt D y D Raftos, 2007. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 299-306. DOI: 10.1016/j.dci.2007.06.006

Bythell JC y C Wild, 2011. Biology and ecology of coral mucus release. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 408:88-93. DOI: 10.1016/j.jembe.2011.07.028

Caldwell JM, B Ushijima, CS Couch y R Gates, 2017. Intra-colony disease progression induces fragmentation of coral fluorescent pigments. *Scientific reports*, 7:14596. DOI: 10.1038/s41598-017-15084-3

Camargo GM, JC de Albuquerque M, CD Pérez, T Fontes O, R da Silva F, F Pereira B, M Vilela de Brito, IH Mendes PC y ML Vilela Oliva, 2018. Zoanthid mucus as new source of useful biologically active proteins. *Toxicon*, 143, 96-107. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.01.012

Carricart-Ganivet JP, AU Beltrán-Torres y G Horta-Puga, 2011. Distribution and prevalence of coral diseases in Veracruz Reef System, Southern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 95:181-187. DOI: 10.3354/dao02359

Cerenius L y K Söderhall, 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198:116-126. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x

Clode PL y Marshall AT, 2002. Low temperature X-ray microanalysis of calcium in a scleractinian coral: evidence of active transport mechanisms. *Journal of Experimental Biology*, 205:3543-3552.

Cole MA, P Dewan y T Ganz, 1999. Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infection and Immunity*, 67(7):3267-3275.

Crossland CJ, 1987. In situ release of mucus and DOC-lipid from the corals *Acropora varianilis* and *Stylophora pistillata* in different light regimes. *Coral Reefs*, 6:35-42.

Davies PS, 1984. The role of zooxanthellae in the nutritional energy requirements of *Pocillopora eydouxi*. *Coral Reefs* 2:181-186.

Deacon EL, 1979. The role of coral mucus in reducing the wind drag over coral reefs. *Boundary-Layer Meteorology*, 17:517-521.

Denner EBM, GW Smith, HJ Busse, P Schumann, T Narzt, SW Polson, W Lubitz y L Richardson, 2003. *Aurantimonas coralicida* gen. nov., sp. nov., the causative agent of white plague type II on Caribbean scleractinian corals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53:1115-1122. DOI: 10.1099/ijs.0.02359-0

Drollet JH, Glasiou, PMV Martin, 1993. A study of mucus from the solitary coral *Fungia fungites* (Scleractinia: Fungiidae) in relation to photobiological UV adaptation. *Marine Biology*, 11:263-266.

Dubois M, KA Gilles, JK Hamilton, PA Rebers y F Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:350-356. DOI: 10.1021/ac60111a017

Duerden JE, 1906. The role of mucus in corals. *The Quarterly Journal of Microscopical Science*. 49:591:614.

Ducklow HW y R Mitchell, 1979. Bacterial populations and adaptations in the mucus layers on living corals. *Limnology and Oceanography*, 24 (4):715-725. DOI: 10.4319/lo.1979.24.4.0715

Ducklow HW y R Mitchell, 1979a. Composition of mucus released by coelenterates. *Limnology and Oceanography*, 24:706-714. DOI: 10.4319/lo.1979.24.4.0706

Estes AM, SC Kempf y RP Henry, 2003. Localization and quantification of carbonic anhydrase activity in the symbiotic Scyphozoan *Cassiopea xamachana*. *Biology Bulletin*, 204: 278-289. DOI: 10.2307/1543599

Ferrario F, MW Beck, CD Storlazzi, F Micheli, CC Shepard y L Airoidi, 2014. The effectiveness of coral reefs for coastal hazard risk reduction and adaptation. *Nature Communications*, 3794: 1-9. DOI: 10.1038/ncomms4794

Fleming A, 1922. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London*, 93:306-318. DOI: 10.1098/rspb.1922.0023

Galloway SB, TM Work, VS Bochsler, RA HARLEY, e Kramarsky-Winters, SM McLaughlin, CU Meteyer, JF Morado, JH Nicholson, PG Parnell, EC Peters, TL Reynolds, DS Rotstein, L Sileo y CM Woodley, 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, 84p.

Geffen Y y E Rosenberg, 2005. Stress-induced rapid release of antibacterial by scleractinian corals. *Marine Biology*, 146:931-935.

Gil-Agudelo DL, R Navas-Camacho, A Rodríguez-Ramírez, M Reyes-Nivia, S Bejarano, J Garzón-Ferreira y G Smith, 2009. Enfermedades coralinas y su investigación en los arrecifes colombianos. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 38:189-224.

Glasl B, GJ Herndl y PR Frade, 2016. The microbiome of coral surface mucus has a key role in mediating holobiont health and survival upon disturbance. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 1-13.

Goreau TF, 1956. A study of the biology and histochemistry of corals (Tesis de Doctorado). Yale University, EU.

Gutierrez-Rodriguez C y HR Lasker, 2004. Microsatellite variation reveals high levels of genetic variability and population structure in the gorgonian coral *Pseudopterogorgia elisabethae* across the Bahamas. *Molecular Ecology*, 13: 2211-2221. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2004.02247.x.

Harvell CD, 2008. Coral disease, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. *Oceanography*, 20: 172-195.

Hejazi A y FR Falkner, 1997. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*, 46:903-912. DOI: 10.1099/00222615-46-11-903

Hillyer KE, S Tumanov, S Villas-Böas, SK Davy, 2016. Metabolite profiling of symbiont and host during thermal stress and bleaching in a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 219: 516-527. DOI:10.1242/jeb.128660.

Hoegh-Guldberg, 1999. Climate change, coral bleaching and the future of the worlds coral reefs. *Marine and Freshwater Research*, 50: 839-866.

Hoegh-Guldberg O, PJ Mumby, AJ Hooten, RS Steneck, 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, 318: 1737-1742. DOI: 10.1126/science.1152509

Hofman K, B Hall, H Cleaver y S Marshall, 2011. High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen. *Analytical Biochemistry*, 417:289-291. DOI: 10.1016/j.ab.2011.06.019

Iguchi AMM, T Aikawa y JJ Matsumoto, 1982. Antibacterial activity of snail mucus mucin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 72A (3): 571-574.H.

Jatkar AA, BE Brown, JC Bythel, R Guppy, NJ Morris y JP Pearson, 2010. Coral mucus: The properties of its constituent mucins. *Biomacromolecules*, 11:883-888. DOI: 10.1021/bm9012106

Jatkar AA, BE Brown, JC Bythell, R Guppy, NJ Morris y JP Pearson, 2010a. Measuring mucus thickness in reef corals using a technique devised for vertebrate applications. *Marine Biology*, 157:261-267.

Jordán-Dahlgren E y RE Rodríguez-Martínez, 2007. Coral diseases in Gulf of Mexico Reefs. En: JW Tunell, EA Chavez y K Withers (eds.). *Coral reefs of the southern Gulf of Mexico*, Texas A & M University Press, EU. p 105-118.

Jordan PJ y LW Deaton, 2005. Characterization of phenoloxidase from *Cassostrea virginica* hemocytes and the effect of *Perkinsus marinus* on phenoloxidase activity in the hemolymph of *Cassostrea virginica* and *Geukensia demissa*. *Journal of Shellfish Research*, 24 (2): 477-482. DOI: 10.2983/0730-8000(2005)24[477:COPFCV]2.0.CO;2

Kellog C, 2004. Tropical archaea: diversity associated with the surface microlayer of corals. *Marine Ecology Progress Series*, 273: 81-88.

Kelman D, A Kushmaro, Y Loya, Y Benayahu, 1998. Antimicrobial activity of a Red Sea soft coral *Parerythropodium fulvum fulvum*: reproductive and developmental considerations. *Marine Ecology Progress Series*, 169:87-95.

Koh EGL, 1997. Do scleractinian corals engage in chemical warfare against microbes? *Journal of Chemical Ecology*, 23:379-398.

Krediet CJ, KB Ritchie, M Cohen, EK Lipp, K Patterson S y M Teplitski, 2009. Utilization of mucus from the coral *Acropora palmata* by the pathogen *Serratia marcescens* and by environmental and coral commensal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:3851-3858.

Krediet CJ, KB Ritchie y M Teplitski, 2009a. Catabolite regulation of enzymatic activities in a white pox pathogen and commensal bacteria during growth on mucus polymers from the coral *Acropora palmata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87: 57-66.

Krediet CJ, EM Carpinone, KB Ritchie y M Teplitski, 2013. Characterization of the gacA-dependent surface and coral mucus colonization by an opportunistic coral pathogen *Serratia marcescens* PDL100. *Microbial Ecology*, 84: 290-301.

Kruskal WH y WA Wallis, 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260):583-621.

Lemeshko BY y EP Mirkin, 2004. Bartlett and Cochran test in measurements with probability laws different from normal. *Measurement Techniques*, 4: 960-968

Loya Y y B Rinkevich, 1980. Effects of oil pollution on coral reef communities. *Marine Ecology*, 3: 167-180.

Marris M, 2005. Tsunami damage was enhanced by coral theft. *Nature*, 436: 1071.

McGill CJ y CM Pomory, 2008. Effects of bleaching and nutrient supplementation on wet weight in the jellyfish *Cassiopea xamachana* (Bigelow) (Cnidaria: Scyphozoa). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 1 (3): 179:189.

Meyer J, SP Gunasekera, RM Scott, VJ Paul y M Teplitski, 2016. Microbiome shifts and the inhibition of quorum sensing by black band disease cyanobacteria. *The ISME Journal*, 10: 1204-1216.

Mishra SK, WI Suh, W Farooq, M Moon, A Shrivastav, MS Park y JW Yang, 2014. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 155:330-333.

Mohd RN y Yap BW, 2011. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling test. *Journal of Statistical Modelling and Analytics*, 2:21-33.

Morgan M, K Goodner, J Ross, AZ Poole, E Stepp, CH Stuart, C Wilbanks y E Weil, 2015. Development and application of molecular biomarkers for characterizing Caribbean Yellow Band Disease in *Orbicella faveolata*. *PeerJ*, 3:E1371.

Muscatine L, D Grossman y J Doino, 1991. Release of symbiotic algae by tropical sea anemones and corals after cold shock. *Marine Ecology Progress Series*, 77: 233-43.

Muscatine LS y Hand C, 1958. Direct evidence for the transfer of materials from symbiotic algae to the tissues of a coelenterate. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 44: 1259-1263.

Mydlarz LD, CS Couch, E Weil, G Smith y CD Harvell, 2009. Immune defenses of healthy, bleached and diseased *Montrastraea faveolata* during a natural bleaching event. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87: 67-78.

Mydlarz LD y CV Palmer, 2011. The presence of multiple phenoloxidases in Caribbean reef-building corals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. doi:10.1016/j.cbpa.2011.03.029.

Nagai T, W Worawattanamateekul, N Suzuki, T Nakamura, T Ito, K Fujiki, M Nakao y T Yano, 2000. Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*). Food Chemistry, 70: 205-208.

Nagai T, T Ogawa, T Nakamura, T Ito, H Nakagawa, K Fujiki, M Nakao y T Yano, 1999. Collagen of edible jellyfish exumbrella. Journal of Science of Food and Agriculture, 79: 855-858.

Ohdera AH, MJ Abrams, CL Ames, DM Baker, LP Suescún-Bolivar, AG Collins, CJ Freeman, E Gamero-Mora, TL Goulet, DK Hofman, A Jaimes-Becerra, PF Long, AC Marques, LA Miller, LD Mydlarz, AC Morandini, CR Newkirk, SP Putri, JE Samson, SN Stampar, B steinworth, M Templeman, PE Thomé, M Vlok, CM Woodley, JCY Wong, MQ Martindale, WK Fitt y M Medina, 2018. Upside-down but headed in the right direction: Review of the highly versatile *Cassiopea xamachana* system. Frontiers in Ecology and Evolution, 6: 35. DOI: 10.3389/fevo.2018.00035.

Palmer CV, LD Mydlarz y BL Willis, 2008. Evidence of an inflammatory-like response in non- normally pigmented tissues of tow scleractinian corals. Proceedings of the Royal Society, 275:2687-2693.

Palmer CV, NG Traylor-Knowles, BL Willis y JC Bythell, 2011. Coral use similar immune cells and wound-healing processes as those of higher organisms. Plos One, 6(8):e23992.

Palmer CV y N Traylor- Knowles, 2012. Towards an integrated network of coral immune mechanisms. Proceedings of Royal Society, 279:4106-4114.

Pantos O y JC Bythell, 2010. A novel reef coral symbiosis. Coral Reefs, 29:761-770.

Patterson KL, JW Prter, KB Ritchie, SW Polson, E Mueller, EC Peters, DL Santavy y GW Smith (2001). The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99:8725-8730.

Patterson SK, JW Porter, JW Truner, BJ Thomas, EE Looney, TP Luna, MK Meyers, JC Futch y EK Lipp, 2010. Human sewage identified as likely source of white pox disease of th threatened Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. Environmental microbiology, 15 (5): 1122-1131.

Patton JS, S Abraham y AA Benson, 1977. Lipogenesis in the intact coral *Pocillopora capitata* and its isolated zooxanthellae: evidence for a light-driven carbon cycle between symbiont and host. Marine biology, 44: 235-247.

Peters E, 1984. A survey of the normal and pathological histology of scleractinian corals with emphasis on the effects of sedimentation stress (Tesis de Doctorado). Universidad de Rhode Island, Nueva Inglaterra, EU.

Pitt SJ, MA Graham, CG Dedi, PM Taylor-Harris y A Gunn, 2015. Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail *Helix aspersa*. *British Journal of Biomedical Sciences*, 72 (4): 174-181.

Poole AZ, SA Kitchen y VM Weis, 2016. The role of complement in cnidarian-dinoflagellate symbiosis and immune challenge in the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Frontiers in Microbiology*, 7:519. DOI: 0.3389/fmicb.2016.00519.

Raymundo L y Harvell CD, 2008. The objectives and scope of this manual. En: Raymundo LJ, CS Couch y CD Harvell (eds.). *Coral disease handbook*. Currie Communications, Melbourne. p 7-16.

Razali NM y YB Wah, 2011. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2: 21-33.

Reshef L, O Koren, Y Loya, I Zilber-Rosenberg y E Rosenberg, 2006. The coral probiotic hypothesis. *Environmental Microbiology*, 8: 2068-2073. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01148.x.

Richardson L, 1998. Coral diseases: What is really known? *Trends Ecology and Evolution*, 13:438-443.

Richardson L, WM Goldberg, KG Kuta, RB Aronson, GW Smith y KB Ritchie, 1998a. Florida's mystery coral-killer identified. *Nature* 392:557-558.

Ritchie KB, 2006. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 322:1-14.

Rogers, 2004. The biology, ecology and vulnerability of deep-water coral reefs. IUCN Report, 13 pp.

Rohwer f, V Seguritan, F Azam y N Knowlton, 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine Ecology*, 243:1-10.

Röthig T, RM Costa, F Simona, S Baumgarten, AF Torres, A Radhakrishnan, M Aranda y C Voolstra, 2016. Distinct bacterial communities associated with the coral model *Aiptasia* in aposymbiotic and symbiotic states with *Symbiodinium*. *Frontiers in Marine Science*, 3: 234. DOI: 10.3389/fmars.2016.00234

Rubble PA, HR Lasker, M Gottfried y MR Roman, 1980. Production and bacterial colonization of mucus from the soft coral *Briarum asbestinum*. *Bulletin of Marine Sciences*, 30:888-893.

Rützler K, DL Santavy y A Antonius, 1983. The blank band disease of Atlantic Reef Corals. *Marine Ecology*, 4: 329-358. DOI: 10.1111/j.1439-0485.1983.tb00118.x.

Scheufen T, WE Krämer, R Iglesias-Prieto y S Enríquez, 2017. Seasonal variation modulates coral sensibility to heat-stress and explains annual changes in coral productivity. *Scientific reports*, 7: 4937.

Schuhmacher H y H Zibrowius, 1985. What is hermatypic. *Coral Reefs*, 4:1-9.

Shnit-Orland M y A Kushmaro, 2008. Coral mucus bacteria as a source for antibacterial activity. *Proceedings of the 11th Coral Reef Symposium, Florida*, 257-259.

Smith VJ y K Söderhall, 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Developmental and Comparative Immunology*, 15: 251-161.

Subramanian S, NW Ross y SL MacKinnon, 2008. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 150:85-92.

Sutherland KP, JW Porter y C Torres, 2004. Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellae corals. *Marine Ecology Progress Series*, 266:273-302.

Sweet M y J Bythell, 2012. Ciliate and bacterial communities associated with white syndrome and brown band disease in reef building corals. *Environmental microbiology*, 14: 2184-2199.

Thurber RV, D Willner-Hall, B Rodriguez-Mueller, C Desnues, RA Edwards, F Angly, E Dinsdale, L Kelly y F Rohwer, 2009. Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environmental Microbiology*, 11: 2148-2163.

Tremblay P, Grover R, Maguer JF, Legendre L, Ferrier-Pagès C (2012) Autotrophic carbon budget in coral tissue: a new ¹³C-based model of photosynthate translocation. *J Exp Biol* 215:1384–1393. doi:10.1242/jeb.065201.

Tunell JW, 2007. Introduction. En: JW Tunell, EA Chavez y K Withers (eds.). *Coral reefs of the southern Gulf of Mexico*, Texas A & M University Press, EU. p 1-36.

Verdugo P, 1990. Goblet cells secretion and mucogenesis. *Annual Review of Physiology*, 52:157-176.

Weil E, G Smith y DL Gil-Agudelo, 2004. Status and progress in coral reef disease research. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69:1-7.

Weil E y AJ Hooten, 2008. Underwater cards for assessing coral health on Caribbean reefs. *Targeted Research & Capacity Building for Management*. pp 28.

Weil E, A Cróquer e I Urreiztieta, 2009. Yellow band disease compromises the reproductive output of the Caribbean reef-building coral *Montastraea faveolata* (Anthozoa, Scleractinia). *Diseases of Aquatic Organisms*, 87:45-55.

Weis VM, SK Davy, O Hoegh-Guldberg, M Rodriguez-Lanetty y JR Pringle, 2008. Cell biology in model systems as the key to understanding corals. *Trends in Ecology and Evolution*, 23:369-376.

Wilkinson C, 2004. Status of coral reefs of the world: 2004, Global Coral Reef Monitoring Network and Rainforest Research Centre, Townsville, Australia. 296 pp.

Wilcoxon F, 1945. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin*, 1:80-83.

Zamer WE y J Malcom S, 1989. Physiological energetics of the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Oecología*, 79: 117-127.

Zaragoza WJ, CJ Krediet, JL Meyer, G Canas, KB Ritchie y M Teplitski, 2014. Outcomes of infections of sea anemone *Aiptasia pallida* with *Vibrio* spp. Pathogenic to corals. *Microbial Ecology*, 68: 388-396. DOI: 10.1007/s00248-014-0397-2.

Zimmerman JA, CJ Cox y E Freundt, 2017. Microbial properties of *Montipora* coral mucus. *Acta Spartae*, 3 (1): 18-21.