



**TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN  
BIOTECNOLOGÍA**

Biomarcadores bioquímicos y fisiológicos en ejemplares de *Cassiopea xamachana* (Bigelow, 1892) y *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) procedentes de l'Oceanogràfic.

Alumno: Mar Llorca Llovet

Tutor UCV: Dra. Belén Frigols Garrido

Tutor UV: Dra. Amparo Torreblanca Tamarit

Curso académico 2021-2022





## **Agradecimientos**

Este proyecto se ha realizado gracias a la ayuda UV-INV-AE19-1210476 de la Universitat de València y a la Fundació Oceanogràfic de la Comunitat Valenciana que ha proporcionado todos los ejemplares de medusas para este estudio.

Además, me gustaría expresar mi agradecimiento a mis tutoras. A la Dra. Belén Frigols por sus consejos, su apoyo y asesoramiento a lo largo de todo el semestre. A la Dra. Amparo Torreblanca, gracias por haber puesto tanta ilusión desde el principio en este estudio, por confiar en mí, por enseñarme, ayudarme, aconsejarme y guiarme en todos los pasos de este proyecto.

A Andrea, Noelia, Ángela, Uxue, Belén y Cris, por el gran apoyo que han sido durante toda la carrera. Y a mis chicas del sóftbol, mis Piratas, por ser mi vía de escape cada lunes y jueves de 21 a 23 durante este último año.

Por último, a mi familia. A mis hermanos Rocío y Andrés. Y a mis padres por apoyarme siempre y ser mis mayores referentes de esfuerzo, trabajo y constancia.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Biomonitores</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. Medusas (Clase Scyphozoa).....	3
1.1.1.1. <i>Cassiopea xamachana</i> .....	6
1.1.1.2. <i>Aurelia aurita</i> .....	7
<b>1.2. Biomarcadores</b> .....	<b>8</b>
1.2.1. Biomarcadores del sistema de biotransformación de xenobióticos.....	9
1.2.1.1. Enzimas de Fase I.....	10
1.2.1.1.1. Carboxilesterasas.....	10
1.2.1.2. Enzimas de Fase II.....	10
1.2.1.2.1. Glutatión-S-transferasa.....	11
1.2.2. Biomarcadores de estrés oxidativo.....	11
1.2.2.1. Daño oxidativo.....	12
1.2.2.1.1. Peroxidación lipídica.....	12
1.2.2.2. Defensa antioxidante.....	13
1.2.2.2.1. Glutatión reductasa.....	13
1.2.2.2.2. Catalasa.....	14
1.2.2.3. Metabolismo energético.....	14
1.2.2.3.1. Glucosa.....	14
1.2.2.3.2. Lactato.....	15
1.2.2.4. Excreción de nitrógeno.....	15
1.2.2.4.1. Amoniacó.....	15
1.2.2.5. Simbiosis cnidario-dinoflagelado.....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1. Objetivo general</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1. Reactivos</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2. Obtención de los organismos</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3. Determinaciones bioquímicas y fisiológicas</b> .....	<b>22</b>
3.3.1. Preparación homogeneizados.....	22
3.3.2. Grado de peroxidación lipídica.....	22
3.3.3. Actividad glutatión reductasa.....	23
3.3.4. Niveles de glucosa.....	24
3.3.5. Niveles de lactato.....	24
3.3.6. Niveles de amoniacó.....	25

3.3.7. Densidad de zooxantelas.....	25
3.3.8. Concentración de proteínas totales .....	26
<b>3.4. Análisis estadísticos .....</b>	<b>27</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Datos biométricos.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Biomarcadores bioquímicos y fisiológicos.....</b>	<b>29</b>
4.2.1. Grado de peroxidación lipídica .....	31
4.2.2. Actividad glutatión reductasa .....	32
4.2.3. Niveles de glucosa.....	33
4.2.4. Niveles de lactato.....	34
4.2.5. Niveles de amoniaco.....	35
4.2.6. Actividad carboxilesterasa .....	36
4.2.7. Actividad glutatión-S-transferasa .....	37
4.2.8. Actividad catalasa .....	38
4.2.9. Densidad de zooxantelas.....	39
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>7. LÍNEAS FUTURAS .....</b>	<b>57</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA .....</b>	<b>59</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>77</b>

## Índice de figuras

Figura 1.....	2
Figura 2.....	5
Figura 3.....	6
Figura 4.....	7
Figura 5.....	9
Figura 6.....	13
Figura 7.....	15
Figura 8.....	31
Figura 9.....	32
Figura 10.....	33
Figura 11.....	34
Figura 12.....	35
Figura 13.....	37
Figura 14.....	38
Figura 15.....	39
Figura 16.....	40
Figura 17.....	41
Figura 18.....	41

## Índice de tablas

Tabla 1. ....	7
Tabla 2. ....	8
Tabla 3. ....	29
Tabla 4. ....	30
Tabla 5. ....	39
Tabla 6. ....	42
Tabla 7. ....	42
Tabla 8. ....	49
Tabla 9. ....	51

## **Listado de abreviaturas**

4-AF: 4-aminofenazona

AMPs: Áreas marinas protegidas

ANOVA: Análisis de varianza

BHT: Butiltilhidroxitolueno

BSA: Albúmina sérica bovina

CAT: Catalasa

CbE: Carboxilesterasa

Cla: Clorofila

DMSO: Dimetil sulfóxido

GLDH: Glutamato deshidrogenasa

GOD: Glucosa oxidasa

GP: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

GST: Glutación-S-Transferasa

LO: Lactato oxidasa

LPO: Peroxidación lipídica

MDA: Malondialdehido

NADPH:  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

pNPA: acetato de p-nitrofenilo

pNPB: butirato de p-nitrofenilo

POD: Peroxidasa

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDS: Dodecilsulfato sódico

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico

TEP: 1,1,3,3-tetraethoxypropane

$\alpha$ NA: acetato de  $\alpha$ -naftilo

$\alpha$ NB: butirato de  $\alpha$ -naftilo

## Resumen

Existe la necesidad de desarrollar herramientas eficientes para prevenir daños a los ecosistemas marinos debidos a la contaminación. Se propone el empleo de los escifozoos como biomonitores mediante el uso de biomarcadores como herramientas sensibles de alerta temprana para la detección de contaminantes. El objetivo del presente estudio fue establecer los procedimientos prácticos y los niveles basales de una batería de biomarcadores bioquímicos y fisiológicos de las especies *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*.

Se estudiaron biomarcadores relacionados con la biotransformación de xenobióticos (actividad enzimática de la CbE y la GST), estrés oxidativo (grado de LPO y actividad enzimática de la CAT y la GR), metabolitos secundarios (niveles de glucosa, lactato y amoniaco) y densidad de zooxantelas en tejidos de umbrela y brazos orales de ambas especies en 8 ejemplares de tamaño similar procedentes de l'Oceanogràfic.

Para los biomarcadores evaluados se han obtenido rangos entre 0.83 y 3.18 nmol g<sup>-1</sup> de peso húmedo para la LPO, 3.30 y 8.36 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína para la GR, 0.78 y 3.17 μmol mg<sup>-1</sup> de proteína para la glucosa, 0.36 y 1.14 μmol mg<sup>-1</sup> de proteína para el lactato, 0.029 y 0.073 μmol mg<sup>-1</sup> de proteína para el amoniaco, 14.55 y 195.02 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína para la CbE, 5.8 y 83 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína para la GST y 18.07 y 22.2 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína para la CAT.

Los resultados obtenidos se compararon con los determinados en especies de escifozoos, otros cnidarios e invertebrados marinos, mostrando variabilidad inter e intraespecífica. Se han descrito las metodologías de medición de los biomarcadores y los niveles basales en las especies de estudio, información que puede contribuir como base para estudios futuros.

**Palabras clave:** *Cassiopea xamachana*, *Aurelia aurita*, biomarcador, niveles basales, peroxidación lipídica, enzimas antioxidantes, metabolitos, enzimas biotransformación.

## Abstract

There is a need to develop efficient tools to prevent damage to marine ecosystems due to pollution. The use of scyphozoans as biomonitors is proposed using biomarkers as sensitive early warning tools for the detection of contaminants. The objective of the present study was to establish the practical procedures and the basal levels of a battery of biochemical and physiological biomarkers of the species *Cassiopea xamachana* and *Aurelia aurita*.

Biomarkers related to the biotransformation of xenobiotics (enzymatic activity of CbE and GST), oxidative stress (LPO levels and enzymatic activity of CAT and GR), secondary metabolites (glucose, lactate and ammonia levels) and density of zooxanthellae in tissues of the umbrella and oral arms of both species in 8 specimens of similar size from l'Océanogràfic were studied.

For the studied biomarkers, ranges have been obtained between 0.83 and 3.18 nmol g<sup>-1</sup> of wet weight for LPO, 3.30 and 8.36 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein for GR, 0.78 and 3.17 μmol mg<sup>-1</sup> of protein for glucose, 0.36 and 1.14 μmol mg<sup>-1</sup> protein for lactate, 0.029 and 0.073 μmol mg<sup>-1</sup> protein for ammonia, 14.55 and 195.02 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein for CbE, 5.8 and 83 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein for GST and 18.07 and 22.2 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein for CAT.

The results obtained were compared with those determined in species of scyphozoans, other cnidarians and marine invertebrates, showing inter and intraspecific variability. Methodologies for measuring biomarkers and basal levels in the study species have been described, information that can contribute as a basis for future studies.

**Key words:** *Cassiopea xamachana*, *Aurelia aurita*, biomarker, basal levels, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, metabolites, biotransformation enzymes.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los servicios ecosistémicos son los beneficios que las personas obtienen de la naturaleza (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). La supervivencia y el bienestar humanos dependen de estos servicios y, por tanto, de la conservación y el mejor manejo de los ecosistemas que los proporcionan (Liquete et al., 2013).

Los océanos y especialmente la zona costera aportan más del 60% del valor económico total de la biosfera (Liquete et al., 2013). Sin embargo, las actividades humanas están transformando los ecosistemas costeros y marinos a escala local, regional y global, exponiendo tanto a los organismos individuales como a las comunidades biológicas a cambios ambientales dramáticos por una serie de factores estresantes (Bosch-Belmar et al., 2016; Epstein et al., 2016). Estos factores incluyen la entrada de contaminantes, la eutrofización, la sobrepesca, los episodios de hipoxia y los cambios de temperatura, salinidad y pH del agua de mar (Bosch-Belmar et al., 2016; Glippa et al., 2018). Lo que altera el equilibrio de los ecosistemas acuáticos y conduce a la reducción del bienestar de las especies con la consiguiente reducción de los servicios ecosistémicos (Lomartire et al., 2021).

La contaminación es reconocida como una de las principales presiones que impulsan la pérdida de biodiversidad en todo el mundo (Lionetto et al., 2021). En los últimos años, los niveles de contaminantes en el medio marino se han incrementado como consecuencia de las actividades antropogénicas (Bonanno et al., 2020; Sarkar et al., 2006). Estos contaminantes ingresan a los ambientes costeros como metales, productos farmacéuticos y veterinarios, pesticidas, hidrocarburos, microplásticos, aguas residuales y nutrientes (Kroon et al., 2020; Lionetto et al., 2021). La absorción de estos por parte de los hidrobiontes puede ocurrir a partir del agua, los sedimentos, las partículas suspendidas y las fuentes de alimento (Lushchak, 2011).

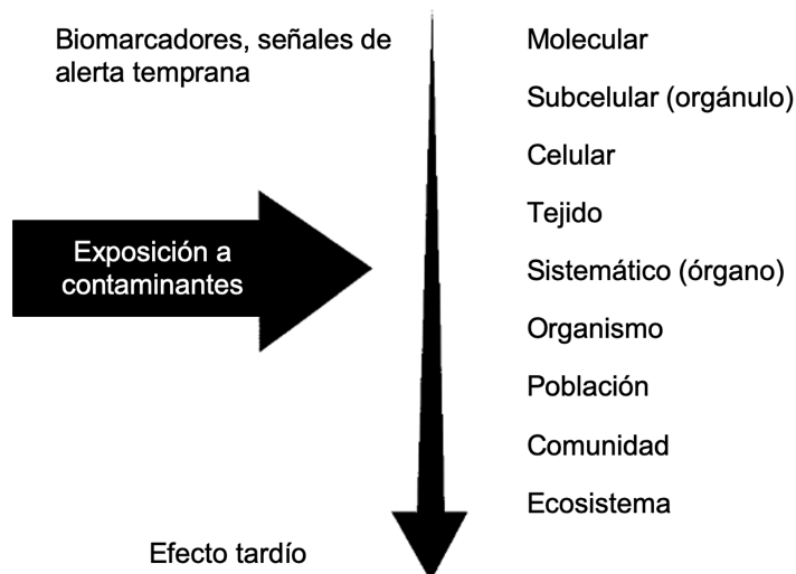
Numerosos contaminantes invisibles y visibles, ya sea individuales o contenidos en mezclas químicas, tienen el potencial para viajar largas distancias y períodos de tiempo después de su entrada en el océano causando impactos en una amplia gama de organismos marinos a muchos grados de latitud y longitud de su origen y entrada al sistema marino (Vagi et al., 2021). Por ello, para la conservación de los ecosistemas marinos y la biodiversidad asociada cobra gran importancia el monitoreo del estado ambiental de los hábitats costeros (Bonanno et al., 2020).

El muestreo discreto de agua es uno de los métodos más directos y mejor utilizados para examinar los contaminantes, pero da poca información de los efectos biológicos y

ecológicos que los contaminantes pueden tener en un ecosistema (Cajaraville et al., 2000). Además, muchas de las perturbaciones que ocurren en el medio marino son exposiciones de duraciones cortas o de “pulso” (horas a días) con mezclas de contaminantes, lo que requiere estar en el lugar correcto en el momento correcto para recolectar una muestra representativa de los compuestos (Templeman et al., 2021). Esto podría promover serios efectos sobre la biota sin llegar a ser evidentes hasta que los cambios se dieran a nivel poblacional o de ecosistema, pudiendo ser demasiado tarde para tomar las medidas adecuadas (Lionetto et al., 2021).

Por lo tanto, la concentración biodisponible solo puede identificarse de forma fiable midiendo los niveles de contaminantes dentro de los propios organismos (Epstein et al., 2016). El uso de organismos marinos como biomonitores es una herramienta importante para comprender como los cambios en la calidad del agua pueden afectar la diversidad y abundancia de la biota local (Muñoz-Vera et al., 2016).

Los efectos nocivos de los contaminantes generalmente se ejercen primero en los niveles más bajos de la organización biológica antes de que las perturbaciones se manifiesten en los niveles de la población, la comunidad o el ecosistema en una escala de tiempo más grande (Figura 1, Lionetto et al., 2021). Por ello, se ha propuesto el uso de biomarcadores como una estrategia de "alerta temprana" para la detección de la presencia de estresores químicos, lo que permite iniciar estrategias de biorremediación antes de que se produzca un daño ambiental irreversible y por ende lograr el mantenimiento del estado de salud de los ecosistemas (Linde-Arias et al., 2008; Lomartire et al., 2021; Sarkar et al., 2006).



**Figura 1.** Representación esquemática del orden secuencial de las respuestas al estrés por contaminación dentro de un sistema biológico. Fuente: Modificado de van der Oost et al. (2003).

## 1.1. Biomonitores

Los biomonitores son un grupo de organismos que se han utilizado en las últimas décadas como un enfoque integrado en el tiempo para medir y monitorear los contaminantes (Templeman et al., 2021). El biomonitoreo, como la detección de contaminantes químicos en organismos marinos, fue introducido por primera vez en los años 70 como el programa de monitoreo mundial utilizando bivalvos como organismos centinela para detectar tendencias en la concentración de contaminantes químicos en las aguas marinas denominado “*Mussel Watch*” (da Costa et al., 2022).

Sin embargo, no existe un organismo de biomonitoreo ideal debido a la variación entre las especies y los tipos de hábitat, por lo que surge la necesidad de identificar biomonitores en diferentes hábitats y de diferentes estrategias de comportamiento y capacidad de bioacumulación (Epstein et al., 2016).

De acuerdo con Templeman et al. (2021), un buen biomonitor requiere de una serie de características para ser útil en la medición de contaminantes en un sistema incluyendo: 1) ser de naturaleza sedentaria; 2) razonablemente abundante y fácilmente identificable; 3) tolerante al manejo en condiciones de campo y laboratorio; 4) tolerante a la variabilidad de las condiciones fisicoquímicas y 5) acumuladores netos del contaminante en consideración.

Aunque los bivalvos han sido la especie más empleada, los investigadores han estado evaluando la contaminación ambiental utilizando diferentes especies como biomonitores, tales como: moluscos (O'Donovan et al., 2020), crustáceos (Not et al., 2020), poliquetos (Gaete et al., 2017), peces (Ranjbar Jafarabadi et al., 2020), esponjas (Orani et al., 2018), macroalgas y pastos marinos (Bonanno & Raccuia, 2018), anémonas (Brock & Bielmyer, 2013), corales (Ranjbar Jafarabadi et al., 2018), medusas (Templeman et al., 2021) y estrellas de mar (Fowler et al., 2004), entre otros.

Entre ellos, las medusas poseen características que se consideran importantes en los biomonitores (Templeman & Kingsford, 2010; Templeman et al., 2021).

### 1.1.1. Medusas (Clase Scyphozoa)

Las medusas son organismos marinos pelágicos o bentónicos y se consideran miembros clave de los ecosistemas oceánicos debido a sus interacciones tróficas (Romero-Kutzner et al., 2022). Son presa de numerosos organismos como gasterópodos, cefalópodos, crustáceos, peces, tiburones, tortugas, aves y mamíferos (Devereux et al., 2021; Epstein et al., 2016) y son predominantemente depredadores voraces de zooplancton (Macali & Bergami, 2020; Romero-Kutzner et al., 2022).

Además, pueden proporcionar refugios seguros para los juveniles de algunas especies de peces (Epstein et al., 2016).

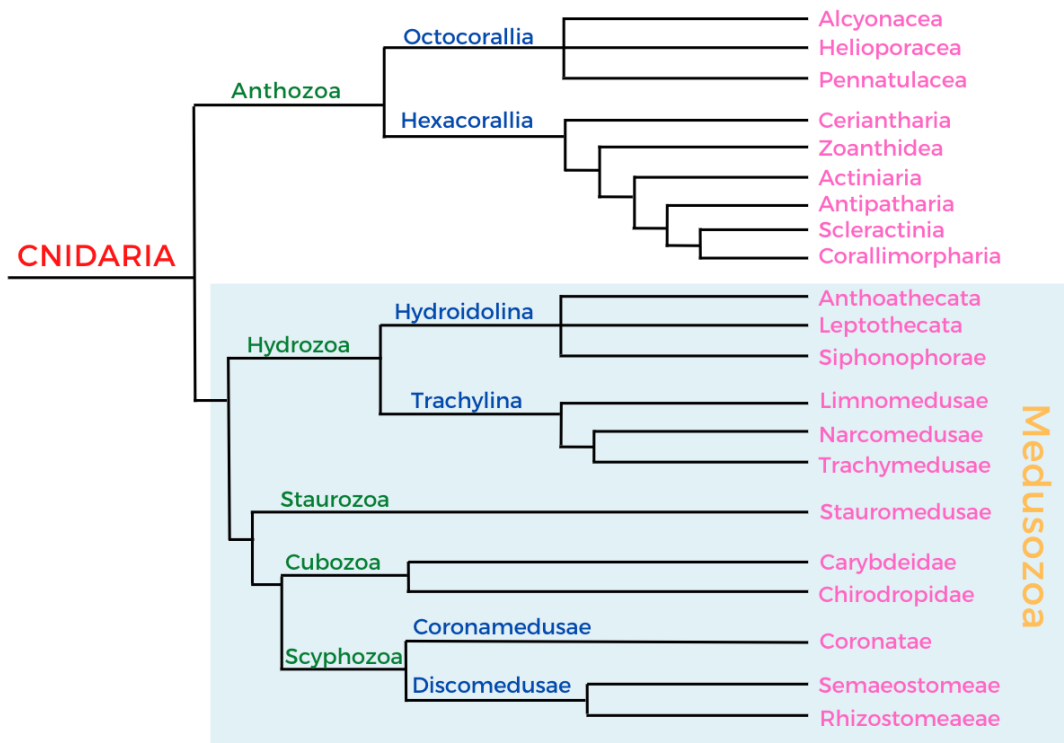
El ciclo de vida de las medusas generalmente consiste en la generación asexual de pólipos y la generación sexual de medusas. Los pólipos sésiles se adhieren a sustratos duros adecuados, mientras que las medusas pelágicas pueden migrar vertical y horizontalmente en respuesta a las mareas y corrientes (Wang et al., 2017).

Las medusas poseen las cinco características clave propuestas por Templeman et al. (2021) para ser un buen biomonitor: 1) algunas especies son bentónicas y se han demostrado distribuciones localizadas para varias especies pelágicas (Schlaefer et al., 2018); 2) las medusas presentan una distribución generalizada y su población ha crecido abundantemente en las últimas décadas (Nevarez-Lopez et al., 2020); 3) las técnicas de cultivo en laboratorio están bien establecidas, los pólipos de medusa se crían fácilmente en condiciones de acuario y se pueden inducir su estrobilación para estudios de fase adulta (Ohdera et al., 2018); 4) las medusas presentan una sorprendente capacidad de supervivencia y se ha descrito su capacidad para adaptarse a condiciones más cálidas, aumentando su distribución y abundancia (Purcell, 2012); 5) varios estudios han demostrado que las medusas son capaces de acumular una variedad de contaminantes por encima de las concentraciones ambientales del agua de mar y transferir estos contaminantes a la cadena alimentaria (Muñoz-Vera et al., 2016).

Las medusas pertenecen al filo Cnidaria. Los cnidarios son organismos invertebrados principalmente marinos y uno de los grupos de animales más diversos en términos de morfología, ciclos de vida, ecología y desarrollo (Zapata et al., 2015). Estos se caracterizan por poseer en sus epitelios células urticantes, conocidas como cnidocitos que comprenden un sofisticado sistema de administración de veneno con una variedad de funciones, que incluyen la captura de presas, la defensa, la locomoción y la fijación (Brusca & Brusca, 2003; Goffredo & Dubinsky, 2016). Los cnidocitos producen y alojan un orgánulo denominado cnidocisto conectado a un cnidocilio (Brusca & Brusca, 2003). El cnidocisto es una cápsula cargada de veneno y con parte de su pared invaginada en forma de filamento hueco enrollado en espiral dentro de la cápsula. El contacto de un organismo extraño con el cnidocilio hace que el filamento se desenrolle violentamente para clavarse e inocular el veneno (Goffredo & Dubinsky, 2016; Vargas et al., 2012). Además, los cnidarios poseen dos capas de tejido: endodermis (gastrodermis) y ectodermis, que están separadas por la capa de un compuesto extracelular llamado mesoglea (Kotova et al., 2016; Vargas et al., 2012).

Actualmente están descritas más de 11.000 especies de cnidarios incluidas en seis clases (Figura 2, Koch & Grimmelikhuijzen, 2019; Maran et al., 2021; Zapata et al., 2015):

- **Clase Anthozoa:** corales duros y blandos, zoantarios, anémonas de mar, anémonas de tubo (ceriántidos), plumas de mar (pennatuláceos), gorgonias.
- **Clase Cubozoa:** avispas de mar, medusas con formas cúbicas.
- **Clase Hydrozoa:** grupo diverso relacionado con las medusas; como *Physalia physalis*, *Porpita porpita*, *Velella velella*, hidroides, sifonóforos.
- **Clase Myxozoa:** parásitos microscópicos con esporas multicelulares y cápsulas similares a nematocistos.
- **Clase Scyphozoa:** medusa verdadera.
- **Clase Staurozoa:** pequeñas medusas sésiles de aspecto polipoide.



**Figura 2.** Relaciones filogenéticas del filo Cnidaria. La clase Myxozoa se ha omitido en esta figura debido a su posición incierta (Koch & Grimmelikhuijzen, 2019). Los nombres resaltados en rojo indican un filo; en naranja un subfilo; en verde una clase; en azul una subclase y en rosa un orden. Fuente: Elaboración propia a partir de Kayal et al. (2013), Kayal et al. (2018), Koch y Grimmelikhuijzen (2019), Quek y Huang (2021) y Vargas et al. (2012).

La mayoría de organismos pertenecientes a las clases Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa y Staurozoa tienen un ciclo de vida que incluye un pólipo y una etapa de medusa y, por lo tanto, estas clases se agrupan en el subfilo Medusozoa (Koch & Grimmelikhuijzen, 2019).

La clase Scyphozoa agrupa aproximadamente 200 especies y tradicionalmente se conocen como "medusas verdaderas" (Kayal et al., 2018). Dentro de esta clase se diferencian dos subclases: Coronamedusae y Discomedusae. La subclase Discomedusae está compuesta por los órdenes Rhizostomae y Semaestomeae (Helm, 2018).

Dos especies de medusas que se proponen como candidatas para el biomonitoreo son *Cassiopea xamachana* (Bigelow, 1892) y *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) representantes de los órdenes Rhizostomeae y Semaestomeae respectivamente.

#### 1.1.1.1. *Cassiopea xamachana*

La medusa invertida *Cassiopea xamachana* (Bigelow, 1892) (Figura 3) es un escifozoos del orden Rhizostomeae (Tabla 1) que alberga una abundante comunidad de *Symbiodinium microadriaticum* en el interior de las células de la gastrodermis (Newkirk et al., 2018). Esta es sustancialmente diferente de los escifozoos típicamente pelágicos dado que muestra un estilo de vida epibentónico, orienta sus brazos orales hacia la superficie para exponer sus simbioses a la luz solar descendente, mientras que la umbrela pulsa contra el bentos para generar un flujo de agua y extraer los nutrientes del sedimento (Medina et al., 2021). Por lo que las medusas del género *Cassiopea* habitan aguas poco profundas en áreas de fondos blandos, a menudo también en lechos de pastos marinos, en lagunas tropicales protegidas por manglares y generalmente toleran salinidades de alrededor de 18 a 20 ppt (Ohdera et al., 2018).



**Figura 3.** Medusa invertida *Cassiopea xamachana* descansando sobre el ápice de la umbrela (flecha blanca) con los brazos orales (flechas cian) hacia arriba en el hábitat natural de manglares en Key Largo, Florida (EE. UU.). Fuente: Ames et al. (2020).

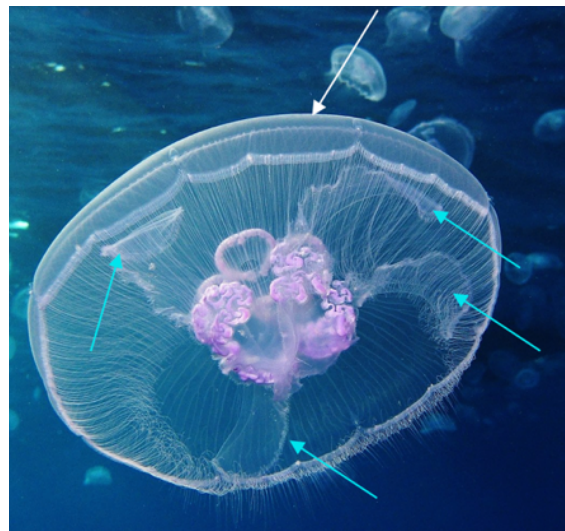
**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la medusa *Cassiopea xamachana* (Bigelow, 1892). Fuente: NCBI Taxonomy Database; ID: 12993.

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Cnidaria
<b>Clase</b>	Scyphozoa
<b>Subclase</b>	Discomedusae
<b>Orden</b>	Rhizostomeae
<b>Familia</b>	Cassiopeidae
<b>Género</b>	Cassiopea
<b>Especie</b>	<i>Cassiopea xamachana</i>

Diversos estudios previos han identificado *Cassiopea xamachana* como un organismo potencial de biomonitordeo, debido a su naturaleza sedentaria, la relación simbiótica con las zooxantelas dinoflageladas y su capacidad para absorber contaminantes (Devereux et al., 2021; Fowler et al., 2004; Templeman & Kingsford, 2010; Templeman et al., 2021).

#### 1.1.1.2. *Aurelia aurita*

La medusa común o luna *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) (Figura 4) es un escifozoos epipelágico del orden Semaestomeae (Tabla 2) y presenta una distribución cosmopolita en todo el mundo para aguas neríticas entre 70°N y 40°S, eurihalina (salinidades de <10 a 38 ppt) y euritermal (temperaturas que oscilan entre 0 y 30°C) (Echols et al., 2016).



**Figura 4.** Medusa luna *Aurelia aurita*, se puede observar la umbrela (flecha blanca) y los brazos orales (flechas cian) en el Mar Rojo (Gota Sagher, Egipto). Fuente: Vasenin (2014).

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de la medusa *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758). Fuente: NCBI Taxonomy Database; ID: 6145.

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Cnidaria
<b>Clase</b>	Scyphozoa
<b>Subclase</b>	Discomedusae
<b>Orden</b>	Semaeostomeae
<b>Familia</b>	Ulmaridae
<b>Subfamilia</b>	Aureliinae
<b>Género</b>	Aurelia
<b>Especie</b>	<i>Aurelia aurita</i>

*Aurelia aurita* es una especie muy estudiada debido a que su cultivo es sencillo, por lo que es muy utilizada en acuarios. El género *Aurelia* ha sido propuesto como un organismo modelo en ecotoxicología debido a su sensibilidad a contaminantes como el petróleo crudo, químicos orgánicos y metales pesados (Olguín-Jacobson et al., 2020). Además, debido a su importancia ecológica y económica y su biología bien estudiada y amplia distribución, la especie *Aurelia aurita* tiene potencial para ser empleada en el biomonitoreo ambiental (Schroth et al., 2005).

## 1.2. Biomarcadores

Los biomarcadores pueden definirse como mediciones cuantitativas de cambios que ocurren a nivel celular, bioquímico, molecular o fisiológico, que pueden medirse en células, fluidos corporales, tejidos u órganos dentro de un organismo como respuesta a contaminantes o factores estresantes en el entorno ambiental (Galloway et al., 2006; Vidal-Liñán & Bellas, 2013).

La especificidad de los biomarcadores varía desde biomarcadores específicos, que permiten identificar el contaminante o la clase química de contaminantes responsables de las respuestas observadas en los organismos, hasta biomarcadores generales, que responden a una variedad de factores ambientales químicos estresantes (Lionetto et al., 2021).

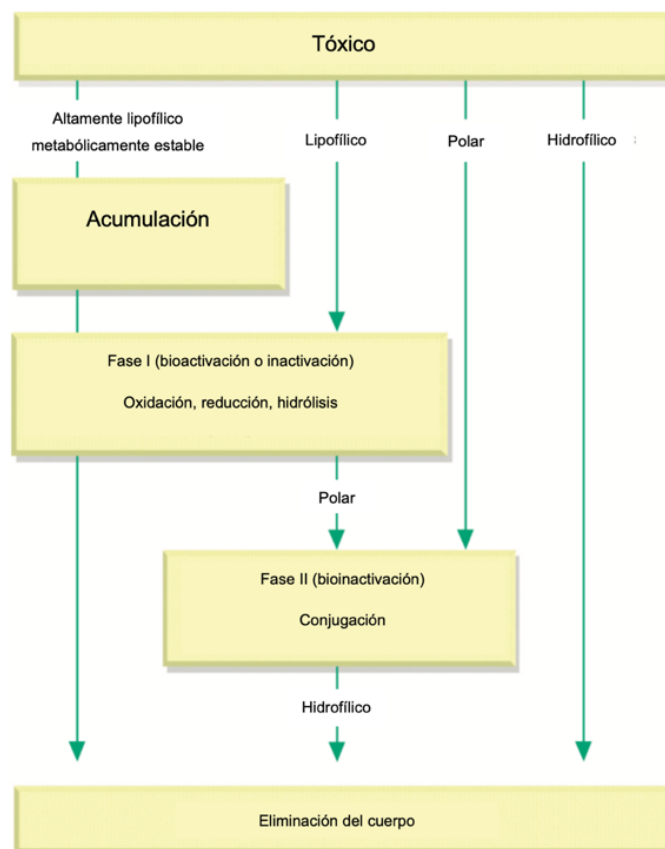
Debido a la complejidad de los ecosistemas y a la presencia de múltiples contaminantes en condiciones reales, no existe un biomarcador que pueda dar información completa acerca de la calidad ambiental (Beliaeff & Burgeot, 2002; Lionetto et al., 2021). Por lo que se recomienda llevar a cabo una batería de biomarcadores complementarios de diferentes niveles de organización biológica para evaluar adecuadamente los impactos

de la contaminación sobre los organismos en un determinado medioambiente, así como identificar distintos tipos de contaminantes, y el efecto sinérgico de sus mezclas (Beliaeff & Burgeot, 2002; Cossu-Leguille & Vasseur, 2013; Monserrat et al., 2007).

Entre los biomarcadores de contaminación más empleados se encuentran los relacionados con la biotransformación de compuestos orgánicos, así como los relacionados con las defensas antioxidantes y el estrés oxidativo (Zanette et al., 2011).

### 1.2.1. Biomarcadores del sistema de biotransformación de xenobióticos.

Los contaminantes ambientales absorbidos por los organismos marinos son generalmente compuestos orgánicos los cuales son apolares y lipofílicos, característica que les permite atravesar con facilidad las membranas biológicas, imposibilitando su excreción y acumulándose en tejidos grasos (Rourke & Sinal, 2014). Sin embargo, la mayoría de estas sustancias químicas experimentan reacciones de conversión metabólica *in vivo* en un proceso denominado biotransformación (Figura 5, Hampel et al., 2016). Este consiste en la metabolización mediante reacciones enzimáticas de los compuestos lipofílicos poco excretables en productos que son más hidrofílicos para facilitar su excreción (Gerba, 2019; Hampel et al., 2016; Rourke & Sinal, 2014).



**Figura 5.** Descripción general de la biotransformación mostrando reacciones de Fase I y Fase II. Fuente: Modificado de Gerba (2019).

Por lo tanto, las alteraciones en las actividades de las enzimas de biotransformación pueden ser empleados como biomarcadores de exposición a contaminantes lipofílicos biodisponibles en el medio ambiente (Hampel et al., 2016).

Las enzimas encargadas de la biotransformación se dividen en función de las reacciones que se catalizan en enzimas de Fase I y enzimas de Fase II (Rourke & Sinal, 2014).

#### **1.2.1.1. Enzimas de Fase I**

Las enzimas de Fase I catalizan reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis que desenmascaran o agregan un pequeño grupo polar (por ejemplo, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH) en la molécula parental, generándose metabolitos más polares, que son sustratos para las siguientes reacciones de Fase II (Gerba, 2019; Hampel et al., 2016). Entre las enzimas más comunes implicadas en este primer paso se encuentran las carboxilesterasas (Ribalta et al., 2015).

##### **1.2.1.1.1. Carboxilesterasas**

Las carboxilesterasas (CbE, EC 3.1.1.1), que pertenecen a la familia de las serina hidrolasas, son enzimas importantes involucradas en la hidrólisis de los enlaces éster, amida, tioéster y carbamatos de muchos compuestos químicos (Omedes et al., 2022; Solé et al., 2021).

La capacidad de las CbE para responder a la presencia de contaminantes las convierte en un biomarcador adecuado de exposición a los contaminantes y susceptibilidad de los organismos a verse afectados por los contaminantes (Nos et al., 2017). Además, se pueden usar varios sustratos comerciales para medir la actividad de las CbE y su uso combinado es muy recomendable en el monitoreo de la contaminación ya que pueden ser indicativos de diferentes isoformas enzimáticas (Nos et al., 2021).

##### **1.2.1.2. Enzimas de Fase II**

Las enzimas de la Fase II implican reacciones de conjugación que agregan grupos endógenos polares (por ejemplo, glutatión, aminoácidos, sulfato y derivados de carbohidratos) al compuesto original o a los productos de la Fase I, para producir metabolitos aún más polares que el tóxico original o el metabolito de Fase I. Por lo tanto, estos se vuelven aún más solubles en agua y pueden excretarse fácilmente (Gerba, 2019; Hampel et al., 2016; Timbrell, 2008). Enzimas como las glutatión-S-transferasa tienen un papel fundamental en estas reacciones de conjugación (Ribalta et al., 2015).

### 1.2.1.2.1. Glutación-S-transferasa

Las glutación-S-transferasas (GST, EC 2.5.1.18) constituyen una superfamilia de isoenzimas multifuncionales que contribuyen a eliminar compuestos xenobióticos catalizando la reacción de conjugación del tripéptido glutación (GSH) con diversas sustancias electrófilas y produciendo compuestos más hidrofílicos y menos tóxicos (Capo et al., 2021). Además, desempeñan un papel en la prevención del daño oxidativo al conjugar los productos de descomposición de los peróxidos lipídicos con GSH (Barata et al., 2005).

Debido a ello, la actividad enzimática de las GST responde a cambios en los niveles de contaminantes en el ambiente marino y se ha empleado como biomarcador de exposición de varios contaminantes como éteres de difenilo bromados, productos farmacéuticos y de cuidado personal, hidrocarburos aromáticos policíclicos y bifenilos policlorados, metales, microplásticos e insecticidas tanto en peces como en invertebrados (Hariharan et al., 2022; Park et al., 2020; Solomando et al., 2022; Wu et al., 2022).

### 1.2.2. Biomarcadores de estrés oxidativo

El oxígeno es fundamental para todos los organismos aeróbicos, pero en el proceso de metabolismo biológico se transforma en radicales libres, como los radicales peróxido ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) y superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), y especies no radicales, como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) que se conocen en general como especies reactivas de oxígeno (ROS) (Regoli & Giuliani, 2014).

Las ROS presentan un papel dual como especies que resultan ser beneficiosas o perjudiciales para los organismos. Los efectos beneficiosos de las ROS ocurren a bajas concentraciones ya que cumplen funciones celulares como la defensa frente a agentes infecciosos y están implicadas en procesos de señalización celular. El efecto perjudicial de las ROS se origina cuando aumenta la tasa de producción de estas especies y excede la tasa de su descomposición por las defensas antioxidantes. El desequilibrio entre las especies oxidantes y la capacidad antioxidante celular en los organismos vivos se denomina estrés oxidativo (Lushchak & Storey, 2021; Vidal-Liñán & Bellas, 2013)

La exposición de los organismos a contaminantes puede promover un aumento en la tasa de producción de ROS y, posteriormente, generar estrés oxidativo (Regoli & Giuliani, 2014). Al mismo tiempo, el proceso de biotransformación de xenobióticos también representa una fuente importante de ROS (Solomando et al., 2020).

Además, Vlahogianni et al. (2007) afirman que la biota acuática es altamente susceptible a los efectos oxidativos de los contaminantes ambientales. De esta manera, el uso de biomarcadores de estrés oxidativo como indicadores de cambios biológicos relevantes en biomonitores puede ser una herramienta clave en los estudios de biomonitorización de los contaminantes presentes en ecosistemas marinos (Alves de Almeida et al., 2007; Vidal-Liñán & Bellas, 2013). Sin embargo, nunca se debe utilizar uno de los parámetros para describir el estrés oxidativo, sino que se debe aplicar una batería de técnicas (Lushchak, 2011). Los estudios que examinan el estrés oxidativo inducido por contaminante han incluido en la mayoría de los casos dos componentes del estrés oxidativo: el daño oxidativo y las defensas antioxidantes (Prokić et al., 2019).

#### **1.2.2.1. Daño oxidativo**

El exceso de producción de ROS puede provocar un daño oxidativo significativo de los componentes celulares, incluidos lípidos, proteínas y ADN (Solomando et al., 2020).

Cuando el ataque de los ROS se produce a los lípidos de membrana, se inicia un proceso de oxidación denominado peroxidación lipídica (Alves de Almeida et al., 2007).

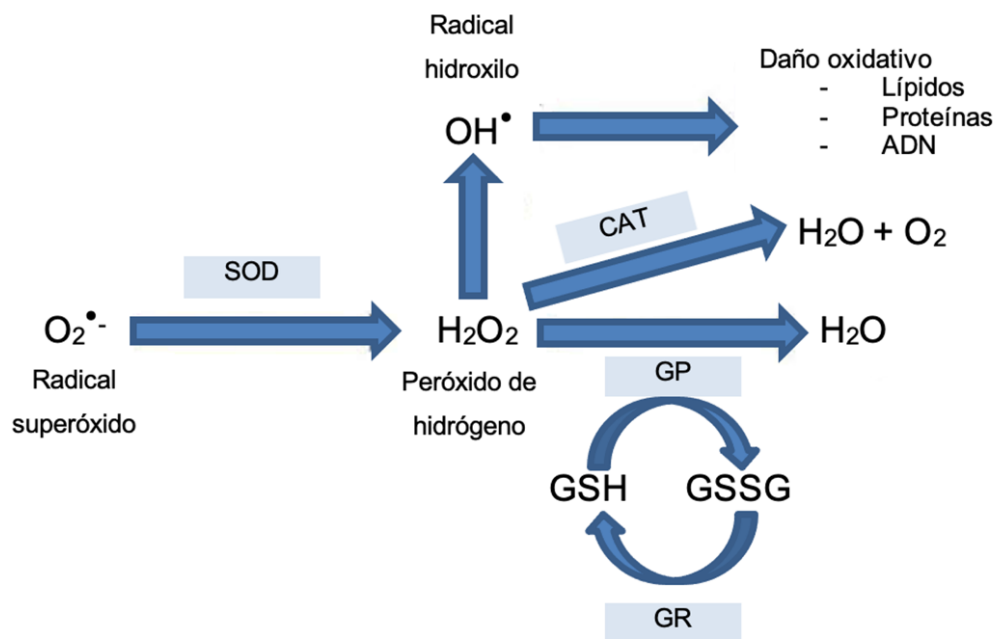
##### **1.2.2.1.1. Peroxidación lipídica**

La peroxidación de lípidos (LPO) es un proceso en el cual los oxidantes atacan los lípidos, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), lo que altera la estructura y función de las bicapas lipídicas, cambia la permeabilidad de la membrana y promueve la penetración de agentes tóxicos en las células (Ayala et al., 2014; Prokić et al., 2019).

Los organismos, especialmente los acuáticos, contienen altas cantidades de lípidos con residuos de ácidos grasos poliinsaturados como sustrato para la oxidación (Lushchak, 2011). Además, aquellos que están expuestos a xenobióticos a menudo muestran niveles elevados de LPO (Prokić et al., 2019). Por lo tanto, la cuantificación de la LPO de membrana se ha usado como biomarcador de efecto a contaminantes ambientales (Lushchak, 2011; Solé et al., 2010). Para ello, la LPO se investiga especialmente, a través de la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como la formación de malondialdehído (MDA) ya que es un producto secundario de la peroxidación lipídica tras el ataque de los radicales libres a las membranas biológicas (Pires et al., 2021; Zanette et al., 2011).

### 1.2.2.2. Defensa antioxidante

Los organismos pueden adaptarse al aumento de la producción de ROS mediante la regulación positiva de las defensas antioxidantes para proteger las células contra el estrés oxidativo, como las actividades de las enzimas antioxidantes (Barata et al., 2005). Estas incluyen fundamentalmente las enzimas superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1 convierte  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ ), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6 reduce  $H_2O_2$  a agua) y glutatión peroxidasa (GP, EC 1.11.1.9 desintoxica  $H_2O_2$  o hidroperóxidos orgánicos producidos, por ejemplo, por peroxidación de lípidos) y otras asociadas que proporcionan cofactores necesarios como la glutatión reductasa (GR, EC1.6.4.2 reduce la forma oxidada de glutatión a GSH) (Figura 6, Barata et al., 2005; Lushchak, 2011).

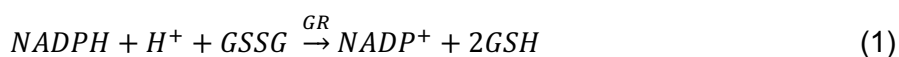


**Figura 6.** Esquema de la generación de ROS y defensa antioxidante enzimática. Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GP), glutatión reductasa (GR), glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG). Fuente: Elaboración propia.

A continuación, se describen las enzimas del sistema antioxidante que han sido objeto de estudio: la glutatión reductasa y la catalasa.

#### 1.2.2.2.1. Glutatión reductasa

La glutatión reductasa (GR, EC1.6.4.2) cataliza la transformación de la forma del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), con la correspondiente oxidación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) a  $NADP^+$  (Reacción 1) (Alves de Almeida et al., 2007).



Aunque no siempre se ha reconocido a la GR como una enzima antioxidante porque no participa directamente en la eliminación de ROS, es una enzima esencial para mantener la homeostasis celular y los mecanismos de defensa antioxidante, ya que el GSH generado actuar como un antioxidante en sí mismo o como un sustrato para la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GP) y glutatión-S-transferasa (GST) (Fernández et al., 2012; Regoli & Giuliani, 2014).

La glutatión reductasa ha sido ampliamente documentada como un biomarcador altamente sensible al desafío oxidativo en organismos marinos (Regoli et al., 2011).

#### **1.2.2.2.2. Catalasa**

Las catalasas (CAT, EC 1.11.1.6) son enzimas antioxidantes principalmente presentes dentro de los peroxisomas que catalizan la reducción de  $H_2O_2$  a agua y oxígeno (Reacción 2), lo que protege a las células del daño oxidativo causado por ROS (Regoli & Giuliani, 2014; Vidal-Liñán & Bellas, 2013).



El peróxido de hidrógeno se puede producir durante el metabolismo aeróbico basal o después de una generación de oxiradicales potenciada por la contaminación, razón por la cual la catalasa se considera un biomarcador confiable y temprano de contaminación (Ribeiro et al., 2020).

#### **1.2.2.3. Metabolismo energético**

##### **1.2.2.3.1. Glucosa**

La glucosa es un monosacárido que tiene un papel importante en la bioenergética de los organismos y al ser transformada en energía química (ATP), puede ser utilizada como energía mecánica (Martinez-Porchas et al., 2009). Los organismos toman glucosa principalmente a través del consumo de alimentos y el metabolito se usa inmediatamente o se almacena en forma de glucógeno (Hill, 2012).

La exposición a sustancias químicas induce la respuesta al estrés, se liberan catecolaminas y corticosteroides, lo que provoca la movilización de las reservas de glucógeno (Martinez-Porchas et al., 2009). El glucógeno liberado se cataboliza por la glucogenólisis estimulada por la acción del cortisol produciendo glucosa para hacer frente al aumento de la demanda de energía (Huggett, 2018; Martinez-Porchas et al., 2009). Por ello, el análisis de los niveles de glucosa se ha utilizado ampliamente como un indicador de una exposición subletal a largo plazo a un factor estresante (Huggett, 2018).

### 1.2.2.3.2. Lactato

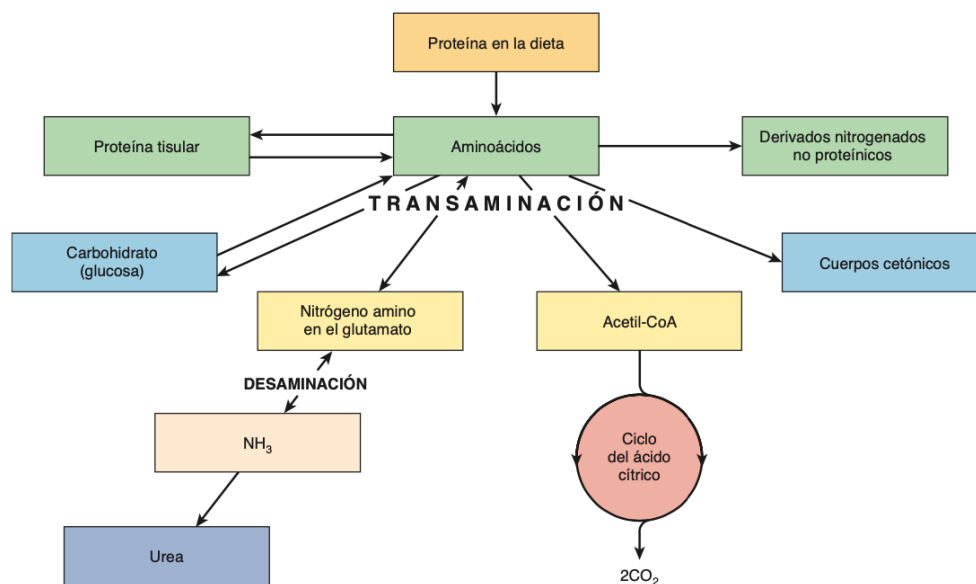
El lactato o ácido láctico es un metabolito producido como subproducto del metabolismo anaeróbico, que ocurre cuando no hay suficiente oxígeno disponible para satisfacer la demanda (Hill, 2012).

El uso de los niveles de lactato como biomarcador se basa en el supuesto de que los organismos sustentan su demanda de energía a través del metabolismo aeróbico; sin embargo, bajo condiciones estresantes, se produce un incremento en la demanda de energía y se inicia la vía anaerobia que eleva la producción de lactato (Aljbour et al., 2018; Weis, 2013).

### 1.2.2.4. Excreción de nitrógeno

#### 1.2.2.4.1. Amoniaco

Las proteínas son utilizadas como fuente de energía si previamente son degradadas a aminoácidos (Hill, 2012). Al catabolizar los aminoácidos, los átomos del esqueleto de carbono pueden: 1) oxidarse hacia  $\text{CO}_2$  por medio del ciclo del ácido cítrico, 2) usarse para sintetizar glucosa (gluconeogénesis) o 3) formar cuerpos cetónicos o acetil CoA, que se oxidan o emplean para la síntesis de ácidos grasos. Mientras que el grupo amino se transfiere a otra molécula para su reutilización o se libera para su excreción (Figura 7, Bender & Mayes, 2021).



**Figura 7.** Descripción general del metabolismo de los aminoácidos que muestra las principales vías y los productos finales. Fuente: Bender y Mayes (2021).

El principal producto de excreción en las medusas es el amoniaco, ya que su entorno proporciona abundante agua como medio para la rápida dilución de esta sustancia

tóxica por lo que son animales amonotéticos (Brusca & Brusca, 2003; Hubot et al., 2021). Al ser altamente soluble, el amoníaco se difunde fácilmente a través de fluidos y tejidos, y se elimina directamente en el agua a través de sus superficies corporales externas (Brusca & Brusca, 2003; Hill, 2012).

Bajo condiciones de estrés, la alta demanda de energía puede conducir a la estimulación del catabolismo de proteínas y aminoácidos para producir glucosa lo que provoca un aumento en la producción de nitrógeno y por ende del amoníaco en los tejidos (Baudou et al., 2017; Gluszczak et al., 2006; Hawlena & Schmitz, 2010). Por lo tanto, los cambios en los niveles de amoníaco pueden ser útiles como biomarcadores fisiológicos de exposición a contaminantes (Baudou et al., 2017; Hawlena & Schmitz, 2010).

#### **1.2.2.5. Simbiosis cnidario-dinoflagelado**

Muchos cnidarios tienen una relación simbiótica con microalgas fotosintéticas llamadas zooxantelas, principalmente dinoflagelados del género *Symbiodinium* (Olguin-Jacobson & Pitt, 2021). En concreto, la medusa *Cassiopea xamachana* se encuentra más comúnmente en simbiosis con *Symbiodinium microadriaticum* (Newkirk et al., 2020).

En simbiosis exitosas, los simbiosites fotosintéticos translocan al huésped productos orgánicos de fijación de carbono y asimilación de nitrógeno. A cambio, el huésped brinda protección y proporciona acceso a nutrientes inorgánicos disueltos (carbono, nitrógeno y fósforo) y también puede intercambiar aminoácidos, lípidos y ácidos grasos derivados del huésped (Davy et al., 2012; Hillyer et al., 2016; Olguin-Jacobson & Pitt, 2021).

Sin embargo, cuando el holobionte está bajo estrés, tanto el huésped como el simbiote participan en la producción de ROS en las mitocondrias y las mitocondrias y los cloroplastos, respectivamente. Las ROS del simbiote se difunden en la célula huésped y en un intento por reducir el daño oxidativo, el organismo huésped libera una de sus principales fuentes de ROS, su simbiote, proceso conocido como blanqueamiento (Krueger et al., 2015).

Durante la exposición a contaminantes la simbiosis cnidario-dinoflagelado puede verse alterada y ocurrir la exocitosis de células de *Symbiodinium sp.* de los tejidos del huésped interrumpiendo la relación simbiótica (Olguin-Jacobson & Pitt, 2021; Patel & Bielmyer-Fraser, 2015). En concreto, la simbiosis puede ser particularmente sensible a los herbicidas ya que su modo de acción daña el aparato fotosintético del simbiote, lo que resulta en la producción de un exceso de ROS y la expulsión de las zooxantelas (Cima et al., 2013; Klein et al., 2016). El estudio realizado por Rowen et al. (2017) demostró

que la exposición a los herbicidas hexazinona y diurón, comúnmente encontrados en los sistemas costeros, afectó a la densidad de zooxantelas en *Cassiopea maremetens*.

De esta manera, la determinación de la concentración de zooxantelas en organismos de *Cassiopea xamachana* puede ser un indicador para monitorear la contaminación ambiental. Dado que *Symbiodinium microadriaticum* posee clorofila a y c<sub>2</sub>, la cuantificación del contenido en clorofila de dinoflagelados por absorbancia después de la extracción puede ser utilizado como indicador del número de zooxantelas (Jiang et al., 2014; Krediet et al., 2015).

Las medusas son un ejemplo principal de organismos cuyo estudio implica varios problemas prácticos debido a su delicada naturaleza gelatinosa y alto contenido de agua (Fowler et al., 2004). Por lo tanto, es necesario establecer los procedimientos prácticos para la determinación de los biomarcadores con el fin de lograr una aplicación más factible de esas respuestas biológicas en los programas de monitoreo de la contaminación marina (Vidal-Liñán & Bellas, 2013).

Cabe destacar que la selección del órgano diana es un paso crucial a tener en cuenta, ya que se debe asegurar que la magnitud de la respuesta del biomarcador sea lo suficientemente alta como para ser cuantificada (Vidal-Liñán & Bellas, 2013). Estudios recientes realizados en diferentes especies de medusas diferencian dos tejidos principales: umbrela y brazos orales (Aljbour et al., 2018; Aljbour et al., 2019; Enrique-Navarro et al., 2022; Leone et al., 2019).

Además, es fundamental definir el rango de valores normales para las actividades enzimáticas en biomonitores antes de implementar el uso de estos biomarcadores en estudios de campo (Cajaraville et al., 2000). Ya que el conocimiento de los niveles basales de biomarcadores como rangos que se pueden encontrar en animales sanos puede construir un umbral a partir del cual los cambios pueden ser indicativos de estrés o incluso cómo los factores estresantes pueden actuar tras la exposición (Ferreira et al., 2010). Se ha observado variabilidad en la actividad de los biomarcadores en diferentes estaciones del año, y estos cambios están correlacionados con diferentes factores bióticos como la temperatura, la salinidad o el oxígeno disuelto en los ecosistemas acuáticos (Domingues et al., 2007). En los acuarios, los organismos cultivados no sufren estos cambios bióticos y, por esa razón, la determinación de los niveles basales de biomarcadores puede ser una herramienta importante para controlar las condiciones fisiológicas y sanitarias de los animales (Ferreira et al., 2010).

Esta información es crucial para establecer las bases de una metodología de alerta temprana para los programas de monitoreo de contaminación marina mediante la determinación de biomarcadores bioquímicos y fisiológicos utilizando las medusas *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* como biomonitores.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado es establecer los procedimientos prácticos y los niveles basales de una batería de biomarcadores bioquímicos de daño oxidativo (peroxidación lipídica), enzimas del sistema antioxidante (glutación reductasa y catalasa), enzimas de biotransformación de xenobióticos (carboxilesterasa y glutación S-transferasa) y fisiológicos del metabolismo energético (glucosa y lactato), excreción de nitrógeno (amoníaco) y relación simbiote-cnidario en ejemplares de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* procedentes de l'Oceanogràfic.

### 2.2. Objetivos específicos

Para lograr el objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Adaptar las metodologías de medición de los biomarcadores en las especies de estudio.
- Determinar los datos biométricos de los ejemplares de estudio.
- Determinar los niveles basales de biomarcadores bioquímicos relacionados con el daño oxidativo (LPO) y enzimas del sistema antioxidante (GR) y fisiológicos (glucosa, lactato y amoníaco) en ejemplares de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*.
- Analizar la actividad basal de las enzimas carboxilesterasas, glutación-S-transferasa y catalasa obtenida en un estudio previo en los mismos ejemplares de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*.
- Determinar la concentración de zooxantelas en brazos y umbrela de *Cassiopea xamachana*.
- Establecer posibles correlaciones entre los diferentes biomarcadores de estudio.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos

Para la determinación de la actividad glutatión reductasa, el grado de peroxidación lipídica y el aislamiento del simbionte, los siguientes reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma Aldrich Corp. (St Louis, MO, EE. UU.): fosfato dipotásico, butiltilhidroxitolueno (BHT), dodecilsulfato sódico (SDS), 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), glutatión oxidado (GSSG) y  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Los reactivos etanol absoluto, ácido acético y n-butanol se obtuvieron de VWR Chemicals (Fontenay-sous-bois, France). El ácido tiobarbitúrico y la piridina se adquirieron de Fluka Chemika (Buch, Suiza). El hidróxido de sodio y el fosfato monopotásico se obtuvieron de PanReac AppliChem ITW Reagents (Darmstadt, Alemania).

La acetona y el dimetil sulfóxido (DMSO) empleados para la determinación de la concentración de clorofila se obtuvieron de J.T.Baker (Deventer, Netherlands) y Sigma Aldrich Corp. (St Louis, MO, EE. UU.), respectivamente.

#### 3.2. Obtención de los organismos

Los ejemplares adultos en etapa de medusa de *Cassiopea xamachana* (N = 8) y *Aurelia aurita* (N = 8) utilizados en el presente Trabajo de Fin de Grado fueron previamente obtenidos y procesados por Jiménez (2020). Estos fueron entregados por l'Oceanogràfic de Valencia (España) donde se encontraban en los acuarios de exposición en las condiciones óptimas de su ecología y fueron transportados al laboratorio del Departamento de Biología Funcional y Antropología Física de la Universidad de Valencia en bolsas de plástico con agua del propio acuario. Inmediatamente después de la llegada al laboratorio, determinaron el diámetro de la campana (con una precisión de 0,1 cm) y la masa húmeda (con una precisión de 0,01 g) empleando el método de Aljbour et al. (2018) y Aljbour et al. (2019). A continuación, sacrificaron los organismos realizando una disección transversal sobre una placa de hielo para ralentizar la actividad metabólica de manera que el individuo sufra lo menos posible. Finalmente, cortaron los brazos orales individuales desde la punta distal hasta la base, pesaron la umbrela y los brazos orales por separado y almacenaron las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$ , las cuales han sido utilizadas en el presente estudio.

### 3.3. Determinaciones bioquímicas y fisiológicas

#### 3.3.1. Preparación homogeneizados

Se realizó una homogeneización en frío de tejido de umbrela y brazos de *Cassiopea xamachana* (N = 8 de umbrela y brazos orales) y *Aurelia aurita* (N = 8 de umbrela y N = 6 de brazos orales) (≈ 400 mg) en tampón fosfato 100 mM pH 7.4 en una relación 1:2 (p:v) mediante ULTRA Turrax® (VDI 12, VWR International, Darmstadt, Alemania). Para pesar los tejidos se empleó una balanza de precisión (TE153S, Sartorius mechatronics, Goettingen, Alemania). El pH del tampón fosfato 100 mM se determinó mediante un pH-metro (micropH 2002, Crison, Barcelona, España) el cual fue previamente calibrado con soluciones tampón de pH 7 y 4.

Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 5.000 g durante 2 minutos a 4°C. A continuación, se separaron dos alícuotas de 50 µl para la determinación de la peroxidación lipídica. El homogeneizado restante se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga (Sartorius 3K30, rotor 12154, Sigma, Osterode am Harz, Alemania). Los sobrenadantes se dividieron en 3 alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su análisis en un ultracongelador (U410, New Brunswick Scientific, New Brunswick, Canadá). El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de la actividad glutatión reductasa, el contenido de proteína total, amoniaco, lactato y glucosa. El pellet de los homogeneizados de *Cassiopea xamachana* se empleó para la determinación de la densidad de zooxantelas.

#### 3.3.2. Grado de peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se evaluó espectrofotométricamente a través del ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa et al., 1979). Este ensayo cuantifica el estrés oxidativo midiendo el daño peroxidativo a los lípidos que ocurre con la generación de radicales libres. El daño de los radicales libres a los lípidos da como resultado la producción de malondialdehído (MDA), que reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en condiciones de alta temperatura y acidez generando un cromógeno medible espectrofotométricamente o espectrofluorométricamente (Oakes & Van Der Kraak, 2003).

Las TBARS se midieron de acuerdo con el protocolo empleado por Barata et al. (2005) adaptado, para ello el procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (ST1200, Burdinola, Vizcaya, España). Se incubaron 50 µl de tejido homogeneizado con una mezcla que contenía 20 µl de SDS al 8.1% con BHT al 0.05%, 175 µl de ácido acético al 20% (pH 3.5 con NaOH) y 175 µl de ácido tiobarbitúrico al 0.8%, durante 60

minutos a 95°C al baño maría en un baño termostático (BT-2, SBS Instruments, Barcelona, España). Tras detener la reacción con un baño de hielo de 5 minutos, se mezclaron y agitaron vigorosamente 80 µl de agua destilada y 500 µl de una mezcla de n-butanol y piridina (15:1, v:v) y se centrifugó durante 3 minutos a 10.000 g. Se tomó el sobrenadante (capa orgánica) mediante pipeta Pasteur de vidrio (Normax, Marinha Grande, Portugal), se colocaron duplicados de 150 µL del sobrenadante de cada reacción en la microplaca negras de 96 pocillos (Nunc, Thermo Scientific, EE. UU) y se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/550 nm y ganancia óptima en un lector de placas (Tecan Spectra FLUOR Plus, Tecan, Männedorf, Suiza), cada muestra se analizó por duplicado. Las concentraciones de TBARS se derivaron de una curva estándar de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TEP 0.5-6 µM) y se empleó tampón fosfato 100 mM, pH 7.4 como blanco. La peroxidación lipídica se expresó como nanomoles de MDA por gramo de peso húmedo de tejido (nmol de MDA g<sup>-1</sup> de peso húmedo).

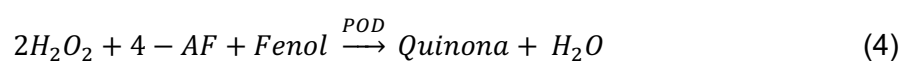
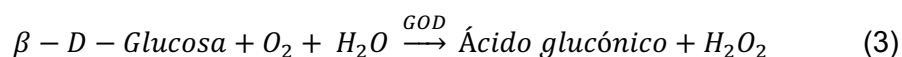
### 3.3.3. Actividad glutatión reductasa

La actividad glutatión reductasa se determinó mediante el método de Koenig y Solé (2012) con algunas modificaciones. Este se basa en medir la tasa de oxidación de NADPH espectrofotométricamente ya que la glutatión reductasa cataliza la reducción dependiente de NADPH del disulfuro de glutatión (GSSG) a glutatión (GSH) (Reacción 1). La oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> va acompañada de una disminución de la absorbancia a 340 nm y es directamente proporcional a la actividad de GR en la muestra (Carlberg & Mannervik, 1985).

El método se adaptó a microplaca de 96 pocillos, utilizaron 50 µL de muestra y 200 µL de solución de reacción formada por tampón fosfato 100 mM pH 7.4, GSSG 1.1 mM y NADPH 0.55 mM. Para pesar los reactivos se empleó una balanza analítica (Extend, Sartorius mechatronics, Goettingen, Alemania). La glutatión reductasa se cuantificó siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 5 minutos (a intervalos de 51 segundos por 5 minutos, 6 ciclos) a 28°C, en microplaca de 96 pocillos UV-transparente (UVStar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) mediante un lector de placas (Synergy H1, BioTeck, Vermont, E.E. U.U.). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. La actividad GR se expresó como nanomoles de sustrato transformado por minuto y por miligramo de proteína (nmol/min/mg proteína), utilizando el coeficiente de extinción molar de 6.22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para NADH/NADPH.

### 3.3.4. Niveles de glucosa

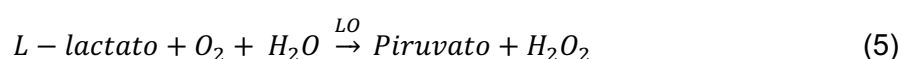
La determinación de la glucosa se realizó mediante el kit comercial «Determinación cuantitativa de glucosa GOD-POD Líquido» (Ref: 41011, SPINREACT, Girona, España), el cual se basa en la oxidación de la glucosa, en presencia de agua y oxígeno, por la glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico y produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Reacción 3). El peróxido de hidrogeno formado reacciona catalizado por la peroxidasa (POD) con fenol y 4-aminofenazona (4-AF) para formar un compuesto rojo de quinona (Reacción 4). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada (Trinder, 1969).



El método se adaptó a microplaca de 96 pocillos, empleando 50  $\mu$ L de tejido homogeneizado y 200  $\mu$ L del reactivo del kit. El patrón primario acuoso de glucosa 100 mg/dL proporcionado en el kit se usó como referencia y tampón fosfato 100 mM pH 7.4 se usó como blanco. Las placas se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 485 nm en un lector de placas (Tecan Spectra FLUOR Plus, Tecan, Männedorf, Suiza) en microplaca de 96 pocillos (Nunc, Thermo Scientific, EE. UU), cada muestra se analizó por triplicado. Los valores de glucosa se expresaron como  $\mu$ mol por contenido en proteína ( $\mu$ mol  $mg^{-1}$  de proteína).

### 3.3.5. Niveles de lactato

La determinación del lactato se realizó mediante el kit comercial «Determinación cuantitativa de lactato LO-POD Enzimático colorimétrico» (Ref: 1001330, SPINREACT, Girona, España), el cual se basa en la oxidación del lactato, en presencia de agua y oxígeno, por la glucosa oxidasa (GOD) lactato oxidasa (LO) a piruvato y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Reacción 5). El peróxido de hidrogeno formado reacciona catalizado por la peroxidasa (POD) con fenol y 4-aminofenazona (4-AF) para formar un compuesto rojo de quinona (Reacción 4). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de lactato presente en la muestra ensayada (Kaplan et al., 1980).



El método se adaptó a microplaca de 96 pocillos, empleando 10  $\mu$ L de tejido homogeneizado y 200  $\mu$ L del reactivo de trabajo del kit. El patrón primario acuoso de lactato 10 mg/dL se usó como referencia y tampón fosfato 100 mM, pH 7.4 como blanco. Las placas se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia se midió

a una longitud de onda de 485 nm en un lector de placas (Tecan Spectra FLUOR Plus, Tecan, Männedorf, Suiza) en microplaca de 96 pocillos (Nunc, Thermo Scientific, EE. UU), cada muestra se analizó por triplicado. Los valores de lactato se expresaron como  $\mu\text{mol}$  por contenido en proteína ( $\mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína).

### 3.3.6. Niveles de amoniaco

La determinación del amoniaco se realizó mediante el kit comercial «Determinación cuantitativa de amoniaco. Enzimático-UV» (Ref: 1001410, SPINREACT, Girona, España), este se basa en la reacción del amoniaco, en presencia de glutamato deshidrogenasa (GLDH), con  $\alpha$ -cetoglutarato y NADPH para producir glutamato y  $\text{NADP}^+$  (Reacción 6). La disminución de la absorbancia a 340 nm es proporcional a la concentración de amoniaco (Dewan, 1938; Neeley & Phillipson, 1988; Pesh-Imam et al., 1978).



El método se adaptó a microplaca de 96 pocillos, empleando 30  $\mu\text{L}$  de tejido homogeneizado y 200  $\mu\text{L}$  del reactivo del kit. Las placas se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 340 nm en un lector de placas (Multiskan Go, Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.) en microplaca de 96 pocillos UV-transparente (UVStar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de GLDH, se incubaron las placas 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de nuevo. El patrón primario acuoso de amoniaco 293  $\mu\text{mol/L}$  se usó como referencia y tampón fosfato 100 mM, pH 7.4 como blanco. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. Los valores de amoniaco se expresaron como  $\mu\text{mol}$  por contenido en proteína ( $\mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína).

### 3.3.7. Densidad de zooxantelas

La densidad de zooxantelas se determinó mediante el contenido de clorofila en los pellets de las muestras de umbrela y brazos de *Cassiopea xamachana*. Para ello, se resuspendió el pellet en 1000  $\mu\text{l}$  de una disolución de acetona y DMSO (1:1, v:v) y se sonicó durante 1 minuto. A continuación, se incubó en oscuridad a  $-20^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Los sobrenadantes se aclararon por centrifugación a 5000 g durante 10 minutos. Inmediatamente se leyó la absorbancia del sobrenadante a 630, 663 y 750 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (WPA BLOWAVE II, Biochrom, Cambridge, Reino Unido) y cubeta de vidrio (Hellman Analytics, Müllheim, Alemania). Las concentraciones de clorofila a y  $c_2$  se calcularon de acuerdo con las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (1975) para dinoflagelados que contienen clorofila a y  $c_2$  (Ecuaciones 1 y 2). Las

concentraciones de zooxantelas se expresaron como  $\mu\text{g}$  de clorofila a y  $c_2$  por gramo de peso húmedo de tejido y por contenido en proteína.

$$\text{Clorofila } a = 11.43 (E_{663} - E_{750}) - 0.64 (E_{630} - E_{750}) \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } c_2 = 27.09 (E_{630} - E_{750}) - 3.63 (E_{663} - E_{750}) \quad (2)$$

Para el aislamiento del simbionte, se emplearon dos metodologías.

Para la primera, el tejido de umbrela de *Cassiopea xamachana* ( $\approx 400$  mg) se homogeneizó, utilizando el protocolo de dos pasos empleado por Krediet et al. (2015), en  $\text{dH}_2\text{O}$  con SDS al 0,01% en una relación 1:2 (p:v) mediante ULTRA Turrax® y se pasó el homogeneizado cinco veces a través de una aguja de calibre 25 fijada a una jeringa de 1 ml, este último procedimiento se repitió 3 veces..

Para la segunda, se digirieron las muestras de tejido congelado de umbrela de *Cassiopea xamachana* siguiendo un protocolo adaptado utilizado por Zamoum y Furla (2012) para extraer zooxantelas intactas. Las muestras de tejido se descongelaron y se añadió hidróxido de sodio 4 M (0,5 ml de NaOH si la masa de la muestra de tejido era  $< 0,5$  g y 1 ml de NaOH si la masa era de 0,5 a 1 g). Las muestras se agitaron mediante un vórtex (PACISA, Madrid, España) durante aproximadamente 10 segundos, seguido de una incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante una hora en una estufa (Memmert, Schwabach, Alemania) agitando en un vórtex durante 10 segundos cada 15 minutos. A continuación, la muestra se volvió a agitar con vórtex, se centrifugó a 3000g durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Luego, la muestra se pasó cinco veces a través de una aguja de calibre 25 fijada a una jeringa de 1 ml, este procedimiento se repitió 3 veces.

Los extractos obtenidos mediante ambas metodologías se observaron bajo un microscopio óptico (CX23, Olympus, Tokio, Japón).

### 3.3.8. Concentración de proteínas totales

La concentración de proteínas totales en las muestras homogeneizadas se determinó mediante el método de Bradford (1976) empleando el kit Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, California, EE. UU.).

El método se adaptó a microplaca de 96 pocillos, empleando 10  $\mu\text{L}$  de tejido homogeneizado diluido en tampón fosfato 100 mM, pH 7.4 (1:2, v:v) y 200  $\mu\text{L}$  de Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, California, EE. UU.) diluido en agua destilada (1:4, v:v). Las concentraciones de proteína se derivaron de una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA 0.05-0.5 mg/ml) (Bio-Rad Laboratories, California,

EE. UU.) y se usó tampón fosfato 100 mM, pH 7.4 como blanco. Las placas se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 595 nm en un lector de placas (Tecan Spectra FLUOR Plus, Tecan, Männedorf, Suiza), cada muestra se analizó por triplicado.

### 3.4. Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo a través del programa informático RStudio 2022.02.3 (Build 492) para macOS. El nivel de significación estadística que se estableció para todos los análisis fue de  $p < 0.05$  y los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar.

Para probar las diferencias en los biomarcadores entre los grupos experimentales, se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías analizando los factores especie (*Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*) y tejido (umbrela y brazos orales) junto a sus interacciones. Posteriormente, para determinar las diferencias significativas entre las medias de las variables se aplicó la prueba *post hoc* de Tukey para varianzas homogéneas.

Se utilizó el *test t* de Student para muestras independientes para comparar la concentración de zooxantelas según el tejido.

Previamente, se comprobó la normalidad y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente (Tablas S1, S2, S3 y S4). En aquellas variables que no cumplían con los requisitos del análisis se realizaron transformaciones matemáticas, transformando con  $\log(X+1)$  la actividad glutatión reductasa y con  $1/X$  los niveles de glucosa y la concentración de clorofila  $c_2$  por gramo de peso húmedo de tejido y por contenido en proteína.

En el caso de los niveles de amoníaco, dado que no se pudieron transformar para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se aplicó la prueba no paramétrica equivalente Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn ajustando los valores de  $p$  con el método de Benjamini-Hochberg.

Finalmente, se evaluó el grado de asociación entre los diferentes biomarcadores a través de los coeficientes de correlación de Spearman indicando el  $p$ -valor.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Datos biométricos

Las variables biométricas consideradas (diámetro y peso húmedo) para umbrela, brazos orales y medusas totales de los 8 ejemplares de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* utilizados en el presente estudio se resumen en la Tabla 3. Las medusas fueron de tamaño similar, presentando un diámetro por individuo y un peso total promedio, respectivamente, de  $8.16 \pm 1.32$  cm y  $38.20 \pm 9.30$  g para *Cassiopea xamachana* y  $10.85 \pm 1.16$  cm y  $66.52 \pm 14.31$  g para *Aurelia aurita*.

**Tabla 3.** Datos biométricos en función de la especie. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar, entre paréntesis se indica el número de muestras.

Especie	Diámetro umbrela <sup>A</sup>	Peso húmedo <sup>B</sup>	Peso húmedo Umbrela <sup>B</sup>	Peso húmedo Brazos <sup>B</sup>
<i>Aurelia aurita</i>	$8.16 \pm 1.32$ (8)	$38.20 \pm 9.30$ (8)	$13.91 \pm 3.64$ (8)	$2.71 \pm 0.74$ (8)
<i>Cassiopea xamachana</i>	$10.85 \pm 1.16$ (8)	$66.52 \pm 14.31$ (8)	$17.07 \pm 3.57$ (8)	$13.03 \pm 3.99$ (8)

<sup>A</sup> Datos en centímetros, <sup>B</sup> Datos en gramos

### 4.2. Biomarcadores bioquímicos y fisiológicos

En la Tabla 4 se muestran los niveles basales de la batería de biomarcadores bioquímicos y fisiológicos estudiada en brazos orales y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*.

**Tabla 4.** Niveles basales de la batería de biomarcadores bioquímicos y fisiológicos estudiada en función de la especie y el tejido. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar, entre paréntesis se indica el número de muestras. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para cada biomarcador individual entre especies y tejido.

Biomarcador	<i>Aurelia aurita</i>		<i>Cassiopea xamachana</i>	
	Brazos	Umbrela	Brazos	Umbrela
Peroxidación lipídica <sup>A</sup>	3.18 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup> (6)	2.40 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup> (8)	0.90 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup> (8)	0.83 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup> (8)
Glutación reductasa <sup>B</sup>	3.30 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup> (6)	3.48 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup> (8)	7.63 $\pm$ 2.71 <sup>b</sup> (8)	8.36 $\pm$ 4.77 <sup>b</sup> (8)
Glucosa <sup>C</sup>	0.78 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup> (6)	3.17 $\pm$ 1.70 <sup>a</sup> (8)	1.58 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup> (8)	0.89 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup> (8)
Lactato <sup>C</sup>	0.36 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup> (6)	0.75 $\pm$ 0.50 <sup>ab</sup> (8)	1.14 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup> (8)	0.81 $\pm$ 0.42 <sup>ab</sup> (8)
Amoniaco <sup>C</sup>	0.029 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup> (6)	0.048 $\pm$ 0.019 <sup>ab</sup> (8)	0.073 $\pm$ 0.035 <sup>b</sup> (8)	0.069 $\pm$ 0.017 <sup>b</sup> (8)
Carboxilesterasa ( $\alpha$ NA) <sup>B</sup>	14.55 $\pm$ 7.16 (8)	ND	ND	ND
Carboxilesterasa ( $\alpha$ NB) <sup>B</sup>	195.02 $\pm$ 36.82 <sup>c</sup> (8)	86.7 $\pm$ 13.65 <sup>b</sup> (8)	35.04 $\pm$ 8.99 <sup>a</sup> (8)	32.03 $\pm$ 7.32 <sup>a</sup> (8)
Carboxilesterasa (pNPA) <sup>B</sup>	55.93 $\pm$ 17.22 <sup>b</sup> (8)	27.82 $\pm$ 6.59 <sup>a</sup> (8)	45.03 $\pm$ 17.22 <sup>b</sup> (8)	26.48 $\pm$ 4.96 <sup>a</sup> (8)
Carboxilesterasa (pNPB) <sup>B</sup>	108.78 $\pm$ 32.03 <sup>c</sup> (8)	48.42 $\pm$ 14.15 <sup>b</sup> (8)	20.07 $\pm$ 4.50 <sup>a</sup> (8)	14.94 $\pm$ 2.60 <sup>a</sup> (8)
Glutación-S-transferasa <sup>B</sup>	ND	5.8 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup> (8)	ND	83 $\pm$ 21 <sup>b</sup> (8)
Catalasa <sup>D</sup>	ND	22.2 $\pm$ 44.74 (8)	ND	18.07 $\pm$ 4.99 (8)

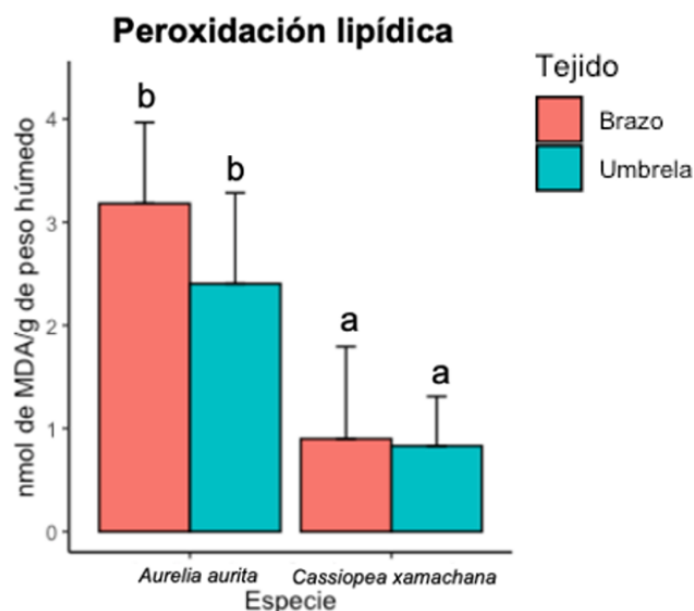
<sup>A</sup> Datos en nmol g<sup>-1</sup> de peso húmedo, <sup>B</sup> Datos en nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, <sup>C</sup> Datos en  $\mu$ mol mg<sup>-1</sup> de proteína, <sup>D</sup> Datos en  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína,  $\alpha$ NA = acetato de  $\alpha$ -naftilo,  $\alpha$ NB = butirato de  $\alpha$ -naftilo, pNPA = acetato de p-nitrofenilo, pNPB = butirato de p-nitrofenilo, ND = No detectable.

#### 4.2.1. Grado de peroxidación lipídica

El grado de peroxidación lipídica en brazos orales y umbrela fue, respectivamente, de  $3.18 \pm 0.79$  y  $2.40 \pm 0.88$  nmol g<sup>-1</sup> de peso húmedo en *Aurelia aurita* y  $0.90 \pm 0.89$  y  $0.83 \pm 0.48$  nmol g<sup>-1</sup> de peso húmedo en *Cassiopea xamachana* (Tabla 4).

Como se observa en la Figura 8, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el grado de peroxidación lipídica entre tejidos ( $p = 0.7051$ , Tabla S5). Ambas especies mostraron un grado de peroxidación lipídica más elevado en los brazos orales en comparación con la umbrela, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0.5182270$  en el caso de *Aurelia aurita* y  $p = 0.9995680$  en el de *Cassiopea xamachana*, Tabla S6).

Sin embargo, se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el grado de peroxidación lipídica entre especies ( $p = 3.505e-07$ , Tabla 5), siendo este mayor en *Aurelia aurita*. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante la prueba *post hoc* de Tukey estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) se encontraron entre brazos de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* ( $p = 0.0000664$ , Tabla S6), umbrela de *Cassiopea xamachana* y brazos de *Aurelia aurita* ( $p = 0.0000857$ , Tabla S6), brazos de *Cassiopea xamachana* y umbrela de *Aurelia aurita* ( $p = 0.0010616$ , Tabla S6) y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* ( $p = 0.0013930$ , Tabla S6).



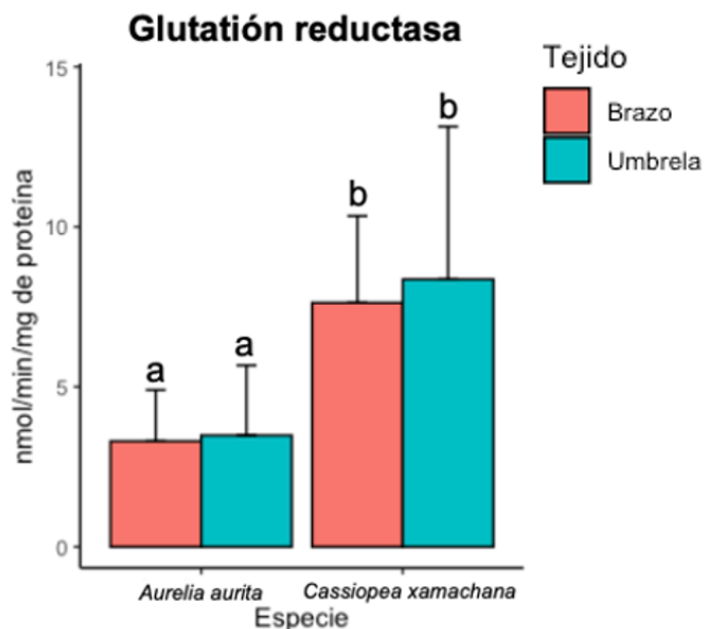
**Figura 8.** Grado de peroxidación lipídica analizado en brazos y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre especies y tejido de acuerdo con el ANOVA de 2 factores y el test de Tukey.

#### 4.2.2. Actividad glutatión reductasa

La actividad glutatión reductasa en brazos orales y umbrela fue, respectivamente, de  $3.30 \pm 1.60$  y  $3.48 \pm 2.19$   $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína en *Aurelia aurita* y  $7.63 \pm 2.71$  y  $8.36 \pm 4.77$   $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína en *Cassiopea xamachana* (Tabla 4).

Los resultados de la prueba de ANOVA de dos vías no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la actividad glutatión reductasa entre tejidos ( $p = 0.805611$ , Tabla S5). Las diferencias entre actividad glutatión reductasa no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0.9999669$  para *Aurelia aurita* y  $p = 0.9999246$  para *Cassiopea xamachana*, Tabla S6), sin embargo, ambas especies mostraron una actividad ligeramente superior en la umbrela en comparación con los brazos orales

Como se puede observar en la Figura 9, se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la actividad glutatión reductasa entre especies ( $p = 0.000125$ , Tabla S5), siendo estos más elevados en *Cassiopea xamachana*. El test *post hoc* de Tukey confirmó que las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) se encontraron entre brazos de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* ( $p = 0.0249793$ , Tabla S6), umbrela de *Cassiopea xamachana* y brazos de *Aurelia aurita* ( $p = 0.0220208$ , Tabla S6), brazos de *Cassiopea xamachana* y umbrela de *Aurelia aurita* ( $p = 0.0157874$ , Tabla S6) y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* ( $p = 0.0137227$ , Tabla S6).

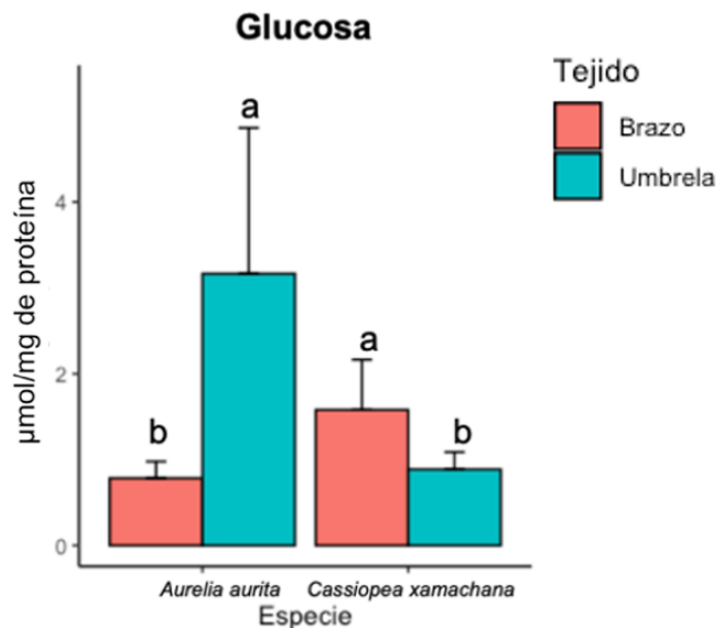


**Figura 9.** Actividad de la glutatión reductasa analizada en brazos y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre especies y tejido de acuerdo con el ANOVA de 2 factores y el test de Tukey.

### 4.2.3. Niveles de glucosa

Los niveles de glucosa en brazos orales y umbrela fueron, respectivamente, de  $0.78 \pm 0.19$  y  $3.17 \pm 1.70 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína en *Aurelia aurita* y  $1.58 \pm 0.58$  y  $0.89 \pm 0.20 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína en *Cassiopea xamachana* (Tabla 4).

Los resultados de la prueba de ANOVA de dos vías mostraron que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los niveles de glucosa entre tejidos ( $p = 0.1048$ , Tabla S5) ni entre especies ( $p = 0.2787$ , Tabla S5). Sin embargo, se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en la interacción entre tejido y especie ( $p = 1.71 \times 10^{-6}$ , Tabla S5). Como se observa en la Figura 10, de acuerdo con la prueba *post hoc* de Tukey estas diferencias se encontraron entre brazos y umbrela de *Aurelia aurita* ( $p = 0.0000401$ , Tabla S6) y *Cassiopea xamachana* ( $p = 0.0282042$ , Tabla S6), brazos de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* ( $p = 0.0045992$ , Tabla S6), y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* ( $p = 0.0001946$ , Tabla S6). Mientras que no hubo diferencias significativas entre umbrela de *Cassiopea xamachana* y brazos de *Aurelia aurita* ( $p = 0.7634477$ , Tabla S6) y brazos de *Cassiopea xamachana* y umbrela de *Aurelia aurita* ( $p = 0.2197693$ , Tabla S6).



**Figura 10.** Niveles de glucosa analizados en brazos y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*.

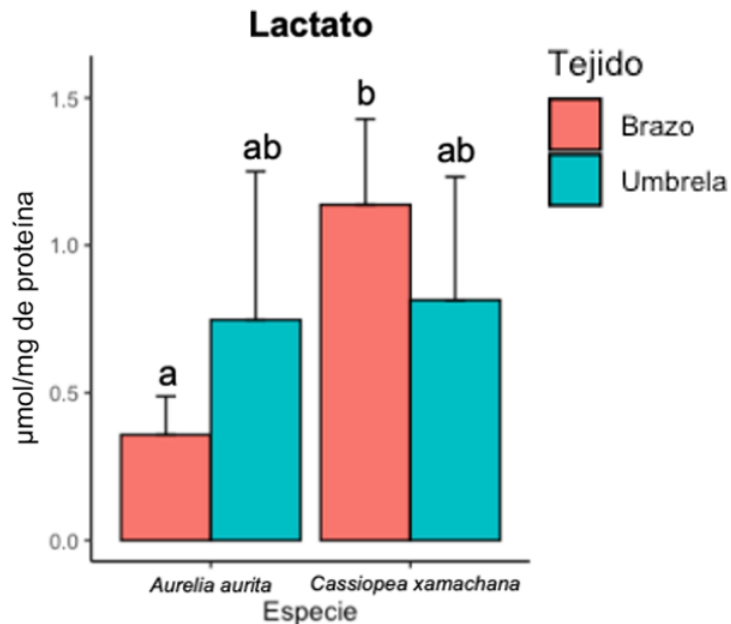
Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre especies y tejido de acuerdo con el ANOVA de 2 factores y el test de Tukey.

#### 4.2.4. Niveles de lactato

Los niveles de lactato en brazos orales y umbrela fueron, respectivamente, de  $0.36 \pm 0.13$  y  $0.75 \pm 0.50 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína en *Aurelia aurita* y  $1.14 \pm 0.29$  y  $0.81 \pm 0.42 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína en *Cassiopea xamachana* (Tabla 4).

El análisis estadístico de los resultados mediante ANOVA de dos vías puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los niveles de lactato en *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* ( $p = 0.008061$ , Tabla S5). Sin embargo, estas diferencias significativas fueron encontradas entre brazos de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* ( $p = 0.0037240$ , Tabla S6), siendo los niveles de lactato mayores en *Cassiopea xamachana* (Figura 11). No obstante, no se detectaron diferencias significativas entre umbrela de *Cassiopea xamachana* y brazos de *Aurelia aurita* ( $p = 0.1372281$ , Tabla S6), brazos de *Cassiopea xamachana* y umbrela de *Aurelia aurita* ( $p = 0.1874844$ , Tabla S6) y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* ( $p = 0.9841980$ , Tabla S6).

Mientras que el ANOVA de dos vías no mostró una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre tejidos ( $p = 0.870318$ , Tabla S5). Confirmándose con los resultados obtenidos del test *post hoc* de Tukey entre brazos y umbrela de *Aurelia aurita* ( $p = 0.2455702$ , Tabla S6) y *Cassiopea xamachana* ( $p = 0.3340720$ , Tabla S6).



**Figura 11.** Niveles de lactato analizados en brazos y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*.

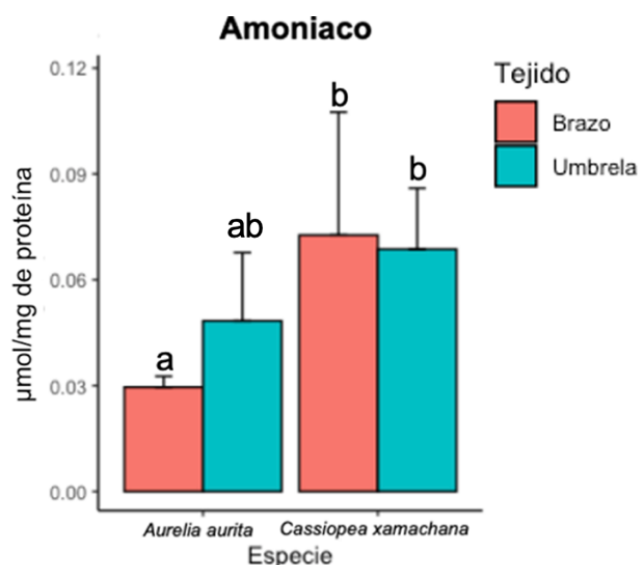
Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre especies y tejido de acuerdo con el ANOVA de 2 factores y el test de Tukey.

#### 4.2.5. Niveles de amoniaco

Los niveles de amoniaco en brazos orales y umbrela fueron, respectivamente, de  $0.029 \pm 0.003$  y  $0.048 \pm 0.019 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína en *Aurelia aurita* y  $0.073 \pm 0.035$  y  $0.069 \pm 0.017 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína en *Cassiopea xamachana* (Tabla 4).

Los resultados del test de Kruskal-Wallis tomando la especie como factor mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los niveles de amoniaco en *Aurelia aurita* y *Cassiopea xamachana* ( $p = 0.003615$ , Tabla S7). De acuerdo con la prueba de Dunn ajustando los valores de p con el método de Benjamini-Hochberg, estas en concreto se encontraron en los niveles de amoniaco entre umbrela de *Cassiopea xamachana* y brazos de *Aurelia aurita* ( $p = 0.007495445$ , Tabla S8), siendo estos mayores en *Cassiopea xamachana* (Figura 12). Mientras que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre brazos de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* ( $p = 0.007327823$ , Tabla S8), brazos de *Cassiopea xamachana* y umbrela de *Aurelia aurita* ( $p = 0.287169605$ , Tabla S8) y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* ( $p = 0.336637080$ , Tabla S8).

Por el contrario, el test de Kruskal-Wallis no determinó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los niveles de amoniaco entre tejidos ( $p = 0.3184$ , Tabla S7). Estas diferencias no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) entre brazos y umbrela de *Aurelia aurita* ( $p = 0.085848287$ , Tabla S8) y *Cassiopea xamachana* ( $p = 0.820280098$ , Tabla S8), de acuerdo con la prueba de Dunn ajustando los valores de p con el método de Benjamini-Hochberg.



**Figura 12.** Niveles de amoniaco analizados en brazos y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre especies y tejido de acuerdo con el test de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn ajustando los valores de p con el método de Benjamini-Hochberg.

#### 4.2.6. Actividad carboxilesterasa

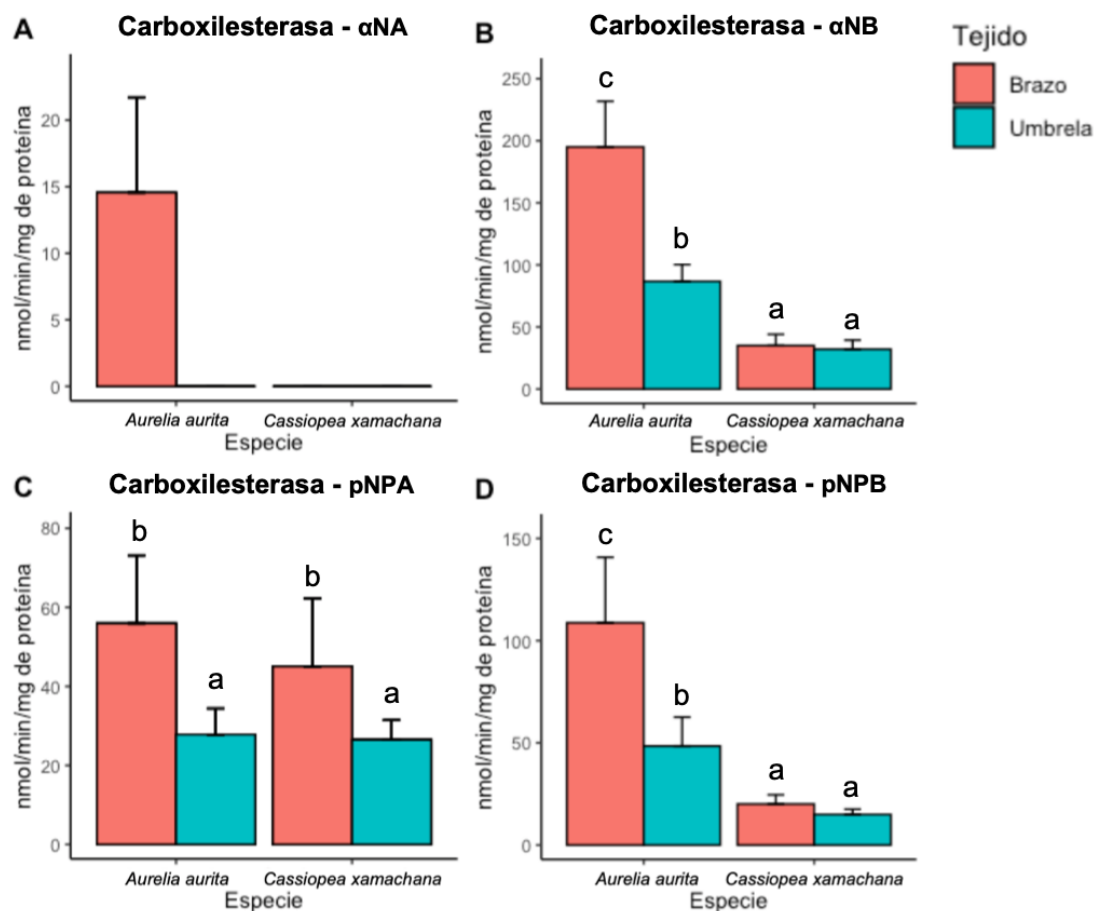
El estudio realizado por Jiménez (2020) determinó la actividad de la enzima de fase I del sistema de biotransformación de xenobióticos carboxilesterasa en brazos orales y umbrela de los mismos ejemplares de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* mediante 4 sustratos distintos: acetato de  $\alpha$ -naftilo ( $\alpha$ NA), butirato de  $\alpha$ -naftilo ( $\alpha$ NB), acetato de p-nitrofenilo (pNPA) y butirato de p-nitrofenilo (pNPB).

Como se observa en la Figura 13A, la actividad carboxilesterasa cuando se empleó como sustrato acetato de  $\alpha$ -naftilo, se detectó únicamente en brazos orales de *Aurelia aurita* con una actividad de  $14.55 \pm 7.16$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína (Tabla 4, Jiménez, 2020).

En el caso de butirato de  $\alpha$ -naftilo, la actividad de la carboxilesterasa en brazos orales y umbrela fue, respectivamente, de  $195.02 \pm 36.82$  y  $86.7 \pm 13.65$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína en *Aurelia aurita* y  $35.04 \pm 8.99$  y  $32.03 \pm 7.32$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína en *Cassiopea xamachana* (Tabla 4). La Figura 13B muestra que a partir de los resultados del ANOVA de dos vías se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tejido, especie y para la interacción entre ambos. El test *post hoc* de Tukey determinó que las diferencias significativas se encontraron entre todos los grupos excepto entre la umbrela y los brazos de *Cassiopea xamachana* (Jiménez, 2020).

Cuando se empleó acetato de p-nitrofenilo como sustrato, la actividad de la carboxilesterasa en brazos orales y umbrela fue, respectivamente, de  $55.93 \pm 17.22$  y  $27.82 \pm 6.59$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína en *Aurelia aurita* y  $45.03 \pm 17.22$  y  $26.48 \pm 4.96$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína en *Cassiopea xamachana* (Tabla 4). A partir de la prueba de ANOVA de dos vías, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre especies. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la actividad carboxilesterasa entre tejidos, siendo esta mayor en brazos orales en ambas especies (Figura 13C, Jiménez, 2020).

La actividad de la carboxilesterasa estudiada mediante la hidrólisis de butirato de p-nitrofenilo en brazos orales y umbrela fue, respectivamente, de  $108.78 \pm 32.03$  y  $48.42 \pm 14.15$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína en *Aurelia aurita* y  $20.07 \pm 4.50$  y  $14.94 \pm 2.60$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína en *Cassiopea xamachana* (Tabla 4). Como se puede apreciar en la Figura 13D, los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tejido, especie y para la interacción entre ambos. Estas diferencias se encontraron entre todos los grupos excepto entre ambos tejidos de estudio de *Cassiopea xamachana* de acuerdo con el test *post hoc* de Tukey (Jiménez, 2020).

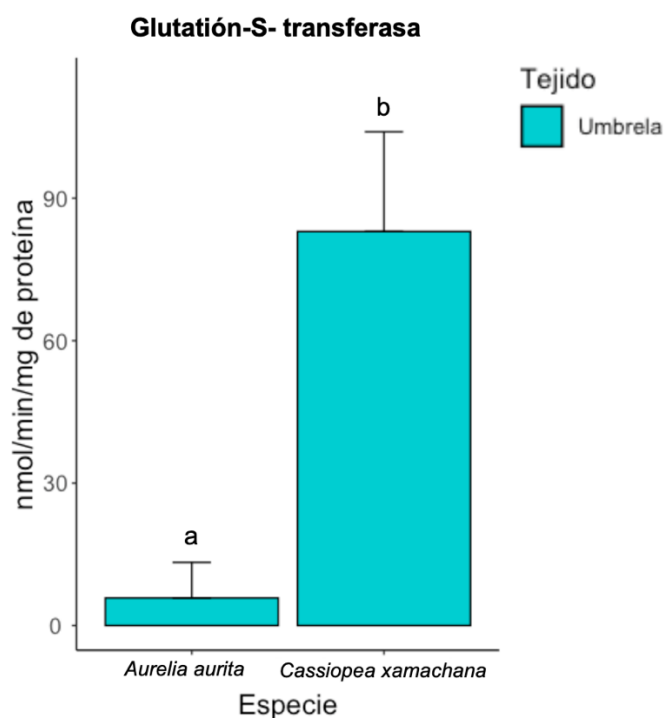


**Figura 13.** Actividad de la carboxilesterasa analizada en brazos y umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita* empleando como sustrato A) acetato de  $\alpha$ -naftilo, B) butirato de  $\alpha$ -naftilo, C) acetato de p-nitrofenilo y D) butirato de p-nitrofenilo. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre especies de acuerdo con el ANOVA de 2 factores y el test de Tukey.

#### 4.2.7. Actividad glutatión-S-transferasa

La actividad glutatión-S-transferasa en la umbrela fue de  $5.8 \pm 7.5$  y  $83 \pm 21$   $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína para *Aurelia aurita* y *Cassiopea xamachana*, respectivamente (Tabla 4, Jiménez, 2020).

De acuerdo con Jiménez (2020), el *test t* de Student para muestras independientes determinó que los resultados obtenidos para la actividad de la enzima de fase II del sistema de biotransformación glutatión-S-transferasa en la umbrela de *Aurelia aurita* y *Cassiopea xamachana* muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), siendo esta actividad mayor en *Cassiopea xamachana* (Figura 14).



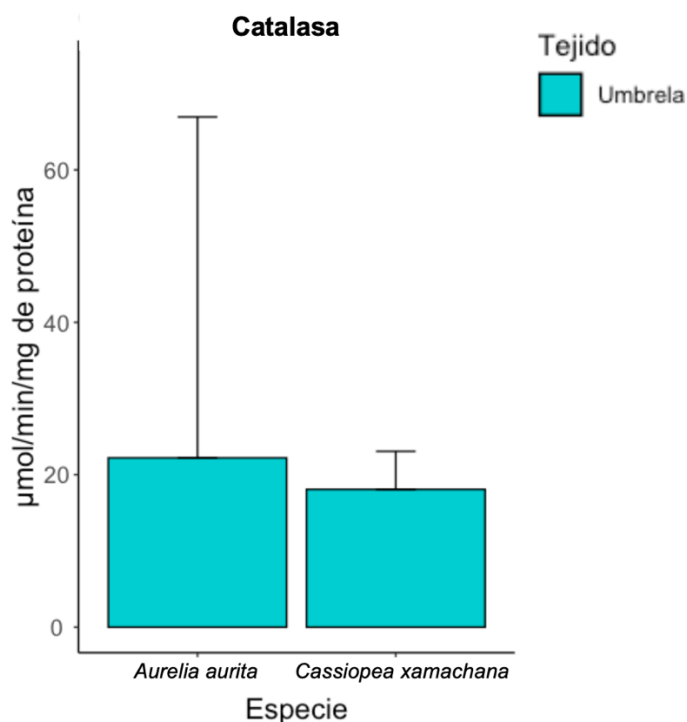
**Figura 14.** Actividad de la glutación-S-transferasa en umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*.

Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre especies de acuerdo con el *test t* de Student para muestras independientes.

#### 4.2.8. Actividad catalasa

Los resultados obtenidos por Jiménez (2020) para la actividad catalasa en umbrela fueron de  $22.2 \pm 44.74$  y  $18.07 \pm 4.99 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína para *Aurelia aurita* y *Cassiopea xamachana*, respectivamente (Tabla 4).

En la Figura 15 se puede apreciar que la actividad catalasa fue superior en umbrela de *Aurelia aurita* en comparación con *Cassiopea xamachana*, sin embargo, de acuerdo con el *test t* de Student para muestras independientes las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre ambas especies (Jiménez, 2020).



**Figura 15.** Actividad de la catalasa en umbrela de *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar.

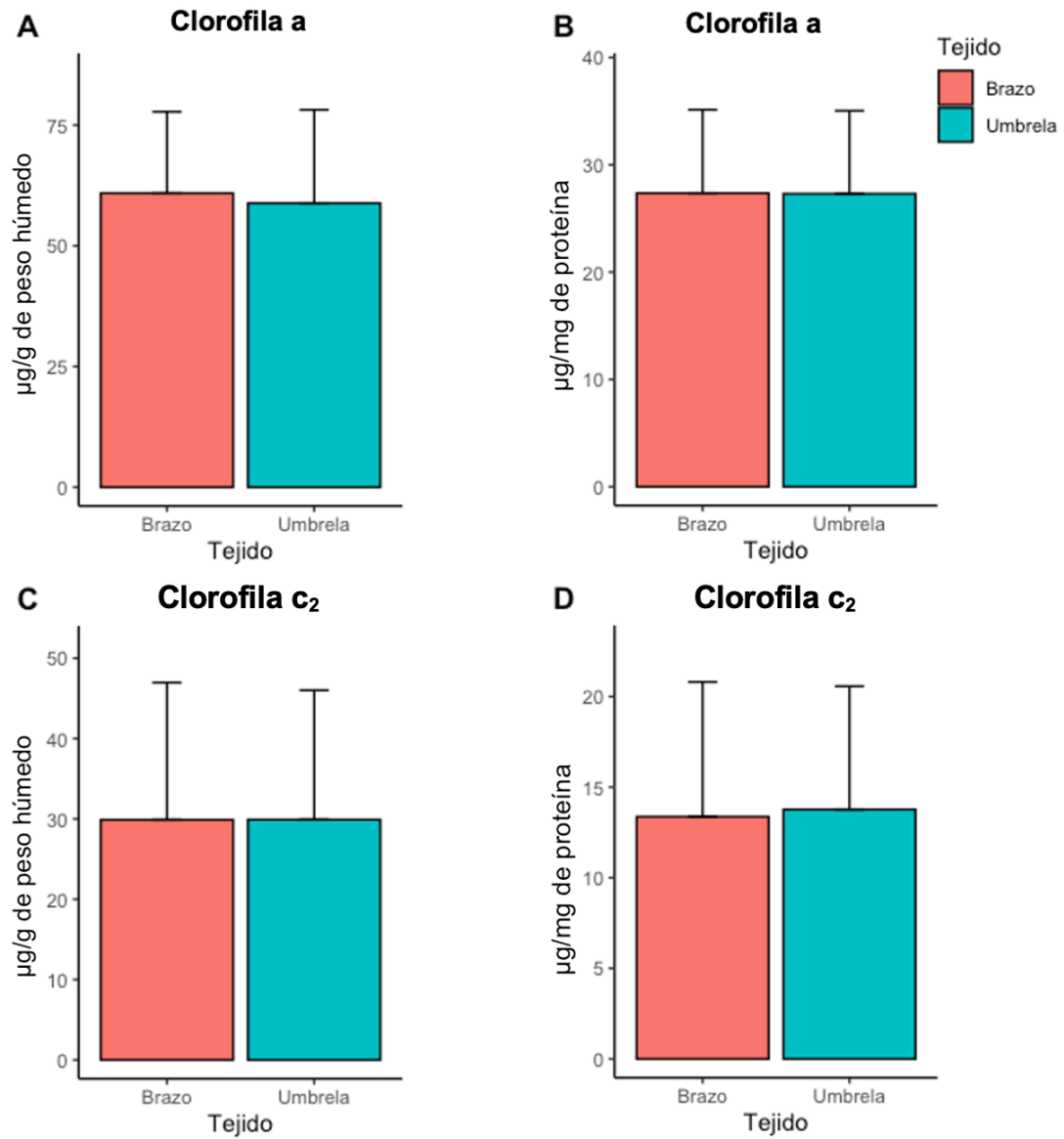
#### 4.2.9. Densidad de zooxantelas

La concentración de clorofila a y  $c_2$  utilizada como indicador de la densidad de zooxantelas se recoge Tabla 5 (Figura 16).

Los resultados del *test t* de Student para muestras independientes señalan que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre tejidos en la concentración de clorofila a por gramo de peso húmedo de tejido ( $p = 0.8225$ , Tabla S9) y por contenido en proteína ( $p = 0.9886$ , Tabla S9) y clorofila  $c_2$  por gramo de peso húmedo de tejido ( $p = 0.954$ , Tabla S9) y por contenido en proteína ( $p = 0.9556$ , Tabla S9).

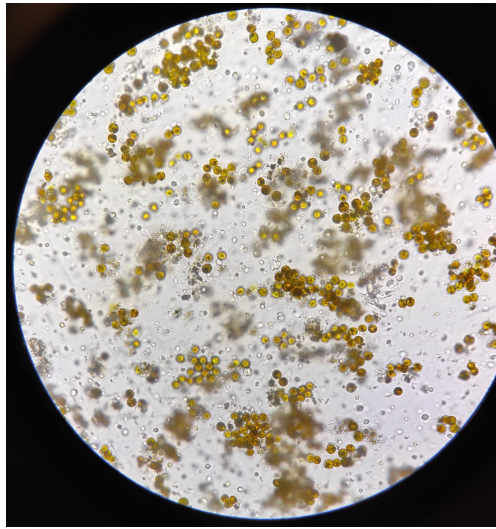
**Tabla 5.** Concentración de clorofila a y  $c_2$  respecto al peso húmedo y proteína en función del tejido. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar, entre paréntesis se indica el número de muestras.

Tejido	Clorofila a		Clorofila $c_2$	
	$\mu\text{g g}^{-1}$ de peso húmedo	$\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína	$\mu\text{g g}^{-1}$ de peso húmedo	$\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína
Brazos	$60.91 \pm 16.85$ (8)	$27.36 \pm 7.77$ (8)	$29.89 \pm 17.07$ (8)	$13.37 \pm 7.44$ (8)
Umbrela	$58.84 \pm 19.33$ (8)	$27.30 \pm 7.74$ (8)	$29.91 \pm 16.11$ (8)	$13.77 \pm 6.80$ (8)



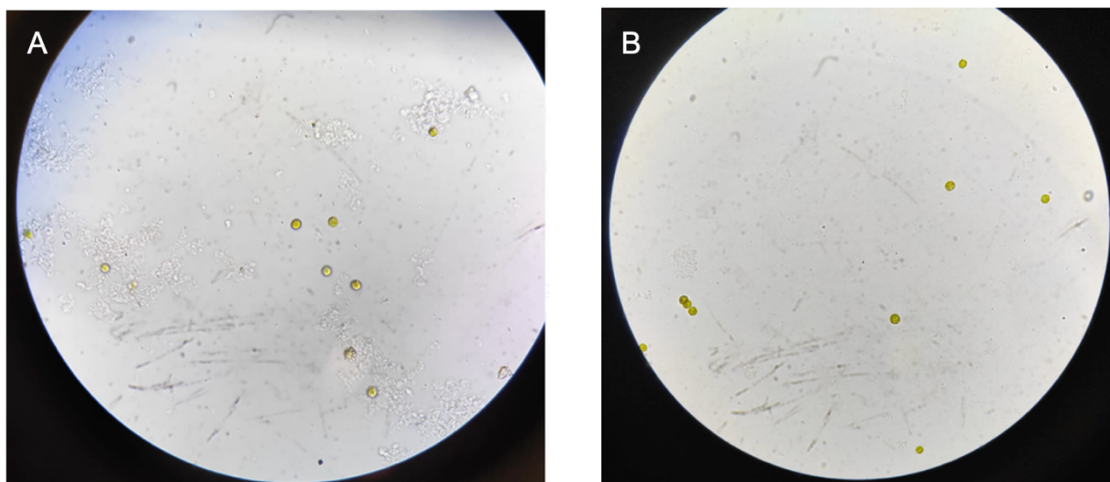
**Figura 16.** Concentración de A) clorofila a por gramo de peso húmedo de tejido, B) clorofila a por contenido en proteína, C) clorofila c<sub>2</sub> por gramo de peso húmedo de tejido y D) clorofila c<sub>2</sub> por contenido en proteína analizados en brazos y umbrela de *Cassiopea xamachana*. Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Como se observa en la Figura 17, tras aplicar el protocolo de dos pasos empleado por Krediet et al. (2015) las células del simbiote se encontraban en las células gastrodémicas del escifozoo y presentaban una coloración marrón.



**Figura 17.** Vista al microscopio óptico del extracto de zooxantelas obtenido después del protocolo de dos pasos empleado por Krediet et al. (2015), 40X.

Utilizando la metodología con NaOH propuesta por Zamoum y Furla (2012) se logró liberar las células de *Symbiodinium microadriaticum* de la gastrodermis de *Cassiopea xamachana*. Sin embargo, se observó que las células presentaban una coloración verde, algunas células seguían adheridas a tejido de medusa (Figura 18A) y otras se encontraban unidas formando cadenas (Figura 18B).



**Figura 18.** Vista al microscopio óptico del extracto de zooxantelas obtenido después del protocolo con NaOH utilizado por Zamoum y Furla (2012), 40X.

En la Tabla 6 se muestran los coeficientes de correlación de Spearman ( $r_s$ ) y el nivel de significancia  $p$  entre los biomarcadores bioquímicos y fisiológicos estudiados en *Aurelia aurita*. Esta tabla sugiere, una correlación negativa entre la actividad de la enzima glutatión reductasa y el grado de peroxidación lipídica en la umbrela ( $r_s = -0.94$ ;  $p < 0.01$ ) y entre la actividad de la enzima glutatión reductasa y la glucosa en los brazos ( $r_s = -0.83$ ;  $p < 0.05$ ). También se detectó una correlación positiva en la umbrela entre los niveles de lactato y amoníaco ( $r_s = 0.71$ ;  $p < 0.05$ ), entre los niveles de lactato y glucosa ( $r_s = 0.76$ ;  $p < 0.05$ ) y entre los niveles de amoníaco y glucosa ( $r_s = 0.83$ ;  $p < 0.05$ ).

**Tabla 6.** Matriz de los coeficientes de correlación de Spearman entre los biomarcadores bioquímicos y fisiológicos determinados en *Aurelia aurita*.

<i>Aurelia aurita</i>		Umbrela					Brazos				
		LPO	GR	Lactato	Amoníaco	Glucosa	LPO	GR	Lactato	Amoníaco	Glucosa
Umbrela	LPO										
	GR	-0.94**									
	Lactato	ns	ns								
	Amoníaco	ns	ns	0.71*							
	Glucosa	ns	ns	0.76*	0.83*						
Brazos	LPO	ns	ns	ns	ns	ns					
	GR	ns	ns	ns	ns	ns	ns				
	Lactato	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
	Amoníaco	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
	Glucosa	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.83*	ns	ns	

Nivel de significación: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . ns: no significativa

En la Tabla 7, se indica la relación entre los biomarcadores bioquímicos y fisiológicos estudiados en *Cassiopea xamachana* como coeficiente de correlación ( $r_s$ ) y el nivel de significancia  $p$ . Se observó una correlación positiva entre el grado de peroxidación lipídica en brazos y umbrela ( $r_s = 0.91$ ,  $p < 0.01$ ), entre los niveles de amoníaco y lactato en umbrela ( $r_s = 0.76$ ,  $p < 0.05$ ) y entre la actividad glutatión reductasa y la concentración de clorofila a ( $r_s = 0.76$ ,  $p < 0.05$ ) y  $c_2$  ( $r_s = 0.81$ ,  $p < 0.05$ ) respecto a la proteína en brazos. Además de correlaciones positivas entre clorofila a y  $c_2$  por gramo de peso húmedo de tejido y por contenido en proteína en ambos tejidos. Por el contrario, se correlacionó negativamente la actividad glutatión reductasa en umbrela y brazos ( $r_s = -0.78$ ,  $p < 0.05$ ), el grado de peroxidación lipídica en brazos y clorofila a respecto al peso ( $r_s = -0.71$ ,  $p < 0.05$ ) y clorofila  $c_2$  respecto a la proteína ( $r_s = -0.76$ ,  $p < 0.05$ ) en umbrela, entre la actividad glutatión reductasa en brazos y los niveles de lactato ( $r_s = -0.71$ ,  $p < 0.05$ ) y amoníaco ( $r_s = -0.76$ ,  $p < 0.05$ ) en umbrela y entre los niveles de amoníaco en umbrela y clorofila a ( $r_s = -0.86$ ,  $p < 0.05$ ) y  $c_2$  ( $r_s = -0.81$ ,  $p < 0.05$ ) respecto a la proteína en brazos.

**Tabla 7.** Matriz de los coeficientes de correlación de Spearman entre los biomarcadores bioquímicos y fisiológicos determinados en *Cassiopea xamachana*.

<i>Cassiopea xamachana</i>	Umbrela										Brazos									
	LPO	GR	Lactato	Amoniaco	Glucosa	Cla a <sup>A</sup>	Cla c <sub>2</sub> <sup>A</sup>	Cla a <sup>B</sup>	Cla c <sub>2</sub> <sup>B</sup>		LPO	GR	Lactato	Amoniaco	Glucosa	Cla a <sup>A</sup>	Cla c <sub>2</sub> <sup>A</sup>	Cla a <sup>B</sup>	Cla c <sub>2</sub> <sup>B</sup>	
Umbrela	LPO																			
	GR	ns																		
	Lactato	ns	ns																	
	Amoniaco	ns	ns	0.76*																
	Glucosa	ns	ns	ns	ns															
	Cla a <sup>A</sup>	ns	ns	ns	ns	ns														
	Cla c <sub>2</sub> <sup>A</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	0.98**													
	Cla a <sup>B</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	0.74*	0.79*												
Cla c <sub>2</sub> <sup>B</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	0.88**	0.91**	0.91**												
Brazos	LPO	0.91**	ns	ns	ns	ns	-0.71*	ns	ns	-0.76*										
	GR	ns	0.78*	-0.71*	-0.76*	ns	ns	ns	ns	ns										
	Lactato	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns							
	Amoniaco	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns						
	Glucosa	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns					
	Cla a <sup>A</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns					
	Cla c <sub>2</sub> <sup>A</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.98**				
	Cla a <sup>B</sup>	ns	ns	ns	-0.86**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.76*	ns	ns	ns	0.76*	0.79*			
Cla c <sub>2</sub> <sup>B</sup>	ns	ns	ns	-0.81*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.81*	ns	ns	ns	0.93**	0.99**	0.98**			

Nivel de significación: \*p<0,05; \*\*p<0,01. ns: no significativa. <sup>A</sup> Clorofila respecto al peso húmedo de tejido, <sup>B</sup> Clorofila respecto al contenido de proteína.



## 5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se establecen los procedimientos experimentales y los niveles basales de una batería de biomarcadores bioquímicos y fisiológicos en las medusas *Cassiopea xamachana*, una especie endosimbiótica, y *Aurelia aurita*, una aposimbiótica.

Los factores biológicos han sido cuestionados a la hora de seleccionar un biomarcador para su seguimiento (Solé et al., 2006). De acuerdo con Berthet (2015) para evitar cualquier influencia de estos posibles factores, todos los organismos deben ser lo más uniformes posible en cuanto a edad y tamaño. Para trabajar sobre poblaciones estadísticamente homogéneas y evitar esta variabilidad intraespecífica que se presenta en individuos tomados en su medio natural, se emplearon poblaciones mantenidas en los acuarios del Oceanogràfic. Además, ello aseguró que las cohortes utilizadas en los experimentos no habían sufrido una exposición a contaminantes. Sin embargo, de acuerdo con Athrey et al. (2007) el mantenimiento de las poblaciones en el laboratorio produce una pérdida de variación genética. Por lo que se deberá tener en cuenta el posible cambio de patrón genético cuando se extrapolen en estudios futuros los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio a poblaciones naturales.

Las medusas tienen cuerpos gelatinosos que consisten principalmente en agua, representando ésta más del 95% en peso (Kogovšek et al., 2014). Estas características dificultan la medición de los biomarcadores y hacen necesaria la adaptación de los protocolos experimentales establecidos en otros organismos. En el presente estudio se han desarrollado los procedimientos prácticos para la determinación de la actividad de la GR, el grado de LPO y los niveles de glucosa, lactato y amoníaco en los brazos orales y la umbrela de ambas especies. Del mismo modo, en el estudio previo realizado por Jiménez (2020) se establecieron para cuantificar la actividad de las enzimas CAT, CbE y GST.

El grado de peroxidación lipídica en términos de concentración de MDA observados difirieron entre *Cassiopea xamachana* y *Aurelia aurita*, siendo significativamente menores en la primera en ambos tejidos de estudio. Los resultados obtenidos en *Cassiopea xamachana* son ligeramente inferiores a los descritos por Aljbour et al. (2019) en brazos orales en organismos control de *Cassiopea sp.* los cuales mostraron valores alrededor de 1.5 nmol g<sup>-1</sup> de peso húmedo y por Aljbour et al. (2018) en organismos recolectados del medio natural con una media en torno a 3.5 nmol g<sup>-1</sup> de peso húmedo. En cambio, no se han encontrado datos disponibles sobre la peroxidación lipídica en *Aurelia aurita*. Sin embargo, los niveles de MDA observados son bajos en comparación con los observados en otros cnidarios como el coral *Sarcophyton glaucum*, con 14 nmol

$\text{g}^{-1}$  de peso húmedo (Cima et al., 2013), y la anémona *Stichodactyla haddoni*, con  $25 \text{ nmol g}^{-1}$  de peso húmedo (Prakash et al., 2022).

La actividad de la glutatión reductasa determinada difiere entre ambas especies, siendo significativamente menor en *Aurelia aurita* tanto en umbrela como en brazos orales. Los datos de GR en escifozoos no son extensos, sin embargo, los estudios de esta enzima antioxidante en otros cnidarios muestran una amplia variabilidad. La anémona *Exaiptasia pallida*, con  $3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína, muestra valores similares a los obtenidos en *Aurelia aurita* (Patel & Bielmyer-Fraser, 2015). Mientras que la anémona *Stichodactyla haddoni*, con  $10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína (Prakash et al., 2022), y el coral *Pocillopora damicornis*, con  $12 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína (Murphy et al., 2019), presentan valores más próximos a los obtenidos para *Cassiopea xamachana*.

En el estudio llevado a cabo por Aljbour et al. (2019) en organismos de *Cassiopea sp.* recolectados a lo largo de la línea costera del Golfo de Aqaba (Jordania) se observa que no hay diferencias significativas en el contenido de MDA entre organismos recolectados en sitios contaminados en comparación con sitios de referencia, lo que indica la capacidad de las medusas para mantener bajo control las ROS. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una relación inversa entre el grado de peroxidación lipídica y la actividad glutatión reductasa para ambos tejidos en las dos especies, lo que sugiere que la defensa antioxidante de la GR en los escifozoos podría ser responsable de controlar los niveles de ROS y por lo tanto de evitar la LPO. Esta tendencia se corrobora con la correlación negativa observada entre la LPO y la GR en umbrela de *Aurelia aurita*.

Los niveles de glucosa, lactato y amoníaco muestran diferencias significativas entre ambas especies. Dichos metabolitos no han sido ampliamente estudiados en escifozoos. Existe un trabajo precedente relacionado con los niveles de glucosa y lactato en escifozoos, determinados en *Stomolophus meleagris* por Nevarez-Lopez et al. (2020). Las observaciones realizadas coinciden con dicho estudio en la tendencia de unos niveles de lactato inferiores que los de glucosa, sin embargo, no se pueden hacer comparaciones cuantitativas de los datos debido a que en dicho trabajo se expresa la medida de los niveles de glucosa y lactato en  $\text{mg}$  por gramo de peso húmedo, mientras que en el presente estudio las unidades empleadas son  $\mu\text{moles}$  por proteína. En este caso, los cnidarios son la fuente de comparación filogenética más cercana descrita en la literatura. En el estudio realizado por Vitale et al. (2020) se detectaron niveles de glucosa, lactato y amoníaco en las anémonas *Anemonia sulcata* y *Actinia equina*, superiores a los observados en *Aurelia aurita* y *Cassiopea xamachana*.

Los tres metabolitos determinados muestran en el caso de *Aurelia aurita* mayor concentración en la umbrela, mientras que en el de *Cassiopea xamachana* ocurre en los brazos orales. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la presencia del simbionte en *Cassiopea xamachana*, ya que se ha descrito que el amoníaco y la glucosa son los principales metabolitos translocados en la interacción cnidario-zooxantela en antozoos (Burriesci et al., 2012; Furla et al., 2005). Además, el estudio realizado por Cates y McLaughlin (1976) determinó las tasas de excreción de amoníaco en organismos aposimbótico y simbiótico de *Cassiopea sp.*, las diferencias observadas sugieren que las zooxantelas eliminan el amoníaco producido por el huésped y ayudan en el reciclaje del nitrógeno. En el presente estudio, se observa una correlación positiva entre los niveles de amoníaco en umbrela y clorofila a y  $c_2$  respecto a la proteína en brazos de *Cassiopea xamachana*. Por lo tanto, sería necesario realizar un estudio de la relación simbiótica que se da entre *Symbiodinium microadriaticum* y *Cassiopea xamachana* para determinar la translocación de dichos metabolitos.

La caracterización de carboxilesterasas en organismos biomonitores es de gran relevancia ya que es necesario utilizar un sustrato específico para cada isoforma específica y el uso indebido de este puede proporcionar información errónea para estudios posteriores (Ferreira et al., 2010). Los resultados obtenidos por Jiménez (2020) muestran una mayor actividad CbE en los brazos orales de *Aurelia aurita* para los 4 sustratos ensayados. Además, en ambas especies el sustrato acetato de  $\alpha$ -naftilo muestra tasas de hidrólisis más bajas, siendo únicamente detectable en brazos de *Aurelia aurita*. La preferencia de sustrato de CbE observadas en brazos y umbrela de *Aurelia aurita* sigue la tendencia:  $\alpha$ NA < pNPA < pNPB <  $\alpha$ NB. Mientras que en *Cassiopea xamachana* las mayores tasas de hidrólisis se alcanzan en la umbrela con  $\alpha$ NB ( $\alpha$ NA < pNPB < pNPA <  $\alpha$ NB) y en los brazos orales con pNPA ( $\alpha$ NA < pNPB <  $\alpha$ NB < pNPA). Por lo tanto, al usar la CbE como biomarcador en las especies de estudio,  $\alpha$ NB parece ser el sustrato más adecuado en brazos y umbrela de *Aurelia aurita* y umbrela de *Cassiopea xamachana*, mientras que pNPA es más adecuado en brazos de *Cassiopea xamachana*.

Las carboxilesterasas han sido estudiadas en diversos organismos acuáticos y terrestres, pero son escasos los estudios realizados en invertebrados marinos (Del Monte-Martínez et al., 2019). Entre ellos, el estudio realizado por Del Monte-Martínez et al. (2019) reportó que la actividad esterasa estudiada en 17 especies del filo Cnidaria empleando el sustrato acetato de p-nitrofenilo está en el rango de 13 a 324 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína (Tabla 8). Los resultados obtenidos por Jiménez (2020) en brazos orales en *Aurelia aurita* y *Cassiopea xamachana* para dicho sustrato muestran una actividad similar a la de la anémona *Lebrunia danae*. Mientras que en el caso de la umbrela los valores observados se aproximan a los presentes en las gorgonias marinas *Iciligorgia schrammi* y *Plexaurella dichotoma*.

En cambio, hasta donde se conoce los sustratos acetato de  $\alpha$ -naftilo, butirato de  $\alpha$ -naftilo y butirato de p-nitrofenilo no han sido ensayados previamente en cnidarios. Sin embargo, un estudio reciente ha reportado la actividad de referencia de carboxilesterasas utilizando los 4 sustratos ensayados por Jiménez (2020) en *Aurelia aurita* y *Cassiopea xamachana* en el órgano hepático de 6 especies de invertebrados marinos (Solé et al., 2021) (Tabla 8). Estos muestran una actividad CbE empleando el sustrato  $\alpha$ NA mucho mayor que la determinada en los brazos orales *Aurelia aurita*. Mientras que los resultados obtenidos para  $\alpha$ NB en *Aurelia aurita* dilucidan en brazos orales más actividad que todas las especies de invertebrados marinos ensayadas por Solé et al. (2021) a excepción del crustáceo *Plesonika martia* y en umbrela una actividad muy similar a *Mytilus galloprovincialis*. En el caso de *Cassiopea xamachana*, ambos tejidos de estudio muestran menor actividad que los moluscos y crustáceos estudiados por Solé et al. (2021). En cambio, cuando se empleó pNPB, se observa en el caso de los brazos orales de *Aurelia aurita* mayor actividad que los moluscos y menor que los crustáceos, pero menor actividad en brazos orales de *Cassiopea xamachana* y umbrela de ambas especies que las 6 especies de estudio de Solé et al. (2021).

Después de caracterizar las actividades basales de la CbE en los diferentes tejidos de las especies postuladas como biomonitores, el siguiente paso será estudiar la sensibilidad a distintos contaminantes y la recuperación según el tejido y el sustrato utilizados en sus mediciones (Otero & Kristoff, 2016).

**Tabla 8.** Media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) para la actividad carboxilesterasa en invertebrados marinos. Fuente: Del Monte-Martínez et al. (2019) y Solé et al. (2021).

Especie	Caroxilesterasa			
	pNPA <sup>A</sup>	pNPB <sup>A</sup>	$\alpha$ NA <sup>A</sup>	$\alpha$ NB <sup>A</sup>
<b>Phylum Cnidaria: Anthozoa</b>				
<i>Iciligorgia schrammi</i> <sup>a</sup>	32 $\pm$ 7	NA	NA	NA
<i>Plexaurella dichotoma</i> <sup>a</sup>	33 $\pm$ 5	NA	NA	NA
<i>Plexaurella grisea</i> <sup>a</sup>	62 $\pm$ 4	NA	NA	NA
<i>Pseudoterogorgia americana</i> <sup>a</sup>	15 $\pm$ 2	NA	NA	NA
<i>Gorgonia ventalina</i> <sup>a</sup>	191 $\pm$ 1	NA	NA	NA
<i>Plexaura homomalla</i> <sup>a</sup>	210 $\pm$ 3	NA	NA	NA
<i>Palythoa caribaeorum</i> <sup>a</sup>	112 $\pm$ 9	NA	NA	NA
<i>Zoanthus pulchellus</i> <sup>a</sup>	96 $\pm$ 8	NA	NA	NA
<i>Ricordea florida</i> <sup>a</sup>	16 $\pm$ 2	NA	NA	NA
<i>Stichodactyla helianthus</i> <sup>a</sup>	148 $\pm$ 11	NA	NA	NA
<i>Condylactis gigantea</i> <sup>a</sup>	324 $\pm$ 9	NA	NA	NA
<i>Lebrunia danae</i> <sup>a</sup>	49 $\pm$ 3	NA	NA	NA
<i>Bartholomea annulata</i> <sup>a</sup>	190 $\pm$ 7	NA	NA	NA
<i>Bunodosoma granulifera</i> <sup>a</sup>	222 $\pm$ 3	NA	NA	NA
<b>Phylum Cnidaria: Scyphozoa</b>				
<i>Cassiopeia xamachana</i> <sup>a</sup>	13 $\pm$ 3	NA	NA	NA
<b>Phylum Cnidaria: Hydrozoa</b>				
<i>Millepora complanata</i> <sup>a</sup>	94 $\pm$ 2	NA	NA	NA
<i>Physalia physalis</i> <sup>a</sup>	100 $\pm$ 6	NA	NA	NA
<b>Phylum Mollusca</b>				
<i>Mytilus galloprovincialis</i> <sup>b</sup>	45.02 $\pm$ 2.80	67.21 $\pm$ 5.21	73.08 $\pm$ 5.10	85.87 $\pm$ 5.19
<i>Cerastoderma edule</i> <sup>b</sup>	42.69 $\pm$ 3.18	50.24 $\pm$ 4.46	65.09 $\pm$ 2.71	121.33 $\pm$ 13.10
<i>Solen marginatus</i> <sup>b</sup>	77.46 $\pm$ 4.13	83.72 $\pm$ 9.05	191.94 $\pm$ 8.03	115.63 $\pm$ 9.84
<i>Bolinus brandaris</i> <sup>b</sup>	67.66 $\pm$ 4.82	69.73 $\pm$ 9.72	48.02 $\pm$ 2.63	61.45 $\pm$ 5.12
<b>Phylum Arthropoda</b>				
<i>Macropipus tuberculatus</i> <sup>b</sup>	67.88 $\pm$ 3.76	169.10 $\pm$ 8.60	78.12 $\pm$ 4.21	114.5 $\pm$ 6.01
<i>Plesonika martia</i> <sup>b</sup>	244.93 $\pm$ 24.26	261.36 $\pm$ 24.86	366.65 $\pm$ 31.37	247.96 $\pm$ 19.73

<sup>A</sup> Datos en nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, <sup>a</sup> Datos de Del Monte-Martínez et al. (2019), <sup>b</sup> Datos de Solé et al. (2021),  $\alpha$ NA = acetato de  $\alpha$ -naftilo,  $\alpha$ NB = butirato de  $\alpha$ -naftilo, pNPA = acetato de p-nitrofenilo, pNPB = butirato de p-nitrofenilo, NA = medida no analizada.

Los resultados obtenidos para la actividad glutatión-S-transferasa en la umbrela de *Aurelia aurita* y *Cassiopea xamachana* muestran diferencias significativas, siendo menores en la primera (Jiménez, 2020). Mientras que no se observan diferencias en la actividad catalasa en la umbrela entre *Aurelia aurita* y *Cassiopea xamachana* (Jiménez, 2020). Hasta donde sabemos, no existen otros estudios en los que se haya realizado la caracterización de dichas actividades enzimáticas para especies de escifozoos, por lo que no se pueden realizar comparaciones dentro de la clase Scyphozoa. Los resultados reportados en otros cnidarios muestran una amplia variabilidad.

Por una parte, la actividad GST en ambas especie de estudio es superior a los observada en el coral *Sarcophyton glaucum*,  $1.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  (Cima et al., 2013), la anemona *Stichodactyla haddoni*,  $3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  (Prakash et al., 2022) e inferior al coral *Veretillum cynomorium*,  $250 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  (Lopes et al., 2018). Además, en el caso de *Aurelia aurita* es inferior a las especies de corales estudiadas por Dias et al. (2019) y Costa et al. (2021), exceptuando *Sinularia asterolobata* (Tabla 9). En cambio, en el de *Cassiopea xamachana*, únicamente es inferior a *Stylophora pistillata*, *Pocillopora damicornis*, *Echinopora lamellosa* y *Turbinaria reniformis*, 4 de las 11 especies estudiadas por Dias et al. (2019) y Costa et al. (2021).

Por otra, los valores obtenido en *Aurelia aurita* y *Cassiopea xamachana* para CAT son superiores a los publicados para diversas especies de corales como los observados por Dias et al. (2019) y Costa et al. (2021) (Tabla 9), *Sarcophyton glaucum*,  $9 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  (Cima et al., 2013) y *Veretillum cynomorium*,  $0.15 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  (Lopes et al., 2018), pero similares a las anemonas *Aiptasia pallida*,  $20 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  (Brock & Bielmyer, 2013) y *Stichodactyla haddoni*, con  $24 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  (Prakash et al., 2022).

**Tabla 9.** Media  $\pm$  desviación estándar (SD) de catalasa y glutatión S-transferasa en cnidarios. Fuente: Dias et al. (2019) y Costa et al. (2021).

Especie	Catalasa	Glutatión-S-transferasa
<i>Acropora tenuis</i> <sup>a</sup>	0.003 $\pm$ 0.001	60 $\pm$ 31
<i>Montipora capricornis</i> morfotipo marrón <sup>a</sup>	0.007 $\pm$ 0.003	12 $\pm$ 4
<i>Montipora capricornis</i> morfotipo verde <sup>a</sup>	0.061 $\pm$ 0.030	34 $\pm$ 17
<i>Turbinaria reniformis</i> <sup>a</sup>	0.069 $\pm$ 0.009	105 $\pm$ 20
<i>Echinopora lamellosa</i> <sup>a</sup>	0.294 $\pm$ 0.047	207 $\pm$ 64
<i>Galaxea fascicularis</i> <sup>a</sup>	0.039 $\pm$ 0.022	64 $\pm$ 15
<i>Pocillopora damicornis</i> <sup>a</sup>	0.014 $\pm$ 0.003	125 $\pm$ 55
<i>Stylophora pistillata</i> <sup>a</sup>	0.005 $\pm$ 0.001	104 $\pm$ 31
<i>Psammocora contigua</i> <sup>a</sup>	0.054 $\pm$ 0.019	70 $\pm$ 12
<i>Sinularia polydactyla</i> <sup>b</sup>	0.390 $\pm$ 0.177	12.141 $\pm$ 3.109
<i>Sinularia asterolobata</i> <sup>b</sup>	10.314 $\pm$ 3.074	4.372 $\pm$ 1.818

<sup>A</sup> Datos en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, <sup>B</sup> Datos en  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, <sup>a</sup> Datos de Dias et al. (2019),

<sup>b</sup> Datos de Costa et al. (2021).

Los simbioses de *Cassiopea xamachana* están adaptados a los ambientes que habitan sus huéspedes y pueden asociarse preferentemente con tejidos que reciben intensidades de luz más altas (Estes et al., 2003). En el presente estudio, no se han observado diferencias significativas en la distribución de *Symbiodinium microadriaticum* empleando como aproximación la concentración de clorofila a y  $c_2$  en brazos y umbrela de *Cassiopea xamachana*. Los valores obtenidos de clorofila a respecto del peso húmedo muestran una alta similitud por los determinados en el estudio realizado por Aljbour et al. (2018), con alrededor de  $60 \mu\text{g mg}^{-1}$  de peso húmedo. Sin embargo, diversos estudios determinan unas densidades de *Symbiodinium microadriaticum* más altas en los brazos orales de *Cassiopea xamachana* que pueden deberse a la mayor iluminación de dicho tejido (Estes et al., 2003; Verde & McCloskey, 1998).

En *Cassiopea xamachana* y otros cnidarios simbióticos, se ha establecido la correlación entre la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de clorofila (Aljbour et al., 2019). Dykens y Shick (1984) establecen que las áreas de tejido que contienen un mayor número de algas simbióticas presentan la mayoría de las actividades totales de SOD y CAT en *Anthopleura elegantissima*. En el estudio realizado por Aljbour et al. (2019), se observa que en *Cassiopea sp.* las actividades de SOD están positivamente correlacionadas con el contenido de clorofila. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una correlación positiva entre la concentración de clorofila a y  $c_2$  y la

actividad de la enzima antioxidante GR en brazos orales de *Cassiopea xamachana*. Esto podría ser debido a que las ROS del simbiote se difunden en la célula huésped y como respuesta del escifozoo, se produce un aumento en la actividad antioxidante (Krueger et al., 2015).

Además, cabe destacar que el enfoque que emplea la concentración de clorofila para evaluar el número de simbioses supone un contenido de pigmento constante por célula de dinoflagelado, mientras que en realidad este a menudo varía estacionalmente y también puede responder a condiciones de estrés. De hecho, la correlación entre el contenido de clorofila y el número de células de *Symbiodinium sp.* puede ser inexistente o incluso negativa, ya que en condiciones de blanqueo, el contenido de clorofila puede permanecer constante o incluso aumentar aunque el número de células de algas esté disminuyendo (Krediet et al., 2015). De acuerdo con los resultados obtenidos por Fonseca et al. (2017) tras exponer al aumento de la temperatura solo y combinado con la exposición al cobre al coral *Mussismilia harttii*, el nivel de clorofila no es un biomarcador sensible del daño a la capacidad fotosintética en los cnidarios.

La metodología empleada por Krediet et al. (2015) para la anémona *Aiptasia sp.* y el coral *Pocillopora damicornis* no resultó efectiva para la liberación de las células de *Symbiodinium microadriaticum* de la gastrodermis de *Cassiopea xamachana*. En cambio, la metodología propuesta por Zamoum y Furla (2012) para la anémona *Anemonia viridis*, la gorgonia *Eunicella singularis* y el coral *Stylophora pistillata* permitió la extracción del simbiote del escifozoo. Sin embargo, se observó que algunas células formaban cadenas o seguían adheridas al tejido de *Cassiopea xamachana* y por lo tanto no se procedió a realizar un conteo preciso por citometría de flujo empleando el método de Krediet et al. (2015). Además, dado el cambio de coloración de las células de marrón a verde, se desconoce cómo afecta el NaOH al simbiote y tras el conteo se deseaba determinar los biomarcadores de estudio en *Cassiopea xamachana* y su simbiote por separado como el estudio realizado por Yakovleva et al. (2004) en los corales *Platygyra ryukyuensis* y *Stylophora pistillata* y sus zooxantelas simbióticas. Por lo tanto, es necesario desarrollar una metodología que permita la separación eficaz de las células del simbiote de la gastrodermis de *Cassiopea xamachana* sin que estas se vean afectadas para lograr un conteo preciso del número de células simbioses y la determinación de los niveles basales de los biomarcadores estudiados.

Los resultados informados podrán ser empleados como base para futuros estudios sobre la evaluación de biomarcadores en las medusas *Aurelia aurita* y *Cassiopea xamachana* en experimentos de exposición a xenobióticos en el laboratorio y como una posible herramienta de biomonitorización para pruebas *in situ*.

Por lo tanto, este es el primer paso para establecer dichas especies como biomonitores de contaminación marina a partir del estudio de biomarcadores bioquímicos y fisiológicos.



## 6. CONCLUSIONES

En relación con los resultados obtenidos, las conclusiones del presente Trabajo de Fin de Grado son:

1. Mediante la adaptación de las metodologías empleadas en otros organismos, se ha logrado establecer los procedimientos prácticos en ambas especies.
2. Los ejemplares estudiados presentaron un diámetro y peso total promedio similar entre organismos de la misma especie.
3. Los biomarcadores analizados muestran rangos entre 0.83-3.18 nmol g<sup>-1</sup> de peso húmedo para la LPO, 3.30-8.36 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína para la GR y 0.78-3.17, 0.36-1.14 y 0.029-0.073 μmol mg<sup>-1</sup> de proteína para la glucosa, el lactato y el amoníaco, respectivamente.
4. La actividad basal muestra rangos entre 14.55-195.02 y 5.8-83 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína para la CbE y la GST, respectivamente y 18.07-22.2 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína para la CAT.
5. No se observan diferencias significativas en la distribución de las algas dinoflageladas entre los brazos orales y la umbrela de *Cassiopea xamachana*.
6. La correlación negativa entre el grado de LPO y la actividad GR en umbrela de *Aurelia aurita* indica que la defensa antioxidante de la GR es responsable de evitar el daño oxidativo en lípidos. Además, la correlación positiva entre la concentración de clorofila y la actividad GR podría ser debida a la respuesta del escifozoo ante la difusión de las ROS del simbiote.



## 7. LÍNEAS FUTURAS

Los cambios en los biomarcadores no solo están relacionados con los contaminantes químicos, sino también con factores abióticos (temperatura, salinidad, turbidez, disponibilidad de alimentos, niveles de oxígeno disuelto etc.) y factores bióticos (ciclo de reproducción, crecimiento, edad, sexo, talla, etc.). Por lo tanto, antes de que los biomarcadores se implementen con éxito, es necesario comprender esta variabilidad para discernir si la alteración de las respuestas biológicas se debe a la presencia de contaminantes o a las variaciones naturales de esos factores en el medio marino evitando así falsos negativos o falsos positivos. Por lo que es necesario la realización de estudios para conocer los efectos de los factores abióticos y bióticos en las respuestas mencionadas para validar el uso de esos biomarcadores en estudios de campo. Estos se podrían llevar a cabo mediante el análisis de los biomarcadores en especímenes recolectados durante más de un año de áreas marinas protegidas (AMPs) y hábitats costeros marinos impactados antropogénicamente.

Además, se debe conocer bien la biología de las especies para diferenciar la señal causada por la exposición al contaminante. Por lo tanto, serán necesarios estudios que establezcan las bases de la relación zooxantela-cnidario.

Por otra parte, también sería conveniente establecer una metodología que permita la separación de las células de *Symbiodinium microadriaticum* de *Cassiopea xamachana* para estudiar las variaciones en los biomarcadores en ambas especies por separado.



## 8. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA

- Aljbour, S. M., Al-Horani, F. A., & Kunzmann, A. (2018). Metabolic and oxidative stress responses of the jellyfish *Cassiopea* to pollution in the Gulf of Aqaba, Jordan. *Marine Pollution Bulletin*, 130, 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.044>
- Aljbour, S. M., Zimmer, M., Al-Horani, F. A., & Kunzmann, A. (2019). Metabolic and oxidative stress responses of the jellyfish *Cassiopea sp.* to changes in seawater temperature. *Journal of Sea Research*, 145, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2018.12.002>
- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., . . . Di Mascio, P. (2007). Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146(4), 588-600. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.040>
- Ames, C. L., Klompen, A. M. L., Badhiwala, K., Muffett, K., Reft, A. J., Kumar, M., . . . Vora, G. J. (2020). Cassiosomes are stinging-cell structures in the mucus of the upside-down jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Communications Biology*, 3(1), Article 67. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0777-8>
- Athrey, N. R., Leberg, P. L., & Klerks, P. L. (2007). Laboratory culturing and selection for increased resistance to cadmium reduce genetic variation in the least killifish, *Heterandria formosa*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(9), 1916-1921. <https://doi.org/10.1897/06-589R.1>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Barata, C., Varó, I., Navarro, J. C., Arun, S., & Porte, C. (2005). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 140(2), 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.013>

- Baudou, F. G., Ossana, N. A., Castañé, P. M., Mastrángelo, M. M., & Ferrari, L. (2017). Cadmium effects on some energy metabolism variables in *Cnesterodon decemmaculatus* adults. *Ecotoxicology*, 26(9), 1250-1258. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1850-z>
- Beliaeff, B., & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6), 1316-1322. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>
- Bender, D. A., & Mayes, P. A. (2021). Sección V. Metabolismo de los carbohidratos. In V. W. Rodwell, D. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, & P. A. Weil (Eds.), *Bioquímica Ilustrada de Harper* (31th ed.). McGraw Hill Brasil.
- Berthet, B. (2015). Reference Species. In C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard, & C. Mouneyrac (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks* (pp. 205-228).
- Bigelow, R. P. (1892). *On a New Species of Cassiopea from Jamaica*.
- Bonanno, G., & Raccuia, S. A. (2018). Seagrass *Halophila stipulacea*: Capacity of accumulation and biomonitoring of trace elements. *Science of The Total Environment*, 633, 257-263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.196>
- Bonanno, G., Veneziano, V., & Piccione, V. (2020). The alga *Ulva lactuca* (Ulvaceae, Chlorophyta) as a bioindicator of trace element contamination along the coast of Sicily, Italy. *Science of the Total Environment*, 699, Article 134329. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134329>
- Bosch-Belmar, M., Giomi, F., Rinaldi, A., Mandich, A., Fuentes, V., Mirto, S., . . . Piraino, S. (2016). Concurrent environmental stressors and jellyfish stings impair caged European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) physiological performances. *Scientific Reports*, 6, Article 27929. <https://doi.org/10.1038/srep27929>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brock, J. R., & Bielmyer, G. K. (2013). Metal accumulation and sublethal effects in the sea anemone, *Aiptasia pallida*, after waterborne exposure to metal mixtures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 158(3), 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.07.001>
- Brusca, R. C., & Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates*. Sinauer Associates.

- Burriesci, M. S., Raab, T. K., & Pringle, J. R. (2012). Evidence that glucose is the major transferred metabolite in dinoflagellate-cnidarian symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 215(19), 3467-3477. <https://doi.org/10.1242/jeb.070946>
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., & Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of The Total Environment*, 247(2-3), 295-311. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4)
- Capo, X., Rubio, M., Solomando, A., Alomar, C., Compa, M., Sureda, A., & Deudero, S. (2021). Microplastic intake and enzymatic responses in *Mytilus galloprovincialis* reared at the vicinities of an aquaculture station. *Chemosphere*, 280, 130575. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130575>
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113, 484-490. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13062-4)
- Cates, N., & McLaughlin, J. J. A. (1976). Differences of ammonia metabolism in symbiotic and aposymbiotic *Condylactus* and *Cassiopea* spp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 21(1), 1-5. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-0981\(76\)90065-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-0981(76)90065-4)
- Cima, F., Ferrari, G., Ferreira, N. G. C., Rocha, R. J. M., Serôdio, J., Loureiro, S., & Calado, R. (2013). Preliminary evaluation of the toxic effects of the antifouling biocide Sea-Nine 211™ in the soft coral *Sarcophyton cf. glaucum* (Octocorallia, Alcyonacea) based on PAM fluorometry and biomarkers. *Marine Environmental Research*, 83, 16-22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.10.004>
- Cossu-Leguille, C., & Vasseur, P. (2013). *Aquatic Biomarkers*. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5704-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5704-2_6)
- Costa, A. P. L., Silva, D. A. M., Rodrigues, A. C. M., Marques, C. R., Soares, A. M. V. M., & Rocha, R. J. M. (2021). Species-specific oxidative stress responses and cellular energy allocation after coral shipping. *Aquaculture Reports*, 19, 100623. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100623>
- da Costa, B., Duarte, A., & Rocha-Santos, T. (2022). Environmental monitoring approaches for the detection of organic contaminants in marine environments: A critical review. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 33, Article e00154. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00154>

- Davy, S. K., Allemand, D., & Weis, V. M. (2012). Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 229-261. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05014-11>
- Del Monte-Martínez, A., González-Bacero, J., Varela, C. M., Vega-Villasante, F., Lalana-Rueda, R., Nolasco, H., . . . Guisán, J. M. (2019). Screening and Immobilization of Interfacial Esterases from Marine Invertebrates as Promising Biocatalyst Derivatives. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189(3), 903-918. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03036-8>
- Devereux, R., Hartl, M. G. J., Bell, M., & Capper, A. (2021). The abundance of microplastics in cnidaria and ctenophora in the North Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 173(Pt A), 112992. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112992>
- Dewan, J. G. (1938). The I(+)glutamic dehydrogenase of animal tissues. *Biochemical Journal*, 32(8), 1378-1385. <https://doi.org/10.1042/bj0321378>
- Dias, M., Ferreira, A., Gouveia, R., Madeira, C., Jogee, N., Cabral, H., . . . Vinagre, C. (2019). Long-term exposure to increasing temperatures on scleractinian coral fragments reveals oxidative stress. *Marine Environmental Research*, 150, 104758. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104758>
- Dykens, J. A., & Shick, J. M. (1984). Photobiology of the Symbiotic Sea Anemone, *Anthopleura elegantissima*: Defenses against Photodynamic Effects, and Seasonal Photoacclimatization. *Biological Bulletin*, 167(3), 683–697. <https://doi.org/10.2307/1541419>
- Domingues, I., Guilhermino, L., Soares, A. M., & Nogueira, A. J. (2007). Assessing dimethoate contamination in temperate and tropical climates: potential use of biomarkers in bioassays with two chironomid species. *Chemosphere*, 69(1), 145-154. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.013>
- Echols, B. S., Smith, A. J., Gardinali, P. R., & Rand, G. M. (2016). The use of ephyrae of a scyphozoan jellyfish, *Aurelia aurita*, in the aquatic toxicological assessment of Macondo oils from the Deepwater Horizon incident. *Chemosphere*, 144, 1893-1900. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.082>
- Enrique-Navarro, A., Huertas, E., Flander-Putrlé, V., Bartual, A., Navarro, G., Ruiz, J., Malej, A., & Prieto, L. (2022). Living Inside a Jellyfish: The Symbiosis Case Study of Host-Specialized Dinoflagellates, “Zooxanthellae”, and the Scyphozoan

- Cotylorhiza tuberculata. *Frontiers in Marine Science*.  
<https://doi.org/10.3389/fmars.2022.817312>
- Epstein, H., Templeman, M., & Kingsford, M. (2016). Fine-scale detection of pollutants by a benthic marine jellyfish. *Marine Pollution Bulletin*, 107(1), 340-346.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.027>
- Estes, A.M., Kempf, S.C., & Henry, R.P. (2003). Localization and Quantification of Carbonic Anhydrase Activity in the Symbiotic Scyphozoan *Cassiopea xamachana*. *Biological Bulletin*, 204(3), 278-289.  
<https://doi.org/10.2307/1543599>
- Fernández, B., Campillo, J. A., Martínez-Gómez, C., & Benedicto, J. (2012). Assessment of the mechanisms of detoxification of chemical compounds and antioxidant enzymes in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean coastal sites. *Chemosphere*, 87(11), 1235-1245.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.024>
- Ferreira, N. G. C., Santos, M. J. G., Domingues, I., Calhoa, C. F., Monteiro, M., Amorim, M. J. B., . . . Loureiro, S. (2010). Basal levels of enzymatic biomarkers and energy reserves in *Porcellionides pruinosus*. *Soil Biology & Biochemistry*, 42(12), 2128-2136. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.008>
- Fonseca, J. D. S., Marangoni, L. F. B., Marques, J. A., & Bianchini, A. (2017). Effects of increasing temperature alone and combined with copper exposure on biochemical and physiological parameters in the zooxanthellate scleractinian coral *Mussismilia harttii*. *Aquatic Toxicology*, 190, 121-132.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.07.002>
- Fowler, S., Teysse, J., Cotret, O., Danis, B., Rouleau, C., & Warnau, A. (2004). Applied radiotracer techniques for studying pollutant bioaccumulation in selected marine organisms (jellyfish, crabs and sea stars). *Nukleonika*, 49(3), 97-100.
- Furla, P., Allemand, D., Shick, J. M., Ferrier-Pagès, C., Richier, S., Plantivaux, A., . . . Tambutté, S. (2005). The Symbiotic Anthozoan: A Physiological Chimera between Alga and Animal. *Integrative and Comparative Biology*, 45(4), 595-604.  
<https://doi.org/10.1093/icb/45.4.595>
- Gaete, H., Álvarez, M., Lobos, G., Soto, E., & Jara-Gutiérrez, C. (2017). Assessment of oxidative stress and bioaccumulation of the metals Cu, Fe, Zn, Pb, Cd in the polychaete *Perinereis gualpensis* from estuaries of central Chile. *Ecotoxicology and*

- Environmental Safety*, 145, 653-658.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.073>
- Galloway, T. S., Brown, R. J., Browne, M. A., Dissanayake, A., Lowe, D., Depledge, M. H., & Jones, M. B. (2006). The ECOMAN project: A novel approach to defining sustainable ecosystem function. *Marine Pollution Bulletin*, 53(1-4), 186-194.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.09.036>
- Gerba, C. P. (2019). Chapter 28 - Environmental Toxicology. In M. L. Brusseau, I. L. Pepper, C. P. Gerba (Ed.), *Environmental and Pollution Science* (3 ed., pp. 511-540). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814719-1.00028-8>
- Glippa, O., Engström-Öst, J., Kanerva, M., Rein, A., & Vuori, K. (2018). Oxidative stress and antioxidant defense responses in *Acartia* copepods in relation to environmental factors. *PLoS One*, 13(4), e0195981.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195981>
- Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., Braga da Fonseca, M., de Araújo Pedron, F., Duarte, M. F., & Vieira, V. L. (2006). Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(2), 237-241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.017>
- Goffredo, S., & Dubinsky, Z. (2016). *The Cnidaria, Past, Present and Future: The world of Medusa and her sisters*. Springer International Publishing.
- Hampel, M., J., B., & Martín Díaz, M. L. (2016). Chapter 5 - Biomarkers and Effects. In J. Blasco, P. M. Chapman, O. Campana, M. Hampel (Ed.), *Marine Ecotoxicology* (pp. 121-165). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803371-5.00005-9>
- Hariharan, G., Purvaja, R., Anandavelu, I., Robin, R. S., & Ramesh, R. (2022). Ingestion and toxic impacts of weathered polyethylene (wPE) microplastics and stress defensive responses in whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*). *Chemosphere*, 300, 134487. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134487>
- Hawlena, D., & Schmitz, O. (2010). Physiological Stress as a Fundamental Mechanism Linking Predation to Ecosystem Functioning. *American Naturalist*, 176(5), 537-556. <https://doi.org/10.1086/656495>

- Helm, R. R. (2018). Evolution and development of scyphozoan jellyfish. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 93(2), 1228-1250. <https://doi.org/10.1111/brv.12393>
- Hill, R. W. (2012). *Animal Physiology*. Sinauer Associates.
- Hillyer, K. E., Tumanov, S., Villas-Boas, S., & Davy, S. K. (2016). Metabolite profiling of symbiont and host during thermal stress and bleaching in a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 219(4), 516-527. <https://doi.org/10.1242/jeb.128660>
- Hubot, N., Giering, S., Fussel, J., Robidart, J., Birchill, A., Stinchcombe, M., . . . Lucas, C. (2021). Evidence of nitrification associated with globally distributed pelagic jellyfish. *Limnology and Oceanography*, 66(6), 2159-2173. <https://doi.org/10.1002/lno.11736>
- Huggett, R. J. (2018). *Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. CRC Press.
- Jeffrey, S. W., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher-plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen*, 167(2), 191-194. [https://doi.org/10.1016/s0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/s0015-3796(17)30778-3)
- Jiang, J., Zhang, H., Orf, G. S., Lu, Y., Xu, W., Harrington, L. B., . . . Blankenship, R. E. (2014). Evidence of functional trimeric chlorophyll a/c2-peridinin proteins in the dinoflagellate Symbiodinium. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837(11), 1904-1912. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.07.023>
- Jiménez, P. (2020). *Determinación de la actividad basal de las enzimas carboxilesteras, catalasa y glutatión-s-transferasa y ensayo "in vitro" de la inhibición de la actividad carboxilesterasa debida a plastificantes en C. xamachana y A. aurita*. [Trabajo Fin de Máster no publicado, Universitat de València].
- Kaplan, L. A., Gau, N., & Stein, E. A. (1980). Collection and storage of serum lactic acid samples at room temperature without deproteinization. *Clinical Chemistry*, 26(1), 175-176.
- Kayal, E., Bentlage, B., Pankey, M., Ohdera, A., Medina, M., Plachetzki, D., . . . Ryan, J. (2018). Phylogenomics provides a robust topology of the major cnidarian lineages and insights on the origins of key organismal traits. *Bmc Evolutionary Biology*, 18, Article 68. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1142-0>

- Kayal, E., Roure, B., Philippe, H., Collins, A., & Lavrov, D. (2013). Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. *Bmc Evolutionary Biology*, 13, Article 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-5>
- Klein, S. G., Pitt, K. A., & Carroll, A. R. (2016). Reduced salinity increases susceptibility of zooxanthellate jellyfish to herbicide toxicity during a simulated rainfall event. *Environmental Pollution*, 209, 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.012>
- Koch, T., & Grimmelikhuijzen, C. (2019). Global Neuropeptide Annotations From the Genomes and Transcriptomes of Cubozoa, Scyphozoa, Staurozoa (Cnidaria: Medusozoa), and Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Frontiers in Endocrinology*, 10, Article 831. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00831>
- Koenig, S., & Solé, M. (2012). Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. *Marine Environmental Research*, 79, 122-131. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.06.005>
- Kogovšek, T., Tinkara, T., Katja, K., & Alenka, M. (2014). Jellyfish biochemical composition: Importance of standardised sample processing. *Marine Ecology Progress Series*, 510, 275-288. <https://doi.org/10.3354/meps10959>
- Kotova, A. V., Naiden, A. A., Alex, Shumeev, e., Shaposhnikova, T., Podgornaya, O. I., & Adonin, L. S. (2016). Mesoglein Expression During *Aurelia aurita* Life Cycle. *Journal of Marine Science: Research & Development*, 6. <https://doi.org/10.4172/2155-9910.1000211>
- Krediet, C. J., DeNofrio, J. C., Caruso, C., Burriesci, M. S., Cella, K., & Pringle, J. R. (2015). Rapid, Precise, and Accurate Counts of Symbiodinium Cells Using the Guava Flow Cytometer, and a Comparison to Other Methods. *PLoS One*, 10(8), e0135725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135725>
- Kroon, F. J., Berry, K. L. E., Brinkman, D. L., Kookana, R., Leusch, F. D. L., Melvin, S. D., . . . Williams, M. (2020). Sources, presence and potential effects of contaminants of emerging concern in the marine environments of the Great Barrier Reef and Torres Strait, Australia. *Science of the Total Environment*, 719, 135140. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135140>
- Krueger, T., Hawkins, T., D., Becker, S., Pontasch, S., Dove, S., Hoegh-Guldberg, O., . . . Davy, S. K. (2015). Differential coral bleaching—Contrasting the activity and response of enzymatic antioxidants in symbiotic partners under thermal stress.

- Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 190, 15-25.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.08.012>
- Leone, A., Lecci, M., Milisenda, G., & Piraino, S. (2019). Mediterranean jellyfish as novel food: effects of thermal processing on antioxidant, phenolic, and protein contents. *European Food Research and Technology*, 245, 17.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-019-03248-6>.
- Linde-Arias, A. R., Inácio, A. F., Novo, L. A., de Albuquerque, C., & Moreira, J. C. (2008). Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environmental Pollution*, 156(3), 974-979.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.05.006>
- Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.5962/bhl.title.542>
- Lionetto, M., Caricato, R., & Giordano, M. (2021). Pollution Biomarkers in the Framework of Marine Biodiversity Conservation: State of Art and Perspectives. *Water*, 13(13), Article 1847. <https://doi.org/10.3390/w13131847>
- Liquete, C., Piroddi, C., Drakou, E. G., Gurney, L., Katsanevakis, S., Charef, A., & Egoh, B. (2013). Current status and future prospects for the assessment of marine and coastal ecosystem services: a systematic review. *PLoS One*, 8(7), e67737.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067737>
- Lomartire, S., Marques, J., & Goncalves, A. (2021). Biomarkers based tools to assess environmental and chemical stressors in aquatic systems. *Ecological Indicators*, 122, Article 107207. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107207>
- Lopes, A. R., Faleiro, F., Rosa, I. C., Pimentel, M. S., Trubenbach, K., Repolho, T., . . . Rosa, R. (2018). Physiological resilience of a temperate soft coral to ocean warming and acidification. *Cell Stress Chaperones*, 23(5), 1093-1100.  
<https://doi.org/10.1007/s12192-018-0919-9>
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Lushchak, V. I., & Storey, K. B. (2021). Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI Journal*, 20, 956-967.  
<https://doi.org/10.17179/excli2021-3596>

- Macali, A., & Bergami, E. (2020). Jellyfish as innovative bioindicator for plastic pollution. *Ecological Indicators*, 115, 106375. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106375>
- Maran, B. A. V., Aungtonya, C., Hoe, C. C., Metillo, E. B., Miyake, H., Iesa, I., . . . Das, Y. (2021). *Field guide to the jellyfish of Western Pacific*. Centre for Marine and Coastal Studies, University Sains Malaysia.
- Martinez-Porchas, M., Rafael, M.-C. L., & Rogelio, R.-E. (2009). Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4, 158-178.
- Medina, M., Sharp, V., Ohdera, A., Bellantuono, A., Dalrymple, J., Gamero-Mora, E., . . . Morandini, A. C. (2021). The Upside-Down Jellyfish *Cassiopea xamachana* as an Emerging Model System to Study Cnidarian–Algal Symbiosis. In *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology* (pp. 149-171). CRC Press.
- Millennium Ecosystem Assessment (2005). *Ecosystems and human well-being: wetlands and water*. World resources institute.
- Monserat, J. M., Martínez, P. E., Geracitano, L. A., Lund Amado, L., Martinez Gaspar Martins, C., Lopes Leães Pinho, G., . . . Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 146(1-2), 221-234. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.012>
- Murphy, J. W. A., Collier, A. C., & Richmond, R. H. (2019). Antioxidant enzyme cycling over reproductive lunar cycles in. *PeerJ*, 7, e7020. <https://doi.org/10.7717/peerj.7020>
- Muñoz-Vera, A., Peñas Castejón, J. M., & García, G. (2016). Patterns of trace element bioaccumulation in jellyfish *Rhizostoma pulmo* (Cnidaria, Scyphozoa) in a Mediterranean coastal lagoon from SE Spain. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1), 143-154. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.069>
- Neeley, W. E., & Phillipson, J. (1988). Automated enzymatic method for determining ammonia in plasma, with 14-day reagent stability. *Clinical Chemistry*, 34(9), 1868-1869. <https://doi.org/10.1093/clinchem/34.9.1866>
- Nevarez-Lopez, C. A., Sanchez-Paz, A., Lopez-Martinez, J., Llera-Herrera, R., & Muhlia-Almazan, A. (2020). Metabolic response of the cannonball jellyfish *Stomolophus*

- meleagris* upon short-term exposure to thermal stress. *Journal of Sea Research*, 166, 101959. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seares.2020.101959>
- Newkirk, C. R., Frazer, T. K., & Martindale, M. Q. (2018). Acquisition and proliferation of algal symbionts in bleached polyps of the upside-down jellyfish, *Cassiopea xamachana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 508, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.08.010>
- Newkirk, C. R., Frazer, T. K., Martindale, M. Q., & Schnitzler, C. E. (2020). Adaptation to Bleaching: Are Thermotolerant Symbiodiniaceae Strains More Successful Than Other Strains Under Elevated Temperatures in a Model Symbiotic Cnidarian? *Frontiers in Microbiology*, 11, Article 822. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00822>
- Nos, D., Navarro, J., Barriá, C., & Solé, M. (2017). Carboxylesterase activities in chondrichthyans of the western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), 332-335. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.021>
- Nos, D., Navarro, J., Macias, D., & Sole, M. (2021). Carboxylesterase activities as potential biomarkers of pollution in marine pelagic predators. *Ecological Indicators*, 122, Article 107217. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107217>
- Not, C., Lui, C., & Cannicci, S. (2020). Feeding behavior is the main driver for microparticle intake in mangrove crabs. *Limnology and Oceanography Letters*, 5(1), 84-91. <https://doi.org/10.1002/lo2.10143>
- O'Donovan, S., Mestre, N. C., Abel, S., Fonseca, T. G., Carteny, C. C., Willems, T., . . . Bebianno, M. J. (2020). Effects of the UV filter, oxybenzone, adsorbed to microplastics in the clam *Scrobicularia plana*. *Science of The Total Environment*, 733, 139102. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139102>
- Oakes, K. D., & Van Der Kraak, G. J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63(4), 447-463. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(02)00204-7)
- Ohdera, A. H., Abrams, M. J., Ames, C. L., Baker, D. M., Suescun-Bolivar, L. P., Collins, A. G., . . . Medina, M. (2018). Upside-Down but Headed in the Right Direction: Review of the Highly Versatile *Cassiopea xamachana* System. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, Article 35. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00035>

- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Olguin-Jacobson, C., & Pitt, K. A. (2021). Symbiotic microalgae do not increase susceptibility of zooxanthellate medusae (*Cassiopea xamachana*) to herbicides. *Aquatic Toxicology*, 236, Article 105866. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105866>
- Olguín-Jacobson, C., Pitt, K. A., Carroll, A. R., & Melvin, S. D. (2020). Polyps of the Jellyfish *Aurelia aurita* Are Unaffected by Chronic Exposure to a Combination of Pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(9), 1685-1692. <https://doi.org/10.1002/etc.4750>
- Omedes, S., Andrade, M., Escolar, O., Villanueva, R., Freitas, R., & Solé, M. (2022). B-esterases characterisation in the digestive tract of the common octopus and the European cuttlefish and their in vitro responses to contaminants of environmental concern. *Environmental Research*, 210, 112961. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112961>
- Orani, A. M., Barats, A., Vassileva, E., & Thomas, O. P. (2018). Marine sponges as a powerful tool for trace elements biomonitoring studies in coastal environment. *Marine Pollution Bulletin*, 131(Pt A), 633-645. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.073>
- Otero, S., & Kristoff, G. (2016). In vitro and in vivo studies of cholinesterases and carboxylesterases in *Planorbarius corneus* exposed to a phosphorodithioate insecticide: Finding the most sensitive combination of enzymes, substrates, tissues and recovery capacity. *Aquatic Toxicology*, 180, 186-195. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.002>
- Park, J. C., Hagiwara, A., Park, H. G., & Lee, J. S. (2020). The glutathione S-transferase genes in marine rotifers and copepods: Identification of GSTs and applications for ecotoxicological studies. *Marine Pollution Bulletin*, 156, 111080. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111080>
- Patel, P. P., & Bielmyer-Fraser, G. K. (2015). The influence of salinity and copper exposure on copper accumulation and physiological impairment in the sea anemone, *Exaiptasia pallida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 168, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.11.004>

- Pesh-Imam, M., Kumar, S., & Willis, C. E. (1978). Enzymatic determination of plasma ammonia: evaluation of Sigma and BMC Kits. *Clinical Chemistry*, 24(11), 2044-2046.
- Pires, V. L., Novais, S. C., Lemos, M. F. L., Fonseca, V. F., & Duarte, B. (2021). Evaluation of Multivariate Biomarker Indexes Application in Ecotoxicity Tests with Marine Diatoms Exposed to Emerging Contaminants. *Applied Sciences*, 11(9), 3878. <https://doi.org/10.3390/app11093878>
- Prakash, S., Kumar, A., Okla, M. K., Ahmad, A., Abbas, Z. K., Al-Ghamdi, A. A., . . . AbdElgawad, H. (2022). Physiological responses of the symbiotic shrimp *Ancyllocaris brevicarpalis* and its host sea anemone *Stichodactyla haddoni* to ocean acidification. *Marine Pollution Bulletin*, 175, 113287. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113287>
- Prokić, M. D., Radovanović, T. B., Gavrić, J. P., & Faggio, C. (2019). Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111, 37-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.001>
- Purcell, J. E. (2012). Jellyfish and ctenophore blooms coincide with human proliferations and environmental perturbations. *Annual Review of Marine Science*, 4, 209-235. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142751>
- Quek, Z., & Huang, D. (2021). Application of phylogenomic tools to unravel anthozoan evolution. *Coral Reefs*. <https://doi.org/10.1007/s00338-021-02072-3>
- R Core Team (2019). RStudio (Versión 2022.02.3 Build 492) [Computer software]. <https://www.R-project.org/>
- Ranjbar Jafarabadi , A., Mashjoor , S., Riyahi Bakhtiari, A., & Jadot , C. (2020). Dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from coral reef fish in the Persian Gulf — Human health risk assessment. *Food Chemistry*, 329, 127035. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127035>
- Ranjbar Jafarabadi, A., Riyahi Bakhtiari, A., Maisano, M., Pereira, P., & Cappello, T. (2018). First record of bioaccumulation and bioconcentration of metals in Scleractinian corals and their algal symbionts from Kharg and Lark coral reefs (Persian Gulf, Iran). *Science of The Total Environment*, 640-641, 1500-1511. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.029>

- Regoli, F., Benedetti, M., & Giuliani, M. E. (2011). Antioxidant Defenses and Acquisition of Tolerance to Chemical Stress. *Tolerance to Environmental Contaminants*, 153-173. <https://doi.org/10.1201/b10519-9>
- Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93, 106-117. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>
- Ribalta, C., Sanchez-Hernandez, J. C., & Sole, M. (2015). Hepatic biotransformation and antioxidant enzyme activities in Mediterranean fish from different habitat depths. *Science of The Total Environment*, 532, 176-183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.001>
- Ribeiro, E. B., Noleto, K. S., de Oliveira, S. R. S., Batista de Jesus, W., de Sousa Serra, I. M. R., da Silva de Almeida, Z., . . . Fortes Carvalho Neta, R. N. (2020). Biomarkers (glutathione S-transferase and catalase) and microorganisms in soft tissues of *Crassostrea rhizophorae* to assess contamination of seafood in Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 158, 111348. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111348>
- Romero-Kutzner, V., Tarí, J., Herrera, A., Martínez, I., Bondyale-Juez, D., & Gómez, M. (2022). Ingestion of polyethylene microspheres occur only in presence of prey in the jellyfish *Aurelia aurita*. *Marine Pollution Bulletin*, 175, 113269. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113269>
- Rourke, J. L., & Sinal, C. J. (2014). Biotransformation/Metabolism. In W. Philip (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (3 ed., pp. 490-502). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00007-5>
- Rowen, D. J., Templeman, M. A., & Kingsford, M. J. (2017). Herbicide effects on the growth and photosynthetic efficiency of *Cassiopea maremetens*. *Chemosphere*, 182, 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.001>
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A. N., & Sarker, S. (2006). Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15(4), 333-340. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0069-1>
- Schlaefer, J., Wolanski, E., & Kingsford, M. (2018). Swimming behaviour can maintain localised jellyfish (*Chironex fleckeri*: Cubozoa) populations. *Marine Ecology Progress Series*, 591, 287-302. <https://doi.org/10.3354/meps12305>

- Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database: the journal of biological databases and curation*, 2020, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Schroth, W., Ender, A., & Schierwater, B. (2005). Molecular biomarkers and adaptation to environmental stress in moon jelly (*Aurelia spp.*). *Marine Biotechnology*, 7(5), 449-461. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-4095-9>
- Solomando, A., Capó, X., Alomar, C., Álvarez, E., Compa, M., Valencia, J. M., . . . Sureda, A. (2020). Long-term exposure to microplastics induces oxidative stress and a pro-inflammatory response in the gut of *Sparus aurata* Linnaeus, 1758. *Environmental Pollution*, 266(Pt 1), 115295. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115295>
- Solomando, A., Cohen-Sánchez, A., Box, A., Montero, I., Pinya, S., & Sureda, A. (2022). Microplastic presence in the pelagic fish, *Seriola dumerili*, from Balearic Islands (Western Mediterranean), and assessment of oxidative stress and detoxification biomarkers in liver. *Environmental Research*, 212(Pt C), 113369. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113369>
- Solé, M., Baena, M., Arnau, S., Carrasson, M., Maynou, F., & Cartes, J. E. (2010). Muscular cholinesterase activities and lipid peroxidation levels as biomarkers in several Mediterranean marine fish species and their relationship with ecological variables. *Environment International*, 36(2), 202-211. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.11.008>
- Solé, M., Freitas, R., & Rivera-Ingraham, G. (2021). The use of an in vitro approach to assess marine invertebrate carboxylesterase responses to chemicals of environmental concern. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 82, 103561. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103561>
- Solé, M., García de la Parra, L. M., Alejandre-Grimaldo, S., & Sardá, F. (2006). Esterase activities and lipid peroxidation levels in offshore commercial species of the NW Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 52(12), 1708-1716. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.07.015>
- Templeman, M. A., & Kingsford, M. J. (2010). Trace element accumulation in *Cassiopea* sp. (Scyphozoa) from urban marine environments in Australia. *Marine*

- Environmental Research*, 69(2), 63-72.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.08.001>
- Templeman, M. A., McKenzie, M. R., & Kingsford, M. J. (2021). The utility of jellyfish as marine biomonitors. *Marine Pollution Bulletin*, 173(Pt B), 113056.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113056>
- Timbrell, J. A. (2008). *Principles of Biochemical Toxicology, Fourth Edition*. Taylor & Francis.
- Trinder, P. (1969). Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology*, 22(2), 158-161. <https://doi.org/10.1136/jcp.22.2.158>
- Vagi, M. C., Petsas, A. S., & Kostopoulou, M. N. (2021). Potential Effects of Persistent Organic Contaminants on Marine Biota: A Review on Recent Research. *Water*, 13(18), 2488. <https://doi.org/10.3390/w13182488>
- van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149. [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6)
- Vargas, P., Zardoya, R., Vargas, V. G., & Sebastián, R. Z. S. (2012). *El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Vasenin, A. (2014). *Moon jellyfish (Aurelia aurita) at Gota Sagher (Red Sea, Egypt)* [Image]. Recuperado de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Moon\\_jellyfish\\_at\\_Gota\\_Sagher.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Moon_jellyfish_at_Gota_Sagher.JPG)
- Verde, E. A., & McCloskey, L.R. (1998). Production, respiration, and photophysiology of the mangrove jellyfish *Cassiopea xamachana* symbiotic with zooxanthellae: effect of jellyfish size and season. *Marine Ecology Progress Series*, 168, 147–162. <https://doi.org/10.3354/meps168147>
- Vidal-Liñán, L., & Bellas, J. (2013). Practical procedures for selected biomarkers in mussels, *Mytilus galloprovincialis*--implications for marine pollution monitoring. *Science of The Total Environment*, 461-462, 56-64.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.079>
- Vitale, D., Picó, Y., Spanò, N., Torreblanca, A., & Del Ramo, J. (2020). Carbamazepine exposure in the sea anemones *Anemonia sulcata* and *Actinia equina*: Metabolite

- identification and physiological responses. *Science of The Total Environment*, 744, 140891. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140891>
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. J., & Valavanidis, A. (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 54(9), 1361-1371. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.05.018>
- Wang, G., Zhen, Y., Yu, Z., Shi, Y., Zhao, Q., Wang, J., & Mi, T. (2017). The physiological and molecular response of *Aurelia sp.1* under hypoxia. *Scientific Reports*, 7(1), 1558. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01318-x>
- Weis, J. S. (2013). *Physiological, Developmental and Behavioral Effects of Marine Pollution*. Springer Netherlands.
- Wu, M., Miao, J., Li, Y., Wu, J., Wang, G., Zhang, D., & Pan, L. (2022). Impact of P-Chloroaniline on Oxidative Stress and Biomacromolecules Damage in the Clam. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph19095092>
- Yakovleva, I., Bhagooli, R., Takemura, A., & Hidaka, M. (2004). Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemical and Molecular Biology*, 139(4), 721-730. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.08.016>
- Zamoum, T., & Furla, P. (2012). *Symbiodinium* isolation by NaOH treatment. *Journal of Experimental Biology*, 215(22), 3875-3880. <https://doi.org/10.1242/jeb.074955>
- Zanette, J., de Almeida, E., da Silva, A., Guzenski, J., Ferreira, J., Di Mascio, P., . . . Bainy, A. (2011). Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. *Science of the Total Environment*, 409(10), 1976-1983. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.048>
- Zapata, F., Goetz, F. E., Smith, S. A., Howison, M., Siebert, S., Church, S. H., . . . Cartwright, P. (2015). Phylogenomic Analyses Support Traditional Relationships within Cnidaria. *PLoS One*, 10(10), e0139068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139068>



## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Análisis estadístico de los resultados obtenidos

**Tabla S1.** Resumen de los resultados del análisis de homogeneidad de varianzas para los biomarcadores bioquímicos y fisiológicos estudiados en función del tejido y la especie antes y después de la transformación.

Biomarcador	Test de Levene antes de la transformación		Test de Levene después de la transformación	
	F	Pr(>F)	F	Pr(>F)
Peroxidación lipídica	1.1115	0.3624	-	-
Glutación reductasa	2.5655	0.07628	0.7938	0.5084
Glucosa	14.94	0.000007476***	0.0767	0.972
Lactato	1.0927	0.3698	-	-
Amoniaco	2.6743	0.06812	-	-

Nivel de significación: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**Tabla S2.** Resumen de los resultados del análisis de distribución normal en función de la especie y el tejido para los biomarcadores bioquímicos y fisiológicos estudiados antes y después de la transformación.

Biomarcador	Test de Shapiro Wilk antes de la transformación								Test de Shapiro Wilk después de la transformación							
	<i>Aurelia aurita</i>				<i>Cassiopea xamachana</i>				<i>Aurelia aurita</i>				<i>Cassiopea xamachana</i>			
	Brazos		Umbrela		Brazos		Umbrela		Brazos		Umbrela		Brazos		Umbrela	
	W	p-valor	W	p-valor	W	p-valor	W	p-valor	W	p-valor	W	p-valor	W	p-valor	W	p-valor
Peroxidación lipídica	0.88815	0.3086	0.95134	0.7247	0.87354	0.1632	0.86037	0.1211	-	-	-	-	-	-	-	-
Glutación reductasa	0.82408	0.09569	0.77239	0.01439*	0.97941	0.9599	0.90006	0.2893	0.87696	0.2554	0.86959	0.1493	0.92532	0.4745	0.93908	0.6021
Glucosa	0.93628	0.6294	0.8963	0.2675	0.96984	0.8967	0.90535	0.3225	0.90183	0.3849	0.90197	0.301	0.96984	0.2509	0.84598	0.08671
Lactato	0.89341	0.3364	0.8289	0.05782	0.90655	0.3304	0.8339	0.06516	-	-	-	-	-	-	-	-
Amoniaco	0.89639	0.353	0.78308	0.01881*	0.89327	0.2509	0.84976	0.09473	-	-	-	-	-	-	-	-

Nivel de significación: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**Tabla S3.** Resumen de los resultados del análisis de homogeneidad de varianzas para la concentración de clorofila a y c<sub>2</sub> en función del tejido antes y después de la transformación.

Biomarcador	Test de Levene antes de la transformación		Test de Levene después de la transformación	
	F	Pr(>F)	F	Pr(>F)
Clorofila a ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo)	0.1301	0.7237	-	-
Clorofila a ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteína)	0.0264	0.8733	-	-
Clorofila c <sub>2</sub> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo)	0.0114*	0.9165	0.154	0.7007
Clorofila c <sub>2</sub> ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteína)	0.1223	0.7318	0.6873	0.421

Nivel de significación: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**Tabla S4.** Resumen de los resultados del análisis de distribución normal en función del tejido para la concentración de clorofila a y c<sub>2</sub> en función del tejido estudiados antes y después de la transformación.

Biomarcador	Test de Shapiro Wilk antes de la transformación				Test de Shapiro Wilk después de la transformación			
	Brazos		Umbrella		Brazos		Umbrella	
	W	p-valor	W	p-valor	W	p-valor	W	p-valor
Clorofila a ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo)	0.87271	0.1602	0.90374	0.3121	-	-	-	-
Clorofila a ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteína)	0.9571	0.782	0.87503	0.1687	-	-	-	-
Clorofila c <sub>2</sub> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo)	0.69575	0.002016	0.79938	0.02819*	0.88896	0.2289	0.93553	0.5677
Clorofila c <sub>2</sub> ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteína)	0.76232	0.01117*	0.86946	0.1489	0.96726	0.8757	0.93785	0.5901

Nivel de significación: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**Tabla S5.** Resumen de los resultados del análisis de varianza de 2 factores.

Test de ANOVA de 2 factores						
Biomarcador	Factor	SS	df	MS	F	p
Peroxidación lipídica	Tejido	0.5046	1	0.5046	0.8345	0.3694
	Especie	26.7931	1	26.7931	44.3111	4.626e-07 ***
	Tejido x Especie	0.9298	1	0.9298	1.5376	0.2260
	Error	15.7211	26	0.6047		
Log (Glutación reductasa +1)	Tejido	0.0110	1	0.0110	0.0618	0.805611
	Especie	3.6015	1	3.6015	20.2708	0.000125 ***
	Tejido x Especie	0.0000	1	0.0000	0.0001	0.994326
	Error	4.6195	26	0.1777		
1/Glucosa	Tejido	0.2664	1	0.2664	2.8242	0.1048
	Especie	0.1155	1	0.1155	1.2243	0.2787
	Tejido x Especie	3.5583	1	3.5583	37.7212	1.71e-06 ***
	Error	2.4526	26	0.0943		
Lactato	Tejido	0.0038	1	0.00385	0.0272	0.870318
	Especie	1.1654	1	1.16541	8.2337	0.008061 **
	Tejido x Especie	0.9388	1	0.9385	6.6330	0.016048 *
	Error	3.6801	26	0.14154		

Nivel de significación: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**Tabla S6.** Resumen de los resultados del test *post hoc* de Tukey

Test <i>post hoc</i> de Tukey		
Tejido:Especie		
Biomarcador	Comparación	p valor
Peroxidación lipídica	Umbrela: <i>Aurelia aurita</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.2729291
	Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.0000607***
	Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i> - Umbrela: <i>Aurelia aurita</i>	0.0034717**
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.0000398***
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Umbrela: <i>Aurelia aurita</i>	0.0022275**
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i>	0.9980423
Log (Glutación reductasa +1)	Umbrela: <i>Aurelia aurita</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.9999669
	Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.0249793*
	Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i> - Umbrela: <i>Aurelia aurita</i>	0.0157874*
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.0220208*
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Umbrela: <i>Aurelia aurita</i>	0.0137227*
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i>	0.9999246
1/Glucosa	Umbrela: <i>Aurelia aurita</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.0000401***
	Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.0045992**
	Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i> - Umbrela: <i>Aurelia aurita</i>	0.2197693
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.7634477
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Umbrela: <i>Aurelia aurita</i>	0.0001946***
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i>	0.0282042*
Lactato	Umbrela: <i>Aurelia aurita</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.2455702
	Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.0037240**
	Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i> - Umbrela: <i>Aurelia aurita</i>	0.1874844
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	0.1372281
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Umbrela: <i>Aurelia aurita</i>	0.9841980
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i>	0.3340720

Nivel de significación: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**Tabla S7.** Resumen de los resultados del test no paramétrico de Kruskal-Wallis

Test de Kruskal-Wallis				
Biomarcador	Factor	Chi <sup>2</sup>	df	p valor
Amoniaco	Tejido	0.99539	1	0.3184
	Especie	8.4677	1	0.003615**
	Tejido x Especie	12.618	3	0.005541**

Nivel de significación: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**Tabla S8.** Resumen de los resultados del test de Dunn ajustando los valores de p con el método de Benjamini-Hochberg.

Test de Dunn ajustando los valores de p con el método de Benjamini-Hochberg.				
Biomarcador	Comparación	Z	P.unadj	P.adj
Amoniaco	Umbrela: <i>Aurelia aurita</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	-2.0244474	0.042924143*	0.085848287
	Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	-3.2338575	0.001221304**	0.007327823**
	Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i> - Umbrela: <i>Aurelia aurita</i>	-1.3063122	0.191446404	0.287169605
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Aurelia aurita</i>	-3.0235253	0.002498482*	0.007495445**
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Umbrela: <i>Aurelia aurita</i>	-1.0791275	0.280530900	0.336637080
	Umbrela: <i>Cassiopea xamachana</i> - Brazos: <i>Cassiopea xamachana</i>	0.2271847	0.820280098	0.820280098

Nivel de significación: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**Tabla S9.** Resumen de los resultados del análisis de *test t* de Student para muestras independientes

Biomarcador	<i>Test t</i> de Student para muestras independientes		
	t	df	p-valor
Clorofila a ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo)	0.22861	14	0.8225
Clorofila a ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteína)	0.014582	14	0.9886
Clorofila c <sub>2</sub> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo)	-0.058748	14	0.954
Clorofila c <sub>2</sub> ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteína)	0.056714	14	0.9556

Nivel de significación: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .