



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Biología

Informe de conclusión de Servicio Social

Proyecto de investigación:

**Actividad de la fenoxidasas en moco y tejido de coral
en la especie: *Montastraea cavernosa***

Alumna: Galilea Daniela Ordoñez Ruiz

Matrícula: 2183029872

Asesor interno: Dr. Jaime Matus Parada

Asesora externa: Dra. Patricia Elena Thomé Ortíz



Instituto de Ciencias
del Mar y Limnología

1. Introducción

En los últimos años ha existido un descenso en la cantidad de arrecifes coralinos en el mundo a consecuencia del aumento de la temperatura, la acidificación de los océanos, sobrepesca, desarrollo costero insostenible y la contaminación marina que va aumentando con más frecuencia (GCRMN, 2020). Aunque los arrecifes de coral cubren solo el 0.2% del fondo del océano albergan al menos una cuarta parte de las especies marinas; si éste llegara a perderse también afectaría a todas las especies que tienen relación con él (GCRMN, 2020).

Se ha reportado el aumento de enfermedades en corales escleractinios (Gil-Agudelo, *et al.*, 2009). Las enfermedades coralinas son aquellas que afectan o alteran las funciones vitales de un coral llevándolos a un estado de vulnerabilidad (Forero-Mejía, 2012). Para que los corales adquieran alguna enfermedad es necesario que sucedan tres factores: la existencia de un patógeno que sea el agente causal de la enfermedad; un organismo (hospedero) susceptible que puede ser afectado por ése patógeno y un ambiente que favorezca la propagación del patógeno en el hospedero. (Rodríguez, *et al.*, 2013).

Además de las enfermedades, durante este año se vio un aumento considerable en la temperatura de los océanos, lo que provocó el blanqueamiento masivo de corales. Según la NOAA (2023), durante el mes de junio se registraron en el Golfo de México y el Caribe temperaturas que oscilan entre uno y tres grados Celsius por encima de la normal. El blanqueamiento de los corales se produce en respuesta al estrés ambiental y altera la relación simbiótica establecida entre los corales y las zooxantelas. Estas microalgas tienen una simbiosis con el coral, en dónde le proporcionan energía necesaria para sobrevivir, bajo estrés, el coral expulsa las zooxantelas y se blanquea debido al color de su esqueleto calcáreo (Douglas, 2003; Weis, 2008; Miranda 2010).

Los cnidarios, filo al que pertenecen los corales, tienen inmunidad innata, la cual representa la primera línea de defensa (Reed *et al.*, 2010), la inmunidad innata se da por: 1) reconocimiento inmunológico, 2) señalización intracelular, y 3) respuesta efectora (Mydlarz *et al.*, 2016). Este tipo de inmunidad les permite generar respuestas ante infecciones, además de proveerles de mecanismos para identificar patógenos específicos, ayudándoles a mantener la integridad de tejidos y la prevención de infecciones (Reed *et al.*, 2010, Palmer *et al.*, 2011).

Las respuestas inmunitarias de los corales escleractinios, así como de otros invertebrados, involucran la actividad de la enzima fenoloxidasa (PO). Esta enzima se activa ante agentes patógenos dañinos, y al momento de activarse produce grupos indol que posteriormente se polimerizan en melanina (Cerenio & Söderhäll, 2011). La melanina es un pigmento redox activo presente en el tejido del coral, el cual produce subproductos citotóxicos, capaces de matar a los microorganismos invasores, además de encapsularlos por medio de “coágulos” (Palmer, *et al.*, 2011). La melanina también tiene efectos ante las enfermedades como el blanqueamiento, ya que tiene propiedades de absorción de luz, lo que permite que los corales

puedan regular el sombreado de los simbioses fotosintéticos mediante la reorganización de células melanizadas (Palmer *et al.*, 2011).

La actividad de la fenoloxidasa (PO) se puede usar como una métrica de inmunocompetencia, en donde se observan correlaciones positivas entre la actividad de PO y la resistencia a enfermedades en muchos sistemas de invertebrados (Mydlarz, *et al.*, 2011). Sin embargo, la técnica que se usa para obtener PO en tejido es una técnica muy invasiva, que si bien es más rápida y menos costosa, es de gran impacto para las colonias de coral, que crecen aproximadamente de 2 a 5 mm por año (Robles-Payán *et al.*, 2021). En el moco del coral también podemos encontrar PO y es la manera menos agresiva para investigar el sistema inmune (Rivera-Ortega & Thomé, 2018). Sin embargo, no se conoce si la actividad de fenoloxidasa se expresa de manera similar en moco y en tejido o si existe alguna variación entre ellas.

El objetivo de este estudio fue determinar si existe una relación entre la actividad de PO presente en moco y tejido de corales escleractinios para el estudio del sistema inmune. En caso de que exista una relación positiva, esto ayudaría a la conservación de los arrecifes de coral al permitir un monitoreo con un impacto mínimo en el crecimiento de estos organismos.

La investigación para liberar el Servicio Social se realizó entre el 13 de febrero y 18 de agosto del año 2023, cumpliendo 6 meses de estancia. Todos los experimentos y muestreos se realizaron en el laboratorio de Microbiología Molecular en la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA), Puerto Morelos, Quintana Roo, perteneciente al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

2. Planteamiento del problema y justificación

Los arrecifes de coral son uno de los ecosistemas más productivos y con mayor diversidad biológica del planeta, ya que son hábitat para más del 25% de especies marinas (Robles-Payán *et al.*, 2021), por esto, es de gran interés el estudio del sistema inmune de los corales y los mecanismos de defensa que han desarrollado para su sobrevivencia. Uno de estos mecanismos de defensa que poseen es el sistema inmune innato como barrera principal ante patógenos, el cual puede activar la vía de la fenoloxidasa (PO).

Esta vía es de gran importancia para contrarrestar las enfermedades que atacan al sistema inmune de los corales. Sin embargo, el muestreo más común es muy agresivo con las colonias, ya que se tiene que trocear o perforar la estructura coralina para sacar un núcleo de tejido vivo de aproximadamente 3 cm y posteriormente extraer la enzima del tejido (Palmer *et al.*, 2011). Si bien, es un método rápido, eficaz y de bajo costo (por el equipo de buceo autónomo y material en campo), es costoso para el planeta, vulnerando a los corales de los que se obtienen las muestras, los que tardan años en llegar a un tamaño considerable (Robles-Payán *et al.*, 2021).

Otro método conocido es obtener la enzima del moco que produce el coral como mecanismo de protección; esta es una técnica que se lleva a cabo *in situ*, sin dañar tejido o estructura coralina (Rivera-Ortega & Thomé, 2018); además de ser un método más nuevo es mucho menos invasivo. La importancia de este trabajo es identificar si la actividad enzimática que se produce en las dos estructuras (moco y tejido) es comparable, o existe alguna variación entre ellas. Esta alternativa representaría una herramienta que permite conservar a los corales arrecifales, evitando la fragmentación de estructuras coralinas para el estudio de la actividad inmune de estos organismos.

3. Hipótesis

Ya que existe presencia de PO en moco y en tejido y ambas actúan ante agentes patógenos dañinos, entonces, esta vía actúa de manera similar en moco y en tejido permitiendo el estudio del sistema inmune en los corales escleractinios.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Determinar la actividad de fenoloxidasa en tejido y moco del coral escleractinio *Montastraea cavernosa* aparentemente sano.

4.2 Objetivos específicos

- Analizar la relación entre la actividad de fenoloxidasa en tejido y moco.
- Comparar los resultados entre corales sanos y blanqueados.
- Determinar la efectividad del muestreo de mucus como proxy inmunológico para impulsar el desuso de la extracción de tejido.

5. Métodos

5.1 Muestras de coral

Se llevó a cabo un muestreo subacuático con equipo de buceo SCUBA. Se recolectaron con un sacabocados 7 fragmentos de 3 cm de diámetro de *M. cavernosa* sanos y 2 fragmentos blanqueados, en el sitio de la Bocana (20° 52' 26.41" N, 86° 51' 4.80" W) localizado en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, México (Figura 1a). Las muestras se colectaron en profundidades de entre los 3 a 5 metros, durante el mes de junio 2023. Los fragmentos se transportaron al laboratorio dentro de frascos individuales etiquetados, en un contenedor con agua de mar a temperatura ambiente (Figura 1b).

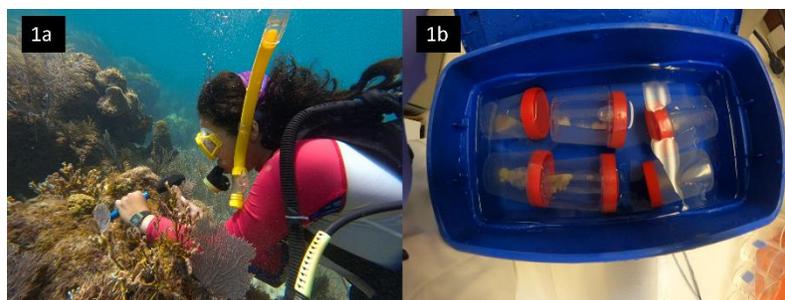


Figura 1. a) Recolección de muestras en campo con sacabocados. b) Transporte de muestras al laboratorio en agua a temperatura ambiente.

5.2 Extracción de moco y tejido

En el laboratorio se extrajo el moco de cada muestra con ayuda de una pipeta de transferencia y se reservaron por separado en tubos Eppendorff etiquetados (Figura 2a). Posteriormente se extrajo el tejido sobre un vaso de precipitados utilizando un AirBrush y 1mL de Buffer de fosfato con 0.05M de ditiotreitol y pH de 7.5 (Figura 2b). El tejido extraído se raspó de las paredes del vaso y cada muestra se colocó en tubos Eppendorf etiquetados. Posteriormente se homogeneizaron durante 30 segundos (Figura 3b); todas las muestras se mantuvieron en hielo por 5 minutos.

Las muestras de moco y tejido se centrifugaron por 10 min a 14,000 rpm y 16,800, respectivamente. Se recuperó el sobrenadante y se reservó en tubos Eppendorff nuevos y etiquetados por separado. Una vez teniendo los sobrenadantes, se tomó la misma cantidad de la muestra con menor volumen, para que todas las muestras fueran similares en todos los experimentos. Si los experimentos no se llevan a cabo el mismo día, las muestras se deben guardar a -10°C , sin embargo es importante no dejar pasar más de 24 horas ya que los resultados pueden variar.



Figura 2. a) Recolección de moco con pipeta de transferencia. b) Recolección de tejido con AirBrush sobre un vaso de precipitados. c) Homogeneización de muestras.

5.3 Actividad de PO

La actividad de fenoloxidasa se determinó añadiendo 30 µl de cada muestra (moco y tejido por separado) de coral por duplicado, en una microplaca de 96 pozos, añadiendo 30 µl de activador, (Tripsina 0.5 mg/ml⁻¹) y se incubó durante 5 minutos a 35°C. Posteriormente se añadieron 30 µl de sustrato Dopamina 10 mmol (Sigma-Aldrich H8502), ya que es el que se ha demostrado tiene mayor eficiencia para PO en esta especie (Mydlarz *et al.*, 2011). Se registró la absorbancia a 450 nm cada 5 minutos durante 90 minutos, utilizando un micro lector de placas AMR-100. Para estandarizar PO se utilizó la concentración de proteína total de cada muestra, determinada mediante el método de Bradford. Las mediciones de proteína se llevaron a cabo el mismo día, tanto de moco como de tejido; el resto de la muestra que se utilizó para estimar la actividad de PO se guardó a -10°C para utilizarlas al siguiente día.

5.4 Análisis estadístico

Se midió normalidad mediante Shapiro-Wilk y homocedasticidad mediante Levin, demostrando que los datos no son normales ni homocedásticos. Entonces se empleó el análisis de correlación no paramétrica de Wilcoxon, para demostrar la relación entre las variables de PO en moco y tejido. Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo en RStudio (2023.06.1 Build 524).

6. Actividades realizadas

Mes 1:

- Se realizó una consulta bibliográfica para elaborar el protocolo de investigación junto con los asesores del proyecto.
- Se planteó el diseño experimental.
- Se conocieron y aprendieron los instrumentos y técnicas de laboratorio y de campo.

Mes 2:

- Se realizó la primera salida a campo para estandarizar las técnicas de extracción de fragmentos en campo (Para estandarizar se usó la especie *Porites astreoides*).
- Se hizo estandarización y por primera vez todos los experimentos (fenoloxidasa y proteína) para conocer las técnicas en laboratorio y el manejo de resultados en la base de datos.

Mes 3:

- Se llevaron a cabo dos salidas a campo en dónde se siguió estandarizando la técnica con *P. astreoides*.
- Se brindó el apoyo en el laboratorio en técnicas de cuantificación de clorofila.

- Se empezaron con pruebas en el lector de microplacas

Mes 4:

- Se realizaron dos salidas más a campo con *P. astreoides*, en la segunda salida se colectaron muestras de corales enfermos para ver si se ve alguna diferencia en PO con respecto a los corales aparentemente sanos.

Mes 5:

- Se trabajó en los scripts de R con los datos obtenidos en *P. astreoides* para tener una base de datos y un formato establecido para trabajar con los datos de *M. cavernosa*.
- Se estudiaron e investigaron las pruebas estadísticas no paramétricas y las pruebas de normalidad y homocedasticidad.

Mes 6:

- Se realizó la última salida a campo, recolectando un total de 9 fragmentos de *M. cavernosa*, de los cuales, 7 fueron sanos y 2 blanqueados.
- Se llevaron a cabo los experimentos para proteína y PO, junto con todos los análisis estadísticos
- Se escribió el Informe de conclusión de Servicio Social, el cual se mandó a los asesores para que dieran el visto bueno o correcciones.

Durante los meses 1 al 5, tomé clases de Biología Marina que imparte el Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. También tomé un curso de “Writing scientific papers for publication in English”, impartido por la Dra. Anne Grant, realizado dentro de la UASA. Y durante los meses de junio y julio apoyé en el desove y reproducción de coral con el laboratorio “Coralium”, perteneciente a la UASA.

7. Metas alcanzadas

El objetivo principal de la investigación fue determinar la variación de la actividad de fenoloxidasa entre el tejido y el moco del coral escleractinios *Montastraea cavernosa* aparentemente sano. Lo cual se vio reflejado en los resultados del trabajo, lo que es de suma importancia para el estudio de la inmunidad en corales. Aunado a esto, y debido al blanqueamiento que está afectando las costas del Caribe actualmente y a los corales en general, a causa del aumento de la temperatura a nivel global, se abrieron más preguntas de investigación que se buscarán responder en un futuro con más proyectos sobre el tema.

El Servicio Social me brindó muchas herramientas tanto prácticas como teóricas que no pude tener durante la carrera por temas de pandemia, y aprendí no solo de inmunidad de corales y microbiología, también aprendí técnicas de laboratorio, reproducción sexual de corales, preparar alimento vivo para anémonas, trabajar en equipo, conocer técnicas nuevas de muestreo en campo y desarrollarme en otro tipo de ambiente académico. También pude poner

en práctica los conocimientos y habilidades que adquirí durante los años como estudiante de la UAM.

A mi parecer, aproveche muchas de las oportunidades que la UASA me brindó durante la estancia y me voy satisfecha con el trabajo que realicé y con muchas ganas de regresar muy pronto para seguir aprendiendo e investigando del Sistema Arrecifal que tiene Puerto Morelos.

8. Resultados y conclusiones

8.1 Estandarización de técnicas

Durante los primeros meses del servicio social, se llevó a cabo la estandarización de técnicas, tanto en campo como en laboratorio, utilizando la especie *P. astreoides*, este es un coral constructor de arrecife importante por su rol evolutivo, ecológico y estructural desde hace millones de años (Foster, 1986; Garthwaite *et al.*, 1994). Se utilizó esta especie, ya que es de las más abundantes y en mejor estado de salud aparente en el sitio de muestreo, a diferencia de *M. cavernosa*, que si bien también es de gran importancia por ser de los principales constructores de arrecifes (Horta-Puga & Carriquiry, 2008), en el sitio de muestreo hay menos abundancia y hacer estandarización con esta especie sería de alto costo ecológico para el arrecife.

Se colectaron 8 fragmentos de colonias sanas y 7 fragmentos de colonias enfermas entre los meses de marzo y abril del 2023. Los resultados obtenidos arrojan que la variación en la actividad de PO entre moco y tejido (Fig. 3) es estadísticamente significativa (Wilcoxon $p=0.015$). En cuanto a las colonias enfermas (Fig. 4), también se mostraron diferencias significativas ($p=0.031$), sin embargo, se puede observar que hay más actividad en moco de las colonias enfermas.

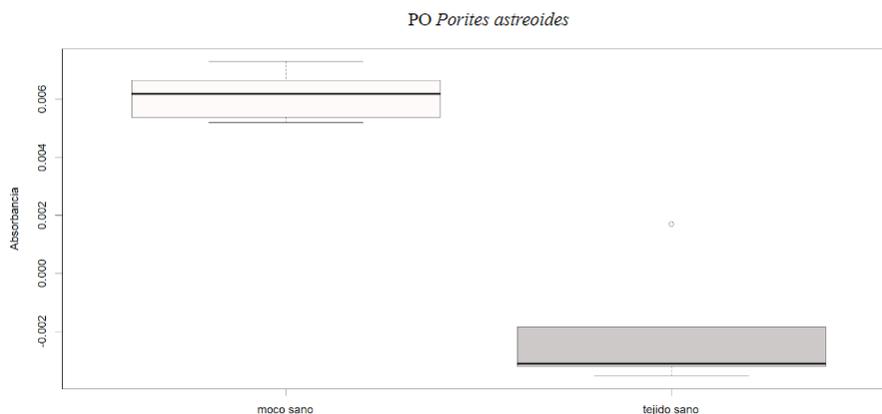


Figura 3. Actividad de PO en moco y tejido de colonias sanas de *P. astreoides*

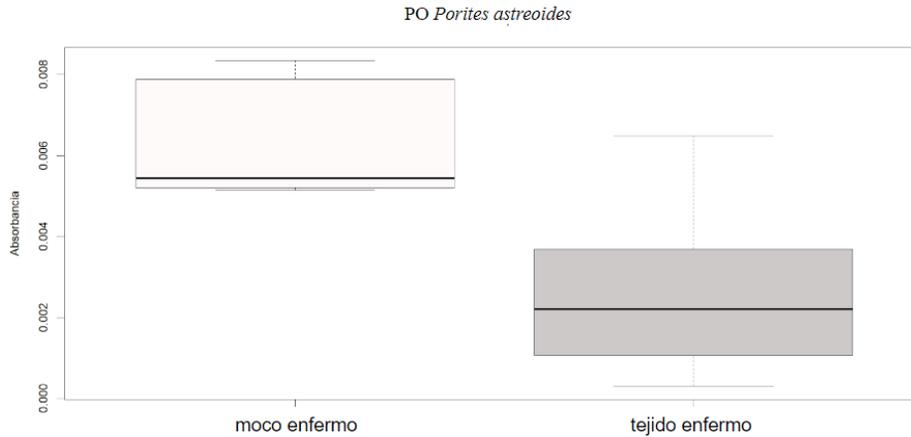


Figura 4. Actividad de PO en moco y tejido de colonias de *P. astreoides* enfermas

8.2 Correlación de actividad de fenoloxidasa en moco y tejido de coral de la especie *Montastraea cavernosa*

Se realizó un análisis para evaluar la actividad de fenoloxidasa entre moco y tejido de coral de la especie *M. cavernosa*. Las muestras de corales sanos (Fig.5) ni las de corales blanqueados (Fig. 6) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre moco y tejido (Wilcoxon $p= 0.37$ y $p= 0.5$ respectivamente). Sin embargo, en las colonias blanqueadas, se muestra mayor actividad de la enzima en el moco.

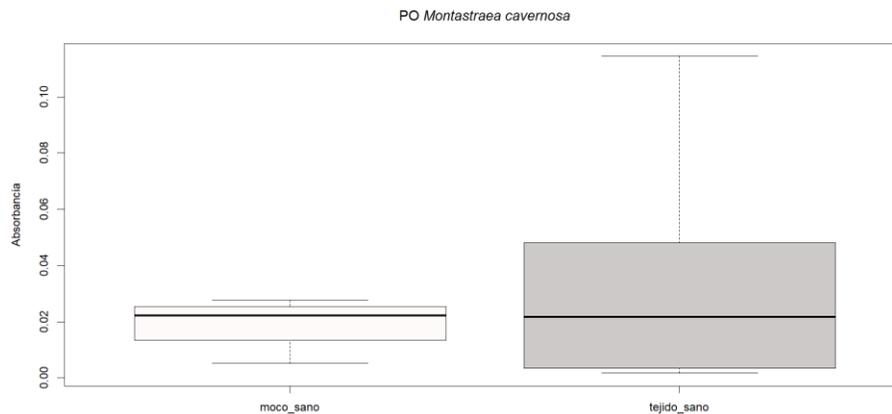


Figura 5. Actividad de fenoloxidasa en moco y tejido de coral en colonias sanas

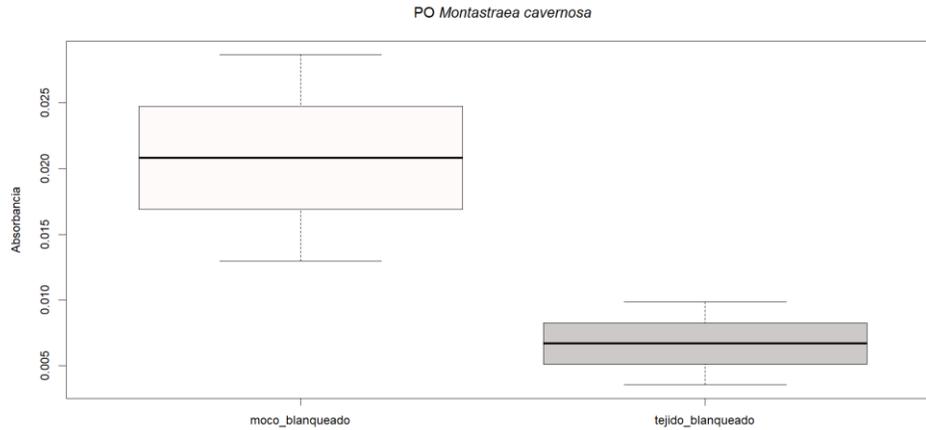


Figura 6. Actividad de fenoloxidasa en moco y tejido de coral en colonias blanqueadas

8.3 Actividad de PO en colonias blanqueadas vs sanas

Debido al incremento anómalo de temperatura que se empezó a presentar desde junio y que ha causado el blanqueamiento y la muerte de muchos corales dentro del arrecife, se llevó a cabo una comparación entre los datos de *P. astreoides* que se obtuvieron durante la estandarización (temporada sin blanqueamiento) y fragmentos obtenidos durante la temporada de incremento de la temperatura, para ver cómo se comporta la actividad de fenoloxidasa en ambas temporadas en corales sanos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en moco ($p=0.36$), ni en tejido ($p=0.12$), sin embargo, se puede observar que en el moco de las colonias sanas (Fig. 7) hay mayor actividad de PO en temporada de blanqueamiento, en cuanto a tejido, se ve más actividad durante el mes de abril (Fig. 8).

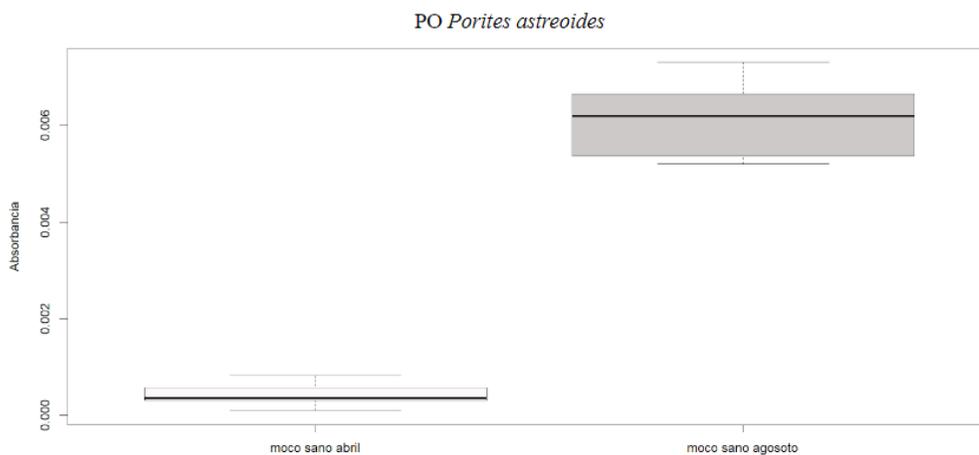


Figura 7. Actividad de fenoloxidasa en moco y tejido de coral en colonias blanqueadas

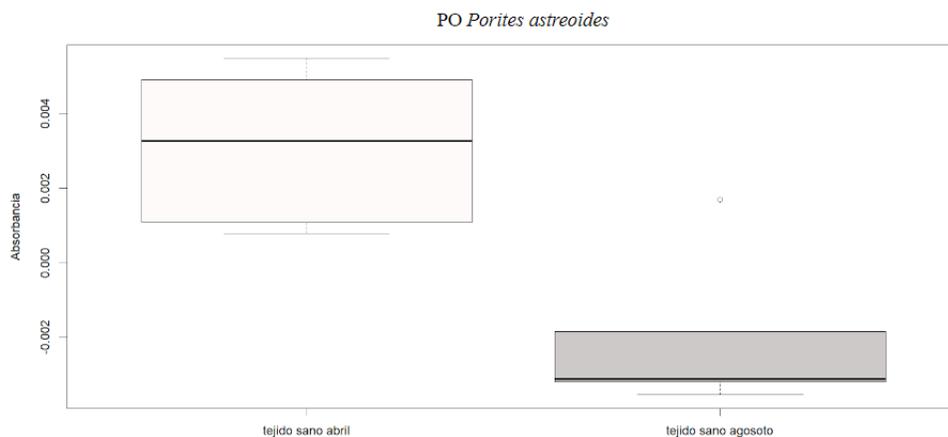


Figura 8. Actividad de fenoloxidasa en moco y tejido de coral en colonias blanqueadas

8.4. Tejido vs moco para el estudio del sistema inmune en corales

Estos resultados demuestran que se puede medir la actividad de fenoloxidasa en ambas estructuras y que el moco es un buen indicador, pudiendo sustituir el muestreo de tejido. Además, se demostró que en temporadas con temperaturas altas, hay mas actividad de PO en moco (Fig. 7), esto es de gran importancia, ya que el moco, al ser un buen proxy inmunológico, podría dar pie a cambiar las técnicas utilizadas actualmente, dejando de lado el estudio del tejido. Si bien, en este trabajo se utilizó el moco del fragmento obtenido para aprovecharlo en su totalidad, ya se han hecho estudios para obtener moco *in situ* (Rivera-Ortega & Thomé, 2018), lo que daría como paso siguiente comparar la actividad entre moco *in situ* y en laboratorio.

10. Recomendaciones

10.1 Para la investigación

Al no tomar en cuenta factores que están afectando al sistema arrecifal, como el aumento de la temperatura y el blanqueamiento, fue un poco difícil evaluar los resultados, pero , dio pie a otras preguntas de investigación.

También se recomienda tener en cuenta los tiempos, esfuerzos y presupuesto que implica muestrear en campo para futuras investigaciones similares.

Se propone investigar organismos modelo como la anémona *Exaiptasia diaphana* y la medusa *Cassiopea xamachana* para ver si PO se comporta de manera similar que en un coral.

Se propone darle seguimiento a la investigación para comparar la actividad de PO en moco obtenido *in situ* vs laboratorio.

10.2 Personales

Investigar más acerca de la inmunidad en organismos invertebrados, así como temas relacionados a enfermedades coralinas, simbiontes asociados, entre otras.

Mejorar el acomodo de mis tiempos para hacer más eficiente la investigación.

Tomar algún curso de redacción y de estadística, ya que fue lo que más se me complicó.

11. Referencias

- Cerenio, L. & Söderhall, K. (2011). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198: 116-26.
- Douglas, AE (2003). Blanqueamiento de corales: ¿cómo y por qué? *Mar. Contaminación. Bol.*, 46: 385-392.
- Forero-Mejía A. (2012) Estado actual de salud coralina en las comunidades arrecifales en chengue y gayraca, dos bahías del parque nacional natural tayrona, caribe colombiano.
- Foster, A.B. 1986. Neogene paleontology in the northern Dominican Republic. 3. The family Poritidae (Anthozoa: Scleractinia). *Bull. Amer. Paleont.*, 90: 45-123.
- Garthwaite, R.L, D.C. Potts, J.E.N. Veron y T.J. Done. 1994. Electrophoretic identification of Poritid species (Anthozoa: Scleractinia). *Coral Reefs*, 13: 49-56.
- Global Coral Reef Monitoring Network (GCRMN). (2020). Status of Coral Reefs of the World. <https://gcrmn.net/2020-report/>
- Gil-Agudelo, D., Navas-Camacho, R., Rodríguez-Ramírez, A., Reyes-Nivia, C., Garzón-Ferrerira, J. & Smith, G. (2009). Enfermedades coralinas y su investigación en los arrecifes colombianos. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 28(2): 189-224.
- Horta-Puga, G, & Carriquiry, JD. (2008). Crecimiento del coral hermatípico *Montastraea cavernosa* en el Sistema Arrecifal Veracruzano. *Cienc. mar*, 34(1), 107-112.
- Mydlarz, L. & Palmer, C. (2011). The presence of multiple phenoloxidases in Caribbean reef-building corals. *Rev. Biochem. Phys.* 159(4): 372-378.
- Palmer, C.V. J.C. Bythell, & B.L. Willis. (2011). A comparative study of phenoloxidase activity in diseased and bleached colonies of the coral *Acropora millepora*. *Rev. Develop. Comp. Immunol.* 35(10): 1098-1101.
- Reed, K., Muller, E. & van Woesik, R. (2010). Coral immunology and resistance to disease. *Dis. Aquat. Org.* 90: 85-92.
- Rivera-Ortega, J. & Thomé, P. E. (2018). Contrasting Antibacterial Capabilities of the Surface Mucus Layer From Three Symbiotic Cnidarians. *Front. Mar. Sci.* 5:392.

- Robles-Payán, A., Reyes-Bonilla, H. & Cáceres-Martínez, C. (2021). Crecimiento y supervivencia de corales durante la fase inicial de cultivo en La Paz, Baja California Sur, México. *Rev. Mex. Biol.* 92:1-12.
- Rodríguez, Calderón & Rocha. (2013). ¿De qué se enferman los corales?. *Rev. Cienc. Des.*, 6-13.
- Sutherland, K., J. Porter & C. Torres. (2004). Disease and immunity in Caribbean and IndoPacific zooxanthellate corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 266: 273 - 302.
- Weis, VM 2008. Mecanismos celulares del blanqueamiento de cnidarios: el estrés provoca el colapso de la simbiosis. *J. Exp. Biol.*, 211: 3059-3066.

12. Bibliografía recomendada

- Ben-Haim, Y., M. Zicherman-Keren & E. Rosenberg. (2003). Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4236-4242
- Cadavid, L. F. (2016). Resolución de conflictos al interior del organismo: el papel del sistema inmune. *Acta Biológica Colombiana*, 21(1), S287-S295. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n1Supl.50973>
- Frías-López, J. A., G. T. Bonheyo, Q. Jin & B. W. Fouke. (2003). Cyanobacteria associated with coral black band disease in Caribbean and Indo-Pacific reefs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2409-2413.
- González-Santoyo, I. & Córdoba-Aguilar, A. (2011). Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomology*. 142(1): 1-16.
- Glasl, B., Herndl, G. & Frade, P. (2016). The microbiome of coral surface mucus has a key role in mediating holobiont health and survival upon disturbance. *ISME J* 10: 2280–2292.
- Leal, E., Suescún-Bolívar, L., & Múnera, M. (2022). Mecanismos inmunológicos en Cnidaria: un sistema inmune basal de gran complejidad e interés biopropectivo. *Rev. Biol. Trop.* 70: 726-741.
- Van de Water, J., Ainsworth, T. D., Leggat, W., Bourne, D., Willis, B. & van Oppen J. H. (2015). The coral immune response facilitates protection against microbes during tissue regeneration. *Mol. Ecol.* 24(13): 3390-3404.
- Woodhead, A., Chicks, C., Norström, A., Williams, G. & Graham, N. (2019). Coral reef ecosystem services in the Anthropocene. *Funct. Ecol.* 33(6): 1023-1034.
- Yamashiro, H., M. Yamamoto & R. van Woesik. 2000. Tumor formation on the coral *Montipora informis*. *Dis. Aquat. Org.*, 41: 211-217.