



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE LA VARIACIÓN DE pH SOBRE LA ESTRUCTURA
DE LA CONCHA Y EL TEJIDO DEL MANTO DE JUVENILES DE
CALLO DE HACHA (*Atrina maura*).**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Rosa Virginia Domínguez Beltrán

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 8 horas del día 8 del Mes de marzo del 2023, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Efecto de la variación de pH sobre la estructura de la concha y el tejido del manto de juveniles de callo de hacha (*Atrina maura*)"

Presentada por la alumna:

Rosa Virginia Dominguez Beltran

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Co-Directora de Tesis



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Co-Directora de Tesis



Dra. Oliviert Martínez Cruz
Co-Tutora de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 09 de marzo de 2023.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Rosa Virginia Dominguez Beltran del Programa de Maestría en Ciencias del Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas y bibliografía
- Porcentajes de similitud:
13%

13%
ÍNDICE DE SIMILITUD

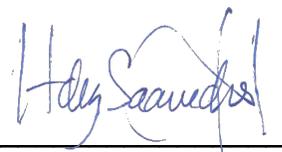
FUENTES PRIMARIAS

1	cibnor.repositorioinstitucional.mx Internet	810 palabras — 3%
2	hdl.handle.net Internet	155 palabras — 1%
3	sidofqa.segob.gob.mx Internet	95 palabras — < 1%
4	dspace.cibnor.mx:8080 Internet	82 palabras — < 1%
5	rediberoamericanaequinodermos.com Internet	62 palabras — < 1%
6	www.climaterra.org Internet	57 palabras — < 1%
7	creativecommons.org Internet	53 palabras — < 1%
8	tesis.ipn.mx Internet	53 palabras — < 1%
9	cicese.repositorioinstitucional.mx Internet	52 palabras — < 1%

Firmas del comité



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Co-Directora de Tesis



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Co-Directora de Tesis



Dra. Olivert Martínez Cruz
Co-Tutora de Tesis

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Directora de Tesis

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Directora de Tesis

Dra. Oliviart Martínez Cruz
Universidad de Sonora
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Dra. Oliviart Martínez Cruz

Jurado de Examen

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Dra. Oliviart Martínez Cruz

Suplente

Dr. Luis Hernández Adame

Resumen

Las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera debido a actividades antropogénicas provocan la acumulación de CO₂ en el agua de mar. Esta acumulación provoca una disminución del pH y el estado de saturación del carbonato de calcio (Ω CaCO₃), fenómeno conocido como acidificación del océano (AO). Se prevé que el pH disminuya de 0.3 a 0.5 unidades para el año 2100 y 0.7 unidades para el año 2300, donde la magnitud y dirección de los efectos de la AO varían en los organismos, dependiendo de la especie, tiempo de exposición, límites fisiológicos y adaptabilidad a corto plazo. En este estudio se analizó el efecto de la variación de pH sobre la estructura de la concha y el tejido del manto de juveniles de callo de hacha (*Atrina maura*) al día 0, 2, 4 y 40 de exposición. A partir del día 2 de exposición hasta el término del experimento, los análisis de las conchas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron que bajo condiciones de pH 7.5 ± 0.2 menor que los controles (7.8 ± 0.1) la integridad de la microestructura de la capa prismática de calcita y la capa nacarada presentaba signos malformación y disolución química en comparación con los controles. Por otro lado, el crecimiento de la concha y el tejido del manto de *A. maura* no se vieron afectados bajo condiciones de acidificación en ninguno de los tiempos evaluados. Estos resultados sugieren que *A. maura* podría estar implementando estrategias fisiológicas para destinar energía adicional hacia la homeostasis del pH, siendo la disolución de la concha una estrategia para compensar la inestabilidad química utilizando reservas de CaCO₃. Sin embargo, es posible que las proyecciones futuras de la AO causada por altos niveles de CO₂ impacte negativamente sobre la calcificación de la concha de *A. maura*, ya que, la pérdida de integridad estructural a causa de la AO compromete las propiedades mecánicas de la concha, lo que podría provocar que *A. maura* sea más susceptible a depredadores y otros factores ambientales estresantes. Por lo que se requieren más investigaciones para determinar el mecanismo fisiológico de *A. maura* en respuesta a la AO a largo plazo.

Palabras clave: acidificación, microestructura, concha, manto, CO₂.

ORCID: 0009-0006-5465-3148

Vo. Bo. Co-Directoras de Tesis



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez



Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Summary

Carbon dioxide emissions (CO₂) into the atmosphere due to anthropogenic activities cause the accumulation of CO₂ in seawater. This accumulation causes a decrease in pH and the saturation state of calcium carbonate (Ω CaCO₃), a phenomenon known as ocean acidification (OA). The pH is expected to decrease by 0.3 to 0.5 units by the year 2100 and 0.7 units by the year 2300, where the magnitude and direction of OA effects vary in organisms, depending on the species, exposure time, physiological limits, and short-term adaptability. In this study, the effect of pH variation on the structure of the shell and mantle tissue of the juveniles Pen shell (*Atrina maura*) at day 0, 2, 4 and 40 of exposure was analyzed. From day 2 of exposure until the end of the experiment, the analysis of the shells by scanning electron microscopy (SEM) showed at pH 7.5 ± 0.2 lower than the controls (7.8 ± 0.1) the integrity of the microstructure of the calcite prismatic layer and the nacre layer showed signs of malformation and dissolution compared to controls. On the other hand, the growth of the shell and the mantle tissue of *A. maura* were not affected under acidification conditions at any of the times evaluated. These results suggest that *A. maura* could be implementing physiological strategies to allocate additional energy to pH homeostasis, with shell dissolution being a strategy to compensate for chemical instability using CaCO₃ reserves. However, it is possible that the future projections of AO caused by high CO₂ levels have a negative impact on the shell calcification of *A. maura*, considering that the loss of structural integrity due to AO compromises the mechanical properties of the shell, which could make *A. maura* more susceptible to predators and other environmental stressors. Therefore, more research is required to determine the physiological mechanism of *A. maura* in response to OA in the long term.

Key words: ocean acidification, microstructure, shell, mantle, CO₂.

ORCID: 0009-0006-5465-3148

Vo. Bo. Co-Directoradas de Tesis



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez



Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Dedicatoria

A mi mamá, Olga Lidia Beltran Delgado, por siempre apoyarme, por todo tu esfuerzo, trabajo y tiempo para darme la oportunidad de tener una educación y una calidad de vida mejor, por alimentar mi cuerpo y alma, por acompañarme en mis desvelos, por cuidarme incondicionalmente, por siempre creer en mí, por tus abrazos que me tranquilizan y tus palabras que me alientan, por ser un claro ejemplo de fortaleza, dedicación y perseverancia, por ser la mejor mamá que pudo haberme tocado.

A mi papá, Juan Cerafin Dominguez Flores, por siempre apoyarme en cada decisión, por todo tu esfuerzo, trabajo y dedicación para darme la oportunidad de tener una educación y una calidad de vida mejor, por siempre confiar en mí y cuidarme, por las noches que te desvelaste esperándome, por ser un ejemplo de fortaleza, dedicación y perseverancia, por ser el mejor papá que pudo haberme tocado.

Por amarme incondicionalmente, porque este título no es sólo mío sino el de ustedes también.

A mí, por atreverme a ir contra corriente, por ser fuerte, dedicada y dar siempre lo mejor de mí aún bajo situaciones complejas, por siempre ser yo, por defender mis ideales, por confiar más en mí, por aprender a pedir ayuda y por llegar hasta el final en contra de mí misma, por ser mi propio talismán.

“Volar se parece a dejarse caer”

-Sharif Hernández

Agradecimientos

A CONACyT por la beca otorgada (CVU 1086856) para la realización mis estudios y la obtención del grado de Maestría en Ciencias.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR) y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por brindarme las herramientas académicas necesarias y por el apoyo parcial de gastos de manutención para finalizar mi proyecto de tesis (No. de proyecto: 20010).

A mis padres, Olga Lidia Beltran Delgado y Juan Cerafin Dominguez Flores por siempre apoyarme en este largo camino, por todo su esfuerzo y trabajo para darme la oportunidad de tener una educación, por alimentar mi cuerpo y alma, por desvelarse conmigo, por ser siempre los primeros en creer en mí, por ser un claro ejemplo de fortaleza, dedicación y perseverancia, porque este título no es sólo mío sino el de ustedes también.

A la Dra. Crisalejandra Rivera Pérez, por guiarme una vez más en este camino tan complejo y bonito a la vez llamado ciencia, por creer en mí, por ser un ejemplo que seguir como mujer científica, y por la confianza, apoyo y tiempo brindado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra por siempre invitarme a imaginar más allá de lo obvio, por el conocimiento compartido, el apoyo y tiempo brindado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Oliviart Martínez Cruz, por aceptar ser mi tutora de tesis, por el conocimiento, consejos y tiempo brindado, por sus críticas constructivas.

A la M. C. Delia Irene Rojas Posadas, por acompañarme en este largo camino, por creer siempre en mí, por todo el apoyo brindado desde el día uno, por todo el cariño, amor, confianza y consejos, por permitirme ser más que su estudiante, su amiga.

A la Dra. Martha Patricia Hernández Cortés, por proveer el sistema de inyección de CO₂, por todo su apoyo, sus pláticas y sus deliciosos panes de fin de semana.

Al Laboratorio de Especialidades Bioquímicas y Biológicas del CIBNOR, por apoyarme con las instalaciones y equipo necesario del Laboratorio húmedo adjunto para la realización del diseño experimental.

Al Dr. Francisco Antonio Flores Higuera, por todo su apoyo, tiempo y consejos para la instalación y estandarización del sistema de inyección de CO₂, y para la realización del diseño experimental.

Al Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez, por todo su apoyo y consejos en la instalación del bioensayo de acidificación y en momentos de emergencia.

Al Dr. Ignacio Leyva Valencia del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) por sus sugerencias durante el bioensayo y su apoyo al proveer la bomba peristáltica de cartucho multicanal utilizada para la alimentación continua durante el bioensayo.

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica a cargo del Técnico Ariel Arturo Cruz Villacorta, por todo el apoyo, tiempo extraordinario, consejo, confianza, por las largas pláticas y por darme serenidad en tiempos de caos a través de la microscopía electrónica.

A Diego Alejandro Gonzáles Cosío, mi amado compañero de aventuras y maestro de vida en estos últimos casi 12 años, por todo su apoyo, comprensión, fortaleza, sabiduría y motivación, por ser un ejemplo de dedicación, perseverancia y fortaleza, por sacarme siempre de mi zona de confort y por siempre sacar la mejor versión de mi cada día.

A Salvadora Olivia Cosío, Miguel Leonardo González Morales, Gloria González Morales, Daniel González Cosío y Miguel González Cosío, mi segunda familia, por todo su amor, apoyo y bendiciones.

A mis hermanos, Rubí Itzel Navarro Beltrán y Ángel Axel Navarro Beltrán, por todo su amor y apoyo, por ser mis maestros de vida y mi motor.

A mi mejor amiga y compañera de maestría, Selena Karina Hernández Rascón, por acompañarme en este camino, por su apoyo, tiempo y confianza, por siempre ayudarme/obligarme a levantarme de momentos difíciles y convertirlos en risas y aventuras.

A mi amigo y compañero de maestría Jorge Paul Castro Cosío, por las largas pláticas, por todo su apoyo, consejos y risas, y por ser un ejemplo que seguir como persona y como profesional.

A mis mejores amigos Jesús Alberto Geraldo León y Jorge Alberto Chávez Telechea por su apoyo incondicional, por confiar en mí antes que yo misma, por su ánimo, su tiempo y sus palabras que siempre me ayudan a levantarme.

A mis colegas bioquímicos y amigos, Citlalic Romero Camarillo, Ulises Zarate Lira, Alejandro Ortiz Sosa y Silva, Natividad Ramos Leyva y Paolo Ramírez Rosas por todo su apoyo, ánimo y compartir conmigo los momentos más divertidos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Genética Molecular que no esperaba pero que llegaron a salvar mis días, Leonardo Sánchez Angulo, Nohemí Villaseñor, Diana Rojas Sánchez y Odette Carral, por todo su apoyo, cariño, confianza y tiempo, por los viernes de comidas, por las largas, divertidas y complejas pláticas, y por las salidas más divertidas.

A mi perrita e hija Nigga, por estar siempre a mi lado incondicionalmente, por desvelarse conmigo, por acompañarme en seminarios, cursos y clases de maestría, por su amor, cariño, besos, abrazos y miradas que siempre me curan, y por sus travesuras, aventuras y ocurrencias que transforman mis días.

GRACIAS PORQUE SIN USTEDES ESTO NO HUBIERA SIDO POSIBLE.

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vii
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xii
Abreviaturas	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Biomineralización en moluscos.....	3
2.1.1 Estructura, composición y formación de la concha en moluscos bivalvos.	4
2.1.2 Estructura del tejido del manto de moluscos bivalvos.	9
2.2 Interacción entre el dióxido de carbono (CO ₂) y el océano.	13
2.2.1 Acidificación del océano (AO).	15
2.2.1.1 Efectos de la AO en moluscos bivalvos: a nivel estructural, fisiológico y genético. .	18
2.2.1.2 Impactos ecológicos y socioeconómicos de la AO.....	27
2.3 Callo de hacha (<i>Atrina maura</i>).	30
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo general.....	35
5. Objetivos particulares	35
6. MATERIAL Y MÉTODOS	36
6.1 Recolección y aclimatación de ostras juveniles de <i>A. maura</i>	36
6.2 Diseño experimental.	36
6.3 Identificación de los genes que codifican SMPs en el tejido del manto de <i>A. maura</i>	40
6.3.1 Extracción de ARN total del manto de <i>A. maura</i>	40
6.3.1.1 Diseño y estandarización de oligonucleótidos.....	41
6.4 Análisis histológico del manto de <i>A. maura</i>	43

6.5	Análisis estructural de la concha de <i>A. maura</i> por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	44
6.6	Análisis estadístico de la talla de la concha de <i>A. maura</i>	44
7.	RESULTADOS	45
7.1	Parámetros fisicoquímicos del bioensayo.....	45
7.2	Análisis estadístico de la talla (longitud) de las conchas de <i>A. maura</i> expuestas a condiciones de acidificación.....	48
7.3	Identificación de los genes que codifican SMPs en el tejido del manto de <i>A. maura</i>	49
7.3.1	Extracción del ARN total del manto de <i>A. maura</i>	49
7.3.2	Diseño y estandarización de oligonucleótidos.....	51
7.3.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final y secuenciación de productos de amplificación.....	52
7.3.4	Identificación de los genes que codifican SMPs en el tejido del manto de <i>A. maura</i>	53
7.4	Análisis histológico del manto de <i>A. maura</i>	54
7.5	Análisis estructural de la concha de <i>A. maura</i> mediante Microscopía Electrónica de Barrido	
8.	DISCUSIÓN	62
8.1	Parámetros fisicoquímicos del bioensayo.....	62
8.2	Identificación de los genes que codifican SMPs en el tejido del manto de <i>A. maura</i>	62
8.3	Análisis histológico del manto de <i>A. maura</i>	63
8.4	Análisis estructural de la concha de <i>A. maura</i> por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	
8.5	Análisis estadístico de la talla de la concha de <i>A. maura</i>	66
9.	CONCLUSIONES	68
10.	LITERATURA CITADA	69
11.	ANEXOS	78

Lista de figuras

Figura 1. Representación esquemática de la concha y el manto de los moluscos bivalvos. Las SMPs y otros componentes orgánicos son representados en diferentes formas y colores.....	4
Figura 2. Polimorfos de carbonato de calcio CaCO_3 . Calcita presenta cristales trigonales y aragonita cristales ortorrómbicos (Maleki Dizaj et al. 2015).....	5
Figura 3. Manto paleal (manto membranoso) de la zona central. a, epitelio del manto; b, cavidad del epitelio del manto (Smolowitz, 2021).....	10
Figura 4. Orilla del manto de una ostra mostrando los tres lóbulos. a, periostraco ubicado entre el lóbulo externo (1), y medio (2); b, lóbulo interno (3); nervio circumpaleal (Smolowitz, 2021).	11
Figura 5. Orilla del manto de la almeja <i>Mercenaria mercenaria</i> en la que se indican los lóbulos del manto. a, lóbulo externo (1); b, pliegue periostracal; c, lóbulo medio (2); d, lóbulo 3; e, lóbulo 4 (Smolowitz, 2021).	12
Figura 6. Orilla del manto de la almeja <i>Mercenaria mercenaria</i> en la que se señala el periostraco. a, pliegue periostracal; b, periostraco (Smolowitz, 2021).....	12
Figura 7. Interacción entre el CO_2 atmosférico y el agua de mar (H_2O). Flechas azules, reacción de la formación de CaCO_3 ; flechas azules/rojas, reacción de acidificación del océano (Modificado de Branch et al. 2013).	14
Figura 8. Modelos climáticos proyectados desde el año 1850 al 2100 del pH promedio global del océano. Línea negra, tendencia histórica con un decremento de 0.1 unidades de pH. Proyecciones para el año 2100: Línea roja, escenario basado en altas emisiones de CO_2 ; Línea azul: escenario de mitigación estricta de emisiones de CO_2 (IPCC, 2014).....	16
Figura 9. Riesgo de las especies marinas bajo condiciones de acidificación del océano (AO). La sensibilidad a la AO es mayor en organismos marinos calcificadores (IPCC, 2014).	17
Figura 10. Callo de hacha (<i>Atrina maura</i>) de edad juvenil de la familia Pinnidae. Colectado en la bahía de La Paz, Baja California Sur, México, tamaño: 60 mm. a) morfología y capas de la concha y b) fisiología interna.....	31
Figura 11. Diseño experimental tipo matriz con alteración de pH por CO_2 . El rectángulo de contorno discontinuo corresponde a un reservorio de H_2O de mar. El rectángulo blanco corresponde a una unidad de mezclado de CO_2 -aire con H_2O de mar. El rectángulo mitad blanco y negro corresponde a una fuente de gas de CO_2 . Los rectángulos de diferentes colores (gris claro y negro) corresponden a diferentes tratamientos de pH.	37
Figura 12. Diagrama del sistema de obtención de aire y CO_2 . La línea continua representa el proceso de obtención de aire seco libre de CO_2 , mientras que la línea punteada representa la entrada de CO_2 puro. La línea roja representa la mezcla del CO_2 y el aire hacia la unidad de mezclado (modificado de Fangue et al. 2010).	37
Figura 13. Diagrama del flujo de la mezcla gases-agua de mar hacia el diseño experimental tipo matriz. (A) Esquema de la unidad de mezclado de los gases con agua de mar. (B) Esquema de las unidades experimentales tipo matriz. Flechas azules indican el flujo de agua dentro y fuera de la unidad de mezclado y hacia las unidades experimentales. Flechas rojas representan el flujo del gas pre-mezclado (CO_2 y aire). Flechas verdes indican flujo de aire procedente de las bombas de aire de acuario (modificado de Fangue et al. 2010).	39

- Figura 14.** Parámetros fisicoquímicos del H₂O de mar filtrada y esterilizada con luz UV. Línea verde, salinidad (ppm); línea naranja, temperatura (T °C); línea gris, denota los valores de pH. .45
- Figura 15.** Parámetros fisicoquímicos del agua de mar del control de las UEs. Línea azul, indica los valores de oxígeno disuelto (%); Línea verde, denota los valores de salinidad (ppm); línea naranja, denota los valores de temperatura (T °C); línea gris indica los valores de pH.46
- Figura 16.** Parámetros fisicoquímicos del agua de mar de las UEs de acidificación. Línea azul, indica los valores de oxígeno disuelto (%); Línea verde, indica los valores de salinidad (ppm); línea naranja, indica los valores de temperatura (T °C); línea gris, indica los valores de pH.47
- Figura 17.** Mortalidad presentada en las UEs del control (barras verdes oscuro y claro) y el tratamiento de acidificación (barras rojas).48
- Figura 18.** Análisis cuantitativo del crecimiento de las conchas de callo de hacha (*A. maura*) bajo condiciones de acidificación durante 40 días. A, tratamiento de acidificación (pH 7.5±0.2); C, tratamiento control (7.8±0.1); Talla, diferencia de las longitudes (cm) de las conchas del día 0 y 40 del experimento. A, tratamiento de acidificación; C, tratamiento control.49
- Figura 19.** Perfil electroforético en gel de agarosa-TBE DEPC al 1% en el que se muestra la integridad del ARN total (100 ng) del manto de callo de hacha (*A. maura*) extraído por el método de TRIZOL™. Se denotan con flechas: derecha, ADN genómico (ADNg) y subunidades ribosomales 28S y 18S del ARN (28S y 18S); y a la izquierda bandas de referencia de 1500 y 1000 pares de bases (pb) en la línea MM (marcador de peso molecular, 1 kb). Líneas D19-30, ARN total del manto de organismos control muestreados el día 2; Líneas E1-7, ARN del manto de organismos tratados (acidificación) muestreados el día 4.50
- Figura 20.** Perfil electroforético en gel de agarosa-TBE al 1% de los productos de PCR probatorio de ARN total (50 ng) de *A. maura* tratado con Turbo DNasa. Línea MM, marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder, 100-2000 pb). Líneas C, productos de ARN total de tratamientos control y acidificación del día 0; D, producto de ARN total de tratamientos control y acidificación del día de muestreo 2; Línea (-), control negativo (H₂O mili-Q); Línea Ch (+), control positivo de ADNc de *A. maura*.51
- Figura 21.** Electroforesis en gel de agarosa-TBE 1% del gen 28S amplificado a partir del ADNc del manto de *A. maura*. Líneas: MM, marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder 100-2000 pb); (+), control positivo de ADNc de *C. gigas*; (-), control negativo (H₂O mili-Q).52
- Figura 22.** Electroforesis en gel de agarosa-TBE 2% del gen *aspeina* (*Asp*), *perlina* (*Perl*), *N16*, *prismalina-14* (*P14*), *calmodulina* (*CaM*) y *28S* amplificado a partir de ADNc del manto de *A. maura*. MM, marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder 200-2000 pb); (-), control negativo (H₂O mili-Q).53
- Figura 23.** Secciones del tejido del manto de juveniles de *A. maura* expuestos a condiciones de acidificación. A-C, tratamiento control (7.8 ± 0.1); D-K, tratamiento de acidificación (7.5 ± 0.2); D-F, día 2 de exposición; G-I, día 4 de exposición; J-L, día 40 de exposición. Tinción con HE. Magnificación, 20X. mb, membrana basal; ecs, epitelio cilíndrico pseudoestratificado; tc, tejido conectivo; mu, mucosito; cc, células caliciformes; In, invaginaciones.55
- Figura 24.** Micrografía electrónica de barrido (SEM) lateral de la concha de *A. maura*. Capa inferior: capa prismática de calcita, Capa superior: capa laminar de aragonita.56
- Figura 25.** Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de la superficie del interior de la concha de *A. maura* expuesta a condiciones de acidificación. Panel superior condición control (pH 7.8 ± 0.1): A, B, y C, día 0 de exposición; Paneles inferiores condiciones de acidificación (7.5 ± 0.2) por

tiempo de exposición: D, E y F, día 2 de exposición; G, H e I, día 4 de exposición; J, K y L, día 40 de exposición. A, límite entre la capa de calcita (c) y aragonita (a); B, capa de calcita; C, capa de aragonita (nácar).58

Figura 26. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) laterales del interior de la capa prismática de calcita de *A. maura* expuesta a condiciones de acidificación. Panel superior condición control ($\text{pH } 7.8 \pm 0.1$): A, B, y C, día 0 de exposición; Paneles inferiores condiciones de acidificación (7.5 ± 0.2) por tiempo de exposición: D, E y F, día 2 de exposición; G, H e I, día 4 de exposición; J, K y L, día 40 de exposición. A, D, G y J, tabletas apiladas de calcita; B, C, E, F, H, I, K y L, prismas de calcita. Cl, columna; ro, recubrimiento orgánico; co, contorno orgánico; po, poros.60

Figura 27. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) laterales de la capa nacarada de *A. maura* después de 40 días. A-B, tratamiento control (7.8 ± 0.1); C-H, tratamiento de acidificación (7.5 ± 0.2): C-D, día 2 de exposición; E-F, día 4 de exposición; G-H, día 40 de exposición. Panel superior, vista lateral del arreglo laminar de nácar; Panel inferior, vista lateral superior de láminas de nácar. *, formas adicionales de CaCO_3 ; corchetes, espacios vacíos entre las láminas de nácar; flechas, signos de disolución.61

Lista de tablas

Tabla 1. Microestructuras minerales encontradas en conchas de moluscos. a) nácar columnar, b) lámina de nácar, c) foliada, d) prismática, e) laminar cruzada, f) laminar cruzada compleja, g) homogéneo. (Kobayashi et al. 2006; Barthelat et al. 2009).	6
Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos del cultivo de callo de hacha (<i>A. maura</i>) (INAPESCA, 2021).	32
Tabla 3. Oligonucleótidos para el gen <i>28S</i> (Romero-Geraldo, R. y Hernández- Saavedra, N. 2012).	41
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los genes <i>N66</i> y <i>perlina</i> de <i>P. sterna</i> (Ojeda Ramírez de Areyano, 2014), <i>N16</i> , <i>aspeina</i> de <i>P. fucata</i> (Liu et al. 2012), <i>calmodulina</i> de <i>C. gigas</i> (Li et al. 2016) y <i>prismalina-14</i> de <i>P. margaritifera</i> (Le Moullac et al. 2018).....	42
Tabla 5. Programa de PCR para la amplificación de genes que codifican SMPs.	43
Tabla 6. Longitud (pb) de los productos de PCR secuenciados.	53
Tabla 7. Resultados del alineamiento en BLAST de NCBI de las secuencias amplificadas de los genes <i>calmodulina</i> y <i>28S</i> de callo de hacha (<i>A. maura</i>).....	54

Abreviaturas

H ⁺	Iones hidrógeno
HCO ₃	Ion bicarbonato
CaCO ₃	Carbonato de calcio
Ω CaCO ₃	Nivel de saturación de carbonato de calcio
Ω cal	Nivel de saturación de calcita
Ω arg	Nivel de saturación de aragonita
AO	Acidificación del océano
CO ₂	Dióxido de carbono
pCO ₂	Dióxido de carbono atmosférico
CO ₃ ⁻²	Ion carbonato
SMPs	Shell matrix proteins
EPS	Espacio extrapalial
Ca ²⁺	Ion calcio
AC	Anhidrasa carbónica
DIC	Carbono inorgánico disuelto
CO ₂ (aq)	Dióxido de carbono acuoso
H ₂ CO ₃	Ácido carbónico
H ₂ O	Agua
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
LT	Longitud total
OPRE	Organización de Pescadores Rescatando la Ensenada
MFC	Mass Flow controllers
CaSO ₄	Sulfato de calcio anhídrido

UM	Unidad de mezclado
UE	Unidad experimental
DO	Densidad óptica
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
Cg	<i>Crassostrea gigas</i>
ADNc	ADN complementario
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppm	Partes por millón
MM	Marcador molecular
DEPC	Dietilpirocarbonato
TBE	Buffer Tris-borato-EDTA
Kb	Kilo bases
Pb	Pares de bases
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ecs	Epitelio pseudoestratificado
Ci	Cilios
Mb	Membrana basal
Cc	Células caliciformes
Tc	Tejido conjuntivo
Fm	Fibras musculares
H&E	Hematoxilina-Eosina
He	Hemocito
Mu	Mucosito
In	Invaginaciones

Cl	Columnas
Co	Contorno
Po	Poros
Ro	Recubrimiento orgánico
Cm	Centímetros
PE	Pliegue externo
PI	Pliegue interno
PM	Pliegue medio

1. INTRODUCCIÓN

En los organismos calcáreos, durante el proceso de biomineralización se liberan iones hidrógeno (H^+) cuando el bicarbonato (HCO_3^-) es precipitado como carbonato de calcio ($CaCO_3$) (Li et al. 2016; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). La formación de este compuesto conduce a la acumulación de iones H^+ en el sitio de calcificación, lo que disminuye la precipitación de $CaCO_3$ (Li et al. 2016; Chandra Rajan, & Vengatesen, 2020). Para mantener el pH y la tasa de calcificación, los H^+ deben bombearse constantemente fuera del sitio de calcificación a través de transportadores o canales celulares de iones (Li et al. 2016; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Uno de los parámetros más importantes que determinan la tasa de biomineralización, es el nivel de saturación de $CaCO_3$ (Ω_{CaCO_3}) del océano (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Actualmente, en los océanos globales, el nivel de saturación de los minerales de calcita y aragonita (Ω_{cal} y Ω_{arg}) está experimentando una rápida tendencia a disminuir mientras que en los océanos costeros ha comenzado a fluctuar a una magnitud sin precedentes (mayor), debido a la absorción excesiva de dióxido de carbono (CO_2) de origen antropogénico (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Al proceso de cambio de la química del carbonato del océano se le denomina acidificación del océano (AO, por su acrónimo), que también afecta la reducción del pH interno (en el sitio de calcificación) y la capacidad de los organismos de absorber el carbono inorgánico disuelto, forzándolos a utilizar energía adicional para mantener una homeostasis interna de pH/ regulación ácido-base, lo que altera gravemente el proceso de biomineralización y el balance energético (Ries et al. 2009; Le Moullac et al. 2016; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020).

La AO, inducida por la elevación del dióxido de carbono atmosférico (pCO_2) debido a actividades antropogénicas, reduce el nivel de Ω_{CaCO_3} y el pH del océano (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Esta reducción en el gradiente electroquímico del H^+ , entre el citosol del organismo y el agua de mar dificulta el mantenimiento del pH deseado en el sitio de calcificación, lo que provoca una inhibición de la calcificación y un impacto negativo (visible) en la disolución de la concha causado por el incremento de H^+ en el agua de mar; (donde la alta afinidad del H^+ por el

CO_3^{2-} , conduce a la disolución de las estructuras de CaCO_3 existentes) (Ries et al. 2009; Liu et al. 2012; Li et al. 2016; Welladsen et al. 2010; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020).

Asimismo, la reducción del nivel de ΩCaCO_3 , debido a la AO (aumento del nivel de pCO_2), afecta directamente a las proteínas de transporte de iones y las proteínas de matriz de la concha (SMPs, por su acrónimo en inglés) que participan en la biomineralización (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Además, la dirección y magnitud del efecto de elevados niveles de pCO_2 varía en los organismos, dependiendo de la especie, la población, el tiempo de exposición, el tiempo de generación, la variabilidad genética en una población y, lo que es más importante, los límites fisiológicos y la adaptabilidad a corto plazo (Ries et al. 2009; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Los moluscos de la Clase Bivalvia que mantienen el pH del fluido calcificante en el rango de pH de 7.33 a 8.53 han mostrado ser más vulnerables a la AO que los corales que mantienen el pH del fluido calcificante en 9.3 (Ries et al. 2009; Metalpa et al. 2011).

Desde la revolución industrial, el valor medio de pH del agua de mar ha disminuido en un promedio 0.1 unidades debido a la absorción de CO_2 , y se prevé que el sistema oceánico experimente una nueva disminución del pH de entre 0.3 a 0.5 unidades para el año 2100, y 0.7 unidades para el año 2300 (Li et al. 2016). La magnitud de los cambios proyectados tendrá probablemente efectos adversos en la función, estructura y aptitud de los ecosistemas marinos (Liu et al. 2012; Li et al. 2016). Donde, el aumento del pCO_2 provoca la AO, al reducir su grado de saturación con respecto al CaCO_3 y, por tanto, la inhibición de la calcificación, que se traduce en un impacto negativo, visible en la concha y las SMPs de los organismos marinos (Ries et al. 2009; Liu et al. 2012; Li et al. 2016; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Dado lo anterior, este fenómeno podría tener implicaciones ecológicas severas para los organismos marinos que forman exoesqueletos o conchas, entre los que destacan los bivalvos, por el impacto económico potencial para industrias que dependen de ellos (Welladsen et al. 2010). Además, es importante estudiar a nivel histológico, es decir, el tejido de manto de organismos sésiles como los moluscos bivalvos expuestos a condiciones de AO, ya que, estudios del impacto de la AO en términos de morfología del manto son escasos, y la respuesta de *A. maura* ante el aumento de H^+ bajo condiciones de AO no ha sido reportada (Chandra Raja & Vengatesen, 2020).

2. ANTECEDENTES

2.1 Biomineralización en moluscos.

La biomineralización es un proceso dinámico en el que se forman estructuras mineralizadas complejas por sistemas vivos, tales como conchas, huesos y dientes, los cuales presentan funciones fisiológicas importantes brindando soporte estructural, fuerza mecánica, protección, movimiento, resistencia, detección óptica, trituración de alimentos, defensa y almacenamiento (Marin, 2020; Liu & Zhang, 2021). En los moluscos la biomineralización es un proceso fundamental en los océanos globales, en el cual los iones calcio y carbonato se ensamblan junto con biomoléculas tales como, proteínas, carbohidratos y lípidos para la formación de estructuras de carbonato de calcio (CaCO_3) (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020; Clark, 2020). Estas presentan una amplia variedad de funciones como: soporte estructural, protección contra luz ultravioleta (UV), refugio contra la depredación, patógenos, nutrición, reproducción, almacén de iones, y protector contra factores de estrés ambiental (Richards, 2018; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020).

Los organismos mineralizantes presentan una amplia diversidad de fisiologías, anatomías y hábitats, por lo que son considerados económica y ecológicamente importantes, ya que, contribuyen a la sostenibilidad de los ecosistemas marinos, a través de las redes alimenticias, biodiversidad global y su participación en el ciclo global del carbono, actuando como filtradores, formadores de arrecifes, formadores de hábitats y como recurso alimenticio, por mencionar algunos (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020; Clark, 2020). Específicamente el filo Mollusca presenta una diversidad de especies que forman estructuras calcáreas, siendo uno de los principales ejemplos de biomineralización en el océano, ya que estos presentan una gran diversidad de estructuras mineralizadas con una organización y composición estructural única (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020; Marin, 2020).

2.1.1 Estructura, composición y formación de la concha en moluscos bivalvos.

La concha de los moluscos presenta diversas características estructurales, dentro de las cuales destacan: a) estructura de los cristales (polimorfos de CaCO_3), b) arreglos estructurales de los cristales (microestructuras) y c) componentes de la matriz orgánica (macromoléculas), las cuales varían entre las diversas especies de moluscos (Clark, 2020). Por lo que, la composición química, estructural y proteica de las estructuras mineralizadas determinan las propiedades físicas (rigidez y resistencia) ante condiciones ambientales y los costos energéticos de producción (Ponder et al. 2019; Clark, 2020).

La concha de los moluscos está principalmente compuesta por una fase mineral, la cual contiene cristales de CaCO_3 , y una fase orgánica compuesta por macromoléculas (Nudelman, 2015; Marin, 2020). Como se muestra en la Fig. 1, la fase mineral está compuesta por polimorfos de CaCO_3 , principalmente calcita y aragonita, dispuestos en diferentes capas de la concha; la capa externa de la concha está formada por cristales trigonales de calcita, mientras que la capa interna (capa nacarada) está compuesta por placas hexagonales de aragonita (Nudelman, 2015; Li et al. 2017; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020; Marin, 2020).

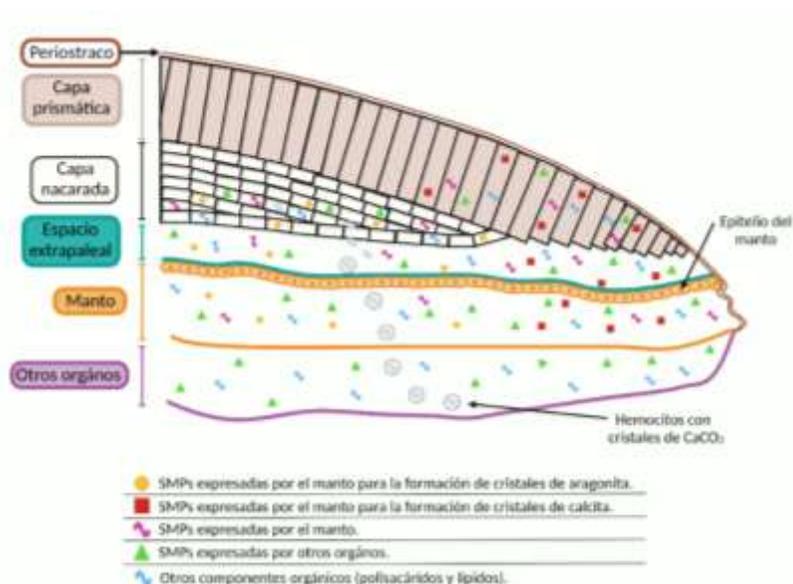


Figura 1. Representación esquemática de la concha y el manto de los moluscos bivalvos. Las SMPs y otros componentes orgánicos son representados en diferentes formas y colores.

Si bien los polimorfos, calcita y aragonita, están químicamente compuestos por CaCO_3 , estos difieren entre sí, ya que presentan una organización de redes atómica diferente (Fig. 2), además se encuentran dispuestos en diferentes arreglos estructurales mineralizados denominados microestructuras (Tabla 1). La calcita es el polimorfo de CaCO_3 con mayor estabilidad termodinámica, mientras que la aragonita es menos estable, pero se transforma fácilmente en un polimorfo estable (Maleki Dizaj et al. 2015). Los cristales de calcita existen de forma natural en forma de trigonal-romboédrica, sin embargo, también se presenta en forma de romboédrica aguda y obtusa, tubular prismática y escalenoedros (Maleki Dizaj et al. 2015). Por otro lado, los cristales de aragonita se encuentran en forma ortorrómbica, que al repetirse conduce a la formación de cristales pseudo-hexagonales, denominado nácar (Maleki Dizaj et al. 2015).

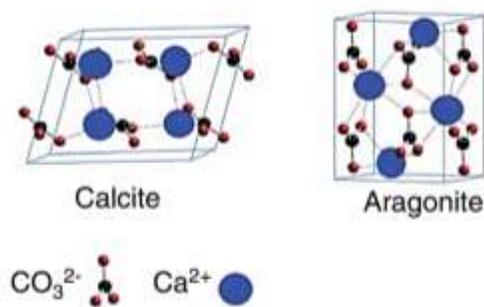
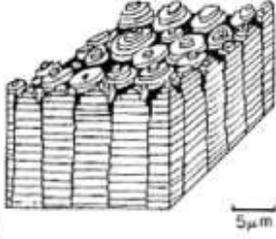
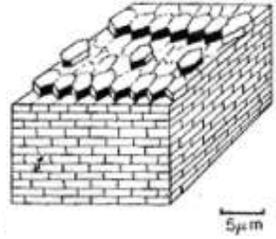
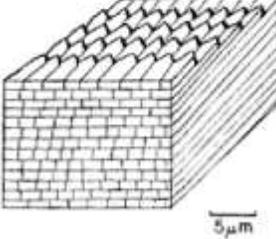
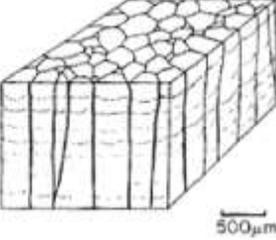


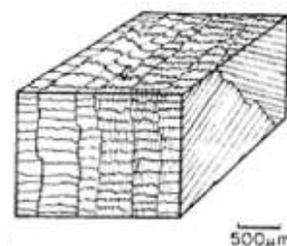
Figura 2. Polimorfos de carbonato de calcio CaCO_3 . Calcita presenta cristales trigonales y aragonita cristales ortorrómbicos (Maleki Dizaj et al. 2015).

Tabla 1. Microestructuras minerales encontradas en conchas de moluscos. a) nácar columnar, b) lámina de nácar, c) foliada, d) prismática, e) laminar cruzada, f) laminar cruzada compleja, g) homogéneo. (Kobayashi et al. 2006; Barthelat et al. 2009).

Tipo de microestructura	Características	Micrografía
Nácar columnar	Compuesta por tabletas apiladas verticalmente como prisma (en columna) dispuestas una del lado de la otra. Cada prisma está rodeado por un recubrimiento de matriz. Los prismas se encuentran alineados al exterior de la concha y generalmente se encuentran en la capa exterior de la misma.	
Láminas de nácar	Agregación de tabletas poligonales arregladas en hojas y en una sección radial dispuestas horizontalmente que dan la apariencia de una pared de ladrillos. Son encontrados en la capa interna de la concha.	
Foliada	Tabletas alargadas de calcita en forma de listones dispuestas en contacto de lado a lado en láminas irregulares que tienen la misma orientación general hacia el margen de la capa y se encuentran sub-paralelas a la superficie interna de la capa. Los bordes terminales en la superficie de la concha muestran una apariencia romboédrica.	
Prismática	Agregaciones de prismas poligonales, donde los ejes más largos son verticales a la superficie de la capa interna. Los prismas muestran un patrón de panal en una sección transversal, y están compuestos por pequeñas tabletas alargadas de calcita. Se encuentra sólo en la capa externa de la concha.	

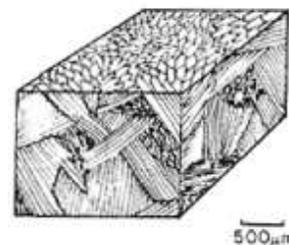
Laminar cruzada

Agregaciones de varillas rectangulares alargadas de aragonita dispuestas paralelamente entre sí, formando un bloque rectangular. Este bloque rectangular se encuentra inclinado en dirección opuesta.



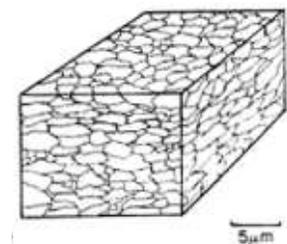
Complejo laminar-cruzado

Es similar a la microestructura lamelar cruzada, pero consiste en un inter-crecimiento de bloques de cristales dispuestos en cuatro orientaciones principales que irradian desde la parte central en forma cónica.



Homogénea

Agregación de cristales de aragonita granulares de diferentes tamaños sin forma específica.



La fase mineral constituye entre un 95-99% del peso de la concha, y el porcentaje restante (1-5%) corresponde al material orgánico compuesto por proteínas de matriz de la concha (SMPs, por sus siglas en inglés), polisacáridos como la quitina, pigmentos, metabolitos y lípidos, los cuales son secretados durante el proceso de biomineralización (Nudelman, 2015; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020; Marin, 2020) (Fig. 1). En el caso de las SMPs se encuentran ocluidas en la microestructura de la concha de los moluscos brindando importantes propiedades mecánicas, ya que la unión entre la estructura mineralizada y la matriz orgánica mejora las propiedades mecánicas de la concha, por lo que la matriz orgánica juega un rol fundamental en el proceso de biomineralización (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Por lo anterior, el estudio del rol de las proteínas involucradas en el proceso es de amplio interés en el área científica para comprender el mecanismo de biomineralización (Liu & Zhang, 2021).

La formación de la concha ocurre por medio de interacciones biológicas y físicas, tales como; actividad genética y celular, interacción proteína-fase mineral, formación y nucleación de cristales, competencia de cristales, crecimiento en espacios confinados y auto-organización (Clark, 2020). Por lo que, la biomineralización involucra alta selectividad y captación de elementos de los ambientes locales, así como la incorporación de estos a estructuras funcionales bajo un estricto y complejo control biológico (Mann, 2001). Dicho control es llevado a cabo por células epiteliales del manto, un tejido delgado que se encuentra junto a la capa interna de la concha (capa nacarada) compuesto por dos epitelios (externo e interno) separados por tejido conectivo, que contienen una solución acuosa y un espacio y fluido extrapalial, respectivamente (Fig. 1) (Mann, 2001; Li et al. 2017).

Inicialmente, se forma una capa proteica altamente entrecruzada llamada periostraco, la cual en conjunto con las células epiteliales del manto forman un espacio que contiene diversas macromoléculas, llamado matriz, la cual funge como base para la deposición de los minerales de CaCO_3 además de actuar como sustrato para el inicio de la biomineralización (Addadi et al. 2006; Nudelman, 2015). Finalmente, se forman los minerales dentro de la matriz, la capa prismática es la primera en formarse cubierta por el periostraco, y la capa nacarada es formada conforme la concha crece en términos de grosor (Mann, 2001). Durante la formación de la fase mineral, algunas proteínas ácidas se mantienen ocluidas dentro de la fase mineral (Addadi et al. 2006).

Si bien las condiciones ambientales, tales como temperatura y presión favorecen la formación de calcita debido a que presenta una mayor estabilidad en comparación con la aragonita, los moluscos controlan genéticamente el tipo de polimorfo en un ambiente determinado (Nudelman, 2015). Siendo las SMPs, las principales biomoléculas participantes, las cuales son expresadas por el tejido del manto y secretadas en el espacio extrapalial (EPS, por sus siglas en inglés), entre la concha y el manto, donde posteriormente los iones Ca^{2+} y $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ son transportados para interactuar con las SMPs y otras biomoléculas para el inicio de la nucleación y la formación controlada de cristales de CaCO_3 (Chandra Raja & Vengatesen, 2020) (Fig. 1). Por lo anterior, la identificación y cuantificación de las SMPs es uno de los pasos clave para

comprender el proceso de biomineralización (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Por otro lado, debido a que los iones calcio y bicarbonato, materias primas de la biomineralización, derivan principalmente del agua de mar y el alimento, el Ω CaCO_3 del agua de mar es un importante parámetro que determina la tasa del proceso de biomineralización (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020).

2.1.2 Estructura del tejido del manto de moluscos bivalvos.

El manto es el órgano externo que cubre el interior de las valvas de la concha y el resto de los órganos y tejidos blandos (Fougerouse et al. 2008). La principal función del manto es la secreción de los minerales que forman las valvas de la concha, así como el crecimiento de esta (Fougerouse et al. 2008). El manto está compuesto por dos lóbulos grandes, cada uno de los cuales cubre una valva de la concha (Fougerouse et al. 2008). El epitelio de los moluscos está compuesto por células ciliadas simples, cuboidales y a veces, columnares (Smolowitz, 2021). El epitelio contiene moco y células sensoriales que se encuentran intercaladas en este, donde una lámina basal separa las células epiteliales de los tejidos conectivos y fibras musculares subyacentes (Pérez Estrada, 2000; Fougerouse et al. 2008; Smolowitz, 2021).

El epitelio de los bivalvos está dividido generalmente en dos zonas, zona central y borde del manto (Smolowitz, 2021). Una de ellas es la zona central (paleal o membranosa), compuesta por dos capas epiteliales separadas por tejido conectivo, epitelio externo e interno (Fig. 3) (Smolowitz, 2021). La capa del epitelio externo o también conocido como epitelio de la concha, se encuentra adherido a la superficie interna de la concha, mediante una unión que puede romperse fácilmente sin destruir las células epiteliales ni los cilios, y produce las valvas de la concha y está compuesto principalmente por células simples cuboidales y/o columnares con cilios largos, compactos y abundantes (Smolowitz, 2021). El epitelio interno cuboidal ciliado recubre desde la superficie a la cavidad del manto, contiene muchas células calciformes productoras de moco con numerosas inclusiones redondas en su citoplasma (Smolowitz, 2021).

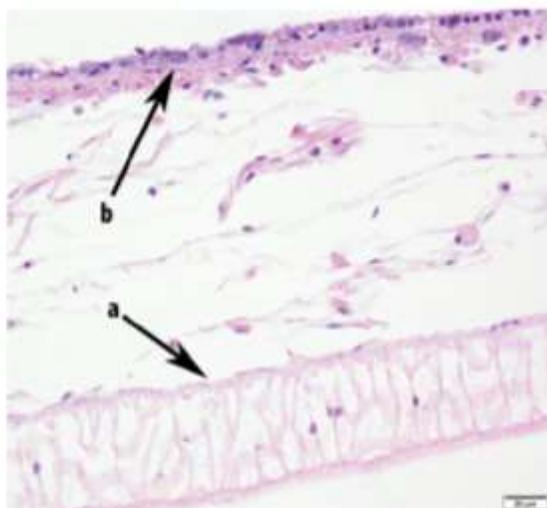


Figura 3. Manto paleal (manto membranoso) de la zona central. a, epitelio del manto; b, cavidad del epitelio del manto (Smolowitz, 2021).

El epitelio interno se encuentra en contacto con el medio ambiente (p. ej. Agua de mar) y tejidos internos, mientras que el epitelio externo segrega todos los componentes macromoleculares e iónicos para la síntesis de la fase mineral (Marin et al. 2012). El epitelio externo e interno generalmente presentan una monocapa de células con microvellosidades, intercaladas por células caliciformes (mucositos) productores de moco (Marin et al. 2012). Además, las células del epitelio externo presentan bombas y canales de membrana para la expulsión de precursores inorgánicos del CaCO_3 (ion bicarbonato), por lo que, si el calcio se libera en el sitio de calcificación de forma iónica, el transporte de iones no es pasivo, sino que requiere el papel activo de bombas transmembrana, tales como Ca-ATPasas (Marin et al. 2012). Sin embargo, estas bombas no se encuentran bien documentadas a nivel molecular, por lo que se sugiere que para el ion bicarbonato podría existir un transporte equivalente, que implicaría canales o bombas de bicarbonato, siendo las anhidrasas carbónicas (AC) transmembranales una alternativa que cataliza la hidratación del CO_2 a bicarbonato (Marin et al. 2012).

La línea paleal (línea de la zona central) delimita circunferencialmente, la zona central del manto (unión con la valva) del borde del manto (no hay unión con la valva) (Smolowitz, 2021). Por lo que la zona posterior a la línea paleal se denomina borde del manto, este suele ser más grueso

en comparación con la zona central del manto y en la mayoría de los bivalvos, se divide en tres lóbulos salientes: externo (1), medio (2) e interno (3) (Fig. 4) (Smolowitz, 2021).

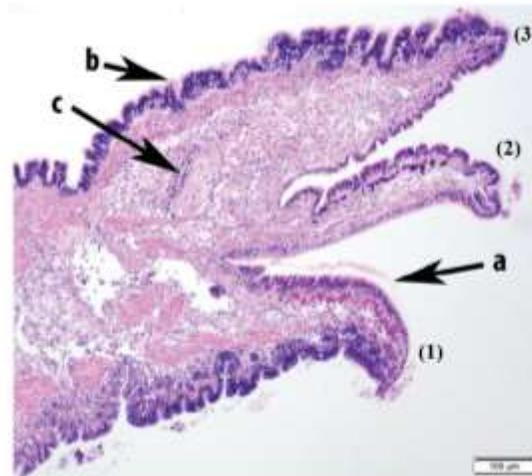


Figura 4. Orilla del manto de una ostra mostrando los tres lóbulos. a, periostraco ubicado entre el lóbulo externo (1), y medio (2); b, lóbulo interno (3); nervio circumpaleal (Smolowitz, 2021).

En la base del surco periostracal, entre los lóbulos externo y medio (lóbulos 1 y 2), se encuentra la glándula periostracal, que secreta periostraco (Smolowitz, 2021). El periostraco es delgado y por lo general escamoso, se observa en la superficie externa de la concha y en el borde del manto, funciona en la superficie interna como molde de la cual se construye el resto de la fase mineral, debido a sus características, el periostraco se elimina frecuentemente por frotamiento de la superficie externa de la concha en áreas más antiguas de la misma (Fig. 5 y 6) (Smolowitz, 2021).

La zona marginal es el área especializada del lóbulo externo (lóbulo 1) que se extiende más allá de la línea paleal, donde se forma una cámara de secreción, entre el epitelio del manto y el periostraco, y se secreta la proteína por las células epiteliales glandulares de estructura columnar simple (Smolowitz, 2021). La matriz proteica se calcifica dentro de la cámara y forma la capa prismática de la concha en la superficie interna del periostraco (Smolowitz, 2021). Conforme crece el borde del organismo, por medio de la deposición del periostraco y la capa prismática, el epitelio de la zona central deposita la capa interna iridiscente de la concha (nácar)

al entrar en contacto con la superficie interna de la capa prismática, aumentando la profundidad de la concha (Smolowitz, 2021). Por lo que, el nácar es producido por el epitelio de toda la zona central, lo que promueve que la porción más gruesa de la valva se encuentre cercana al ligamento (músculo abductor) (Smolowitz, 2021).

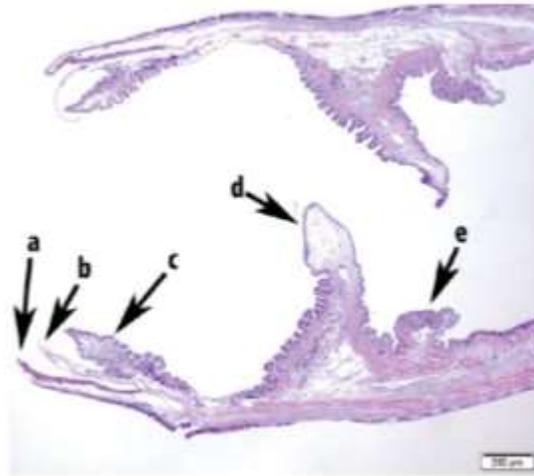


Figura 5. Orilla del manto de la almeja *Mercenaria mercenaria* en la que se indican los lóbulos del manto. a, lóbulo externo (1); b, pliegue periostracal; c, lóbulo medio (2); d, lóbulo 3; e, lóbulo 4 (Smolowitz, 2021).

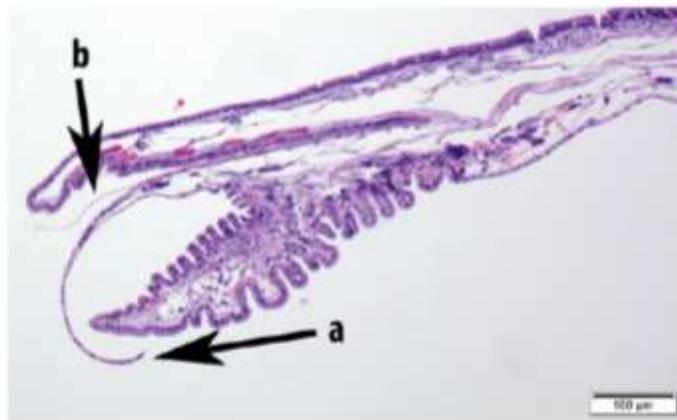


Figura 6. Orilla del manto de la almeja *Mercenaria mercenaria* en la que se señala el periostraco. a, pliegue periostracal; b, periostraco (Smolowitz, 2021).

Los lóbulos medio e interior del borde del manto presentan numerosos pequeños tentáculos, donde los lóbulos internos suelen ser largos y grandes, proyectándose en ángulo recto hacia el lóbulo medio (Smolowitz, 2021). Estos tentáculos internos se entrecruzan formando un sistema

semicerrado cuando las valvas de la concha están casi cerradas, proporcionando una cavidad cerrada que permite el flujo de agua a través de los sifones y sobre las branquias (Smolowitz, 2021). Pequeñas y numerosas glándulas mucosas con conductos se extienden hacia la superficie del tejido conectivo subyacente, al lado del epitelio cilíndrico de los lóbulos internos (Smolowitz, 2021). Los tejidos conectivos que se encuentran entre las dos capas epiteliales del manto están compuestos por sinusoides (canales a través de los cuales fluye la sangre), músculos, nervios y células de soporte (Smolowitz, 2021). Debajo de los lóbulos, en los tejidos conectivos de la zona marginal hay un nervio circumpaleal y una arteria circumpaleal (Smolowitz, 2021). Los músculos longitudinales se extienden desde la línea paleal hasta las puntas de los lóbulos y funcionan para retraer el borde del manto hacia la concha cuando las valvas están bien cerradas (Smolowitz, 2021).

2.2 Interacción entre el dióxido de carbono (CO₂) y el océano.

El equilibrio químico del océano es regulado por el sistema de carbono inorgánico, el cual controla principalmente el pH del océano. Existen cuatro formas principales de carbono inorgánico disuelto (DIC, por sus siglas en inglés) en el océano: iones bicarbonato (HCO₃⁻), iones carbonato (CO₃²⁻) y dióxido de carbono acuoso (CO_{2(aq)}) y ácido carbónico (H₂CO₃). A pH 8.2, el CO_{2(aq)} se encuentra principalmente en forma de bicarbonato, (~88%) y el resto en forma de CO₃²⁻ (~11%) y carbono disuelto (~0.5%) (Fabry et al. 2008). Cuando el dióxido de carbono (CO₂) atmosférico resultado de actividades antropogénicas se disuelve en el océano, reacciona con el agua de mar (H₂O) formando ácido carbónico (H₂CO₃), el cual se disocia rápidamente en un ion hidrógeno (H⁺) y HCO₃⁻ (Fabry et al. 2008; Branch et al. 2013; Clark, 2020). Debido a que el agua de mar se encuentra saturada de iones carbonato (CO₃²⁻) estos actúan como neutralizadores de los iones hidrógeno (H⁺) formando más bicarbonato (HCO₃) (Fig. 7) (Fabry et al. 2008; Branch et al. 2013; Clark, 2020). Por tanto, la dilución del CO₂ en el agua de mar incrementa las concentraciones de H₂CO₃, HCO₃⁻ y H⁺, y disminuye la concentración de CO₃²⁻ y el pH (pH = -log[H⁺]) (Fabry et al. 2008). Así, las tres formas disueltas de carbono inorgánico disuelto (DIC): CO_{2(aq)}, HCO₃⁻, CO₃²⁻, son importantes para procesos biológicos de organismos marinos, tales como las especies biomineralizantes, quienes utilizan el bicarbonato (HCO₃) como fuente de

carbono y iones calcio (Ca^{2+}) para producir estructuras mineralizadas de carbonato de calcio (CaCO_3), liberando iones hidrógeno (H^+) durante la reacción (Fig. 7).

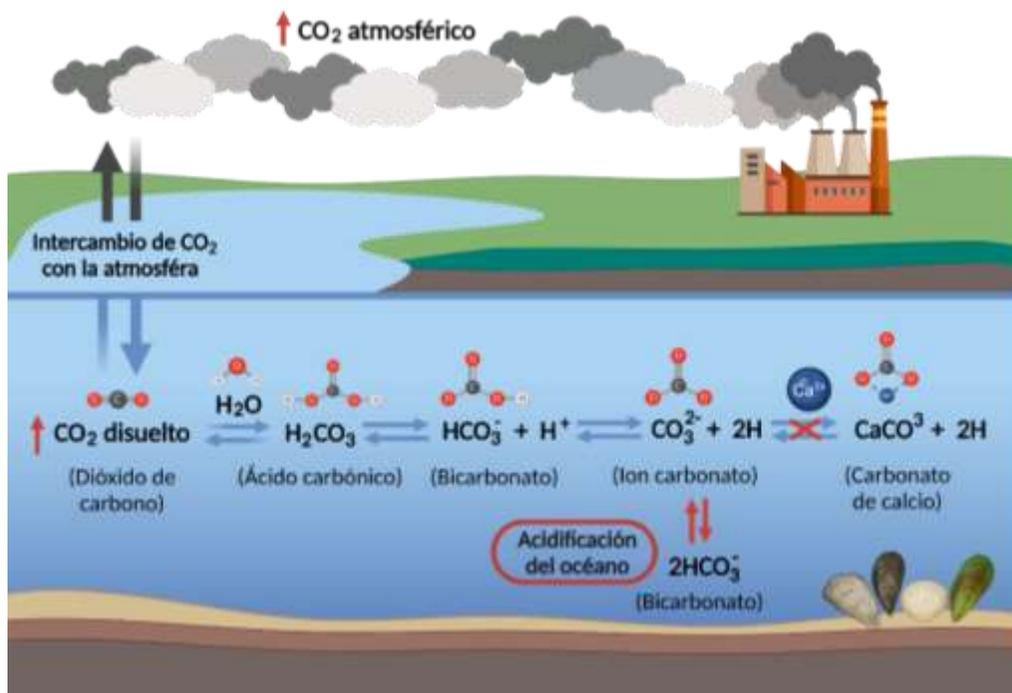


Figura 7. Interacción entre el CO_2 atmosférico y el agua de mar (H_2O). Flechas azules, reacción de la formación de CaCO_3 ; flechas azules/rojas, reacción de acidificación del océano (Modificado de Branch et al. 2013).

La liberación de H^+ afecta el equilibrio ácido-base de la célula al disminuir el pH en el sitio de calcificación y la tasa de producción de CaCO_3 , por lo que, para mantener el equilibrio, los H^+ deben ser bombeados constantemente fuera del sitio de calcificación a través de transportadores o canales de iones celulares (Li et al. 2016; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Debido a lo anterior, el estado de saturación de CaCO_3 del agua de mar es uno de los parámetros más importantes que determina la tasa del proceso de biomineralización (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020).

2.2.1 Acidificación del océano (AO).

Las reacciones químicas involucradas desde la interacción entre el CO_2 y el océano hasta la precipitación del CaCO_3 se encuentran en equilibrio, y la concentración de cada producto de reacción (CO_2 , HCO_3^- , H^+ y CO_3^{2-} .) dependerá de factores ambientales tales como presión, salinidad, temperatura y pH (Richards et al. 2018). Un cambio en una o múltiples condiciones podría provocar efectos negativos sobre los organismos (Doney et al. 2020).

El océano tiene la capacidad de regular los efectos del cambio climático al tomar el CO_2 atmosférico mediante el sistema natural de carbonato, evitando de esta forma cambios en el pH del océano (Fabry et al. 2008; Bellerby, 2017). Sin embargo, este sistema es lento, por lo que se ve limitado con un aumento constante de CO_2 (Fabry et al. 2008).

Del 30-50% del CO_2 global emitido por actividades antropogénicas (p. ej. Quema de combustibles fósiles) es absorbido por el océano (Doney et al. 2020). Y desde la revolución industrial, la concentración de CO_2 atmosférico ha incrementado exponencialmente a causa de actividades antropogénicas (Doney et al. 2020; Alma et al. 2020). Actualmente, las emisiones de carbono en la atmósfera continúan en aumento, incrementando el intercambio de CO_2 entre la atmósfera y el océano, y la subsecuente acumulación de CO_2 en el agua de mar (Bellerby, 2017). Esta acumulación provoca un incremento de las concentraciones de carbono inorgánico, y una disminución del pH y la concentración de CO_3^{2-} (estado de saturación del carbonato de calcio, Ω CaCO_3), fenómeno conocido como acidificación del océano (AO) (Caldeira & Wickett, 2003; Doney et al. 2009; Liu et al. 2012; Wei et al 2015; Li et al. 2016; Bellerby, 2017; Alma et al. 2020; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020).

Bajo condiciones de AO, los organismos calcificantes requieren mayor energía para procesos fisiológicos esenciales (p. ej. homeostasis del pH), lo que implica importantes costos celulares, que afectan negativamente funciones fisiológicas de los organismos marinos, tales como el crecimiento, reproducción y defensa (Li et al. 2015; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Dicho fenómeno afecta directamente a organismos marinos calcificantes que presentan exoesqueletos o conchas de CaCO_3 , tales como los equinodermos, corales y moluscos (Beniash

et al. 2010; Anzoux-Bordenave et al. 2019). Siendo los moluscos, los organismos marinos más vulnerables a la acidificación debido a su baja capacidad de regulación ácido-base, siendo más sensibles en la etapa larvaria y juvenil (Beniash et al. 2010; Anzoux-Bordenave et al. 2019). Sin embargo, la magnitud y dirección de los efectos de la acidificación varían entre las especies (Beniash et al. 2010). En bivalvos, se ha reportado que afecta negativamente al reducir la reproducción, supervivencia de bivalvos juveniles, retraso en la maduración de adultos, alteración en el reclutamiento, biomasa y valor económico de las pesquerías (Doney et al. 2020).

Desde la revolución industrial, el pH global del agua de mar ha disminuido en un promedio de 0.1 unidades debido a la absorción excesiva de CO_2 (Fig. 8, línea negra) (Ries et al. 2009; Liu et al. 2012). Actualmente, los niveles de CO_2 han incrementado un 50% más en comparación con los niveles preindustriales, y se estima que para el año 2100 el pH disminuya entre 0.3 a 0.5 unidades (pH de 8.17 a 7.77) (Fig. 8, línea, roja) y 0.7 unidades para el año 2300 (pH 7.50) (Caldeira & Wickett, 2003; Ries et al. 2009; Liu et al. 2012; Li et al. 2015; Laffoley & Baxter, 2016; Li et al. 2016, Doney et al. 2020). Donde las aguas superficiales están presentando una mayor disminución del pH y del estado de saturación del carbonato de calcio (ΩCaCO_3), debido a que en estas se realiza la mayor parte de la producción oceánica (Doney et al. 2020).

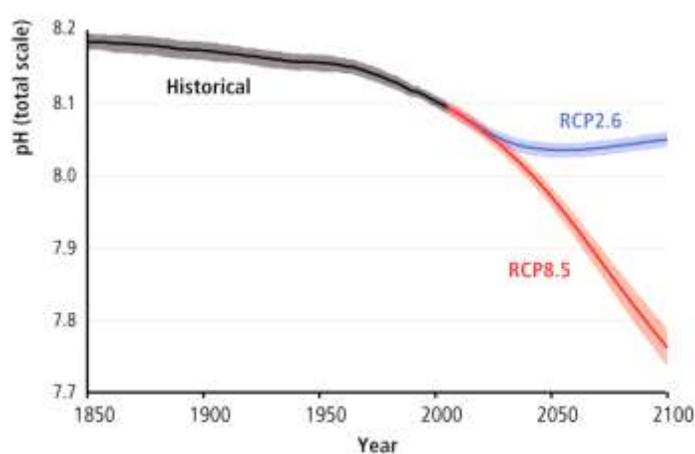


Figura 8. Modelos climáticos proyectados desde el año 1850 al 2100 del pH promedio global del océano. Línea negra, tendencia histórica con un decremento de 0.1 unidades de pH.

Proyecciones para el año 2100: Línea roja, escenario basado en altas emisiones de CO₂; Línea azul: escenario de mitigación estricta de emisiones de CO₂ (IPCC, 2014).

Estos cambios en la química del carbonato del océano afectarán una gran variedad de procesos biológicos dependientes del pH así como los componentes del sistema de carbonato, por lo que se prevé que los organismos calcificadores sean principalmente afectados por la AO, afectando su supervivencia y, por tanto, la producción, funcionamiento y diversidad de los ecosistemas marinos, donde algunas especies serán beneficiadas y otras afectadas, hasta el punto de la extinción local (Fig. 9) (Doney et al. 2020; Liu et al. 2012; Schalkhauser et al. 2012; Bellerby, 2017). Debido a que la pesca productiva y los organismos y ecosistemas de mayor importancia cultural dependen del océano, la AO provocará una reducción del crecimiento y supervivencia de especies calcificantes de interés comercial (IPCC, 2014; Bellerby, 2017).

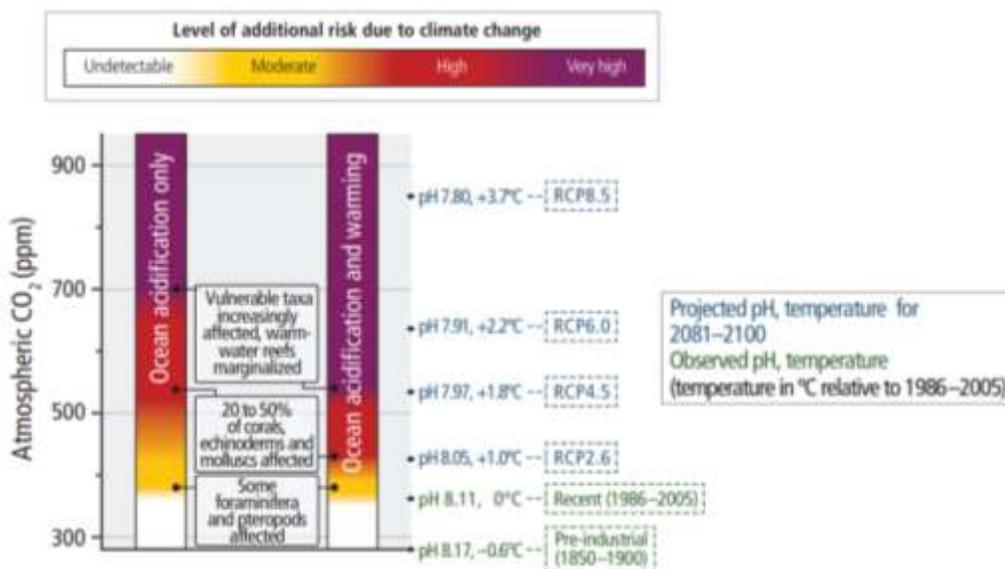


Figura 9. Riesgo de las especies marinas bajo condiciones de acidificación del océano (AO). La sensibilidad a la AO es mayor en organismos marinos calcificadores (IPCC, 2014).

2.2.1.1 Efectos de la AO en moluscos bivalvos: a nivel estructural, fisiológico y genético.

El ion carbonato (CO_3^{2-}) está involucrado en el proceso de calcificación de organismos marinos que forman estructuras de CaCO_3 , como los corales, moluscos y equinodermos, debido a esto, estos organismos son vulnerables a la AO (Wei et al. 2015). Por lo anterior, las investigaciones recientes se han centrado en los efectos de la acidificación del océano sobre la calcificación de diversos organismos marinos (Liu et al. 2012). Los organismos calcificadores tienen la capacidad de regular la biomineralización a través del transporte (pasivo y activo) de iones dentro y fuera del sitio de calcificación (aislado del agua de mar), sin embargo, dicha capacidad de regulación ácido-base es débil, por lo que estos organismos han mostrado ser vulnerables a la AO, donde la biomineralización es el principal proceso afectado (Weiner & Dove, 2003; Li et al. 2016).

Investigaciones han revelado una disminución de las tasas de calcificación bajo condiciones de acidificación de una diversidad de organismos calcáreos, sin embargo, la sensibilidad varía entre las especies e incluso algunos taxones podrían mostrar una mayor calcificación a niveles de CO_2 proyectados (Iglesias-Rodríguez et al. 2008, Ries et al. 2009). Y los estudios de la respuesta de la calcificación bajo condiciones de acidificación se encuentra todavía limitado de especies, por lo que poco se conoce acerca de los mecanismos de calcificación específicas de cada especie (Doney et al. 2009).

El aumento antropogénico del dióxido de carbono atmosférico ($p\text{CO}_2$) disminuye el pH de los océanos, reduciendo así el grado de saturación con respecto al carbonato de calcio (CaCO_3). Dicho fenómeno de acidificación del océano se sugiere tendrá un impacto negativo en los organismos marinos que forman conchas y esqueletos a partir de CaCO_3 (Ries et al. 2009). Un estudio de 18 organismos marinos que abarcaban una amplia gama taxonómica entre los cuales destacan, crustáceos, cnidarios, equinoideos, rodofita, clorofita, gasterópodos, bivalvos y anélidos fueron expuestos a elevados niveles de CO_2 durante 60 días, mostrando que 10 de las 18 especies estudiadas exhibieron tasas reducidas de calcificación neta y en algunos casos, disolución neta bajo altos niveles de $p\text{CO}_2$ (Ries et al. 2009). Sin embargo, en 7 especies la calcificación neta aumentó por debajo de los niveles intermedios y/o altos de $p\text{CO}_2$, y una especie no mostró respuesta a la AO (Ries et al. 2009). De los cuales se reportó que los

moluscos de clase bivalvos, que mantienen un pH del fluido calcificante en el rango de 7.33-8.53, mostraron ser más vulnerables a la AO en comparación con los corales quienes mantienen el pH del fluido calcificante en 9.3 (Ries et al. 2009). Lo anterior sugiere que las diferentes respuestas pueden indicar las diferencias entre los organismos en su capacidad para regular la cubierta orgánica y la solubilidad de su capa o mineral esquelético (Ries et al. 2009). Por tanto, el impacto del $p\text{CO}_2$ atmosférico elevado sobre la calcificación marina es variado, independientemente de los mecanismos específicos involucrados (Ries et al. 2009).

Adicionalmente, experimentos de acidificación sobre organismos marinos, tales como el coral *Stylophora pistillata*, el equinodermo *Amphiura filiformis*, el caracol *Limacina helicina*, el gasterópodo *Strombus luhuanus* y los bivalvos, *Limacina gelicina*, *Mytilus edulis* y *Crassostrea gigas* mostraron que un decremento en el pH del agua de mar provoca efectos negativos sobre la tasa de calcificación y por tanto en el crecimiento de la fase mineral (Gazeau et al. 2007; Marubini et al. 2008; Wood et al. 2008; Comeau et al. 2009; Dupont & Thorndyke, 2009; Liu et al. 2012). Dicho efecto son respuestas de la acidificación interna, siendo la disolución de sus estructuras mineralizadas una estrategia para compensar dicha inestabilidad química (Michaelidis et al. 2005; Miles et al. 2007; Spicer et al. 2007; Doney et al. 2009). Sin embargo, se ha reportado que la tasa de calcificación del gasterópodo *Littorina littorea* y el cefalópodo *Sepia officinalis* incrementó bajo condiciones de pH ácido, por lo que la respuesta a variaciones en el sistema de carbonatos es diversa entre los organismos marinos (Findlay et al. 2009; Gutowska et al. 2010; Liu et al. 2012). Por lo que es necesario comprender los mecanismos fisiológicos esenciales de la biomineralización para evaluar la sensibilidad de los organismos marinos a la AO (Liu et al. 2012).

Es de esperar que dichos efectos de la AO sobre la calcificación influyen en un último término en la tasa del metabolismo energético de los invertebrados, a través de cambios en el pH extracelular e intracelular que causan alteraciones en la distribución de energía (Langenbuch & Pörtner, 2004; Michaelidis et al. 2005; Lannig et al. 2010; Melatunan et al. 2011). A nivel celular, cambios en el pH extracelular provocan una disminución de la tasa y los costos energéticos de la regulación ácido-base, regulación iónica y/o síntesis de proteínas (Pörtner, 1987; Pörtner &

Bock, 2000; Langenbuch & Pörtner, 2004; Schalkhauser et al. 2012). A nivel organismo, ocurre una disminución o una estimulación en la tasa metabólica del organismo completo, dependiendo de si la AO deprime o estimula los mecanismos transepiteliales de regulación ácido-base (Pörtner, 1987; Pörtner & Bock, 2000; Langenbuch & Pörtner, 2004; Michaelidis et al. 2005; Beniash et al. 2010; Stumpp et al. 2011; Schalkhauser et al. 2012). Dichos cambios pueden desencadenar compensaciones en la distribución de energía entre diferentes procesos biológicos, tales como, la regulación de iones, la calcificación, el crecimiento y desarrollo, lo que a su vez provocará limitación en uno o más de dichos procesos (Pörtner & Bock, 2000; Wood et al. 2008; Beniash et al. 2010; Guderley et al. 2010; Stumpp et al. 2011; Schalkhauser et al. 2012).

La mayoría de los organismos calcificadores muestran tasas metabólicas, de crecimiento y de calcificación reducidas como síntomas de la exposición a niveles elevados de CO_2 debido al fenómeno de AO (Dineshram et al. 2012). Además de que la AO afecta el proceso de biomineralización a nivel estructural, este fenómeno también afecta negativamente el proceso a nivel molecular. Debido a que la producción de estructuras de CaCO_3 dependen no solo de la saturación de CaCO_3 , sino también de la capacidad de expresión de SMPs (Brahmi et al. 2021). Y se ha reportado, que altos niveles de pCO_2 impactan negativamente en el proceso de biomineralización en términos de tasa de crecimiento, integridad de las estructuras de CaCO_3 , y en la expresión de genes que codifican SMPs (Brahmi et al. 2021). Por lo que el estudio de las SMPs es una de las principales herramientas que permiten dilucidar las bases moleculares del proceso de biomineralización en moluscos, así como determinar el impacto de los cambios ambientales (acidificación y calentamiento del océano) sobre este (Liu & Zhang, 2021). Por ejemplo, se ha reportado la relación entre la expresión diferencial de las SMPs y la plasticidad fenotípica bajo condiciones ambientales estresantes en diversas especies de moluscos (Liu & Zhang, 2021). Además, se ha reportado que bajo condiciones ambientales estresantes ocurren modificaciones en la microestructura y composición de las conchas, donde el estudio de las SMPs puede ser uno de los principales indicadores de dichas alteraciones (Liu & Zhang, 2021).

La regulación de la expresión génica es uno de los procesos celulares regulados por los organismos, y es una de las respuestas más rápidas y sensibles al estrés ambiental (Liu et al. 2012). Por lo que, la evaluación del perfil de expresión de genes relacionados con el proceso de biomineralización bajo condiciones ambientales cambiantes tales como la acidificación del océano, podría ser una alternativa para determinar los impactos del cambio climático sobre los organismos marinos, ya que la respuesta a nivel molecular de los organismos marinos para tolerar la acidificación del océano es poco conocida (Liu et al. 2012).

Welladsen et al. (2010) expusieron a la ostra perlera *Pinctada fucata* bajo agua acidificada a pH 7.80 y 7.60 por 28 días. Las conchas expuestas a dichas condiciones fueron 25.9% (pH 7.80) y 26.8% (pH 7.60) más débiles en comparación con los controles (Welladsen et al. 2010). Además, un análisis de SEM mostró que a pH 7.60 la concha presentó signos de malformación y/o disolución (Welladsen et al. 2010). Dichos resultados sugieren que la AO impactará reduciendo la dureza de la concha y causando malformaciones del nácar de *P. fucata*, lo cual provocará impactos ecológicos en las ostras perleras, y en último término un impacto negativo en la industria perlera que depende de ellas (Welladsen et al. 2010). Liu et al. (2012) analizaron el efecto de la disminución del pH en la expresión de los genes *calmodulina*, *she-7-F10* y *hsp70* en *P. fucata*, los cuales se han reportado participan en el proceso de biomineralización de la concha. Bajo condiciones de acidificación (pH 7.70) se observó una disminución de la expresión de genes relaciones con la biomineralización, y aumento en la expresión de *Hsp70* (Liu et al. 2012). En el caso de *calmodulina* es un mediador intracelular de la señalización de calcio, además se ha reportado juega un rol importante en la regulación de la absorción y el transporte de calcio en la biomineralización (Liu et al. 2012). En *Patinopecten yessoensis*, *Hyriopsis schlegelii*, *P. fucata* y *C. gigas*, se ha reportado que calmodulina regula la captación, transporte y secreción de calcio durante la formación de la concha (Li et al. 2016). Por otro lado, *She-7-F10* presenta altos niveles de identidad con proteínas estructurales de la matriz de la concha, por lo que se sugiere podría estar involucrada en el proceso de biomineralización de la concha (Liu et al. 2012). Y *Hsp70* se encuentra dentro de un grupo de proteínas altamente conservadas, la cual tiene una función protectora en todos los organismos, y se ha reportado que se expresa en *P. fucata* en respuesta a estímulos estresantes (Liu et al. 2012). Por lo anterior, se sugiere que una

disminución del pH en el agua de mar impactará procesos fisiológicos, y potencialmente la adaptabilidad de *P. fucata* (Wang et al. 2009; Liu et al. 2012).

Posteriormente, se analizó el impacto de la exposición a altos niveles de CO₂ sobre el manto de *C. gigas* a nivel metabólico y proteómico (Wei et al. 2015). *C. gigas* presentó niveles alterados de ATP, succinato, MDH, PEPCK y ALDH, además, las cadenas ligeras de calponina-2, tropomiosinas y miosina presentaron un incremento de la regulación. Por lo que altos niveles de CO₂ posiblemente causará alteraciones en la estructura del citoesqueleto y en el metabolismo energético del tejido del manto de *C. gigas* (Wei et al. 2015).

Li et al. (2016) analizaron la respuesta del transcriptoma y el proceso de biomineralización de *P. fucata* a elevados niveles de CO₂ (pH 7.80 y 7.50). Bajo dichas condiciones se indujeron cambios en la tasa de calcificación neta, así como en el contenido de calcio, mientras que no se observaron cambios en la ultraestructura de la concha (Li et al. 2016). Los resultados mostraron regulación positiva de genes relacionados con la regulación de iones y ácido base, así como la ruta del metabolismo de aminoácidos bajo condiciones de AO, lo cual sugiere que *P. fucata* podría estar implementando un mecanismo ácido-base compensatorio para mitigar los efectos del pH ácido (Li et al. 2016).

Liu et al. (2017) investigaron el efecto de la AO sobre el crecimiento, microestructura de la concha y los niveles de expresión de genes que codifican SMPs, tales como *aspeina*, *N16* y *nacreína* de *P. fucata*, las cuales se han reportado participan en la formación de los polimorfos de CaCO₃. Donde reportaron la disminución de los niveles de expresión de los genes que codifican SMPs bajo condiciones de acidificación (pH de 7.40) desde el primer día de exposición hasta finalizar el experimento. En el caso de *aspeina*, el transcrito se expresa únicamente en la orilla externa del manto, este codifica una proteína ácida de 413 aminoácidos con proporciones elevadas de aspartato (Asp), Gly (glicina) y serina (Ser), y se ha reportado que participa en la formación de la capa prismática de calcita en *P. fucata* (Tsukamoto et al. 2004; Kobayashi & Samata, 2006; Liu et al. 2012). Por otro lado, *N16* codifica una SMP esencial para la nucleación de cristales de aragonita, ya que forma un complejo con MS160 durante la formación de la capa nacarada de *P. fucata*, además no presenta homología definida con otras proteínas, por lo que

representa una nueva familia de proteínas aislada de la concha de moluscos (Samata et al. 1999; Liu et al. 2017). El transcrito de nacreína se expresa específicamente en las células del epitelio externo del manto, y codifica una proteína que contiene dos dominios funcionales: dominio AC y un dominio repetido de Glicina y asparagina, Gly-Xaa-Asn (Xaa=Asp, Asn o Glu) (Miyamoto et al. 1996; Miyamoto et al. 2005). Es una proteína reguladora de las concentraciones de bicarbonato (HCO_3^{-2}) y calcio (Ca^{2+}) y participar en la cristalización de CaCO_3 , donde el dominio repetido Gly-Xaa-Asn une el calcio y dominio de AC cataliza la formación de bicarbonato, promoviendo la formación de la capa nacarada, por lo que ha sido utilizada para evaluar el metabolismo celular durante la biomineralización, ya que, la síntesis de nacreína incrementa al aumentar la concentración de calcio, por lo que resulta ser un marcador de la tasa de biomineralización (Miyamoto et al. 1996; Miyamoto et al. 2005; Liu et al. 2012; Liu et al. 2017).

Por otro lado, la longitud, el contenido de calcio y la dureza de la concha de *P. fucata* disminuyó significativamente a un pH de 7.40, la microestructura nacarada de la concha mostró desorganización y aparente pérdida de integridad estructural en la capa nacarada, y la capa prismática mostró malformación con signos de corrosión y disolución de acuerdo con los análisis por SEM (Liu et al. 2017). Por lo tanto, se sugiere que la acidificación del océano limitará el crecimiento de la concha, la calcificación y los niveles de expresión de genes relacionados con la biomineralización (Liu et al. 2017).

Auzoux-Bordenave et al (2019) investigaron los efectos de la AO inducida por CO_2 en abulones juveniles (6 meses) *Haliotis tuberculata*, un gasterópodo importante a nivel comercial, al cultivar los juveniles durante 3 meses a diferentes niveles de pH (8.10, 7.80, 7.70, 7.60), los cuales representan los pH predichos para el futuro. El análisis por SEM mostró que la textura y porosidad de las capas mineralizadas de la concha presentaban modificaciones, tales como la ruptura de las placas de aragonita e irregularidades en el borde de estas, al igual que el periostraco, además, la longitud, peso y dureza de la concha disminuyeron significativamente a un nivel de pH crítico (7.60) (Auzoux-Bordenave et al. 2019). Estos resultados sugieren que, bajo condiciones de AO, los mecanismos de crecimiento y la deposición de la concha de *H. tuberculata* se verán afectados negativamente, lo que provocará un impacto en el rol ecológico

de esta especie y en los costos de las industrias acuícolas que dependen de ellos (Auzoux-Bordenave et al. 2019).

Además de la especie, se ha reportado que la dirección y magnitud de la AO también depende del ciclo de vida en el que se encuentre el organismo (Ries et al. 2009; Chandra & Vengatesen, 2020). Una variedad de moluscos calcificantes, han mostrado que bajo condiciones de AO presentan un impacto negativo en la supervivencia, crecimiento, biomineralización y otras funciones fisiológicas esenciales en diferentes etapas de su ciclo de vida (Brahmi et al. 2021). En moluscos calcáreos se ha observado que la AO disminuye la supervivencia de larvas, extiende el tiempo de desarrollo, altera la morfología y/o altera la formación y calcificación de la concha (Anzoux-Bordenave et al. 2020).

Por ejemplo, la biomineralización y los mecanismos de calcificación de los estadios larvarios de moluscos pueden ser particularmente sensibles a la AO, ya que, durante su desarrollo estos forman CaCO_3 amorfo como precursor transitorio de aragonita (Weiss et al. 2002). Esta forma de CaCO_3 inestable, transitoria y amorfa es más soluble que los minerales de aragonita y calcita, por lo que, los procesos de biomineralización que ocurren durante el desarrollo embrionario y larvario pueden ser más vulnerables a la AO (Fabry et al. 2008).

Por otro lado, se ha reportado que la exposición a la AO también influye sinérgicamente con otros factores estresantes, es decir, existe una relación y/o asociación de diferentes factores con el aumento de los niveles de CO_2 atmosférico, que pueden interactuar (o no) e impactar el desempeño de los organismos marinos (Schalkhauser et al. 2012). Estudios previos han mostrado que el calentamiento y la acidificación del océano pueden interactuar de forma aditiva o sinérgica reduciendo la aptitud de los invertebrados marinos (Alma et al. 2020). En bivalvos, la AO puede reducir el rango de tolerancia térmica, promoviendo una mayor susceptibilidad a temperaturas extremas y un deterioro en el desempeño del organismo (Alma et al. 2020).

Por ejemplo, las investigaciones indican que la sensibilidad térmica mejora bajo condiciones de acidificación, por el contrario, la sensibilidad a la acidificación aumenta bajo condiciones de

estrés térmico extremo (Schalkhausser et al. 2013). Además, un experimento de la exposición sinérgica entre una baja salinidad y altos niveles de CO₂ causó mayores cambios en las características de la concha de ostras juveniles de *Crassostrea virginica* que cada uno de los factores por sí solo (Dickinson et al. 2012). Dicha intensificación ocurrió con el bivalvo *Mytilus edulis* bajo condiciones de acidificación y suministro limitado de alimentos, donde se destaca que la disponibilidad de energía maximiza la resistencia a la AO (Melzner et al. 2011; Schalkhausser et al. 2012).

Es por lo anterior, que determinar los límites de flexibilidad fisiológica bajo múltiples factores estresantes permitirá desarrollar modelos de predicción más realistas acerca del desempeño de las especies, la distribución de energía, su adaptación y supervivencia en el futuro cambiante (Alma et al. 2020). Esto ayudará a cuantificar los límites de tolerancia, así como determinar en qué condiciones los factores estresantes actuarán de forma aditiva, antagónica o sinérgica, ya que la disminución del rendimiento fisiológico y orgánico en los organismos marinos a causa de condiciones cambiantes potencialmente impactará negativamente en las redes alimentarias asociadas y las economías humanas locales (Alma et al. 2020). Esto debido a que la capacidad metabólica de los organismos depende de parámetros ambientales, tales como el pH o la temperatura, y un cambio en las condiciones ambientales fuera del rango óptimo que alcancen el rango crítico disminuirá la capacidad metabólica para mantener los procesos esenciales relacionados con el estado físico, como el crecimiento, reproducción, respuesta inmunitaria o evasión de depredadores (Schalkhausser et al. 2012; Sokolova et al. 2012).

Adicionalmente, la AO no sólo afecta a nivel estructural, energético y metabólico, sino que se sugiere que este fenómeno podría estar afectando negativamente a nivel fisiológico, específicamente al tejido del manto. Como ya se mencionó anteriormente, las microestructuras y polimorfos de CaCO₃ son reguladas por moléculas orgánicas, como polisacáridos, proteínas y lípidos, secretadas desde las células epiteliales del manto (Shimizu et al. 2022). Dichas estructuras mineralizadas desempeñan un papel vital en la protección contra depredadores, parásitos y condiciones ambientales estresantes, y debido a la vulnerabilidad del proceso de biomineralización de las conchas bajo niveles de AO predichos en un futuro cercano, las

investigaciones se han enfocado en el tejido del manto debido al rol que este juega en el proceso de biomineralización (Hüning et al. 2013; Wei et al. 2015).

Por ejemplo, la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y la formación del periostraco incrementaron en el tejido del manto de *Mytilus edulis* bajo la exposición de altos niveles de CO₂ (Hüning et al. 2013). En el manto de *C. gigas*, los niveles de alanina y ATP disminuyeron significativamente bajo la exposición de altos niveles de pCO₂, lo que sugiere cambios en las vías metabólicas después de la exposición a la AO (Lanning et al. 2010). Además, el proteoma del manto de *C. virginica* presentó cambios significativos bajo condiciones de AO, específicamente proteínas asociadas al citoesqueleto y el estrés oxidativo (Tomanek et al. 2011; Wei et al. 2015).

Los bivalvos son importantes organismos calcificadores a nivel ecológico y económico, sin embargo, los factores de estrés relacionados con el cambio climático los afectan gravemente (Alma et al. 2020). Los modelos de predicción sugieren que para el año 2100, el calentamiento y la AO alterarán negativamente el metabolismo de los bivalvos, reducirán la integridad de la concha e impactarán el proceso de biomineralización, provocando una mayor susceptibilidad de estos a las enfermedades, sin embargo, no se conoce la relación entre el metabolismo celular, la distribución de energía y la tolerancia al estrés ambiental (Alma et al. 2020). Por lo que los estudios del efecto del cambio climático sobre los organismos marinos, específicamente sobre los organismos calcificantes tales como los moluscos, se han centrado en el efecto de la disminución del pH y otros factores estresantes, así como en el efecto sinérgico de ambas condiciones sobre comunidades marinas, con el objetivo de entender los efectos de estos factores ambientales estresantes sobre la función fisiológica de los organismos (Ries et al. 2009; Liu et al. 2012; Alma et al. 2020; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Predecir la respuesta de las especies marinas ante el cambio climático permitirá comprender cómo los organismos utilizarán su energía, se adaptarán (plasticidad fenotípica), y sobrevivirán a las condiciones ambientales cambiantes (Alma et al. 2020).

2.2.1.2 Impactos ecológicos y socioeconómicos de la AO.

El CO₂ liberado por las actividades humanas es absorbido por los océanos, y si bien esto ayuda a disminuir la tasa de calentamiento atmosférico y el cambio climático, también tiene un efecto directo en la química del océano, lo que conocemos como acidificación del océano (Doney et al. 2009).

Actualmente, en los océanos costeros, el nivel de saturación de carbonato de calcio (Ω CaCO₃) está experimentando una rápida disminución sin precedentes, debido a la absorción excesiva de CO₂ de origen antropogénico (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). La mayor parte de la fauna bentónica calcificadora se encuentra en mayor proporción en las comunidades cercanas a la costa (Gutiérrez et al. 2003). Por ejemplo, los bivalvos, tales como los mejillones y las ostras, son formadores de ecosistemas en las zonas costeras, proporcionando hábitat y otros servicios a una diversidad de organismos (Gutiérrez et al. 2003; Fabry et al. 2008). Por lo que, además de su baja capacidad de regulación ácido-base, los bivalvos, debido a su distribución geográfica se convierten en organismos más vulnerables a los efectos de la acidificación.

Es bien entendido que muchos organismos formadores de estructuras mineralizadas de CaCO₃, tales como los bivalvos, exhiben una disminución de la calcificación, crecimiento y supervivencia a altos niveles de CO₂, donde los niveles de pH y disponibilidad de CO₃²⁻ son decrecientes (Doney et al. 2009; IPCC, 2014). Dichas estructuras mineralizadas brindan protección contra los depredadores y soporte estructural, por mencionar algunos de las funciones, por lo que, bajo condiciones cambiantes en la química del agua de mar, los organismos calcificadores deberán adaptarse, cambiando su distribución a regiones más ricas en iones de carbonato o sufrir un impacto adverso (Doney et al. 2009).

Debido a que los efectos de la acidificación son especie-específicos, es posible que cada uno de estos cambios afecte la dinámica de la comunidad de forma compleja, similar a los efectos proyectados de los aumentos de temperatura para comunidades terrestres. Incluso un reducido número de variaciones en las respuestas de las especies se amplificarán a lo largo de generaciones de forma creciente y podrían promover importantes reorganizaciones de los

ecosistemas bentónicos y planctónicos (Doney et al. 2009). Algunas investigaciones destacan la resistencia diferencial y adaptación evolutiva de algunas especies, sin embargo, es posible que dichas capacidades sean limitadas a concentraciones superiores de CO_2 (IPCC, 2014).

Además, la acidificación de los océanos globales no está ocurriendo de forma aislada, sino más bien, forma parte de muchos factores de estrés relacionados con el cambio climático, lo que dificulta la predicción de los efectos ecológicos de la AO (Doney et al. 2009). Por otro lado, la AO no será homogénea en todo el mundo, se sugiere que los océanos polares y las regiones de surgencia, regiones donde el movimiento de las aguas va desde niveles profundos hacia la superficie, presenten una mayor y rápida acidificación que las regiones templadas o tropicales, por lo que el pH variará significativamente de acuerdo con el ecosistema (CoastAdapt, 2017). Por ejemplo, en algunas zonas del Ártico, el agua es lo suficientemente ácida como para corroer algunos tipos de caparzones, mientras que en California ya se han observado eventos de corrosión ocasionales, lo que sugiere que las aguas superficiales serán continuamente ácidos dentro de décadas (CoastAdapt, 2017).

Se espera que la AO cause un decremento en los estados de saturación de CaCO_3 e incremente las tasas de disolución, alcalinidad y capacidad del océano para absorber más CO_2 atmosférico (Doney et al. 2009). Si la producción de carbonato se interrumpiera por la acidificación, el CO_2 atmosférico disminuiría, dicho efecto se podría observar a corto plazo en las regiones costeras, donde la tasa de calcificación de los arrecifes de coral podría disminuir hasta en un 40% para finales de este siglo (Andersson et al. 2005, 2007). Sin embargo, de manera simultánea, la tasa de absorción de CO_2 atmosférico podría saturar por completo los mecanismos compensatorios naturales, por lo que la eficiencia del océano para absorber CO_2 posiblemente disminuirá con el tiempo durante los próximos dos siglos (Doney et al. 2009).

La biomineralización brinda diversos beneficios a los organismos calcificadores, por lo que una disminución en esta podría comprometer la aptitud de estos organismos y cambiar la ventaja competitiva hacia organismos no calcificadores (Fabry et al. 2008). Por ejemplo, Kuffner et al. (2008) reportaron que una reducción en el estado de saturación de aragonita sobre organismos

de arrecifes de aguas cálidas promovió la transición de un sistema dominado por CaCO_3 a uno dominado por algas orgánicas (Fabry et al. 2008).

Debido al impacto de la acidificación sobre procesos fundamentales para la estructura y función general de los ecosistemas marinos, cualquier cambio significativo podría tener consecuencias de gran relevancia para los océanos en el futuro, y las personas que dependen de sus alimentos y otros recursos para su sustento (Doney et al. 2009).

Por ejemplo, los bivalvos, tales como los mejillones y las ostras, tienen un alto valor comercial como pesquerías (Gutiérrez et al. 2003; Fabry et al. 2008). Y debido a los actuales niveles cambiantes de CO_2 atmosférico producido por actividades antropogénicas, las prácticas acuícolas sufrirán modificaciones, tales como cambios en la ubicación de las instalaciones o mejora de las prácticas de cultivo (INAPESCA, 2021). Los efectos negativos de la AO podrían provocar pérdidas económicas significativas debido a que muchas especies de moluscos representan una importante fuente alimentaria comercial (Anzoux-Bordenave et al. 2020).

Como se mencionó anteriormente la AO causará cambios en los ecosistemas marinos, lo que a su vez tendrá consecuencias sobre sociedades que dependan de bienes y servicios que proporcionan estos ecosistemas (CoastAdapt, 2017). Algunos de los efectos sobre la sociedad podrían involucrar una reducción sustancial de ingresos, pérdida de empleo y medios de subsistencia, así como otros costos económicos indirectos (CoastAdapt, 2017). Se espera un impacto socioeconómico relacionado con la reducción en los servicios provistos por la industria alimentaria, y una disminución en el almacenamiento de carbono y regulación del clima. En el área alimentaria, los bivalvos son de gran importancia económica y se encuentran entre los grupos más sensibles a la AO, por lo que para el año 2100, los costos anuales globales de la pérdida de moluscos por la AO podrían superar los 100 000 millones de dólares bajo emisiones de CO_2 constante (CoastAdapt, 2017). Por otro lado, la capacidad de absorción de CO_2 por el océano disminuye conforme aumenta la AO, por lo que océanos ácidos son menos eficientes para moderar el cambio climático (CoastAdapt, 2017).

La AO podría afectar las redes alimentarias y el ciclo del carbono, al modificar la distribución de los nutrientes y metales dependientes del pH, lo que, a su vez, podría alterar la composición de especies y las tasas de productividad primaria (Huesemann et al. 2002). Además, los efectos sinérgicos de la AO con otros factores de estrés, tales como el calentamiento global, la eutrofización, las especies introducidas y la sobrepesca, podrían alterar las respuestas del ecosistema (Schippers et al. 2004; Hutchins et al. 2007; Fabry et al. 2008).

2.3 Callo de hacha (*Atrina maura*).

El bivalvo *Atrina maura* (Sowerby 1835) correspondiente a la familia Pinnidae, es comúnmente conocido como Callo de hacha, debido a la forma del músculo abductor, se distribuye desde Baja California hasta Perú, donde habita principalmente en zonas intermareales protegidas, en sustratos arenosos-rocosos o arenosos de limo y arcilla, utilizando el biso para su anclaje a conchas y rocas, a profundidades a partir de los 0.5 m hasta 15 m (Leyva Valencia, 1999; Escamilla-Montes et al. 2017; Gómez Valdez, 2019; INAPESCA, 2021). El callo de hacha es un bivalvo omnívoro que se alimenta por filtración, captando partículas microscópicas suspendidas, tales como diatomeas, microflagelados, copépodos, protozoarios y detritus orgánico (Angel Dapa, 2015; INAPESCA, 2021). Se ha reportado que la mezcla de las microalgas *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros muelleri* proveen condiciones fisiológicas óptimas al callo de hacha (Velasco Blanco, 1997; Leyva Valencia, 1999; Góngora-Gómez et al. 2011; Angel Dapa, 2015; INAPESCA, 2021). Debido a sus características de poca o nula movilidad (sesilidad) y su estrategia de alimentación por filtración, en la etapa adulta los organismos necesitan filtrar mayores volúmenes de agua para captar suficiente fitoplancton para su supervivencia (Dame, 2011, INAPESCA, 2021).

La concha presenta una morfología triangular, alargada y delgada, la superficie superior externa de la concha presenta espinas, y las valvas de la concha se entierran a través de su extremo puntiagudo y de forma perpendicular al fondo, fijándose a piedras, conchas o un sustrato rígido (INAPESCA, 2021). La capa externa de la concha varía de color ámbar-purpúreo a café oscuro, mientras que la capa interna presenta un color blanco iridiscente de nácar (Fig. 10a) (INAPESCA, 2021). La concha resguarda internamente la región visceral donde se encuentra el manto,

músculos retractores, gónada, branquias, músculo abductor anterior y posterior (mayor tamaño), siendo este último músculo la porción comestible conocida como “callo” (INAPESCA, 2021). Fig. 10b.

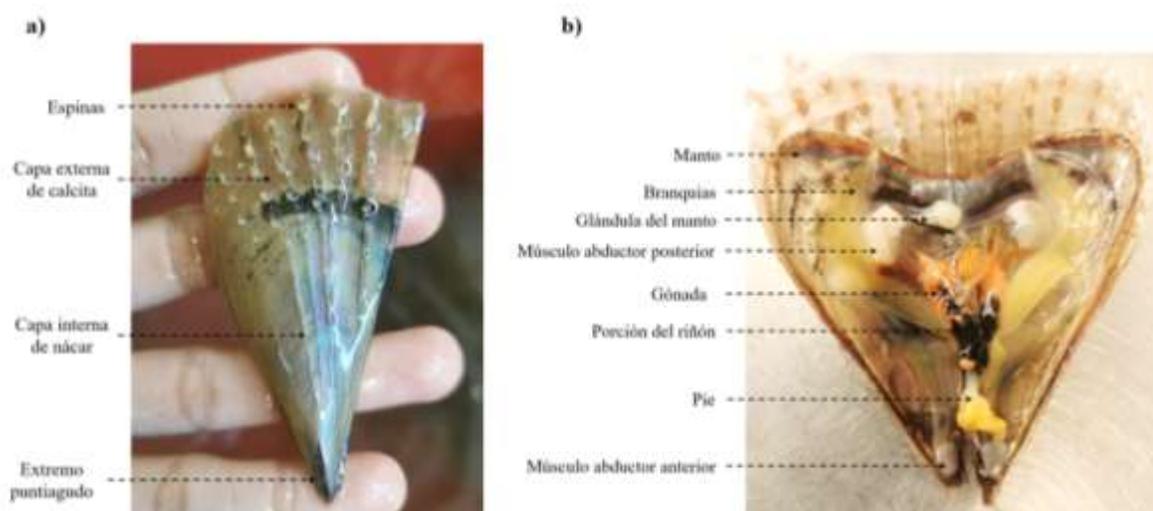


Figura 10. Callo de hacha (*Atrina maura*) de edad juvenil de la familia Pinnidae. Colectado en la bahía de La Paz, Baja California Sur, México, tamaño: 60 mm. a) morfología y capas de la concha y b) fisiología interna.

Este bivalvo representa un molusco de importancia económica debido a la alta demanda local e internacional que lo colocan como uno de los moluscos de alto precio en el mercado (INAPESCA, 2021). Debido a lo anterior, esta especie se ha convertido en una especie sobreexplotada que ha causado un impacto negativo en los bancos naturales de este recurso, por lo que se han desarrollado estrategias acuícolas que permitan el aprovechamiento sustentable y controlado mediante una perspectiva de conservación de la especie en su ambiente natural (INAPESCA, 2021). En Baja California Sur, de acuerdo con los datos del Departamento de Acuicultura de la Subdelegación de Pesca el callo de hacha es cultivado de forma semi-intensiva que involucra la etapa de siembra, pre-engorda y engorda, utilizando canastas suspendidas, donde se realizan dos siembras por año, en primavera y otoño (INAPESCA, 2021). Deben considerarse los efectos de las variables ambientales en el crecimiento del callo de hacha, por lo que los parámetros fisicoquímicos deben ser los óptimos para su cultivo (Tabla 2) (INAPESCA, 2021). En la etapa de siembra (inicial) las semillas tienen una longitud total (LT) menor a 2 cm y tiene una duración de

30 a 40 días, en la etapa de pre-engorda (intermedia) los organismos presentan una LT de 2 a 4 cm y tiene una duración de 60 a 90 días, y, por último, la etapa de engorda se lleva a cabo en el fondo y tiene una duración de 300 a 360 días. Durante la cosecha los organismos pueden alcanzar una LT superior a 20 cm con un peso mayor o igual a 20 g del músculo abductor (callo) (INAPESCA, 2021).

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos del cultivo de callo de hacha (*A. maura*) (INAPESCA, 2021).

Parámetro	Mínimo	Máximo
Temperatura (°C)	24	27
Oxígeno disuelto (mg/l)	4.0	8.4
pH	7.9	8.0
Salinidad (psu)	35	36

El precio aproximado del callo es de \$380.00 MXN por kilogramo, en el macizo continental el precio llega a \$450.00 MX por kilogramo, por lo que el callo de hacha es una especie de alto valor comercial, sin embargo no existen estadísticas de producción específicas para el callo de hacha, debido a que el callo de hacha comparte granjas con otras especies de moluscos, tales como el ostión japonés (*C. gigas*), almeja Catarina (*Agropecten ventricosus*), almeja chocolate (*Megapitaria squalida*) y almeja generosa (*Panopea generosa*) (INAPESCA, 2021). Pero INAPESCA, (2018) reportó que, en el litoral del Océano Pacífico, la producción por Estado de callo de hacha es: Sonora (54.46%), Baja California Sur (19.61%), Sinaloa (16.42%) Jalisco (3.88%), Nayarit (3.88%), Guerrero (1.67%) y Baja California y Colima (0.44%) (INAPESCA, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

Desde la revolución industrial, el valor medio de pH del agua de mar ha disminuido en un promedio de 0.1 unidades debido a la absorción de CO_2 , y se prevé que el sistema oceánico experimente una nueva disminución del pH de 0.3 a 0.5 unidades para el año 2100 y 0.7 unidades para el año 2300 (Li et al. 2016). La magnitud de los cambios proyectados probablemente tendrá efectos adversos en la función, estructura y aptitud de los ecosistemas marinos (Liu et al. 2012; Li et al. 2016). El aumento del pCO_2 provoca la AO, al reducir su grado de saturación con respecto al CaCO_3 y, por tanto, la inhibición de la calcificación, que se traduce en un impacto negativo, visible en la concha y las SMPs de los organismos marinos (Ries et al. 2009; Liu et al. 2012; Li et al. 2016; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020). Dado lo anterior, este fenómeno podría tener implicaciones ecológicas severas para los organismos marinos que forman exoesqueletos o conchas, entre los que destacan los bivalvos, por el impacto económico potencial para industrias que dependen de ellos (Welladsen et al. 2010). Además, es importante estudiar a nivel histológico, es decir, el tejido de manto de organismos sésiles como los moluscos bivalvos expuestos a condiciones de AO, ya que, estudios del impacto de la AO en términos de morfología del manto son escasos (Chandra Rajan & Vengatesen, 2020).

4. HIPÓTESIS

Durante el proceso de biomineralización de calcio se produce una acumulación de iones hidrógeno en el sitio de calcificación que disminuye la tasa precipitación de CaCO_3 , por lo que, para mantener el pH y la tasa de calcificación, los organismos mantienen la homeostasis del sistema al bombear H^+ a través de transportadores o canales de iones celulares. Si se expone al bivalvo *Atrina maura* a condiciones ambientales de pH ácido, emulando cambios críticos de AO, entonces, se observará un efecto negativo visible en la microestructura de la concha conforme incrementa el tiempo de exposición lo que tendrá un efecto negativo en el crecimiento y calcificación de la concha.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la variación de pH sobre el manto y la microestructura de la concha de juveniles de *A. maura*.

5.2 Objetivos particulares

1. Identificación de genes involucrados en la biomineralización de la concha de callo de hacha *A. maura*.
2. Analizar el efecto del pH sobre la estructura del manto de callo de hacha *A. maura*.
3. Evaluar el efecto del pH sobre los componentes microestructurales de la concha de callo de hacha *A. maura*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Recolección y aclimatación de ostras juveniles de *A. maura*.

Los juveniles de callo de hacha (*Atrina maura*, 6.8 ± 0.5 cm de altura de la concha) fueron provistos por la Organización de Pescadores Rescatando la Ensenada (OPRE), localizado en la Bahía de La Paz B.C.S. Los organismos fueron transportados a las instalaciones del Laboratorio Húmedo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR, Campus La Paz) para su aclimatación. Los callos de hacha fueron mantenidos en reservorios de polipropileno con 45 L de agua marina filtrada ($5 \mu\text{m}$) e irradiada con luz ultravioleta (UV) a 22°C , pH ambiental y aireación constante, previo al inicio del bioensayo. Los callos de hacha fueron alimentados continuamente con una mezcla de *Isochrysis galbana* (1.9×10^3 cel/ml) y *Chaetoceros muelleri* (724 cel/ml) en proporción 1:1 con una bomba peristáltica de cartucho multicanal (Watson-Marlow 205s). La temperatura, pH, oxígeno disuelto y salinidad fueron registrados diariamente. Se realizaron dos recambios de agua diariamente al 50%, eliminando las heces por sifoneo.

6.2 Diseño experimental.

Posterior a la aclimatación, se realizó el bioensayo que consistió en un diseño experimental tipo matriz en el cual se emuló la AO al mantener los organismos en agua de mar bajo condiciones de pH de 7.8 ± 0.1 (control), y 7.5 ± 0.2 (nivel de acidificación), durante 40 días. El esquema del sistema de control de pH se puede observar en la Fig. 11. El diseño matricial estuvo compuesto por un total de 6 reservorios (unidades experimentales) correspondientes a los dos niveles de pH por triplicado (Fig. 11). La variación de pH del agua de mar fue realizada mediante la inyección de CO_2 por burbujeo de acuerdo con el modelo desarrollado por Fangue et al. (2010) el cual fue modificado para este experimento (Fig. 12). Se utilizaron controladores de flujo de masa (MFC) de aire (Smart-Trak 100C) y CO_2 (Micro-Trak 101) para la mezcla de los gases (CO_2 con aire seco y libre de CO_2).

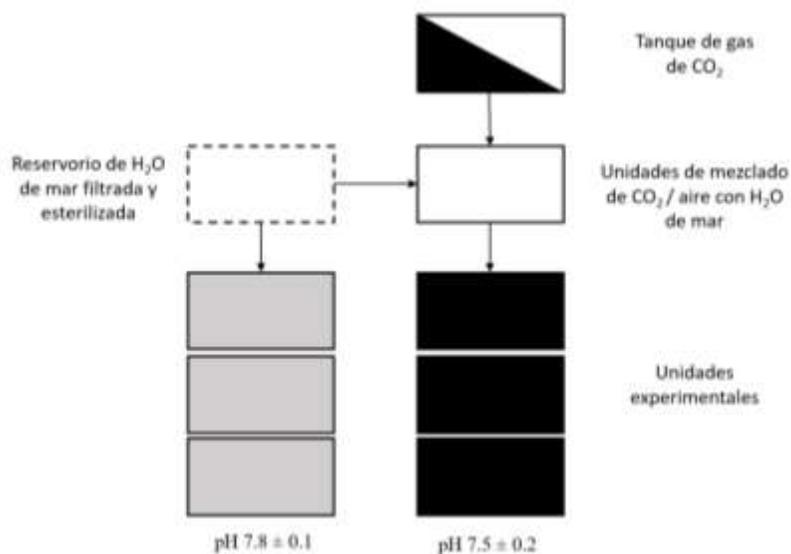


Figura 11. Diseño experimental tipo matriz con alteración de pH por CO₂. El rectángulo de contorno discontinuo corresponde a un reservorio de H₂O de mar. El rectángulo blanco corresponde a una unidad de mezclado de CO₂-aire con H₂O de mar. El rectángulo mitad blanco y negro corresponde a una fuente de gas de CO₂. Los rectángulos de diferentes colores (gris claro y negro) corresponden a diferentes tratamientos de pH.

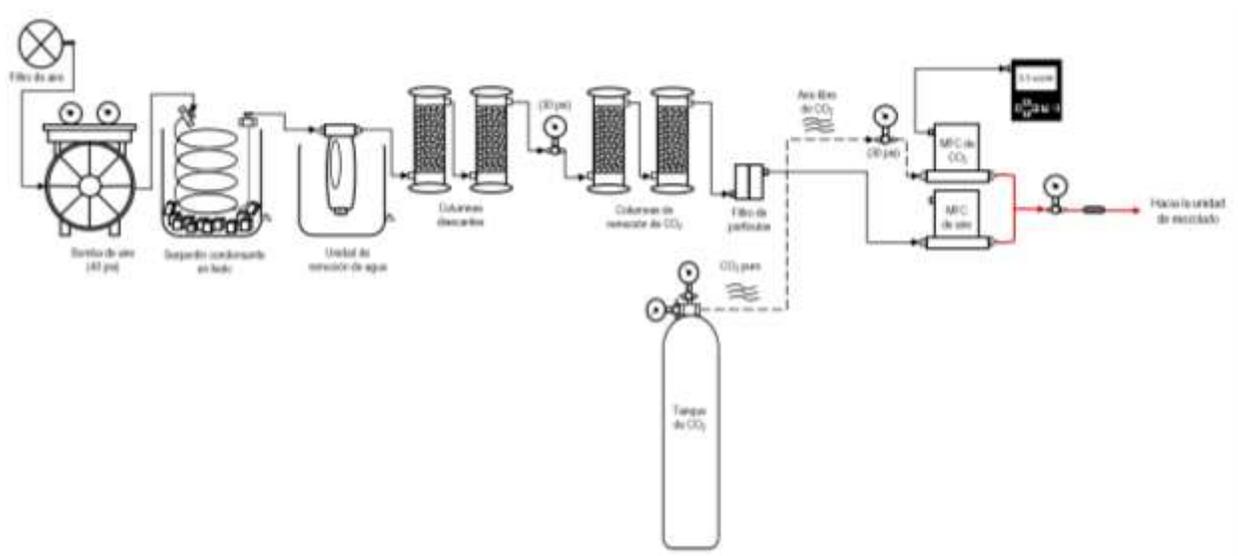


Figura 12. Diagrama del sistema de obtención de aire y CO₂. La línea continua representa el proceso de obtención de aire seco libre de CO₂, mientras que la línea punteada representa la entrada de CO₂ puro. La línea roja representa la mezcla del CO₂ y el aire hacia la unidad de mezclado (modificado de Fangue et al. 2010).

El aire seco y libre de CO₂ fue obtenido como se muestra en la línea continua horizontal del diagrama de la Fig. 12. Inicialmente, el aire atmosférico pasó a través de un filtro de aire, y después fue comprimido por una bomba de diafragma, este aire calentado fue enfriado al pasar a través de un serpentín de condensación de acero inoxidable enfriado con hielo para condensar el vapor de agua presente en el aire, y para remover la humedad (condensado), el aire frío pasó a través de una unidad de eliminación de agua y dos columnas desecantes llenas de sulfato de calcio anhidrido (CaSO₄) como desecante e indicador (W. A. Hammond Drierite Company, LTD). Por último, el aire seco pasó a través de dos columnas que contenían cal sodada (Sodasorb[®] Amron International) para la remoción de CO₂ y un filtro de partículas antes de entrar a los MFC's para eliminar restos de partículas procedentes de las columnas y prevenir un malfuncionamiento de los MFC's. La presión de aire fue regulada a 30 psi antes de entrar a los MFC's. El flujo de aire limpio fue dirigido hacia un MFC para el tratamiento de acidificación, donde el caudal del aire (2833 scc/min) fue regulado para obtener el pH deseado para cada tratamiento. En el caso del CO₂, este pasó directamente al MFC a una presión regulada de 30 psi antes de entrar a este (Fig. 12, línea punteada). Posteriormente, se realizó una mezcla del caudal de CO₂ y aire necesario para alcanzar el nivel de pH del agua de mar determinado (rango de 7.5 ± 0.2). La estandarización del caudal de cada gas fue realizada previo al bioensayo. Por otra parte, la presión de salida de la mezcla de gases y el aire fue monitoreada con manómetros. Además, para cada tratamiento, se utilizaron válvulas de prevención de reflujo después de los MFC's para protegerlos de un posible reflujo de agua. La cal sodada presente en las columnas de remoción de CO₂ del sistema de obtención de aire fue reemplazado al indicar saturación de la columna por medio del color morado, y el CaSO₄ desecante fue cambiado cada 3 días.

La mezcla de aire-CO₂ fue transferido hacia la unidad de mezclado (UM) siguiendo el diagrama de la Fig. 13a. El agua de mar previamente filtrada (5 µm) e irradiada con luz ultravioleta fue bombeada a un reservorio con capacidad de 250 L (UM) y mezclada con los gases (CO₂ y aire seco y libre de CO₂) utilizando una bomba sumergible de acuario. La UM tiene un flotador que mantiene el reservorio lleno de agua de mar a un nivel determinado, y la bomba de acuario en conjunto con un inyector Venturi mezclan el agua de mar y los gases al dirigir el agua a través de

un orificio pequeño creando presión negativa y aspirando la mezcla de gas como una corriente muy fina de burbujas para una mezcla eficiente (Fig. 13a).

El agua de mar acidificada con CO_2 fue distribuida a las 3 unidades experimentales (UEs) correspondientes al tratamiento de acidificación con un flujo continuo de 3.2 ml/s (Fig. 13b), donde la bomba sumergible proporcionó una circulación vigorosa del agua acidificada con CO_2 en el reservorio, y la circulación de esta hacia las UEs. Las UEs control fueron aireadas con bombas de aire de acuario. El nivel del agua de mar en las UEs fue mantenido por medio de la salida del flujo continuo de agua a través de un orificio en cada UE. El volumen total de cada UE fue de 40 L. Las UEs del tratamiento control y acidificación fueron cubiertas para evitar el intercambio de gases entre las UEs y la atmósfera, y mantener el pH deseado en los tratamientos de acidificación.

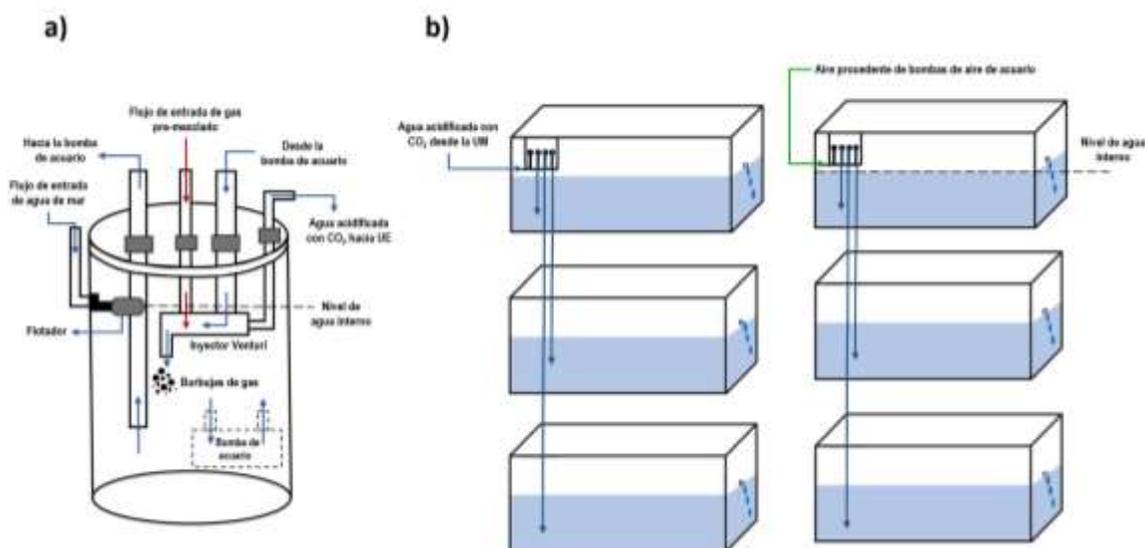


Figura 13. Diagrama del flujo de la mezcla gases-agua de mar hacia el diseño experimental tipo matriz. a) Esquema de la unidad de mezclado de los gases con agua de mar. b) Esquema de las unidades experimentales tipo matriz. Flechas azules indican el flujo de agua dentro y fuera de la unidad de mezclado y hacia las unidades experimentales. Flechas rojas representan el flujo del gas pre-mezclado (CO_2 y aire). Flechas verdes indican flujo de aire procedente de las bombas de aire de acuario (modificado de Fangue et al. 2010).

Los juveniles de callo de hacha fueron asignados aleatoriamente a los reservorios (36 individuos por UE). Se realizó un monitoreo del pH utilizando un potenciómetro calibrado con amortiguadores estándar para medir el pH de muestras de cada UE dos veces al día. Las heces de las UEs fueron eliminadas por sifonado; el flujo de agua acidificada fue continuo para mantener el pH a 7.5 por 40 días. Los individuos de cada UE fueron seleccionados aleatoriamente en los tiempos 0, 2, 4 y 40 días del experimento, 9 individuos fueron seleccionados aleatoriamente por día de los cuales; 6 individuos fueron utilizados para el análisis estructural por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por su acrónimo en inglés) y para extracción de ARN, y 3 individuos para análisis histológicos.

6.3 Identificación de los genes que codifican SMPs en el tejido del manto de *A. maura*.

6.3.1 Extracción de ARN total del manto de *A. maura*.

El ARN total del manto de los individuos colectados fue extraído con TRIzol™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se homogenizaron en FastPred-24TM (MP Biomedicals™ 116004500) (20 segundos, 4.0 m/s) con 0.2 mL de perlas de lisis de 1.0 mm y 3.5 mm y la adición del reactivo de TRIzol™. Posteriormente, se realizó la extracción de cada muestra. La pureza y concentración de ARN se determinaron mediante las relaciones de absorbancia de densidad óptica (DO) de 260/280 y 260/230 generadas por espectrofotometría (NanoDrop™). La integridad y pureza fueron evaluadas en un gel de TBE-DEPC-agarosa al 1% (p/v). Posteriormente, las muestras fueron tratadas con Turbo DNasa (Ambion™ Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la remoción de ADN genómico (ADNg). Para descartar la presencia de ADNg en las muestras se realizó una PCR utilizando como templado el ARN total (50 ng) del manto de callo de hacha (*A. maura*), como control positivo el ADNc (50 ng) del manto de la ostra del pacífico (*Crassostrea gigas*) y como control negativo la mezcla de reacción con H₂O mili-Q estéril como templado. La mezcla de reacción contenía oligonucleótidos para el gen 28S (10 μM cada uno) (Tabla 3), Gotaq (1X), Enhancer (10%) y H₂O mili-Q estéril. El volumen final de la reacción fue de 12.5 μL. El programa de amplificación se describe en la Tabla 5. El ARN total fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

Tabla 3. Oligonucleótidos para el gen 28S (Romero-Geraldo, R. y Hernández- Saavedra, N. 2012).

Oligos	Secuencias 5'- 3'	Tamaño (pb)	Tm (°C) ¹	No. de acceso
Cg-28SF	GCAGGAAAAGAACTAAC	400	45.8	AY632555.1
Cg-28SR	CCTCTAAGTGGTTTCAC		46.6	

¹Dato calculado en OligoAnalyzer Tool <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>.

6.3.1.1 Diseño y estandarización de oligonucleótidos.

Se tomaron las muestras de ARN total para la síntesis de ADNc empleando el kit First-Strand cDNA Syntesis ReactionTM (Invitrogen). Se llevó a cabo una transcripción inversa del ARN total (1 µg) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó una PCR comprobatoria de ADNc utilizando como templado el ADNc (5 ng) de *A. maura*, como control positivo el ADNc (5 ng) de *C. gigas* y como control negativo la mezcla de reacción con H₂O mili-Q estéril como templado. La mezcla de reacción contenía oligonucleótidos para el gen 28S (10 µM cada uno) (Tabla 1), Gotaq polimerasa (1X) y H₂O mili-Q estéril en un volumen final de 12.5 µL. Los productos de reacción fueron visualizados en los geles de agarosa-synergel-TBE 1X al 1% utilizando 1 µL de intercalante (Uview 6X BIO-RAD) y fotodocumentados en ChemiDocTM MP Imaging System (BIO-RAD). El ADNc fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

Para el análisis de la expresión de los genes *N66*, *perlina*, *N16* y *aspeina*, los oligonucleótidos se diseñaron a partir de secuencias de organismos taxonómicamente cercanos a *A. maura* obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se obtuvieron las secuencias consenso para cada gen, las cuales fueron usadas para diseñar los oligonucleótidos con el software Primer3. Los oligonucleótidos se analizaron empleando RNAfold WebServer para determinar la formación de dímeros y estructuras secundarias. Los oligonucleótidos sintetizados para los genes de interés se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los genes *N66* y *perlina* de *P. sterna* (Ojeda Ramírez de Areyano, 2014), *N16*, *aspeina* de *P. fucata* (Liu et al. 2012), *calmodulina* de *C. gigas* (Li et al. 2016) y *prismalina-14* de *P. margaritifera* (Le Moullac et al. 2018).

No. de oligos	Secuencias 5'-3'	Tamaño (pb)	Tm (°C)	No. de acceso
<i>N66</i>	TTCTACCGCCAATAAAAATACAGAC	144	60.1	-
	TCACCTTCCGCAATGCATCA		58.4	
<i>Perlina</i>	CATTGCCATTTGTCTAGACCAGT	105	61.8	JQ962975
	TATCCGTCGTCATATCTGTCCCTC		65.3	
<i>N16</i>	GGATGAGAGGTATGAGTGGCT	100	58.6	- ²
	TCCGTTACCGTTGCCATTC		58.8	
<i>Aspeina</i>	TTCATTTGCTCTTTCAACCAG	156	53.7 ¹	AB094512
	GCATCCGAAGAACAAAGTTTTT		52.3 ¹	
<i>Calmodulina</i>	GATGCTGATGGAATGGAAC	204	61.9 ¹	CGI_100064 82 ³ KM115543
	TTCACTCACTTCTCTCTG		57.1 ¹	
<i>Prismalina-14</i>	CCGATACTCCCTATCTACAATCG	102	54.2 ¹	HE610393
	CCTCCATAACCGAAAATTGG		51.3 ¹	

¹Dato calculado en OligoAnalyzer Tool <https://www.idtdna.com/calc/analyser>.

²AB690169.1, AB690168.1, AB690167.1, AB690166.1, AB690161.1, AB690160.1, AB690157.1, AB690155.1 y AB690153.1.

³ID de Oyster Data Base.

Posterior a la síntesis de ADNc, se inició con la estandarización de los oligos para *Perlina*, *N16*, *aspeina*, *calmodulina* y *Prismalina-14* siguiendo el programa descrito en la Tabla 5. Posteriormente los genes que codifican SMPs amplificados con los oligos anteriormente mencionados fueron enviados a servicios de secuenciación a la empresa MCLAB Molecular Cloning Laboratories, siguiendo las instrucciones del servicio. Para la identificación de las secuencias obtenidas, estas fueron analizadas mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos NCBI.

Tabla 5. Programa de PCR para la amplificación de genes que codifican SMPs.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
1	95	5:00	1
2	94	1:00	5
3	40	1:00	
4	72	1:00	
5	94	1:00	34
6	50	1:00	
7	72	1:00	
8	72	10:00	1
9	4	∞	

6.4 Análisis histológico del manto de *A. maura*.

Los organismos muestreados fueron procesados para el análisis histológico de acuerdo con García-Lagunas et al. (2016). Los mantos completos de los organismos muestreados fueron disectados y almacenados en casetes de inclusión, y conservados en solución de Davidson hasta su procesamiento. Los tejidos blandos se deshidrataron en una serie ascendente de etanol (70, 90, 95, 100%), se aclararon con xileno y se embebieron en parafina. Posteriormente, se cortaron secciones de 5 μm de espesor utilizando un micrótopo rotatorio y se montaron en portaobjetos de vidrio. Cada portaobjetos se tiñó con hematoxilina de Harris durante 5 minutos y se hizo un contraste con Eosina-Floxina durante 12 minutos. Los portaobjetos se examinaron y fotografiaron utilizando un microscopio óptico equipado con una cámara Evolution VF Colour Cooled para observar lesiones tisulares.

6.5 Análisis estructural de la concha de *A. maura* por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Las conchas de los individuos de cada tratamiento y tiempo de exposición fueron colectadas, medidas (longitud), limpiadas cuidadosamente, y secadas al aire a temperatura ambiente. Las conchas de los individuos secas fueron cortadas en piezas pequeñas (2 cm²). Las superficies, secciones fracturadas y pulidas fueron usadas para caracterizar la estructura de la concha, así como para evaluar el efecto de la variación del pH sobre la misma. Las muestras se recubrieron con pulverización catódica de oro y se analizaron utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).

6.6 Análisis estadístico de la talla de la concha de *A. maura*.

Los datos de las tallas de los organismos muestreados fueron analizados mediante el Software R Studio 2022.02.1+461 (Prairie Trillium). Se determinó la normalidad y homocedasticidad mediante la prueba de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) y Levene, respectivamente. Posteriormente, se realizó un análisis de las medias con la prueba Z, para determinar si existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

7. RESULTADOS

7.1 Parámetros fisicoquímicos del bioensayo.

En la Fig. 14 se muestra la tendencia de los parámetros medidos de pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y salinidad (ppm) del reservorio de agua de mar. Obteniendo los siguientes promedios para cada uno de los parámetros: pH de 7.9 ± 0.1 (línea gris), temperatura de $22.6 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ (línea naranja) y salinidad de 40.4 ± 0.5 ppm (línea verde). Se utilizaron calentadores de agua en cada unidad experimental de los tratamientos control y acidificación, manteniendo una temperatura constante de 22°C para evitar fluctuaciones durante el experimento debido a que las temperaturas ambientales no se mantenían constantes previo y durante al inicio del experimento (Fig. 14, línea naranja).

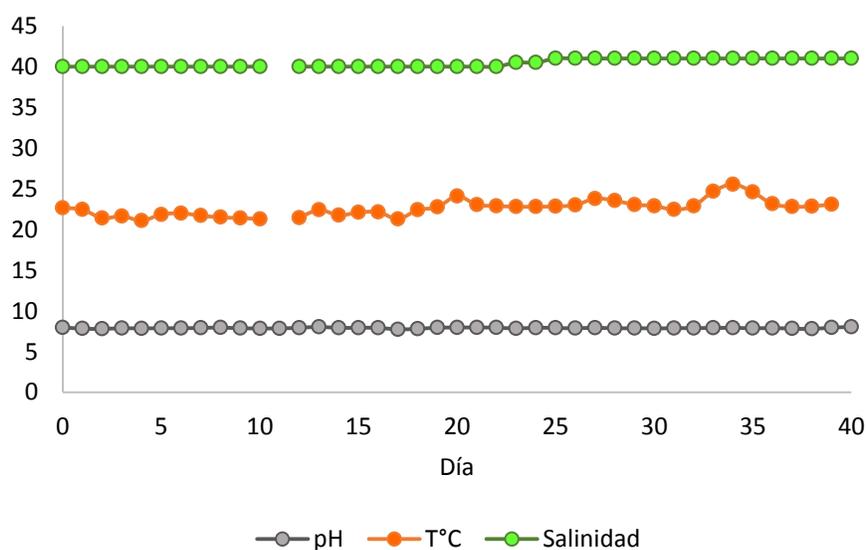


Figura 14. Parámetros fisicoquímicos del H_2O de mar filtrada y esterilizada con luz UV. Línea verde, salinidad (ppm); línea naranja, temperatura ($T^{\circ}\text{C}$); línea gris, denota los valores de pH.

En la Fig. 15 se muestra los parámetros medidos de pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), salinidad (ppm) y oxígeno disuelto (%) de las unidades experimentales del tratamiento control. Obteniendo los siguientes promedios para cada uno de los parámetros: pH de 7.8 ± 0.1 (línea gris), temperatura de $22.1\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ (línea naranja), salinidad de 40.4 ± 0.6 ppm (línea verde) y oxígeno disuelto de $78.5\pm 8.9\%$ (línea azul).

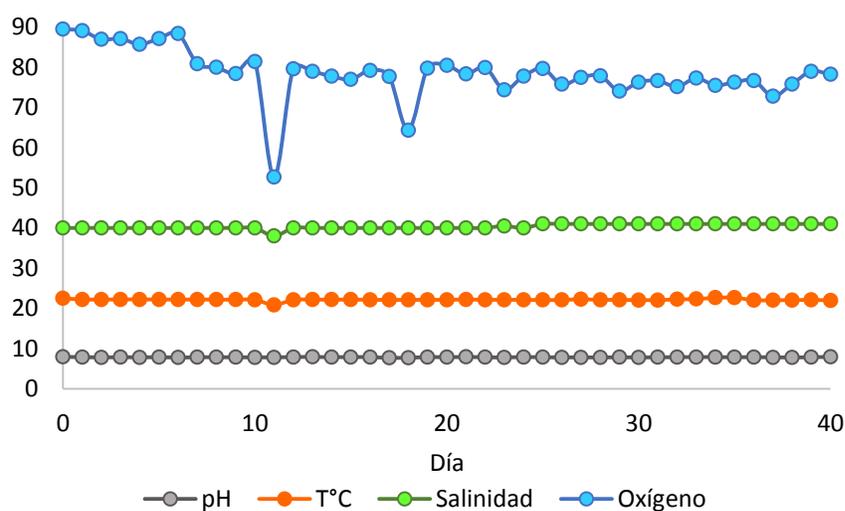


Figura 15. Parámetros fisicoquímicos del agua de mar del control de las UEs. Línea azul, indica los valores de oxígeno disuelto (%); Línea verde, denota los valores de salinidad (ppm); línea naranja, denota los valores de temperatura ($T^{\circ}\text{C}$); línea gris indica los valores de pH.

En la Fig. 16 se muestran los valores de los parámetros medidos de pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), salinidad (ppm) y oxígeno disuelto (%) de las unidades experimentales del tratamiento de acidificación. Obteniendo los siguientes promedios para cada uno de los parámetros: pH de 7.5 ± 0.2 (línea gris), temperatura de $22.5\pm 0.4^{\circ}\text{C}$ (línea naranja), salinidad de 40.4 ± 0.6 ppm (línea verde) y oxígeno disuelto de $49.6\pm 9.9\%$ (línea azul). La salinidad y temperatura no mostraron cambios entre los tratamientos control y acidificación durante el tiempo del experimento (40 días).

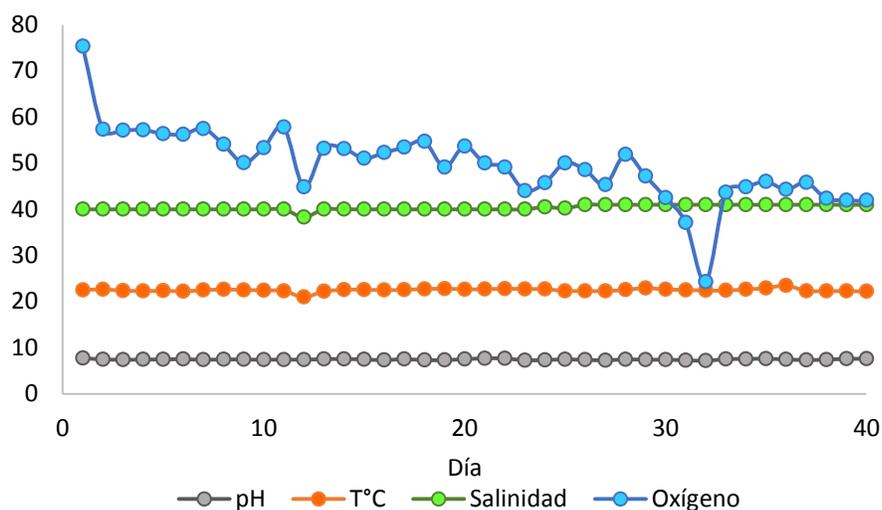


Figura 16. Parámetros fisicoquímicos del agua de mar de las UEs de acidificación. Línea azul, indica los valores de oxígeno disuelto (%); Línea verde, indica los valores de salinidad (ppm); línea naranja, indica los valores de temperatura (T °C); línea gris, indica los valores de pH.

En la Fig. 17 se muestra la mortalidad de los organismos durante el experimento, donde el eje Y se muestran el número de organismos muertos y en el eje X el día de exposición. Indicando que hubo un total 2 organismos muertos para una de las UEs de acidificación (A1, barras rojas), y 1 y 27 organismos muertos para unidades del tratamiento control, C3 y C1, respectivamente (barra verde claro y oscuro). Debido al alto índice de mortalidad en la unidad del tratamiento control C1 debido a causas ajenas al experimento, esta unidad fue descartada para los análisis posteriores.

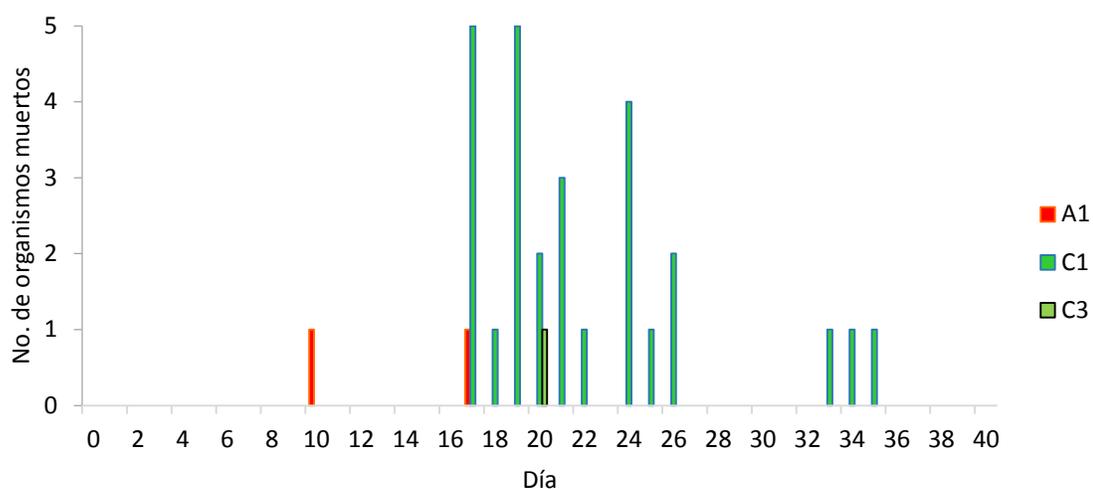


Figura 17. Mortalidad presentada en las UEs del control (barras verdes oscuro y claro) y el tratamiento de acidificación (barras rojas).

7.2 Análisis estadístico de la talla (longitud) de las conchas de *A. maura* expuestas a condiciones de acidificación.

Mediante el análisis de las diferencias de los datos de longitud (cm) de las conchas muestreadas en los días 0 y 40, se obtuvo un valor de p-value = 0.3545 y un valor de $z = -0.92589$ ($\alpha=0.05$), por lo tanto, las medias de las diferencias de los tratamientos no presentaron diferencias significativas. De acuerdo con las medias de los tratamientos analizados se determinó que las conchas de los organismos del tratamiento de acidificación (A) presentaron una longitud promedio de 7.4 ± 0.5 cm, y las conchas de los organismos del tratamiento control (C) presentaron un promedio de 7.9 ± 0.6 cm. El análisis estadístico se muestra en la Fig. 18.

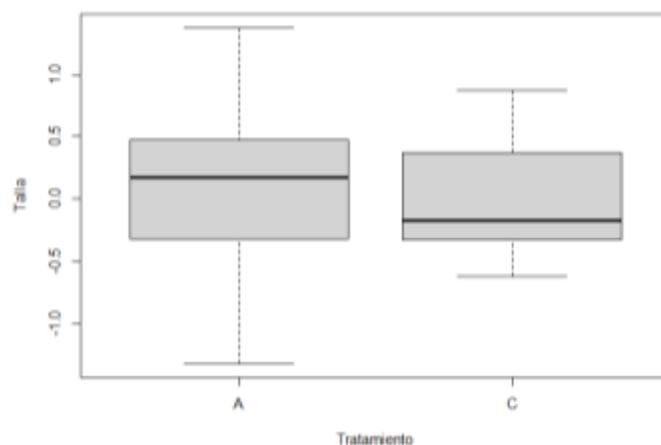


Figura 18. Análisis cuantitativo del crecimiento de las conchas de callo de hacha (*A. maura*) bajo condiciones de acidificación durante 40 días. A, tratamiento de acidificación (pH 7.5 ± 0.2); C, tratamiento control (7.8 ± 0.1); Talla, diferencia de las longitudes (cm) de las conchas del día 0 y 40 del experimento. A, tratamiento de acidificación; C, tratamiento control.

7.3 Identificación de los genes que codifican SMPs en el tejido del manto de *A. maura*.

7.3.1 Extracción del ARN total del manto de *A. maura*.

En la Fig. 19, se observa el perfil electroforético de las muestras de ARN total del manto de organismos muestreados los días 2 y 4 de los tratamientos control y de acidificación, respectivamente, (D19-30 y E1-7), En la figura se observan las bandas de ARNr (28S y 18S) entre 1000-1500 pb. Las muestras de ARN total muestran la presencia de una banda de alto peso molecular correspondiente al ADN genómico (ADNg).

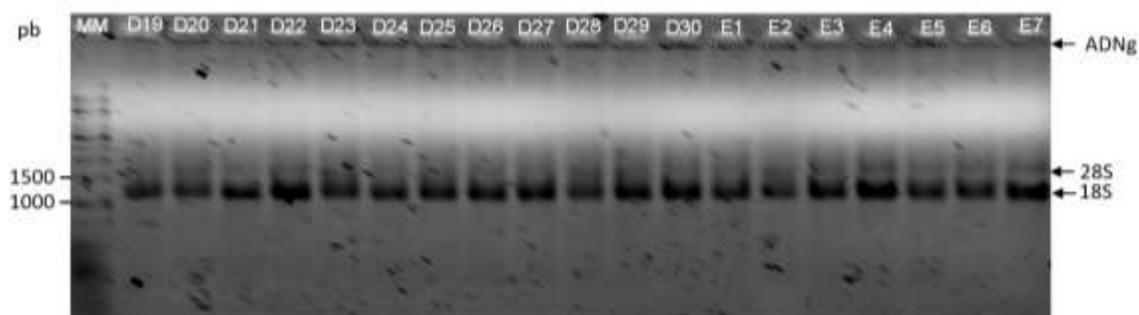


Figura 19. Perfil electroforético en gel de agarosa-TBE DEPC al 1% en el que se muestra la integridad del ARN total (100 ng) del manto de callo de hacha (*A. maura*) extraído por el método de TRIzolTM. Se denotan con flechas: derecha, ADN genómico (ADNg) y subunidades ribosomales 28S y 18S del ARN (28S y 18S); y a la izquierda bandas de referencia de 1500 y 1000 pares de bases (pb) en la línea MM (marcador de peso molecular, 1 kb). Líneas D19-30, ARN total del manto de organismos control muestreados el día 2; Líneas E1-7, ARN del manto de organismos tratados (acidificación) muestreados el día 4.

En la Fig. 20, se observa el perfil electroforético de los productos de una PCR confirmatoria de ausencia de ADNg en las muestras de ARN total de manto tratadas con Turbo DNasa de tratamientos control y de acidificación. En esta figura se muestra la ausencia de productos de PCR en las muestras de ARN total tratadas con DNasa (sin ADNg), mientras que en el control positivo se muestra una banda de 400 pb correspondiente al gen constitutivo 28S.

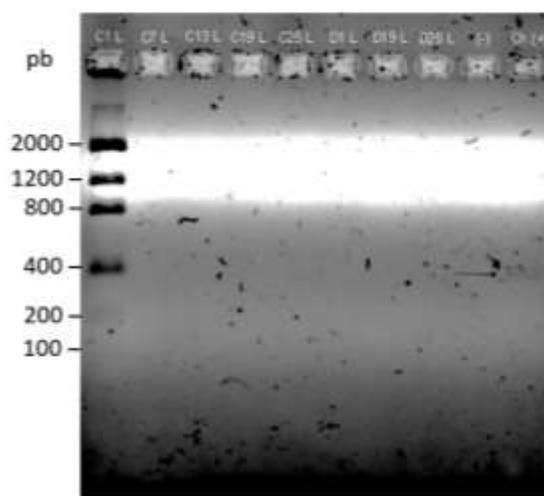


Figura 20. Perfil electroforético en gel de agarosa-TBE al 1% de los productos de PCR probatorio de ARN total (50 ng) de *A. maura* tratado con Turbo DNasa. Línea MM, marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder, 100-2000 pb). Líneas C, productos de ARN total de tratamientos control y acidificación del día 0; D, producto de ARN total de tratamientos control y acidificación del día de muestreo 2; Línea (-), control negativo (H₂O mili-Q); Línea Ch (+), control positivo de ADNc de *A. maura*.

7.3.2 Diseño y estandarización de oligonucleótidos.

En la Fig. 21, se observa el ADN complementario (ADNc) de los tratamientos control y acidificación (C25 L y F3 L) sintetizado usando como templado ARN total del manto de callo de hacha, transcripción inversa y posterior amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos para el gen constitutivo de la subunidad 28S del ARN (ARNr) y el programa descrito en la Tabla 5. El producto de amplificación del ADNc de manto de callo de hacha para 28S presenta una banda de aproximadamente 400 pb.

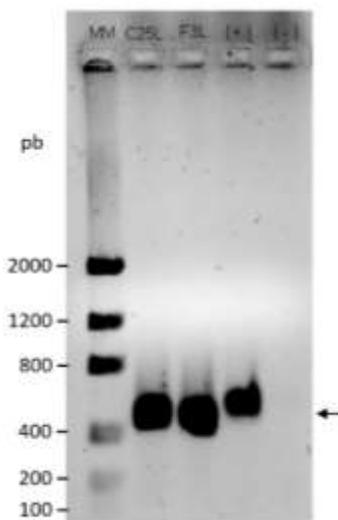


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa-TBE 1% del gen 28S amplificado a partir del ADNc del manto de *A. maura*. Líneas: MM, marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder 100-2000 pb); (+), control positivo de ADNc de *C. gigas*; (-), control negativo (H₂O mili-Q).

7.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final y secuenciación de productos de amplificación.

Posterior a la síntesis de ADNc, se continuó con la estandarización de los oligonucleótidos de genes que codifican las SMPs *aspeina*, *perlina*, *N16*, *prismalina-14* y *calmodulina*, el gen constitutivo de ARNr de la subunidad 28S siguiendo el programa de PCR descrito en la Tabla 5. En la Fig. 22, se observa la amplificación del gen *aspeina* (400-200 pb), *perlina* (~400 pb), *N16* (200-100 pb), *prismalina-14* (~400 pb), *calmodulina* (200-400 pb) y 28S (~400 pb).

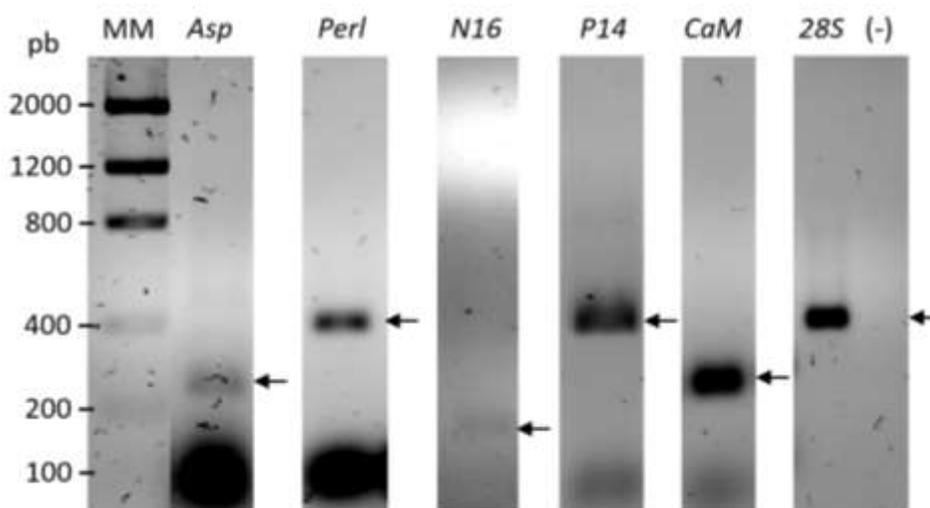


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa-TBE 2% del gen *aspeina* (*Asp*), *perlina* (*Perl*), *N16*, *prismalina-14* (*P14*), *calmodulina* (*CaM*) y *28S* amplificado a partir de ADNc del manto de *A. maura*. MM, marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder 200-2000 pb); (-), control negativo (H₂O mili-Q).

7.3.4 Identificación de los genes que codifican SMPs en el tejido del manto de *A. maura*.

Las secuencias de genes que codifican las SMPs *aspeina*, *perlina*, *N16*, *prismalina-14*, y *calmodulina*, así como del gen de la subunidad ribosomal *28S* amplificados fueron enviados a servicios de secuenciación (Tabla 6).

Tabla 6. Longitud (pb) de los productos de PCR secuenciados.

Nombre del gen	Longitud de la secuencia (pb)
<i>Aspeina</i>	219
<i>Perlina</i>	346
<i>N16</i>	219
<i>Prismalina-14</i>	472
<i>Calmodulina</i>	506
ARNr <i>28S</i>	344

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante un alineamiento de la secuencia de interés con las secuencias de la base de datos de NCBI mediante la herramienta BLAST. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos del alineamiento para los genes *calmodulina* y la subunidad ribosomal 28S, en el caso de las secuencias restantes no se obtuvieron similitudes significativas. Para el gen *calmodulina*, se obtuvo una similitud con la secuencia del ARNm de una proteína tipo-calmodulina del bivalvo *Hyriopsis cumingii* con un porcentaje de identidad del 82.76%, este bivalvo pertenece a la clase bivalvia, a la cual también pertenece el bivalvo en estudio *A. maura*. En el caso del gen de la subunidad ribosomal 28S, se obtuvo una similitud con la secuencia de la subunidad ribosomal 28S del bivalvo *Atrina rígida* con un porcentaje de identidad del 98.53%, este bivalvo pertenece al género *Atrina* de la familia Pinnidae, a la cual también corresponde el bivalvo en estudio *A. maura*.

Tabla 7. Resultados del alineamiento en BLAST de NCBI de las secuencias amplificadas de los genes *calmodulina* y 28S de callo de hacha (*A. maura*).

Nombre científico del organismo	Tipo de secuencia	Query cover	E-value	Porcentaje de identidad	No. de acceso
<i>Hyriopsis cumingii</i>	ARNm de proteína tipo-calmodulina	81%	4e ⁻¹⁸	82.76%	JQ389857.1
<i>Atrina rígida</i>	Subunidad ribosomal 28S	97%	4e ⁻¹⁶⁶	98.53%	KX713359.1

7.4 Análisis histológico del manto de *A. maura*.

De acuerdo con el análisis histológico, los mantos expuestos a condiciones de acidificación (7.5 ± 0.2) no mostraron signos de daño tisular en comparación con los controles (7.8 ± 0.1) para ninguno de los tiempos de exposición evaluados (Fig. 23). El manto de *A. maura* está compuesto por un epitelio columnar pseudoestratificado (ecs) con cilios (ci) en la superficie apical (Fig. 23a-l). En este tipo de epitelio, todas las células tienen contacto con la membrana basal (mb), sin embargo, no todas alcanzan la superficie apical, por lo que se describe como un epitelio simple compuesto por varios tipos de células dispuestas en una sola capa, con núcleos a diferentes

niveles (Leeson et al. 1999). En zonas específicas, el epitelio contiene mucositos (mu) y células caliciformes (cc) (Fig. 23b-l). Además, entre las membranas epiteliales se encuentra tejido conectivo (tc) que envuelve fibras musculares (fm) (Fig. 23a-l). Adicionalmente, la tinción con hematoxilina-eosina (HE) muestran numerosas invaginaciones a lo largo del epitelio del manto (Fig. 23b, e, h y k).

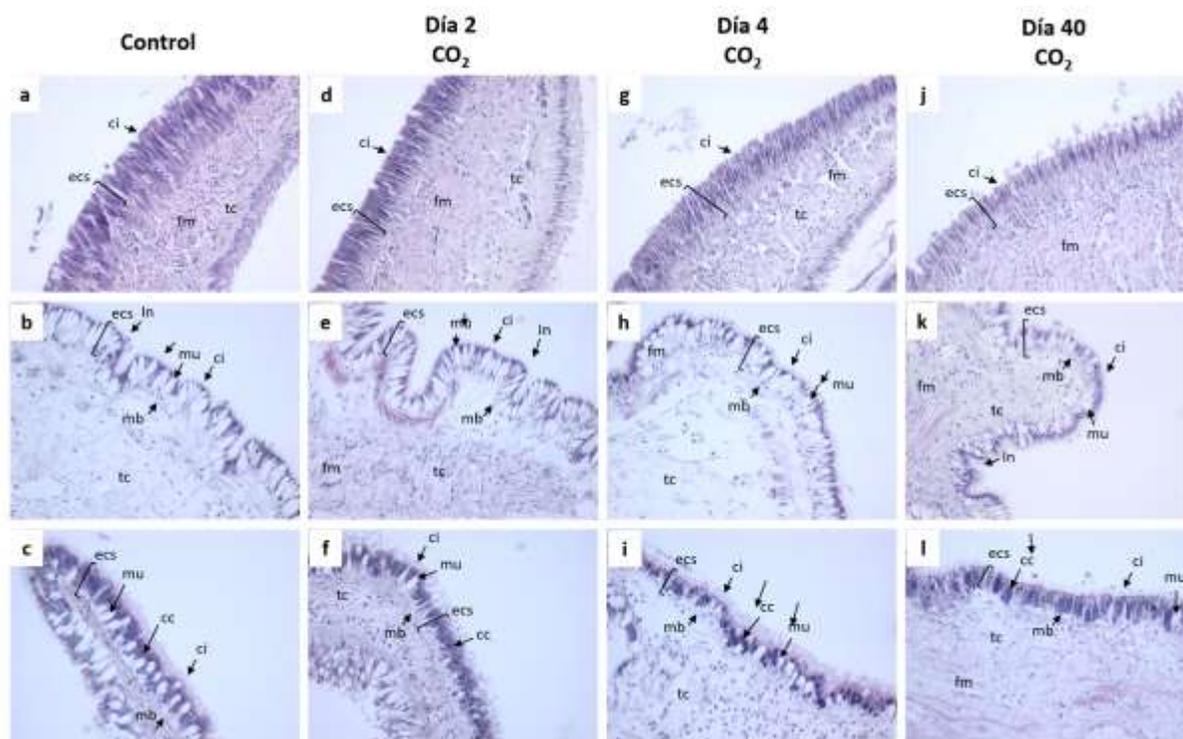


Figura 23. Secciones del tejido del manto de juveniles de *A. maura* expuestos a condiciones de acidificación. A-C, tratamiento control (7.8 ± 0.1); D-K, tratamiento de acidificación (7.5 ± 0.2): D-F, día 2 de exposición; G-I, día 4 de exposición; J-L, día 40 de exposición. Tinción con HE. Magnificación, 20X. mb, membrana basal; ecs, epitelio cilíndrico pseudoestratificado; tc, tejido conectivo; mu, mucosito; cc, células caliciformes; In, invaginaciones.

7.5 Análisis estructural de la concha de *A. maura* mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

La concha de callo de hacha está compuesta por dos capas principales, una capa externa de calcita (Fig. 24, capa inferior) y una capa interna de aragonita (nácar) (Fig. 24, capa superior). En el caso de la capa de calcita, está se encuentra compuesta por prismas de calcita apilados en

columnas (cl) dispuestas perpendicularmente a la superficie interna de la concha, cada prisma y columna se encuentra cubierto por matriz orgánica, dando lugar a un arreglo estructural prismático (Fig. 24, capa externa de calcita). Por otro lado, la capa de nácar está compuesta por laminillas de aragonita dispuestas paralelamente a la superficie interna de la concha, y apiladas desordenadamente, cada una de las cuales se encuentra alternada con capas delgadas de matriz orgánica, dando lugar a un arreglo de hojas/láminas de aragonita (nácar) (Fig. 24, capa interna de aragonita).

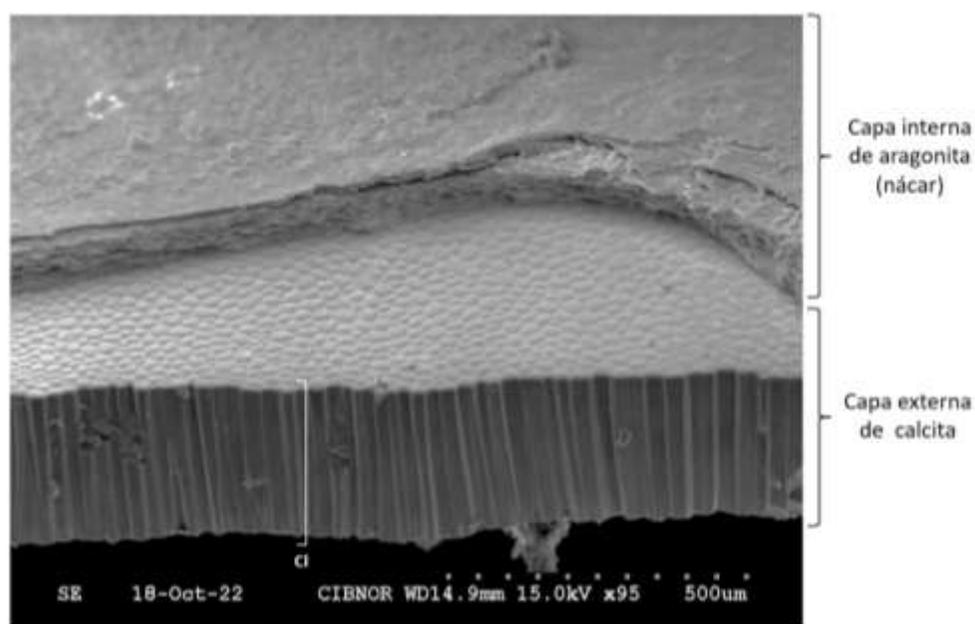


Figura 24. Micrografía electrónica de barrido (SEM) lateral de la concha de *A. maura*. Capa inferior: capa prismática de calcita, Capa superior: capa laminar de aragonita.

De acuerdo con el análisis por SEM, las conchas expuestas a condiciones de acidificación (7.5 ± 0.2) muestran signos de malformación y/o disolución en comparación con aquellas consideradas como controles (7.8 ± 0.1) (Fig. 25), paneles inferiores y panel superior, respectivamente). Las conchas control presentan un límite definido y diferenciado entre la capa de calcita y aragonita (nácar) (Fig. 25a, c y n), la capa de calcita presenta un patrón homogéneo de formas prismáticas definidas, y la matriz orgánica de la misma se encuentra intacta rodeando cada uno de los prismas (Fig. 25b), las láminas de nácar presentan una un patrón granular homogéneo que se

forman dentro de una amplia matriz orgánica (Fig. 25c). Por otro lado, las conchas expuestas bajo condiciones de acidificación muestran un límite desvanecido entre la capa de calcita y aragonita (Fig. 25d, g y j), en la capa de calcita la matriz orgánica se difunde entre los prismas (Fig. 25e y h), por tanto, estas tabletas de calcita ya no presentan una forma prismática definida, sino más bien se diluyen, y en ciertas zonas, no existe una separación entre cada tableta (Fig. 25k). Dicho efecto de dilución es gradual, iniciando con la difusión de la matriz orgánica que rodea los prismas (Fig. 25e y h) y la posterior dilución de la superficie de estos, que se da a través de la formación de poros en la superficie de los prismas que funcionan como canal de salida del material interno de estos (Fig. 25k). Por otro lado, la capa de aragonita o nacarada presenta erosión y evidente disolución química que va desde el interior hacia la superficie de la capa, por lo que las tabletas presentan formas irregulares (Fig. 25f, i y l). A dos días de exposición a condiciones de acidificación, la superficie de la capa granular homogénea de aragonita presenta una dilución a partir del límite entre ambas capas, dejando en descubierto los prismas de calcita (Fig. 25f), posteriormente, la capa de aragonita presenta una superficie de gránulos de mayor tamaño, lo cual evidencia el aumento de la dilución de esta (Fig. 25i), y, por último, tras 40 días de exposición, las láminas de aragonita se encuentran completamente expuestas, con forma redonda irregular y con evidente disolución (Fig. 25l).

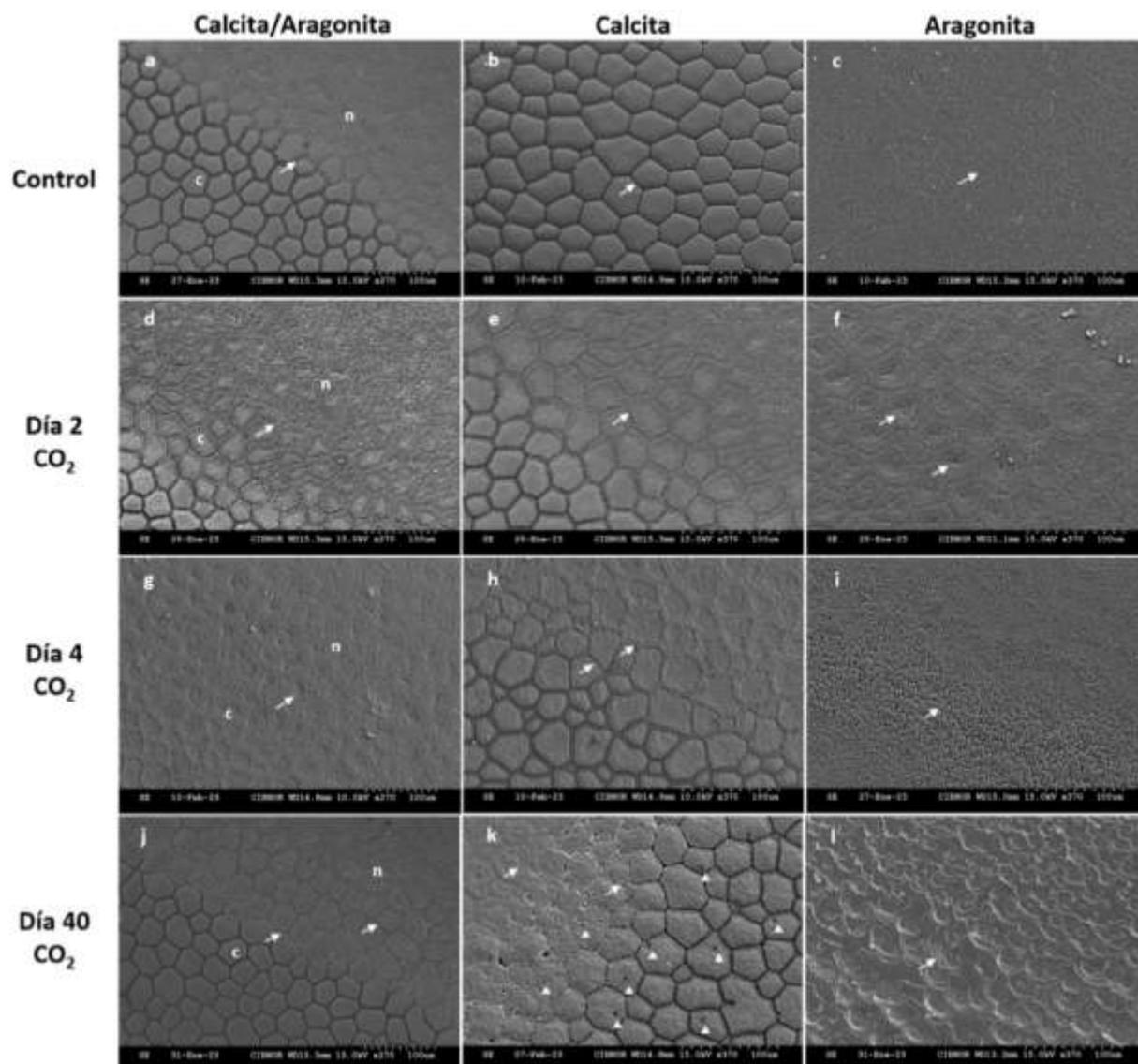


Figura 25. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de la superficie del interior de la concha de *A. maura* expuesta a condiciones de acidificación. Panel superior condición control ($\text{pH } 7.8 \pm 0.1$): A, B, y C, día 0 de exposición; Paneles inferiores condiciones de acidificación (7.5 ± 0.2) por tiempo de exposición: D, E y F, día 2 de exposición; G, H e I, día 4 de exposición; J, K y L, día 40 de exposición. A, límite entre la capa de calcita (c) y aragonita (a); B, capa de calcita; C, capa de aragonita (núcleo).

En la Fig. 26 se observan las micrografías laterales y laterales superiores de la capa prismática de calcita de las conchas del tratamiento control y el tratamiento de acidificación. En el caso de la concha del tratamiento control (panel superior), se observan los prismas de calcita apilados en forma de columnas, cada una de las cuales presenta un recubrimiento orgánico (Fig. 26a), estas tabletas de calcita presentan una forma prismática definida y recubierta (ro), donde una matriz orgánica funge como doble contorno (co) entre cada columna de prismas apilados y cada prisma, y, además, presenta un patrón de poros (po) (Figs. 26b y c). Por otro lado, las conchas expuestas a condiciones de acidificación (paneles inferiores) presentan un visible daño sobre las columnas (cl), prismas de calcita y matriz orgánica para todos los tiempos de exposición (Figs. 26d-l). Las columnas de calcita se observan con un recubrimiento (ro) desvanecido y/o disuelto sobre las mismas (Fig. 26d, g y j), además, se observan visiblemente más débiles al presentar desprendimiento de zonas dentro de las columnas tras ser expuestas a pH ácido durante 40 días (Fig. 26j). Los prismas de calcita presentan disolución química, donde el contorno de matriz orgánica (co) y el recubrimiento (ro) que limita a cada prisma se observa desvanecido y/o disuelto, lo que provoca una deformación de los prismas, la desaparición de los poros (po), y en última instancia columnas con uniones débiles (Figs. 26e, f, h, i, k y l).

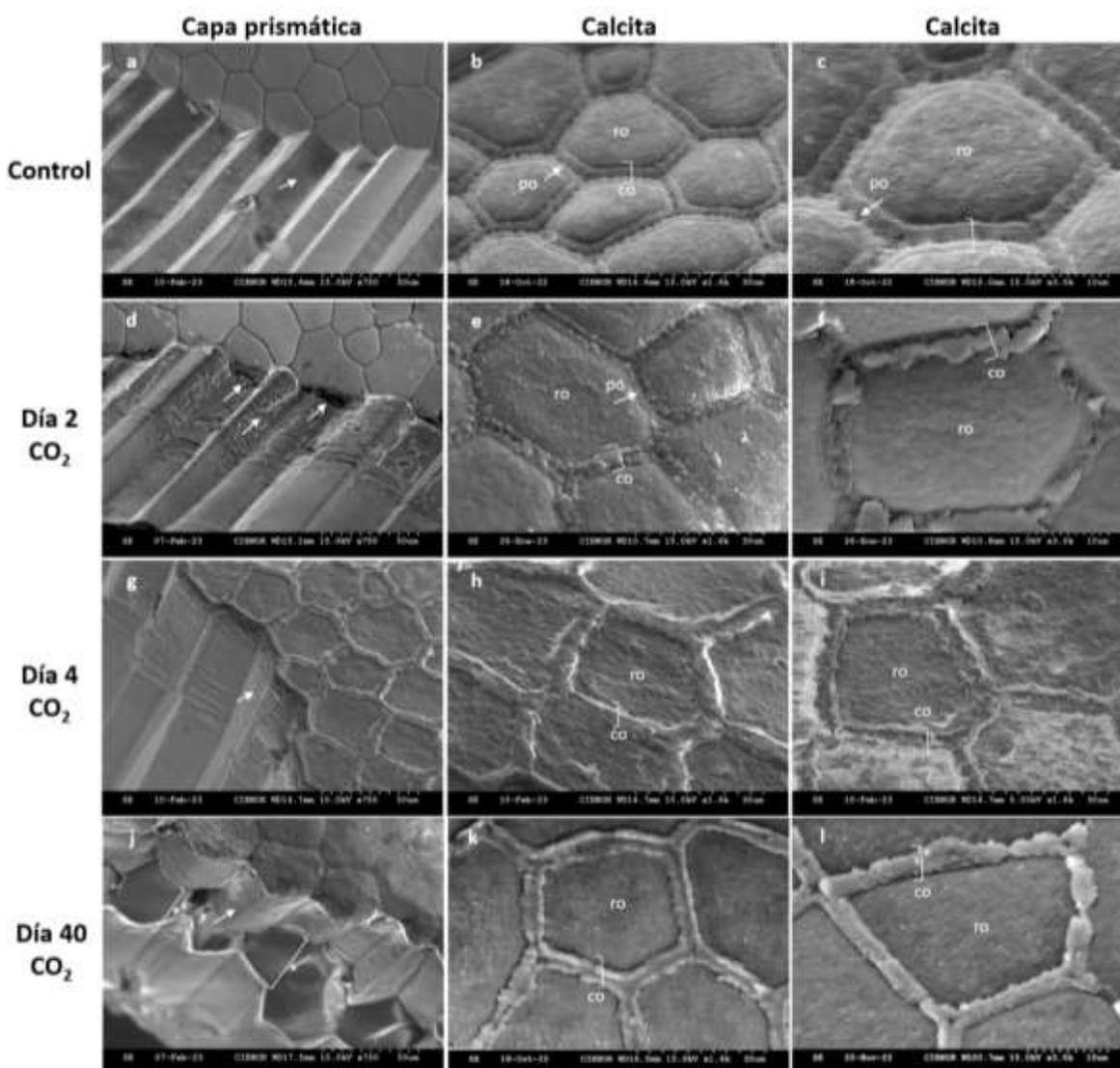


Figura 26. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) laterales del interior de la capa prismática de calcita de *A. maura* expuesta a condiciones de acidificación. Panel superior condición control ($\text{pH } 7.8 \pm 0.1$): A, B, y C, día 0 de exposición; Paneles inferiores condiciones de acidificación (7.5 ± 0.2) por tiempo de exposición: D, E y F, día 2 de exposición; G, H e I, día 4 de exposición; J, K y L, día 40 de exposición. A, D, G y J, tabletas apiladas de calcita; B, C, E, F, H, I, K y L, prismas de calcita. Cl, columna; ro, recubrimiento orgánico; co, contorno orgánico; po, poros.

En la Fig. 27, se observan las micrografías laterales y laterales superiores de la capa nacarada de las conchas del tratamiento control y el tratamiento de acidificación. En el caso de la concha del tratamiento control (panel superior), se observa un arreglo desordenado y compacto de tabletas de nácar, donde se observa un límite bien definido entre la capa nacarada y la capa

prismática (Fig. 27a, flecha). Estas tabletas de nácar no presentan una forma definida y presentan un recubrimiento entre cada tableta (Fig. 27b, flecha). Por otro lado, la capa nacarada expuesta a condiciones de acidificación presenta un visible daño, el arreglo estructural de las tabletas apiladas de nácar presenta espacios vacíos y se observa el desvanecimiento de estas (Fig. 27c, e y g, flechas), las tabletas de nácar se observan erosionadas, disueltas y visiblemente más delgadas en comparación con los controles, las tabletas se observan más expuestas debido a la desaparición del recubrimiento orgánico (Fig. 27d, f y h, flechas). Tras 40 días de exposición a condiciones de acidificación la superficie de la capa nacarada presenta la formación de otras formas aparentes de CaCO_3 , aragonita ortorrómbica (Fig.31g, asteriscos) y calcita trigonal (Fig. 27h, flechas).

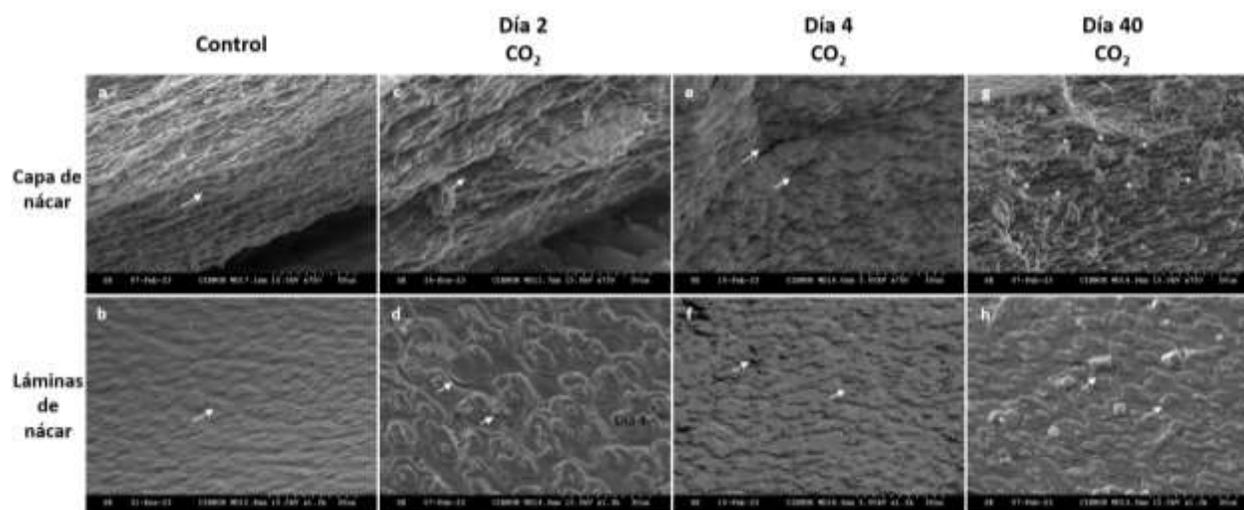


Figura 27. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) laterales de la capa nacarada de *A. maura* después de 40 días. A-B, tratamiento control (7.8 ± 0.1); C-H, tratamiento de acidificación (7.5 ± 0.2): C-D, día 2 de exposición; E-F, día 4 de exposición; G-H, día 40 de exposición. Panel superior, vista lateral del arreglo laminar de nácar; Panel inferior, vista lateral superior de láminas de nácar. *, formas adicionales de CaCO_3 ; corchetes, espacios vacíos entre las láminas de nácar; flechas, signos de disolución.

8. DISCUSIÓN

8.1 Parámetros fisicoquímicos del bioensayo.

En este estudio se evaluó el efecto de la acidificación del océano proyectada para el año 2300 (pH 7.50 ± 0.2) sobre el manto y la microestructura de la concha de callo de hacha (*Atrina maura*). La evaluación estructural e histológica bajo condiciones de AO puede denotar una perspectiva más detallada del efecto de la AO al describir las relaciones a diferentes niveles de la función biológica (Caldeira & Wickett, 2003). La variación de pH del agua de mar fue realizada mediante la inyección de CO₂ por burbujeo de acuerdo con el modelo desarrollado por Fangue et al. (2010) (Fig. 11-12), dicho burbujeo y la renovación del agua de mar mantuvo el pH del agua de mar relativamente estable para cada réplica del tratamiento de acidificación durante todo el experimento (Fig.16), por lo que las respuestas de *A. maura* sólo fueron causadas por el tratamiento con pH.

8.2 Identificación de los genes que codifican SMPs en el tejido del manto de *A. maura*.

Basado en el análisis molecular, se identificaron los genes de la subunidad ribosomal 28S y calmodulina (Tabla 7). Usualmente, los genes de 18S y 28S de ARN ribosomal (ARNr) son ampliamente utilizados como marcadores genéticos para la identificación molecular de rangos taxonómicos, tales como género y especie, debido a que se encuentran altamente conservados (Bengtsson-Palme et al. 2015; Zhao et al. 2020). El alineamiento de la secuencia 28S de ARNr amplificada de *A. maura* mostró identidad con la secuencia de la subunidad ribosomal 28S del bivalvo *Atrina rígida* (98.53%), bivalvo perteneciente al género *Atrina* de la familia Pinnidae, determinando que la secuencia amplificada corresponde a la subunidad ribosomal 28S de un organismo del género *Atrina*. Por otro lado, el alineamiento de la secuencia de amplificada de calmodulina de *A. maura* mostró similitud con una secuencia de ARNm de una proteína tipo-calmodulina del bivalvo *Hyriopsis cumingii* (82.76%). La proteína calmodulina participa en la regulación intracelular de la señalización, absorción, transporte y deposición de calcio en la biomineralización (Liu et al. 2012). Xin et al. (2022) reportaron que calmodulina juega un rol fundamental como regulador de calcio y el proceso de calcificación, por lo que se expresa

constitutivamente en todos los tejidos, con mayores niveles de expresión en el manto de *C. gigas*, debido a que se ha reportado que el manto participa en la regulación del calcio al ser el órgano principal de los bivalvos para la calcificación (Wang et al. 2022; Xin et al. 2022). Por otro lado, determinaron que bajo condiciones de acidificación del agua de mar el nivel de expresión de calmodulina disminuía significativamente en el manto de *C. gigas* (Xin et al. 2022).

8.3 Análisis histológico del manto de *A. maura*.

El manto de los moluscos ha sido ampliamente estudiado con el fin de comprender el mecanismo del proceso de biomineralización, debido a que el manto está organizado por regiones y/o zonas diferentes, cada una de las cuales se encuentra relacionada con el proceso de formación de capas específicas de la concha de los moluscos (Kocot et al. 2016; Clark, 2020). El manto está compuesto por músculos internos, fibras nerviosas y tejidos conectivos delimitados por capas de células epiteliales de cada lado que se extienden hacia estos (Audino et al. 2015). Generalmente, el manto se divide en dos regiones, manto paleal (zona central) y borde del manto (zona marginal), los cuales se encuentran en contacto directo con la capa prismática y la capa nacarada de la concha, respectivamente (Kocot et al. 2016; Clark, 2020). A su vez el borde del manto se divide en tres pliegues o lóbulos, interno (PI), medio (PM) y externo (PE), donde se ha reportado el PE, PI y PM están involucrado en la secreción de la concha, el flujo de entrada de agua y funciones sensoriales, respectivamente. (Fang et al. 2008; Audino et al. 2015; Clark, 2020; Xin et al. 2022). Por lo que el estudio del manto es fundamental para comprender de forma global la adaptación de los bivalvos marinos a la AO (Fang et al. 2008; Audino et al. 2015; Xin et al. 2022).

De acuerdo con el análisis histológico, la AO no causó efectos negativos en la anatomía del manto y la morfología de las células epiteliales, al menos durante los 40 días de exposición a pH ácido (7.5 ± 0.2). Estos resultados concuerdan con Zúñiga-Soto et al. (2023) y Wei et al. (2015), quienes examinaron el tejido del manto de la ostra del pacífico (*C. gigas*) expuesto a un pH normal (8.0 y 8.2, respectivamente) y un pH ácido (7.6) para determinar los efectos de la AO a nivel celular. Reportando que, bajo condiciones de AO por 20 días y 28 días, respectivamente, el tejido del manto de *C. gigas* no mostró diferencias significativas en términos de anatomía.

Debido a que el CO_2 traspasa fácilmente las membranas biológicas entrando a espacios intracelulares, donde la amortiguación pasiva es el único mecanismo disponible para limitar los cambios de pH internos (Fabry et al. 2008). Esto sugiere que los juveniles de *A. maura* podrían estar desarrollando estrategias fisiológicas para destinar energía adicional hacia la homeostasis del pH en condiciones externas de pH ácido, sin embargo, se requieren más investigaciones para determinar el mecanismo fisiológico en respuesta a la AO.

La AO causada por niveles excesivos de CO_2 como resultado de actividades antropogénicas, conlleva a la producción de ácido carbónico (H_2CO_3), el cual se disocia en bicarbonato (HCO_3^-) y un ion hidrógeno (H^+), donde este último provoca una reducción del pH del agua de mar, volviéndola más ácida, y el bicarbonato y calcio (Ca^{2+}) del medio ambiente son transportados a través del epitelio exterior del manto hacia el sitio de biomineralización donde son absorbidos selectivamente para la construcción de la concha de los moluscos (Fabry et al. 2008; Doney et al. 2009; Branch et al. 2013; Li et al. 2016; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020; Clark, 2020). Durante el proceso anterior, la homeostasis ácido-base de las células del manto se ve alterada, por lo que una alternativa ante la ausencia de cambios en la anatomía del manto de *A. maura* podría ser estudiar la actividad secretora realizada por las células del manto bajo condiciones de AO (Zúñiga-Soto et al. 2023). Ya que, la mucosidad en la superficie del manto puede funcionar como una barrera protectora o de respuesta al estrés para el molusco ante condiciones de AO, donde la actividad protectora dependerá de la estructura mucosa y la tasa de cobertura de secreción de la mucosidad del manto, dicha secreción de moco por células mucosas del manto bajo condiciones de pH ácido (7.7) ya ha sido reportada en *C. gigas* después de 21 días de exposición (Wang et al. 2022a). Por otro lado, la compensación del desequilibrio ácido base depende de la capacidad de transporte de iones equivalentes a través de las membranas celulares, donde el bicarbonato se transporta fuera de la célula a cambio de Cl^- y los protones son excretados con la ayuda de proteínas de transporte de iones, por lo que, el estudio de genes relacionados con el transporte de iones, tales como Na^+/K y $\text{H}^+/\text{ATPasas}$ podría proveer más información acerca de la capacidad regulación ácido-base de *A. maura* (Fabry et al. 2008).

8.4 Análisis estructural de la concha de *A. maura* por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Conforme disminuye el pH del océano, el efecto de la AO depende de la estructura y composición de la concha del organismo (Gazeau et al. 2007). El CaCO_3 se presenta comúnmente como calcita y aragonita, aunque los dos polimorfos presentan la misma fórmula química, la disposición anatómica de la aragonita es diferente, por lo que en comparación con la calcita resulta ser más susceptible a la AO (Mele et al. 2023). El análisis estructural de la concha de *A. maura* mediante SEM denotó las microestructuras de la capa externa e interna de la concha. Dónde, la capa externa de calcita presentó un arreglo estructural prismático formado por prismas de calcita, y la capa interna nacarada está conformada por laminillas de cristales hexagonales de aragonita, para cada caso, las capas de mineral de CaCO_3 se encuentran alternadas con capas delgadas de matriz orgánica, la cual recubre también cada una de las columnas (cl) presentes en la capa prismática. Dichos patrones estructurales, son similares a los reportados para el bivalvo *Atrina rígida* (Addadi et al. 2006; Deng et al. 2020). Estudios sobre el efecto de la AO en la biomineralización de bivalvos en la etapa juvenil han reportado corrosión en la superficie de la concha y cambios en la microestructura mineral, tales como la disolución química en condiciones de pH ácido (Auzoux-Bordenave et al. 2019). El análisis de las conchas de *A. maura* por SEM mostró que a un pH ácido de 7.5 ± 0.2 la superficie interna de la concha presentó signos de disolución química y/o malformación de los prismas y columnas de calcita, así como de las láminas de nácar a partir del día 2 de exposición hasta el final del experimento (día 40). Dicho efecto negativo sobre las microestructuras de las conchas de bivalvos bajo condiciones de AO se ha reportado en bivalvos, tales como, *Pinctada fucata*, *Pinctada margaritifera*, *Haliotis tuberculata*, *Mytilus coruscus* y *Tegillarca granosa* (Welladsen et al. 2010; Le Moullac et al. 2016; Liu et al. 2017; Zhao et al. 2017; Zhao et al. 2020). La corrosión de la superficie de la concha y los cambios en las microestructuras biominerales bajo condiciones de acidificación se relacionan con un efecto directo en la disolución de la concha (Anzoux-Bordenave et al. 2020). Se sugiere que dicho efecto son respuestas de la acidificación interna, siendo la disolución de sus estructuras mineralizadas (reservas de CaCO_3) una estrategia para compensar dicha inestabilidad química (Michaelidis et al. 2005; Miles et al. 2007; Spicer et al.

2007; Fabry et al. 2008; Doney et al. 2009). Esto debido a que la reducción en el gradiente electroquímico de los H^+ , entre el citosol del organismo y el agua de mar, dificulta el mantenimiento del pH deseado en el sitio de calcificación, provocando una inhibición de la calcificación y un impacto negativo (visible) en la disolución de la concha causado por el incremento de H^+ en el agua de mar, donde la alta afinidad de los H^+ por los CO_3^{2-} , conduce a la disolución de las estructuras de $CaCO_3$ existentes (Fig.7) (Li et al. 2016; Liu et al. 2012; Chandra Rajan & Vengatesen, 2020; Ries et al. 2009; Welladsen et al. 2010).

Por lo anterior, es posible que las proyecciones futuras de la AO causada por altos niveles de CO_2 impacte negativamente sobre la calcificación de la concha de *A. maura*. Además, la pérdida de integridad estructural a causa del pH ácido del agua de mar compromete las propiedades mecánicas de la concha, lo que podría provocar que *A. maura* sea más susceptible a los depredadores, parásitos y epibiontes perforadores (esponjas, gusanos) (Li et al. 2015; Liu et al. 2017; Alma et al. 2020). Ya que estos organismos optimizan sus hábitos alimenticios al preferir alimentarse de organismos con concha débil (Alma et al. 2020).

8.5 Análisis estadístico de la talla de la concha de *A. maura*.

El proceso de biomineralización de la concha de los moluscos es un proceso complejo, activamente controlado y determinado por el crecimiento en longitud y grosor, se sugiere que la capa externa (prismática) está involucrada en el crecimiento en longitud, mientras que la capa interna (nacarada) es la encargada del crecimiento en términos de grosor (Liu et al. 2017). Los resultados del análisis estadístico de las diferencias entre las longitudes de la concha de organismos control (7.8 ± 0.1) y organismos expuestos a condiciones de pH ácido ($pH 7.5 \pm 0.2$) durante 40 días no mostraron cambios significativos en el crecimiento de la concha de *A. maura*. Lo anterior podría sugerir que *A. maura* es capaz de regular el crecimiento de la concha en condiciones de pH ácido, al menos a los 40 días de exposición. Estos resultados concuerdan con los reportados por Liu et al. (2023), los cuales mencionaron que el crecimiento de la concha de *Arctica islandica* no se ve afectado a un pH de 7.50 durante tres meses de exposición. Existen dos hipótesis acerca de la resistencia de la calcificación de un organismo ante la AO: 1) regulación del pH en el sitio de calcificación del organismo y 2) biomineralización facilitada por

la matriz orgánica (Wall et al. 2016; Liu et al. 2023). Para llevar a cabo la primera hipótesis el organismo debería controlar el pH del líquido de calcificación a través de Ca-H-ATPasa, Na-K-ATPasa o ajustando la capacidad amortiguadora del líquido en el sitio de calcificación, mientras que, en la segunda hipótesis, el carbonato de calcio podría estabilizarse por la presencia de Mg^{2+} , fosfato y/o moléculas orgánicas (Cusack & Freer, 2008; Liu et al. 2023). Por otro lado, el periostraco puede proteger los biominerales de la disolución al protegerlos contra la exposición directa al agua de mar ácido (Liu et al. 2023).

En condiciones estresantes, la reparación y producción de minerales de $CaCO_3$ puede tener altos costos a nivel energético para el organismo, por ejemplo, cuando se encuentra en un ambiente ácido, por lo que la corrosión y/o disolución de la concha son estrategias alternativas para la distribución de energía hacia otros procesos de mantenimiento metabólico internos y esenciales (Melzner et al., 2011; Alma et al. 2020; Anzoux-Bordenave et al. 2020). Por lo que la disolución y malformación de las microestructuras de las conchas y el nulo efecto sobre el tejido del manto de *A. maura* en condiciones de acidificación podrían sugerir que el bivalvo está reasignando la energía de la biomineralización de la concha para el mantenimiento de funciones metabólicas básicas, con el fin de contrarrestar el estrés provocado por una disminución del pH del agua de mar (Michaelidis et al. 2005; Miles et al. 2007; Spicer et al. 2007; Mackenzie et al. 2014; Ramajo et al. 2016; Alma et al. 2020). Además, se sugiere que las especies más tolerantes a la hipercapnia (acumulación de CO_2) presentan una mayor acumulación de bicarbonato, y, en consecuencia, compensan el pH ácido debido a la AO mediante la disolución de la concha, tal como *Mytilus edulis* (Fabry et al. 2008). Cuando el transporte de iones a través de la membrana no es exitoso, la AO puede provocar una disminución del metabolismo como una estrategia adaptativa para la supervivencia bajo dichas condiciones, siendo la síntesis de proteínas, sobre todo aquellas relacionadas con el proceso de biomineralización de la concha, uno de los principales procesos que se observan limitados debido al alto costo energético que estas involucran (Fabry et al. 2008; Liu et al. 2012). Por lo que el estudio de los niveles de expresión de genes relacionados con la formación de la concha de *A. maura* podría proveer información fundamental acerca de la respuesta de este bivalvo ante la AO.

9. CONCLUSIONES

En este estudio se evaluaron los efectos de la AO a nivel estructural e histológico en juveniles de callo de hacha (*A. maura*) expuestas a condiciones de acidificación por 40 días. Bajo condiciones de acidificación (pH 7.5 ± 0.2) la integridad de las capas de la concha se vio afectada negativamente, presentando signos de disolución química y malformación tanto en la capa prismática de calcita como en la capa nacarada, lo que podría afectar la viabilidad económica del callo de hacha para el consumo humano. Por otro lado, el crecimiento de la concha y el tejido del manto de *A. maura* no se vieron afectados bajo condiciones de acidificación. Dichos resultados sugieren que *A. maura* podría estar implementando estrategias fisiológicas para destinar energía adicional hacia la homeostasis del pH, siendo la disolución de la concha una estrategia para compensar la inestabilidad química utilizando reservas de CaCO_3 . Sin embargo, es posible que las proyecciones futuras de la AO causada por altos niveles de CO_2 impacte negativamente sobre la calcificación de la concha de *A. maura*, ya que, la pérdida de integridad estructural a causa de la AO compromete las propiedades mecánicas de la concha, lo que podría provocar que *A. maura* sea más susceptible a depredadores y otros factores ambientales estresantes. Por lo que, se requieren más investigaciones para determinar el mecanismo fisiológico de *A. maura* en respuesta a la AO a largo plazo, siendo los análisis -omicos múltiples una alternativa esencial para comprender los mecanismos subyacentes responsables de la adaptación o aclimatación de los moluscos al estrés provocado por la AO.

10. LITERATURA CITADA

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F. & Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry*, 12(4): 980-987. doi: 10.1002/chem.200500980.
- Alma, L., Kram, K., Holtgrieve, G., Barbarino, A., Fiamengo, C. & Padilla-Gamiño, J. (2020). Ocean acidification and warming effects on the physiology, skeletal properties, and microbiome of the purple-hinge rock scallop. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 240: 110579.
- Andersson, A., Bates, N. R. & Mackenzie, F. T. (2007). Dissolution of carbonate sediments under rising pCO₂ and ocean acidification: observations from devil's hole, bermuda. *Aquatic Geochemistry*, 13: 237-264. doi: 10.1007/s10498-007-9018-8.
- Andersson, A., Mackenzie, F. & Lerman, A. (2005). Coastal ocean and carbonate systems in the high CO₂ world of the anthropocene. *American Journal of Science*, 305(9): 875-918. doi: <https://doi.org/10.2475/ajs.305.9.875>.
- Angel Dapa, M. A. (2015). *Evaluación de la dinámica energética y el desempeño reproductivo y larvario del callo de hacha Atrina maura (Bivalvia: Pinnidae)*. Doctor en Ciencias Marinas. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas e Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN), La Paz, B.C.S.
- Audino, J., Marian, J. E., Wanninger, A. & Lopes, S. (2015). Mantle margin morphogenesis in *Nodipecten nodosus* (Mollusca: Bivalvia): new insights into the development and the roles of bivalve pallial folds. *BMC Developmental Biology*, 15(22). doi: 10.1186/s12861-015-0074-9.
- Auzoux-Bordenave, S., Wessel, N., Badou, A., Martin, S., M'zoudi, S., Avignon, S., Roussel, S., Huchette, S. & Dubois, P. (2020). Ocean acidification impacts growth and shell mineralization in juvenile abalone (*Haliotis tuberculata*). *Marine Biology*, 167(1). doi: 10.1007/s00227-019-3623-0.
- Barthelat, F., Rim, J. E. & Espinosa, H. D. (2009). A review on the structure and mechanical properties of mollusk shells – perspectives on synthetic biomimetic materials. *Applied Scanning Probe Methods XIII. Springer Berlin Heidelberg*. pp. 17-20.
- Bellerby, R. (2017). Ocean acidification without borders. *Nature Climate Change*, 7: 241-242. doi: <https://doi.org/10.1038/nclimate3247>.
- Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K. M., Pal, C., Thorell, K., Larsson, D. & Nilsson, R. (2015). Metaxa2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Molecular Ecology Resources*, 15(6): 1403-1414. doi: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12399>.
- Beniash, E., Ivanina, A., Lieb, N. S., Kurochkin, I. O. & Sokolova, I. (2010). Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, 419: 95-108. doi: <https://doi.org/10.3354/meps08841>.
- Brahmi, C., Chapron, L., Le Moullac, G., Soyeux, C., Benoît, B., Lazareth, C., Gaertner-Mazouni, N. & Vidal-Dupiol, J. (2021). Effects of temperature and pCO₂ on the respiration, biomineralization and photophysiology of the giant clam *Tridacna maxima*. *Conservation Physiology*, 9(1): coab041. doi: <https://doi.org/10.1093/conphys/coab041>.

- Branch, T., DeJoseph, B., Ray, L. & Wagner, C. (2013). Impacts of ocean acidification on marine seafood. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(3): 178-186. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.001>.
- Caldeira, K. & Wickett, M. (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425: 365-365.
- Chandra Rajan, K. & Vengatesen, T. (2020). Molecular adaptation of molluscan biomineralisation to high-CO₂. *Marine Environmental Research*, 155: 104883. doi: 10.1016/j.marenvres.2020.104883.
- Clark, M. S. (2020). Molecular mechanisms of biomineralization in marine invertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 223(11): jeb206961. doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.206961>.
- CoastAdapt. (2017). *Ocean acidification and its effects*. CoastAdapt. Disponible en: <https://coastadapt.com.au/ocean-acidification-and-its-effects>. [consulta: enero 2021].
- Comeau, S., Gorsky, G., Jefree, R., Teyssie, J. L. & Gattuso, J. P. (2009). Impact of ocean acidification on a key Arctic pelagic mollusc (*Limacina helicina*). *Biogeosciences*, 6: 1877-1882. doi: <https://doi.org/10.5194/bg-6-1877-2009>.
- Cusack, M. & A., F. (2008). Biomineralization: elemental and organic influence in carbonate systems. *Chemical Reviews*, 108(11), 4433-4454. doi: 10.1021/cr078270o.
- Dame, R. F. (2011). *Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach*. 2 ed. CRC Press, Boca Ratón.
- Deng, Z., Chen, H., Yang, T., Jia, Z., Weaver, J., Shevchenko, P., De Carlo, F., Mirzaeifar, R. & Li, L. (2020). Strategies for simultaneous strengthening and toughening via nanoscopic intracrystalline defects in a biogenic ceramic. *Nature Communications*, 11(1). doi: 10.1038/s41467-020-19416-2.
- Dickinson, G., Ivanina, A., Matoo, O., Pörtner, H., Lannig, G., Bock, C., Beniash, E. & Sokolova, I. (2012). Interactive effects of salinity and elevated CO₂ levels on juvenile eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *Journal of Experimental Biology*, 215, 29-43. doi: 10.1242/jeb.061481.
- Dineshram, R., Wong, K. K., Xiao, S., Yu, Z., Qian, P. Y. & Thiyagarajan, V. (2012). Analysis of Pacific oyster larval proteome and its response to high-CO₂. *Marine Pollution Bulletin*, 64(10): 210-2167. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.07.043.
- Doney, S. C., Busch, S., S., C. & Kroeker, K. (2020). The impacts of ocean acidification on marine ecosystems and reliant human communities. *Annual Review of Environment and Resources*, 45, 83-112. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-012320-083019>.
- Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A. & Kleypas, J. A. (2009). Ocean acidification: the other CO₂ problem. *Annual Review of Marine Science*, 1(1): 169-192. doi: 10.1146/annurev.marine.010908.163834.
- Dupont, S. & Thorndyke, M. C. (2009). Impact of CO₂-driven ocean acidification on invertebrates early life-history – What we know, what we need to know and what we can do. *Biogeosciences Discussions*, 6(2): 3109-3131. doi: 10.5194/bgd-6-3109-2009.
- Escamilla-Montes, R., Diarte-Plata, G., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J. A., Esparza-Leal, H. M., Granados-Alcantar, S. & Ruiz-Verdugo, C. A. (2017). Ecology, fishery and aquaculture in Gulf of California, Mexico: pen shell *Atrina maura* (Sowerby, 1835). En: *Organismal and Molecular Malacology*. InTech, pp. 3-21. doi: 10.5772/68135.

- Fabry, V. J., Seibel, B. A., Feely, R. A. & Orr, J. C. (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, 65(3): 414-432. doi: <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsn048>.
- Fang, Z., Yan, Z., Li, S., Wang, Q., Cao, W., Xu, G., Xiong, X., Xie, L. & Zhang, R. (2008). Localization of calmodulin and calmodulin-like protein and their functions in biomineralization in *P. fucata*. *Progress in Natural Science*, 18(4): 405-412. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2007.11.011>.
- Fangue, N. A., O'donnell, M. J., Sewell, M. A., Matson, P. G., Macpherson, A. C. & Hofmann, G. E. (2010). A laboratory-based, experimental system for the study of ocean acidification effects on marine invertebrate larvae. *Limnology and Oceanography: Methods*, 8: 441-452. doi: 10.4319/lom.2010.8.441.
- Findlay, H. S., Wood, H. L., Kendall, M. A., Spicer, J. I., Twitchett, R. J. & Widdicombe, S. (2009). Calcification, a physiological process to be considered in the context of the whole organism. *Biogeosciences Discussions*, 6(1): 2267-2284. doi: 10.5194/bgd-6-2267-2009.
- Fougerouse, A., Rousseau, M. & S. Lucas, J. (2008). Soft tissue anatomy, shell structure and biomineralization. En: *The pearl oyster*. Elsevier, Australia, pp. 77-102.
- García-Lagunas, N., Romero-Geraldo, R. & Hernández-Saavedra, N. Y. (2016). Changes in gene expression and histological injuries as a result of exposure of *Crassostrea gigas* to the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Journal of Molluscan Studies*, 82(1): 193-200. doi: <https://doi.org/10.1093/mollus/eyv053>.
- Gazeau, F., Quiblier, C., Jansen, J. M., Gattuso, J., Middelburg, J. J. & Heip, C. (2007). Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification. *Geophysical Research Letters*, 34(7). doi: 10.1029/2006gl028554.
- Guderley, H. & Pörtner, H. (2010). Metabolic power budgeting and adaptative strategies in zoology: examples from scallops and fish. *Canadian Journal of Zoology*, 88(8): 753-763. doi: <https://doi.org/10.1139/Z10-039>.
- Gutiérrez, J. L., Jones, C. G., Strayer, D. L. & Iribarne, O. O. (2003). Mollusk as ecosystem engineers: the role of shell production in aquatic habitats. *Oikos*, 101(1): 79-90. doi: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12322.x>.
- Gutowska, M. A., Melzner, F., Pörtner, H. O. & Meier, S. (2010). Cuttlebone calcification increases during exposure to elevated seawater pCO₂ in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Marine Biology*, 157(7): 1653-1663. doi: 10.1007/s00227-010-1438-0.
- Gómez Valdez, M. M. (2019). *Características de la biología reproductiva de dos especies de callos de hacha de importancia comercial en Laguna ojo de liebre, Baja California Sur: Atrina maura y Pinna rugosa. Doctorado en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, B.C.S.
- Góngora-Gómez, A. M., García-Ulloa, M., Domínguez-Orozco, A. L. & Hernández-Sepúlveda, J. A. (2011). Crecimiento del callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia:Pinnidae) cultivado a diferentes densidades. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 15(2): 79-94. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572016000300017>.
- Huesemann, M., Skillman, A. & Creelius, E. (2002). The inhibition of marine nitrification by ocean disposal of carbon dioxide. *Marine Pollution Bulletin*, 44(2): 142-148. doi: 10.1016/s0025-326x(01)00194-1.

- Hutchins, D. A., Fu, F.-X., Zhang, Y., Warner, M. E., Feng, Y., Portune, K., Bernhardt, P. W. & Mulholland, M. R. (2007). CO₂ control of *Trichodesmium* N₂ fixation, photosynthesis, growth rates, and elemental ratios: Implications for past, present, and future ocean biogeochemistry. *Limnology and Oceanography*, 52(4): 1293-1304. doi: 10.4319/lo.2007.52.4.1293.
- Hüning, A., Melzner, F., Thomsen, J., Gutowska, M., Krämer, L., Frickenhaus, S., Rosenstiel, P., Pörtner, H., Philipp, E. & Lucassen, M. (2013). Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: implications for shell formation and energy metabolism. *Marine Biology*, 160: 1845-1861.
- Iglesias-Rodríguez, D., Halloran, P. R., Rickaby, R., Hall, I., Colmenero-Hidalgo, E., Gittins, J. R., Green, D., Tyrrell, T., Gibbs, S., Von Dassow, P., Rehm, E., Armbrust, E. & Boessenkool, K. (2008). Phytoplankton calcification in a high-CO₂ world. *Science*, 320(5874): 336-340. doi: 10.1126/science.1154122.
- Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA). (2021). Manual de transferencia tecnológica: Cultivo de almeja "Callo de hacha" *Atrina maura* (Sowerby, 1835). Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/718949/1MANUAL_Atrina_maura.pdf. [consultado: septiembre 2022].
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2014). Climate Change (2014): Synthesis Report. IPCC, Geneva, Switzerland. Disponible en: https://archive.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_FINAL_full_wcover.pdf.
- Kobayashi, I. & Samata, T. (2006). Bivalve shell structure and organic matrix. *Materials Science and Engineering: C*, 26(4): 692-698. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.09.101>.
- Kocot, K., Aguilera, F., Mcdougall, C., Jackson, D. & Degnan, B. (2016). Sea shell diversity and rapidly evolving secretomes: insights into the evolution of biomineralization. *Frontiers in Zoology*, 13(23). doi: <https://doi.org/10.1186/s12983-016-0155-z>.
- Kuffner, I., Andersson, A., Jokiel, P., Rodgers, K. & Mackenzie, F. (2008). Decreased abundance of crustose coralline algae due to ocean acidification. *Nature Geoscience*, 1: 114-117. doi: <https://doi.org/10.1038/ngeo100>.
- Laffoley, D. & Baxter, J. M. (2016). Explaining ocean warming: causes, scale, effects and consequences. *IUCN, Gland, Switzerland*. doi: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.CH.2016.08.en>.
- Langenbuch, M. & Pörtner, H. O. (2004). High sensitivity to chronically elevated CO₂ levels in a eurybathic marine sipunculid. *Aquatic Toxicology*, 70(1): 55-61. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.07.006.
- Lannig, G., Eilers, S., Pörtner, H. O., Sokolova, I. M. & Bock, C. (2010). Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster, *Crassostrea gigas*—changes in metabolic pathways and thermal response. *Marine Drugs*, 8(8): 2318-2339. doi: <https://doi.org/10.3390/md8082318>.
- Le Moullac, G., Schuck, L., Chabrier, S., Belliard, C., Lyonnard, P., Broustal, F., Soye, C., Saulnier, D., Brahmi, C., Ky, C.-L. & Beliaeff, B. (2018). Influence of temperature and pearl rotation on biomineralization in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Experimental Biology*, 221(18): jeb186858. doi: 10.1242/jeb.186858.
- Le Moullac, G., Soye, C., Latchere, O., Vidal-Dupiol, J., Fremery, J., Saulnier, D., Lo Yat, A., Belliard, C., Mazouni-Gaertner, N. & Gueguen, Y. (2016). *Pinctada margaritifera* responses to

- temperature and pH: Acclimation capabilities and physiological limits. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 182: 261-269. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.04.011>.
- Leeson, T. S., Leeson, C. & Paparo, A. A. (1999). Epitelio. En *Texto/Atlas de Histología*. 1 ed. McGraw-Hill Interamericana, México, D.F.
- Leyva Valencia, I. (1999). *Termotolerancia, halotolerancia y temperatura óptima en juveniles de callo de hacha (Atrina maura Sowerby, 1835)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Los Reyes Iztalaca, Estado de México.
- Li, H., Liu, B., Huang, G., Fan, S., Zhang, B., Su, J. & Yu, D. (2017). Characterization of transcriptome and identification of biomineralization genes in winged pearl oyster (*Pteria penguin*) mantle tissue. *Comparative Biochemistry Physiology Part D: Genomics Proteomics*, 21: 67-76. doi: 10.1016/j.cbd.2016.12.002.
- Li, S., Liu, C., Huang, J., Liu, Y., Zhang, S., Zheng, G., Xie, L. & Zhang, R. (2016a). Transcriptome and biomineralization responses of the pearl oyster *Pinctada fucata* to elevated CO₂ and temperature. *Scientific Report*, 6(6): 18943. doi: 10.1038/srep18943.
- Li, S., Liu, C., Huang, J., Liu, Y., Zheng, G., Xie, L. & Zhang, R. (2015). Interactive effects of seawater acidification and elevated temperature on biomineralization and amino acid metabolism in the mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Biology*, 218: 3623-3631. doi:10.1242/jeb.126748.
- Li, X.-X., Yu, W.-C., Cai, Z.-Q., He, C., Wei, N., Wang, X.-T. & Yue, X.-Q. (2016b). Molecular cloning and characterization of full-length cDNA of calmodulin gene from pacific oyster *Crassostrea gigas*. *BioMed Research International*, 2016: 1-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5986519>.
- Liu, C. & Zhang, R. (2021). Biomineral proteomics: a tool for multiple disciplinary studies. *Journal of Proteomics*, 238: 104171. doi: 10.1016/j.jprot.2021.104171.
- Liu, W., Huang, X., Lin, J. & He, M. (2012). Seawater acidification and elevated temperature affect gene expression patterns of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *PLoS ONE*, 7(3): e33679. doi: 10.1371/journal.pone.0033679.
- Liu, W., Yu, Z., Huang, X., Shi, Y., Lin, J., Zhang, H., Yi, X. & He, M. (2017). Effect of ocean acidification on growth, calcification, and gene expression in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Marine Environmental Research*, 130: 174-180. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.013>.
- Liu, Y. W., D., A., Aciego, S., Searles, I., Hangstad, T., Chierici, M. & Carroll, M. (2023). Resistant calcification responses of *Arctica islandica* clams under ocean acidification conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 560: 151855. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2022.151855>.
- Mackenzie, C. L., Lynch, S. A., Culloty, S. C. & Malham, S. K. (2014). Future oceanic warming and acidification alter immune response and disease status in a commercial shellfish species, *Mytilus edulis* L. *PLoS One*, 9(6): e99712. doi: 10.1371/journal.pone.0099712.
- Maleki Dizaj, S., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., Adibkia, K. & Lotfipour, F. (2015). Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(10): 1649-1660. doi: 10.1517/17425247.2015.1049530.
- Mann, S. (2001). *Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press, 2(6):675. doi: <https://doi.org/10.1021/cg020033l>.

- Marin, F. (2012). The formation and mineralization of mollusk shell. *Frontiers in Bioscience*, 4(3): 1099-1125. doi: 10.2741/s321.
- Marin, F. (2020). Mollusc shellomes: Past, present and future. *Journal of Structural Biology*, 212(1): 107583. doi: 10.1016/j.jsb.2020.107583.
- Marubini, F., Ferrier-Pagès, C., Furla, P. & Allemand, D. (2008). Coral calcification responds to seawater acidification: a working hypothesis towards a physiological mechanism. *Coral Reefs*, 27: 491-499. doi: 10.1007/s00338-008-0375-6.
- Melatunan, S., Calosi, P., Rundle, S. D., Moody, A. J. & Widdicombe, S. (2011). Exposure to elevated temperature and pCO₂ reduces respiration rate and energy status in the periwinkle *Littorina littorea*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 84(6):583-594. doi: 10.1086/662680.
- Mele, I., McGill, R., Thompson, J., Fennell, J. & Fitzer, S. (2023). Ocean acidification, warming and feeding impacts on biomineralization pathways and shell material properties of *Magallana gigas* and *Mytilus* spp. *Marine Environmental Research*, 186: 105925. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.105925>.
- Melzner, F., Stange, P., Trübenbach, K., Thomsen, J., Casties, I., Panknin, U., Gorb, S. & Gutowska, M. (2011). Food supply and seawater pCO₂ impact calcification and internal shell dissolution in the blue mussel *Mytilus edulis*. *PLoS ONE*, 6(9): e24223. doi: 10.1371/journal.pone.0024223.
- Metalpa, R., Houlbrèque, F., Tambutté, É., Boisson, F., Baggini, C., Patti, F. P., Jeffree, R., Fine, M., Foggo, A., Gattuso, J. P. & Hall-Spencer, J. M. (2011). Coral and mollusc resistance to ocean acidification adversely affected by warming. *Nature Climate Change*, 1: 308-312. doi: <https://doi.org/10.1038/nclimate1200>.
- Michaelidis, B., Ouzounis, C., Paleras, A. & Pörtner, H. (2005). Effects of long-term moderate moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*, 293:109-118. doi: 10.3354/MEPS293109.
- Miles, H., Widdicombe, S., Spicer, J. & Hall-Spencer, J. (2007). Effects of anthropogenic seawater acidification on acid-base balance in the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Marine Pollution Bulletin*, 54(1): 89-96. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.09.021.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T. & Matsushiro, A. (1996). A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18): 9657-9660. doi: 10.1073/pnas.93.18.9657.
- Miyamoto, H., Miyoshi, F. & Kohno, J. (2005). The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. *Zoological Science*, 22(3): 311-315. doi: <https://doi.org/10.2108/zsj.22.311>.
- Nudelman, F. (2015). Nacre biomineralisation: A review on the mechanisms of crystal nucleation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 46:2-10. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.07.004.
- Ponder, W. F., Lindberg, D. R. & Ponder, J. M. (2019). Shell, body, and muscles. *En: Biology and Evolution of the Mollusca*. CRC Press, Boca Ratón, 46: 2-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.07.004>.

- Pérez Estrada, C. J. (2000). *Descripción Anatómica e Histológica de la Concha nácar Pteria sterna, Mollusca: Pteriidae. Tesis de Licenciatura*. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S.
- Pörtner, H. O. (1987). Contributions of anaerobic metabolism to pH regulation in animal tissues: theory. *Journal Experimental Biology*, 131(1): 69-87. doi: 10.1242/jeb.131.1.69.
- Pörtner, H. O. & Bock, C. (2000). A contribution of acid-base regulation to metabolic depression in marine ectotherms. En: *Life in the cold*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 443-458.
- Ramajo, L., Marbà, N., Prado, L., Peron, S., Lardies, M., Rodríguez-Navarro, A., Vargas, C., Lagos, N. & Duarte, C. (2016). Biomineralization changes with food supply confer juvenile scallops (*Argopecten purpuratus*) resistance to ocean acidification. *Global Change Biology*, 22(6): 2025-2037. doi: 10.1111/gcb.13179.
- Richards, M., Xu, W., Mallozzi, A., Errera, R. & Supan, J. (2018). Production of calcium-binding proteins in *Crassostrea virginica* in response to increased environmental CO₂ concentration. *Frontiers in Marine Science*, 5:1-13. doi: <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00203>.
- Ries, J. B., Cohen, A. L. & Mccorkle, D. C. (2009). Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO₂-induced Ocean acidification. *Geology*, 37(12): 1131-1134. doi: <https://doi.org/10.1130/G30210A.1>.
- Romero-Geraldo, R. D. J. & Hernández-Saavedra, N. Y. (2014). Stress gene expression in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in response to experimental exposure to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975. *Aquaculture Research*, 45(9): 1512-1522. doi: 10.1111/are.12100.
- Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C. & Akera, S. (1999). A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Letters*, 462(1): 225-229. doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01387-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01387-3).
- Schalkhauser, B., Bock, C., Stemmer, K., Brey, T., Pörtner, H. & Lannig, G. (2012). Impact of ocean acidification on scape performance of the king scallop, *Pecten maximus*, from Norway. *Marine Biology*, 160:1995-2006 doi: 10.1007/s00227-012-2057-8.
- Schippers, P., Lürling, M. & Scheffer, M. (2004). Increase of atmospheric CO₂ promotes phytoplankton productivity. *Ecology Letters*, 7(6): 446-451. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00597.x>.
- Shimizu, K., Negishi, L., Ito, T., Touma, S., Matsumoto, T., Awaji, M., Kurumizaka, H., Yoshitake, K., Kinoshita, S., Asakawa, S. & Suzuki, M. (2022). Evolution of nacre- and prisms-related shell matrix proteins in the pen shell, *Atrina pectinata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 44: 101025. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2022.101025>.
- Smolowitz, R. (2021). Mollusca: Bivalvia. En: *Invertebrate Histology*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 170-172. doi: <https://doi.org/10.1002/9781119507697.ch6>.
- Sokolova, I., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G. & Sukhotin, A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 72:1-15. doi: 10.1016/j.marenvres.2012.04.003.

- Spicer, J. I., Raffo, A. & Widdicombe, S. (2007). Influence of CO₂-related seawater acidification on extracellular acid–base balance in the velvet swimming crab *Necora puber*. *Marine Biology*, 151(3): 1117-1125. doi: 10.1007/s00227-006-0551-6.
- Stumpp, M., Wren, J., Melzner, F., Thorndyke, M. C. & Dupont, S. T. (2011). CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160(3): 331-340. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.06.022.
- Tomanek, L., Zuzow, M. J., Ivanina, A. V., Beniash, E. & Sokolova, I. M. (2011). Proteomic response to elevated PCO₂ level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, 214: 1836-1844. doi: 10.1242/jeb.055475.
- Tsukamoto, D., Sarashina, I. & Endo, K. (2004). Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(4): 1175-1180. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.072>.
- Velasco Blanco, G. (1997). *Cultivo larvario a nivel piloto del callo de hacha (Atrina maura Sowerby) y de la almeja mano de león (Lyropecten subnodosus Soweby) con dos especies de microalgas. Tesis de Maestría*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICISE), Ensenada, B.C.
- Wall, M., Fietzke, J., Schmidt, G. M., Fink, A., Hofmann, L. C., De Beer, D. & Fabricius, K. E. (2016). Internal pH regulation facilitates in situ long-term acclimation of massive corals to end-of-century carbon dioxide conditions. *Scientific Reports*, 6: 30688. doi: 10.1038/srep30688.
- Wang, X., Li, C., Lv, Z., Zhang, Z. & Qiu, L. (2022). A calcification-related calmodulin-like protein in the oyster *Crassostrea gigas* mediates the enhanced calcium deposition induced by CO₂ exposure. *Science of The Total Environment*, 833: 155114. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155114>.
- Wang, X., Li, P., Cao, X., Liu, B., He, S., Cao, Z., Xing, S., Liu, L. & Li, Z. (2022a). Effects of ocean acidification and tralopyril on bivalve biomineralization and carbon cycling: A study of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Environmental Pollution*, 313: 120161. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120161>.
- Wang, Z., Wu, Z., Jian, J. & Lu, Y. (2009). Cloning and expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(4): 639-645. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.011>.
- Wei, L., Wang, Q., Ning, X., Mu, C., Wang, C., Cao, R., Wu, H., Cong, M., Li, F., Ji, C. & Zhao, J. (2015). Combined metabolome and proteome analysis of the mantle tissue from Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to elevated pCO₂. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 13: 16-23. doi: 10.1016/j.cbd.2014.12.001.
- Weiner, S. & Dove, P. (2003). An overview of biomineralization processes and the problem of vital effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1): 1-29. doi: <https://doi.org/10.2113/0540001>.
- Weiss, I. M., Tuross, N., Addai, L. & Weiner, S. (2002). Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is the precursor phase for aragonite. *Journal of Experimental Biology*, 293(5): 478-491. doi: <https://doi.org/10.1002/jez.90004>.

- Welladsen, H. M. (2010). The effects of exposure to near-future levels of ocean acidification on shell characteristics of *Pinctada fucata* (Bivalvia: Pteriidae). *Molluscan Research*, 30(3): 125-130. Disponible en: <https://www.mapress.com/mr/content/v30/2010f/n3p130.pdf>.
- Wood, H. L., Spicer, J. I. & Widdicombe, S. (2008). Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275: 1767-1773. doi:10.1098/rspb.2008.0343.
- Xin, X., Liu, C., Liu, Z., Zhang, Y., Gao, Y., Zhu, T., Wang, L. & Song, L. (2022). Calmodulin regulates the calcium homeostasis in mantle of *Crassostrea gigas* under ocean acidification. *Frontiers in Marine Science*, 9. doi: <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1050022>.
- Zhao, X., Shi, W., Han, Y., Liu, S., Guo, C., Fu, W., Chai, X. & Liu, G. (2017). Ocean acidification adversely influences metabolism, extracellular pH and calcification of an economically important marine bivalve, *Tegillarca granosa*. *Marine Environmental Research*, 125: 82-89. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.01.007>.
- Zhao, Y., Zhang, W.-Y., Wang, R.-L. & Niu, D.-L. (2020). Divergent domains of 28S ribosomal RNA gene: DNA barcodes for molecular classification and identification of mites. *Parasites & Vectors*, 13(1). doi: 10.1186/s13071-020-04124-z.
- Zúñiga-Soto, N., Pinto-Borguero, I., Quevedo, C. & Aguilera, F. (2023). Secretory and transcriptomic responses of mantle cells to low pH in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cold Spring Harbor Laboratory*. doi: 10.1101/2023.01.19.524809.

11. ANEXOS

Secuencias de los productos de PCR amplificados con oligonucleótidos diseñados para los genes *calmodulina*, y *28S*.

>CalM_Ch

```
TATGAGGCACGAAGTGAGGAAACAGATTCTGAAGAAGAAATTCGAGAGGCTTCCGAGTGTTTGACAA
GGATGGTAACGGTTTTATAAGTGCTGCAGAACTTCGACATGTGATGACCAACTTAGGTGAAAAATTGAC
AGAGGAAGAAGTGAGTGAAAA
```

>28S_Ch

```
GATCGAAACGGCGAGTGAGCGGGAGAGCCCAGCACCGAATCCCGCAGCCTTGCGCTGCTGGGAAATGT
GGTGTTTAGGACGTCTATTTGCTGTGGAGTGCGGGCGCCCAAGTCCTCCTGATCGGGGCCTCTCCCGTAG
TGGGTGTCAGGCCTTACTGGCGACCGCCTCTTCGGCTAAGAACGTCCTTGGAGTCGGGTTGTTTGAGAA
TGCAGCCCAAAGTTGGTGGTAAACTCCATCTAAGGCTAAATACTGACACGAGTCCGATAGCGGACAAGT
ACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGTACGTGAAACAACCTTAGAGGA
```