



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**EFFECTOS DE LA ACIDIFICACIÓN EN LA MORFOLOGÍA,
FISIOLOGÍA Y REGULACIÓN GÉNICA MEDIADA POR
MICROARNS EN EL ABULÓN ROJO *HALIOTIS RUFESCENS***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN
OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

RICARDO DE JESÚS EHECATL GÓMEZ REYES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, ENERO 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias Marinas
Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Posgrado en oceanografía Costera

**Estudio de la regulación génica mediada por microRNAs en
procesos de acidificación en el género del molusco *Haliotis*
*rufescens***

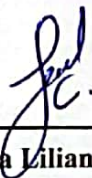
TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS
NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

RICARDO DE JESUS EHECATL GÓMEZ REYES

Aprobado por:



Dra. Laura Liliana López Galindo
Directora



Dra. Clara E. Galindo Sánchez
Co-directora



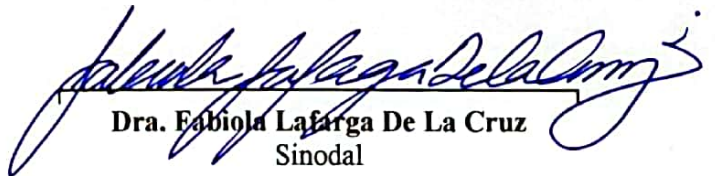
Dra. Ivone Giffard Mena
Sinodal



Dr. José Martín Hernández Ayón
Sinodal



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes
Sinodal



Dra. Fabiola Lafarga De La Cruz
Sinodal

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de Directora de Tesis encargada de revisar la tesis de Doctorado presentada por el estudiante Ricardo de Jesús Ehecatl Gómez Reyes, como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi voto Aprobatorio sobre la tesis titulada:

EFFECTOS DE LA ACIDIFICACIÓN EN LA MORFOLOGÍA, FISIOLOGÍA Y REGULACIÓN GÉNICA MEDIADA POR MICROARNS EN EL ABULÓN ROJO *HALIOTIS RUFESCENS*.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 11 de enero de 2024

Atentamente,



Dra. Laura Liliana López Galindo
Directora de tesis

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargada de revisar la tesis de Doctorado presentada por el estudiante Ricardo de Jesús Ehecatl Gómez Reyes, como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi voto Aprobatorio sobre la tesis titulada:

EFFECTOS DE LA ACIDIFICACIÓN EN LA MORFOLOGÍA, FISIOLÓGIA Y REGULACIÓN GÉNICA MEDIADA POR MICROARNs EN EL ABULÓN ROJO *HALIOTIS RUFESCENS*.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 11 de enero de 2024

Atentamente,



Dra. Clara E. Galindo Sánchez
Sinodal

c.c.p. Expediente

**Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado**

Dra. Natalie Millán Aguiñaga
Directora provisional de la
Facultad de Ciencias Marinas
Presente

Estimada Dra. Millán:

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargada de revisar la tesis de Doctorado presentada por el estudiante **Ricardo de Jesús Ehecatl Gómez Reyes**, como parte de los requisitos para obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi voto **Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

EFECTOS DE LA ACIDIFICACIÓN EN LA MORFOLOGÍA, FISIOLOGÍA Y REGULACIÓN GÉNICA MEDIADA POR MICROARNS EN EL ABULÓN ROJO *HALIOTIS RUFESCENS*.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 11 de enero de 2024

Atentamente,



Dra. Ivohe Giffard Mena
Sinodal

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargado de revisar la tesis de Doctorado presentada por el estudiante Ricardo de Jesús Ehecatl Gómez Reyes, como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi voto Aprobatorio sobre la tesis titulada:

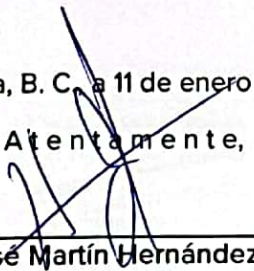
EFFECTOS DE LA ACIDIFICACIÓN EN LA MORFOLOGÍA, FISIOLÓGIA Y REGULACIÓN GÉNICA MEDIADA POR MICROARNs EN EL ABULÓN ROJO HALIOTIS RUFESCENS.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 11 de enero de 2024

Atentamente,



Dr. José Martín Hernández Ayón
Sinodal

c.c.p. Expediente

**Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado**

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargado de revisar la tesis de Doctorado presentada por el estudiante Ricardo de Jesús Ehecatl Gómez Reyes, como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi voto Aprobatorio sobre la tesis titulada:

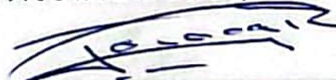
EFFECTOS DE LA ACIDIFICACIÓN EN LA MORFOLOGÍA, FISIOLÓGIA Y REGULACIÓN GÉNICA MEDIADA POR MICROARNs EN EL ABULÓN ROJO HALIOTIS RUFESCENS.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 11 de enero de 2024

Atentamente,



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes
Sinodal

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargada de revisar la tesis de Doctorado presentada por el estudiante Ricardo de Jesús Ehecatl Gómez Reyes, como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi voto Aprobatorio sobre la tesis titulada:

EFFECTOS DE LA ACIDIFICACIÓN EN LA MORFOLOGÍA, FISIOLÓGIA Y REGULACIÓN GÉNICA MEDIADA POR MICROARNS EN EL ABULÓN ROJO HALIOTIS RUFESCENS.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 11 de enero de 2024

Atentamente,



Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz
Sinodal

c.c.p. Expediente

RESUMEN

El abulón rojo *Haliotis rufescens* es un recurso marino fundamental en el contexto de la acuicultura mundial del abulón. Sin embargo, la especie ha sido catalogada como en peligro crítico debido a las mortalidades masivas a lo largo de su vida asociadas con cambios climáticos en el hábitat, entre ellos la acidificación oceánica. Debido a que la supervivencia del abulón depende del éxito de su ciclo de vida planctónico, entender su vulnerabilidad a la acidificación es el primer paso para establecer estrategias de manejo y cultivo adecuadas. Dado que la interpretación de los límites de tolerancia al estrés se extiende desde el nivel más alto de respuesta observado hasta las jerarquías sistémicas, celulares y moleculares, la respuesta a la acidificación se evaluó con parámetros morfológicos, fisiológicos y genómicos. Las tasas de respiración, desarrollo ontogénico, calcificación y crecimiento fueron evaluados en larvas de abulón rojo bajo condiciones de acidificación (pH 7.8 y 7.6), inducida por inyección de CO₂ a largo plazo, y comparadas con condiciones óptimas (pH 8.0). A nivel molecular se cuantificaron e identificaron los microARNs (miRs). Estas moléculas pueden dirigir el destino y plasticidad celular al reprimir la expresión de un gen blanco mediante su degradación o inhibición de su traducción, en respuesta a varios eventos biológicos, como el desarrollo larval y el estrés ambiental. Las larvas de abulón rojo presentaron una reducción en el crecimiento, la calcificación y el desarrollo ontogénico de manera etapa-específica en respuesta a los tratamientos de pH, resultando causar un daño severo a pH de 7.6, aunque no fue letal. En ambas condiciones experimentales de pH, las larvas fueron capaces de completar la transición planctónica-bentónica realizando la metamorfosis y el asentamiento. Sin embargo, la concha de las post-larvas exhibe microfracturas y deterioro del periostraco (capa externa). En condiciones de acidificación las tasas de respiración se incrementaron hasta en un 60%, sugiriendo una necesidad fisiológica para mantener la

homeostasis celular. Se identificó por primera vez la red regulatoria de miRs que se co-expresan durante el desarrollo larvario del abulón rojo. Esta red de miRs fue modificada por el efecto de la acidificación; donde genes asociados al crecimiento, el desarrollo del sistema inmune, el sistema neuronal y la diferenciación de tejidos son regulados negativamente en respuesta a la acidificación. Esta regulación negativa es coherente con la reducción observada en las variables fenotípicas evaluadas.

Palabras claves: Moluscos, Desarrollo larval, acidificación oceánica, microARNs, abulón rojo.

PREFACIO

La acuicultura de moluscos enfrenta retos debido a los cambios en la composición del agua marina modificada por el cambio climático, incluyendo la acidificación oceánica. Mientras que la mayor parte de los estudios se enfocan en los cambios en la estructura y función del adulto frente a los retos del cambio climático, esta tesis encuentra más interesante el estudio de los estados transitorios que preparan al abulón para el estilo de vida adulto. La presente investigación es un esfuerzo que aporta nuevo conocimiento sobre el efecto de la acidificación en la biología del desarrollo del abulón rojo *Haliotis rufescens*. Esta tesis está organizada en dos capítulos. El primero describe toda la investigación relacionada al efecto de dos niveles de acidificación en el desarrollo larval del abulón rojo desde los parámetros morfológicos que incluyen el análisis del crecimiento, calcificación, malformaciones estructurales y retrasos en el desarrollo larval. El segundo capítulo incluye el marco teórico necesario para introducir al lector a la importancia de la genómica como un componente adicional de conocimiento ligada a la interpretación de la sensibilidad del abulón rojo frente a la acidificación oceánica. El análisis transcriptómico a partir de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento permitió describir un nivel adicional de conocimiento en la capacidad del abulón rojo para enfrentar el cambio climático, lo que suma información importante a la investigación holística del efecto de la acidificación en la biología del desarrollo del moluscos.

Dedicatoria

A mis padres, Socorro y Orestes. Mi inspiración y fuerza durante toda mi formación profesional. Es por ustedes que, hoy me encuentro alcanzando este máximo logro académico. *Como saetas en mano del valiente. Así son los hijos habidos en la juventud* (Salmos 127:3-4).

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención otorgada (588201) para realizar mis estudios durante los tres años de doctorado.

A mi amiga, novia y esposa Ayerim Cinai Montelongo-Cano, por acompañarme en todo el proceso del doctorado. Cuando estuve ausente, confiaste en mí. Cuando me desanimé, tus palabras de aliento estuvieron presentes. En cada logro, celebraste a mi lado.

A mi hija, Lisa Sinai.

Jesucristo y su iglesia. Gracias por volverse un fundamento sólido sobre el que construyo mi vida.

Dra. Clarisa, Usted nunca pierde la esperanza en las personas. Gracias por depositar su confianza en mí desde hace años. Gracias por todo

Dra. Laura, por su paciencia en instruirme durante todo el doctorado. Estoy orgulloso de ser su primer estudiante de doctorado egresado.

Dr. Martin, Dra. Fabiola, Dr. Gabriel y Dra. Ivone. Este proyecto de doctorado no hubiera sido posible sin su guianza, participación y apoyo.

Filiberto Núñez-Cebrero, Enrique Valenzuela-Wood, Dr. Larios-Soriano y Dr. Arredondo-Espinoza, por su apoyo técnico a lo largo de mi doctorado.

Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas (FCM) e Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) por brindarme todo lo necesario para llevar a cabo mi proyecto de tesis doctoral.

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por abrirme sus puertas en la colaboración con mi proyecto de tesis doctoral.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| RESUMEN..... | I |
| PREFACIO..... | III |
| Dedicatoria | IV |
| Agradecimientos | V |
| LISTA DE FIGURAS..... | X |
| LISTA DE TABLAS..... | XII |
| Capítulo I. El patrón de respuesta individual al estrés de acidificación inducido por CO ₂ en <i>Haliotis rufescens</i> sugiere una aclimatación etapa-específica durante su historia de vida temprana | 1 |
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Introducción..... | 1 |
| 2.1 Presente y futuro de la acidificación de los océanos | 1 |
| 2.2 Química del carbono, saturación y subsaturación de aragonita | 2 |
| 2.3 El océano costero..... | 4 |
| 2.4 El papel de la acuicultura frente al cambio climático..... | 5 |
| 2.5 El abulón rojo..... | 6 |
| 2.5.1 Hábitat, distribución y acuicultura..... | 6 |
| 2.5.2 Ciclo de vida..... | 7 |
| 2.6 Descripción detallada de las etapas tempranas de la historia de vida del abulón..... | 8 |
| 2.6.1 Larvas trocóforas | 8 |
| 2.6.2 Maduración velígera | 10 |
| 2.6.3 Larvas competentes y su asentamiento | 10 |
| 2.6.4 Lecitotrofia y nutrición larval..... | 11 |
| 2.7 Biomineralización..... | 11 |
| 2.8 Impacto de la acidificación en el desempeño somático en larvas de abulón | 11 |
| 2.9 Exposición a la acidificación a corto y largo plazo en larvas de abulón..... | 12 |
| 3. Justificación | 12 |
| 4. Hipótesis | 13 |
| 5. Objetivos..... | 13 |
| 5.1 General..... | 13 |
| 5.2 Específicos | 13 |
| 6. Métodos | 14 |
| 6.1 Aclimatación y resumen del bioensayo | 14 |
| 6.2 Descripción del diseño experimental y sistema de acidificación por inyección de dióxido de carbono..... | 14 |

| | | |
|--|---|----|
| 6.3 | Análisis químicos del agua | 16 |
| 6.4 | Evaluación morfológica y desempeño del desarrollo | 17 |
| 6.4.1 | Éxito de la eclosión..... | 17 |
| 6.4.2 | Éxito de la maduración velígera | 18 |
| 6.4.3 | Análisis morfométrico | 18 |
| 6.4.4 | Birrefringencia..... | 19 |
| 6.4.5 | Éxito de la competencia | 20 |
| 6.4.6 | Éxito del asentamiento: Acidificación a corto y largo plazo..... | 21 |
| 6.4.7 | Microscopía electrónica de barrido..... | 21 |
| 6.5 | Análisis estadísticos..... | 21 |
| 7. | Resultados..... | 23 |
| 7.1 | Control del pH y química de agua..... | 23 |
| 7.2 | Éxito del desarrollo larval..... | 23 |
| 7.2.1 | Éxito de la eclosión y larvas con concha normal..... | 23 |
| 7.2.2 | Deterioro de la maduración velígera..... | 25 |
| 7.2.3 | Éxito de la competencia | 28 |
| 7.2.4 | Éxito del asentamiento y microscopía electrónica de barrido | 29 |
| 8. | Discusión | 35 |
| 9. | Conclusión..... | 40 |
| Capítulo II. Regulación postranscripcional del abulón en respuesta a la acidificación..... | | 41 |
| 1. | Resumen | 41 |
| 2. | Introducción..... | 41 |
| 2.1 | El mundo del ARN..... | 41 |
| 2.2 | Programa genético del desarrollo temprano de vida del abulón..... | 42 |
| 2.3 | Impacto de la acidificación en rasgos celulares-moleculares de moluscos durante su desarrollo temprano de vida..... | 44 |
| 2.4 | Regulación génica postranscripcional | 45 |
| 2.5 | Biología y diversidad de ARNs pequeños en animales | 46 |
| 2.6 | Origen y función de miRs..... | 47 |
| 2.7 | Eficiencia regulatoria de miRs | 50 |
| 2.8 | Papel de los miRs en moluscos | 50 |
| 3. | Justificación | 52 |
| 4. | Hipótesis..... | 52 |
| 5. | Objetivos..... | 53 |
| 5.1 | General..... | 53 |
| 5.2 | Específicos | 53 |

| | |
|--|----|
| 6. Métodos | 53 |
| 6.1 Consumo de oxígeno | 53 |
| 6.2 Selección de muestras para secuenciación sRNA-seq | 54 |
| 6.3 Toma de muestra, extracción de ARN, preparación y secuenciación de bibliotecas de ARNs pequeños | 55 |
| 6.4 Evaluación de la calidad y limpieza de lecturas | 56 |
| 6.5 Curación y procesamiento de bases de datos | 57 |
| 6.5.1 Genoma de referencia | 57 |
| 6.5.2 Análisis de los loci que codifican ARNs pequeños | 58 |
| 6.5.3 miRs conocidos de referencia..... | 58 |
| 6.5.4 Anotaciones de elementos repetidos en el genoma del abulón rojo..... | 59 |
| 6.6 Ensemble, anotación y cuantificación de ARNs pequeños | 60 |
| 6.7 Predicción de la función regulatoria de miRs | 60 |
| 6.8 Análisis de expresión diferencial y co-expresión de ARNs pequeños..... | 61 |
| 7. Resultados..... | 63 |
| 7.2 Consumo de oxígeno | 63 |
| 7.3 Extracción de ARN y secuenciación de bibliotecas de ARNs pequeños..... | 65 |
| 7.4 Composición de las lecturas sRNA-seq..... | 66 |
| 7.5 Origen de los mapeos | 68 |
| 7.6 Ensamble, anotación y cuantificación de miRs..... | 69 |
| 7.7 Anotaciones de elementos repetidos en el genoma del abulón rojo | 71 |
| 7.8 Análisis de los loci que codifican miRs..... | 72 |
| 7.9 Predicción de la función regulatoria de miRs | 73 |
| 7.10 Análisis de expresión diferencial de miRs | 73 |
| 7.10.1 miRs sobre-expresados regulan procesos específicos en las 24 y 110 hpf..... | 75 |
| 7.10.2 Mirs en respuesta a la acidificación | 77 |
| 7.10.2.1 LET-7 fue omnisciente durante el desarrollo larvario, pero es sobre-expresado en respuesta a la acidificación a las 24 hpf | 80 |
| 7.10.2.2 MIR-133 regula la histogénesis a las 110 hpf, pero la retrasa mediante su sobreexpresión en respuesta a la acidificación desde las 24 hpf | 80 |
| 7.10.2.3 MIR-278 participa durante la transición pelágica-bentónica a las 110 hpf, pero se sobreexpresa desde las 24 hpf en respuesta a la acidificación. | 81 |
| 7.10.2.4 MIR-315 se sobreexpresa durante las 110 hpf y se co-expresa con varios mirs frente a la acidificación..... | 82 |
| 7.10.2.5 MIR-2 va disminuyendo su expresión hasta las 110 hpf, pero se mantiene sobre-expresado en condiciones de acidificación. | 83 |
| 7.10.2.6 BANTAM es un mir de la transición pelágica-bentónica..... | 84 |

| | |
|--|-----|
| 7.10.2.7 MIR-190 disminuye su expresión hasta las 110 hpf, pero se mantiene sobre-expresado en condiciones de acidificación regulando negativamente posibles vías de esqueletogenesis y crecimiento larvario. | 84 |
| 7.10.2.8 MIR-153 mantiene una sobre-expresión frente a la acidificación durante las 24 y 110 hpf..... | 85 |
| 7.10.2.9 MIR-2722 | 85 |
| 7.10.2.10 MIR-1988 | 85 |
| 7.10.3 miRs sub-expresados en respuesta a la acidificación..... | 86 |
| 7.10.4 miRs nuevos sobre-expresados en respuesta a la acidificación | 87 |
| 7.11 Módulos que co-regulan procesos del desarrollo y en respuesta a la acidificación..... | 87 |
| 8. Discusión | 90 |
| 9. Conclusión..... | 95 |
| Capítulo III. Conclusión general..... | 96 |
| Referencias Bibliográficas..... | 97 |
| Anexo 1. Análisis bioinformático | 115 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Proyección de la acidificación del océano superficial. | 2 |
| 2 | Ciclo del carbono. | 3 |
| 3 | Vías clave que contribuyen a la acidificación de los océanos. | 5 |
| 4 | Ocurrencia, acuicultura del género <i>Haliotis</i> y fluctuaciones de pH en el Pacífico Norte. | 7 |
| 5 | Ciclo de vida temprano del abulón. | 8 |
| 6 | Diseño experimental y del sistema de recirculación acuícola. | 16 |
| 7 | Evaluación morfológica de larvas anormales. | 18 |
| 8 | Medición morfológica del cuerpo larval del ancho y largo de larvas a las 30, 48, 60 y 108 horas post fertilización (hpf). | 19 |
| 9 | Ejemplo del análisis de birrefringencia. | 20 |
| 10 | Proporción de larvas que maduraron con éxito durante la historia de vida planctónica. | 25 |
| 11 | Deterioro de la maduración velígera. | 27 |
| 12 | Respuesta de calcificación y crecimiento específica de la etapa de desarrollo. | 28 |
| 13 | Distribución empírica acumulada (eje y) de los niveles de saturación predichos de CaCO_3 con respecto a los valores de aragonito (eje x) obtenidos durante el bioensayo con las siguientes condiciones de pH. | 31 |
| 14 | Éxito promedio del asentamiento (%) y error estándar de larvas de <i>Haliotis rufescens</i> cultivadas en largo plazo (crónico) y corto pH a corto plazo (agudo). | 32 |
| 15 | Micrografías electrónicas de barrido de post-larvas de abulón rojo <i>H. rufescens</i> criadas bajo condiciones óptimas y de acidificación a largo plazo durante 26 días. | 33 |
| 16 | Micrografías electrónicas de barrido de post-larva de abulón rojo <i>H. rufescens</i> criadas bajo condiciones óptimas y de acidificación a corto plazo. | 34 |
| 17 | Clasificación de ARNs. | 42 |
| 18 | Programa genético del desarrollo larvario del género <i>Haliotis</i> . | 44 |
| 19 | Biogénesis e identificación de miRs. | 49 |

| | | |
|----|--|----|
| 20 | Caso de estudio del perfil de miRs durante la historia temprana de vida de un molusco. | 51 |
| 21 | Diagrama de flujo del análisis bioinformático elaborado para el ensamblaje, anotación y cuantificación de ARNs pequeños, incluyendo microARNs. | 62 |
| 22 | Asignación de energía durante el desarrollo temprano de vida del abulón rojo <i>H. rufescens</i> . | 64 |
| 23 | Tasas de respiración durante el desarrollo larval del abulón rojo <i>H. rufescens</i> . | 65 |
| 24 | Distribución de lecturas de calidad obtenidas de la secuenciación de ARNs pequeños. | 67 |
| 25 | Identidad de las lecturas anotadas a algún miR en las bibliotecas de secuenciación. | 68 |
| 26 | Origen de los mapeos a lo largo del genoma del abulón rojo. | 69 |
| 27 | Sitios en el genoma del abulón rojo (eje y) que fueron fuente de miRs intergénicos e intragénicos. | 70 |
| 28 | Preferencia del primer nucleótido en el extremo 5' de las lecturas de calidad obtenidas de la secuenciación de ARNs pequeños. | 71 |
| 29 | Perfil de expresión de miRs entre grupo de muestras. | 74 |
| 30 | Contrastes de expresión diferencial para los miRs expresados en larvas de <i>H. rufescens</i> criadas en pH 8.0 y pH 7.6. | 75 |
| 31 | Radio de enriquecimiento de los procesos biológicos específicamente regulados por miRs sobre-expresados en alguna de las etapas a las 24 y 110 hpf | 76 |
| 32 | Radio de enriquecimiento de los procesos biológicos co-regulados por miRs sobre-expresados en alguna de las etapas a las 24 y 110 hpf. | 77 |
| 33 | miRs expresados diferencialmente en pH 8.0 y pH 7.6 durante las 24 y 110 hpf | 78 |
| 34 | Regulación negativa de procesos biológicos asociados a la interacción miR-gen de miRs expresados diferencialmente en respuesta a la acidificación. | 79 |
| 35 | Relación de módulos de co-expresión de miRs (eje y) y parámetros evaluados (eje x). | 89 |
| 36 | Red de co-expresión ponderada de miRs expresados durante el desarrollo larval del abulón rojo. | 89 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|--|---------------|
| 1 | Etapas críticas de la historia de vida temprana del abulón rojo. | 9 |
| 2 | Análisis químicos del agua. | 23 |
| 3 | Tamaño del efecto relativo (radio de respuesta) calculado para la historia temprana de vida de <i>H. rufescens</i> bajo diferentes condiciones de pH | 24 |
| 4 | Tasa de crecimiento específico derivado de la función de crecimiento Gompertz | 26 |
| 5 | Valores medidos de pH_{NBS} , y predichos de aragonita y pCO_2 disuelto. | 30 |
| 6 | Diversidad de clases de ARNs pequeños de interferencia reportados en organismos multicelulares | 47 |
| 7 | Tasas de respiración promedio. | 63 |
| 8 | Extracción de ARN y resultados de secuenciación | 66 |
| 9 | Loci del genoma del abulón rojo que codifican ARNs pequeños durante el desarrollo de vida temprana. Número de lecturas, y clústers en paréntesis. | 72 |
| 10 | Loci del genoma del abulón rojo que codifican miRs en respuesta a la acidificación o temporales del desarrollo de vida temprana. | 73 |

Capítulo I. El patrón de respuesta individual al estrés de acidificación inducido por CO₂ en *Haliotis rufescens* sugiere una aclimatación etapa-específica durante su historia de vida temprana

1. Resumen

El abulón rojo *Haliotis rufescens* es un recurso marino fundamental en el contexto de la acuicultura mundial del abulón. Sin embargo, la especie ha sido enlistada como una especie en peligro crítico, parcialmente por mortalidades masivas durante su historia de vida asociadas con cambios climáticos en su hábitat, incluyendo la acidificación oceánica a corto y largo plazo. Debido a que la supervivencia del abulón depende del éxito de su historia de vida temprana, descubrir su vulnerabilidad a la acidificación es el primer paso para establecer estrategias de manejo acuícola. En el presente estudio, embriones de abulón rojo fueron cultivados bajo acidificación inducida por CO₂ a largo plazo (pH 7.6 y 7.8) y se evaluó el desempeño larval. La prevalencia de deterioro se evaluó durante sus estadios larvarios, considerando el éxito de desarrollo ontogénico, crecimiento corporal y calcificación. El resultado en la alteración específica de la etapa sugiere que las capacidades corporales evaluadas están a expensas de sus etapas de desarrollo, cuyo umbral crítico se encuentra por debajo de -0.4 unidades de pH. Finalmente, el asentamiento fue estresado a corto plazo, mostrando lo contrario a lo observado en la acidificación a largo plazo. Por lo tanto, la historia de vida temprana interactúa a través de múltiples vías que también pueden depender del desafío de la acidificación (es decir, a corto o largo plazo). Comprender los límites de tolerancia y las vías de respuesta al estrés proporciona información valiosa para explorar la vulnerabilidad de *H. rufescens* a la acidificación de los océanos.

2. Introducción

2.1 Presente y futuro de la acidificación de los océanos

Los efectos humanos sobre el medio ambiente han alcanzado niveles lo suficientemente severos, no sólo para superar los cambios naturales sino para dar nombre propio al tiempo que vivimos: el Antropoceno (Ruddiman, 2013). El rápido crecimiento de la población y la quema de combustibles fósiles ha dado lugar a las emisiones de un gas de efecto invernadero: el

dióxido de carbono (CO₂), el cual representa uno de los más nocivos debido a su largo tiempo de residencia en la atmósfera. Desde el inicio de la revolución industrial, el océano ha absorbido aproximadamente más del 26% del CO₂ liberado a la atmósfera (Friedlingstein et al., 2019). En este contexto, la acidificación de los océanos (AO) se refiere a la disminución del pH oceánico debido a la absorción del CO₂ antropogénico dentro del océano (Zeebe et al., 2012). El Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC) sugiere que la presión parcial del CO₂ aumentará, de los valores actuales de 418.32 μatm a más de 855–1130 μatm para el año 2100 (Figura 1). Por lo que se espera que los cambios en la configuración química del océano durante el Antropoceno sean aproximadamente de tres a siete veces más grandes y 70 veces más rápidos que en otros periodos geológicos conocidos (Zeebe et al., 2012). Aunque la tierra ha experimentado varios periodos de cambios ambientales significativos, el ambiente planetario había permanecido, inusualmente, estable durante los últimos 10,000 años. Este periodo de estabilidad - conocido como holoceno - ha visto surgir, desarrollarse y prosperar la civilización humana (Rockström et al., 2009).

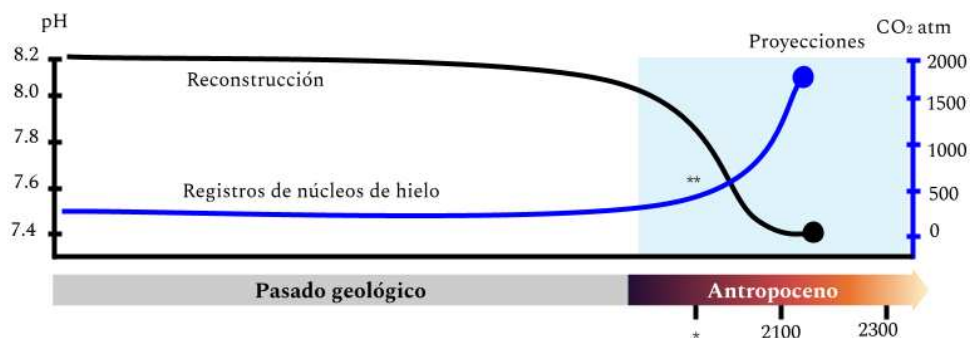


Figura 1. Proyección de la acidificación del océano superficial. Línea azul: Registros de núcleos de hielo que describen la concentración de CO₂ atmosférico en otros periodos geológicos previos al nuestro. Línea negra: La reconstrucción del pH en el pasado geológico corresponde a las entradas de carbono (3.500 pg - 5.000 pg C) durante los últimos 500 años. Doble asterisco (**indican el registro del incremento de CO₂ atmosférico y una disminución del pH en Mauna Loa, Hawai. Las proyecciones del pH de la superficie del océano (caja azul) durante el periodo del Antropoceno, es el resultado del modelado de pH para dichas entradas de carbono que abarcan el presente (*) y los años subsecuentes (Imagen editada de Zeebe et al, 2012).

2.2 Química del carbono, saturación y subsaturación de aragonita

El mineral carbonato de calcio (CaCO₃) es el mineral necesario para formar esqueletos y conchas por diversos organismos marinos, incluyendo moluscos (Feely et al., 2004; Barton et al., 2012; Cai et al., 2021). Las formas más comunes de CaCO₃ son las fases de aragonita y

calcita. Mientras que la estabilidad de la calcita depende del Mg disponible, la aragonita depende solamente de la concentración de los iones carbonato ($[CO_3^{-2}]$) y calcio ($[Ca^{2+}]$) disueltos en agua marina (Mucci, 1983). Mientras que el calcio - considerado un macroconstituyente - es relativamente constante en el océano con respecto a la salinidad, el carbonato oceánico disminuye a medida que aumenta el CO_2 (Figura 2, Waldbusser et al., 2014). La termodinámica de las reacciones entre el CO_2 y el agua de mar requiere que esta adición modifique el ciclo global del carbono en el océano a través del incremento la concentración de iones de hidrógeno ($[H^+]$) en el mar lo que representa una disminución, no sólo del pH sino de la concentraciones de iones carbonato - debido a un cambio en la dirección de las reacciones CO_3^{-2} y HCO_3^{-1} -- y, eventualmente, el estado de saturación del carbonato de calcio (Figura 2).

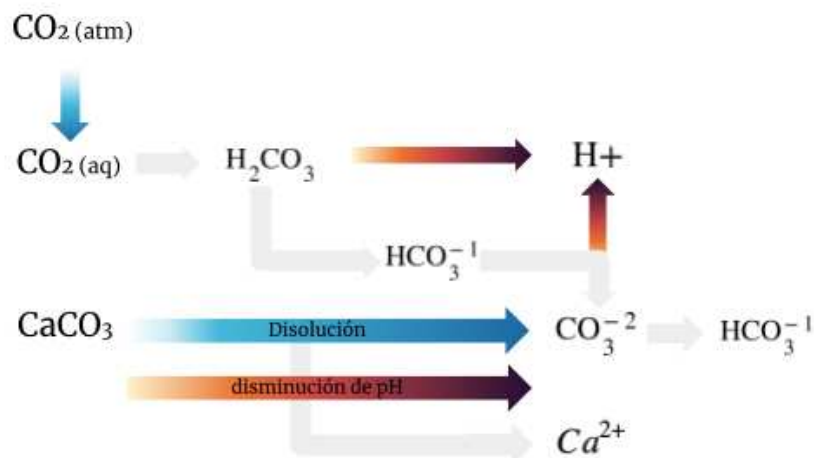


Figura 2. Ciclo del carbono. El dióxido de carbono (CO_2) disuelto en el océano se presenta principalmente en tres formas inorgánicas: CO_2 (aq), bicarbonato (HCO_3^{-1}), y carbonato (CO_3^{-2}). El CO_2 atmosférico (atm) al entrar en contacto con el agua oceánica (CO_2 acuoso, aq) forma ácido carbónico (H_2CO_3), bicarbonato (HCO_3^{-1}) y liberando protones (H^+). La liberación de protones actúa para incrementar la acidez resultando en una disminución del pH del agua marina y disolución del carbonato de calcio ($CaCO_3$).

La conversión energética del $CaCO_3$ es proporcional al estado de saturación (Ω), definido por:

$$\Omega = \frac{[CO_3^{-2}][Ca^{2+}]}{K_{sp,f}}$$

Donde K_{sp} es el producto de solubilidad en equilibrio aparente a una temperatura, salinidad y presión dadas para cada fase en particular (f) del mineral de CaCO_3 .

La precipitación de CaCO_3 es termodinámicamente posible para valores $\Omega_f > 1$. Lo anterior corresponde a una mayor favorabilidad energética para que ocurra la precipitación. Por otro lado, valores $\Omega_f < 1$ indica subsaturación con respecto al equilibrio termodinámico, resultando en una menor favorabilidad energética para que ocurra la formación de CaCO_3 , lo que corresponde a la disolución del mineral.

2.3 El océano costero

El océano costero es una región de transición de alta energía física y alta productividad biológica en la cual grandes cantidades de material suspendido y disuelto se transportan, transforman y almacenan (Swaney et al., 2011). Las costas oceánicas comprenden el 20% de la superficie de la tierra, además de dar mantenimiento al 45% de la población humana, aquí se origina el 90% de la pesca global y el 25% de la productividad biológica global. Aunque, la configuración química en las aguas del océano costero experimenta fluctuaciones de pH naturales diarias, estacionales o incluso a escala interanual que imitan las condiciones predichas de acidificación, los aportes de CO_2 antropogénico, gradualmente están teniendo el mismo efecto que en el océano abierto. Además de las interacciones atmósfera-océano, los sistemas costeros (ej. estuarios y sistemas de la plataforma continental) puede interactuar con flujos de carbono tanto lateralmente, desde los ecosistemas terrestres, como con el océano adyacente (Figura 3). Los sistemas costeros están sujetos a la acidificación de los océanos impulsada, no solo por el CO_2 atmosférico, sino por la acidificación costera causada por las interacciones entre la tierra - costa y el mar adyacente que pueden incluir procesos químicos, biológicos y físicos. Por ejemplo, los flujos de carbono (Cai et al., 2011; Sunda et al., 2012; Regnier et al., 2013) y las masas de agua con bajo pH y alto contenido de CO_2 (Feely et al., 2008), respectivamente. Debido a que la pesquería, acuicultura y otras actividades humanas prevalecen a lo largo de las costas, la medición del impacto ecológico de la AO en los sistemas costeros ha dado origen a la recopilación de datos oceanográficos en zonas costeras en distintas partes del mundo (Cai et al. 2021; Ishida et al., 2021) que complementen las mediciones biológicas, con el fin de cuantificar la capacidad de los organismos para aclimatarse o adaptarse a los cambios de las condiciones oceánicas y costeras (Saba et al., 2019).

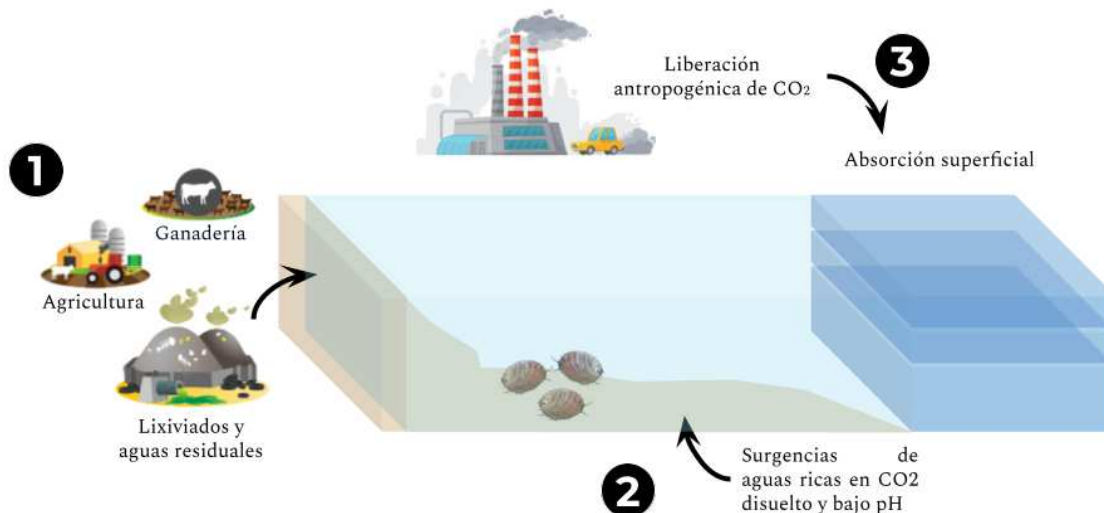


Figura 3. Vías clave que contribuyen a la acidificación de los océanos. Se describen algunos procesos y dinámicas clave en la química del carbono de un sistema costero que contribuyen a la acidificación costera. 1) Las interacciones tierra - océano incluyen diversos flujos de nutrientes como agua dulce rica en CO₂ (las precipitaciones controlan los flujos elevados), Carbono Orgánico Particulado (COP) y Disuelto (COD) y Carbono Inorgánico Particulado (CIP) y Disuelto (CID) se transportan a lo largo del continuo acuático. Otras interacciones incluyen entradas de aguas residuales y descargas de la agricultura y ganadería. Como resultado, la alta productividad y respiración debido a la eutrofización de los nutrientes conduce a una producción elevada de CO₂ y a la acidificación de aguas subsuperficiales y promueven la hipoxia del sistema costero. 2) las interacciones Océano - costa incluyen mezclas de agua de mar bien tamponada o surgencias de agua fría con alto contenido de CO₂ y bajo pH (aguas corrosivas). 3) Las interacciones atmósfera-océano. Imagen original de Cai et al. (2021).

2.4 El papel de la acuicultura frente al cambio climático

Debido al crecimiento de la población mundial, la acuicultura desempeña un papel significativo para sanear la brecha alimentaria de la producción agropecuaria mundial (World Bank, 2013). Los desafíos en el sector acuícola recaen en enfrentar los riesgos asociados del cambio climático en los recursos acuícolas (Costello et al., 2019). Evaluar la vulnerabilidad de los recursos marinos permite prever y mantener los objetivos acuícolas al margen de los retos ecológicos del cambio climático. Aunque el impacto en la biología de los recursos acuícolas pueden ser superados o disminuidos por la adición de otros estresores antropogénicos (por ejemplo, el calentamiento y desoxigenación), la acidificación oceánica puede caer dentro de los principales estresores del cambio climático porque muchos parámetros de carbono inorgánico están cambiando simultáneamente (Waldbusser et al., 2015; Hurd et al., 2020) de modo que, que

pueden contribuir al deterioro y pérdida de organismos marinos, sobre todo los calcificadores, debido al reto que representa la calcificación bajo condiciones de acidificación, como se explicó anteriormente. Se ha sugerido que la tasa de cambio proyectada en la química del CO₂ oceánico deja poco tiempo para que estos organismos desarrollen adaptaciones (Rockström et al., 2009).

2.5 El abulón rojo

Los abulones son gasterópodos marinos, pertenecientes a los Vetigastropodos, considerados entre el grupo más primitivo del filo molusco. Hay aproximadamente 100 especies de abulón descritas en todo el mundo y de ellas unas 25 son de interés comercial y se cultivan aproximadamente 16 especies. El cultivo del abulón se practica en muchas regiones costeras del mundo que incluyen a países como Japón, China, Taiwán, Estados Unidos, Chile, Australia, Nueva Zelanda, Tailandia, Corea, Francia, Irlanda y México (Leighton et al., 2008).

2.5.1 Hábitat, distribución y acuicultura

El abulón rojo *Haliotis rufescens* (Swainson, 1822), es un gasterópodo marino perteneciente a los Vestigasterópodos, se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico oriental de Norteamérica, entre México y Estados Unidos de América, desde Baja California hasta Oregón (Geiger y Owen 2012, Figura 4A). Se localizan en hábitats intermareales y sublitorales rocosos hasta profundidades de 65 m (Leighton et al., 2008) y habitan sobre sustratos donde se alimentan de la microflora bentónica durante las etapas tempranas de postlarva y juvenil; y de macroalgas cuando son adultos (Leighton, 2000). A lo largo de las costas del Pacífico de Norteamérica se han documentado episodios de surgencias de aguas corrosivas (i.e. masas de agua subsuperficial enriquecidas con CO₂, bajo pH y con subsaturación de aragonita que emerge a la superficie por acción de los vientos del noroeste; Feely et al., 2008). Se ha predicho que los eventos de acidificación en el sistema de corrientes de California irán al alza en las próximas décadas (Siedlecki, et al., 2021). Algunos perfiles de pH y CO₂ en columna de agua de las costas del Pacífico (Latitud 25 y 32) muestran que el abulón experimenta fluctuaciones estacionales de pH entre 7.6 y 8 unidades en los últimos años (Figura 4B; Jiang et al., 2020).

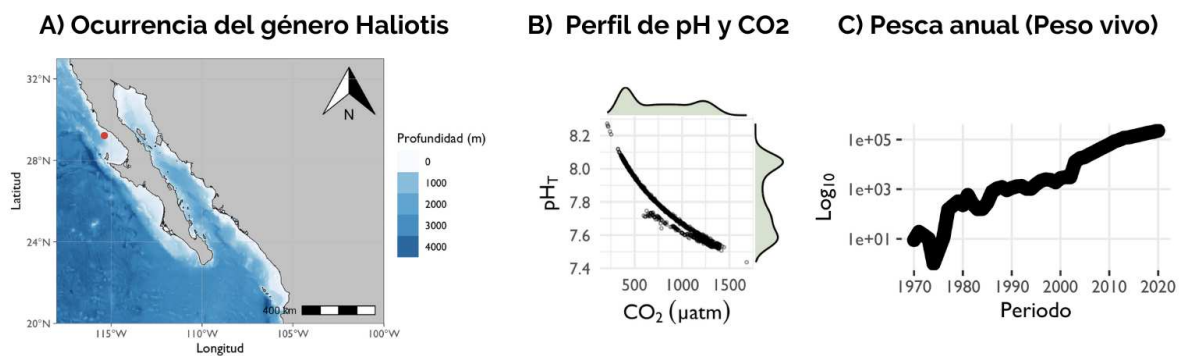


Figura 4. Ocurrencia, acuicultura del género *Haliotis* y fluctuaciones de pH en el Pacífico Norte.

Adquisición de datos: http://fao.org/fishery/static/Data/Aquaculture_2022.1.0.zip y <https://www.ncei.noaa.gov/data/oceans/ncei/ocads/metadata/0219960.html>.

Los gasterópodos marinos se encuentran dentro de las clases más relevantes de captura y cultivo en la acuicultura de moluscos (FAO, 2019). Actualmente, la pesca anual del abulón está resultando en 230 mil toneladas, lo que representa un aumento de 5 veces respecto a los años setenta o 2 veces más desde principios del presente siglo (Figura 4C). En México, el recurso abulón se posiciona en el lugar 49 de la producción pesquera total nacional (CONAPESCA, 2021). A pesar de lo anterior, en los últimos años, los volúmenes de producción de este recurso se han visto reducidos, debido a mortandades masivas asociadas a múltiples factores como enfermedades, cambios en la configuración química de su de hábitat (Rogers-Bennett et al., 2021) y pesca ilegal (Searcy-Bernal et al., 2010; SAGARPA, 2021). Recientemente, el abulón rojo se ha etiquetado como especie en peligro crítico, lo cual significa que las poblaciones naturales de esta especie es muy probable que se extinga en un futuro próximo, debido a la sobrepesca y mortalidades masivas asociadas a los efectos del cambio climático (Peters et al., 2022). Sin embargo, poco se ha estudiado sobre las causas de mortalidad en las poblaciones locales de abulón rojo.

2.5.2 Ciclo de vida

La historia de vida del abulón incluye un ciclo de vida larval bifásico indirecto con un período pelágico corto anterior a su estilo de vida bentónico (Nielsen, 2018). El ciclo de vida de las larvas comprende una fecundación externa del embrión y el inicio de la metamorfosis, en el que se encuentran diversas etapas de maduración hasta el reclutamiento donde las larvas planctónicas se asientan para continuar con el estilo de vida bentónico (Figura 5).



Figura 5. Ciclo de vida temprano del abulón. Este inicia con embriones fertilizados y considerando las 24, 30, 48, 60 y 108 horas posterior a la fertilización (hpf) y 26 días post fertilización (dpf).

A temperatura templada (16°C) el desarrollo larval de abulón rojo se completa entre los 5 a 7 días después de la fertilización, dando lugar a la metamorfosis y posterior desarrollo post-larval durante las tres a cuatro semanas después de la fertilización. Las primeras etapas de la historia de vida del abulón han sido asociadas al cuello de botella en la vida del abulón (Swezey et al., 2020). De las cuales destacamos las etapas transitorias de desarrollo entre los primeros días después de la fertilización, que incluye la eclosión, la maduración velígera para comenzar la larva competente a metamorfosearse con su asentamiento (Tabla 1).

2.6 Descripción detallada de las etapas tempranas de la historia de vida del abulón

El abulón es considerado dentro del subgrupo animal lofotrocozoos (*Lophotrochozoa sensu stricto*), ya que durante su historia de vida temprana ocurre una división espiral del embrión fecundado (superfilo spiralia), formación de mesentoblastos y una etapa larvaria trocoforal. Los lofotrocozoos incluyen a dos grupos importantes: Trochozoa, de los animales con larvas trocóforas como los moluscos; y Lophophorata, mayormente sésiles que presentan lofóforos (i.e. pequeños tentáculos).

2.6.1 Larvas trocóforas

Durante la embriogénesis, un primer cuerpo polar es formado instantes después de la fertilización. Seguido del segundo cuerpo polar formado adyacentemente al primer cuerpo. El siguiente estado notorio es la división a partir de la cual se forma el estado larval conocido como gástrula durante la cual se forman distintas bandas de cilios referidos como la cintura prototroncal así como unos racimos de cilios conocidos como cresta apical. La gástrula esporádicamente va a rotar dentro de la membrana del huevo. A medida que la cintura

prototroncal se hace más densa la rotación dentro del huevo incrementa. Este movimiento debilita la membrana y con la ayuda de los cilios apicales el huevo se rompe (eclosiona) y el embrión sale de la membrana dando lugar al estado larval trocóforo (Leighton et al., 2008). Durante la eclosión de los huevos, las larvas trocóforas nadan hacia la superficie de la columna de agua al tiempo que la secreción de la concha inicia. En esta fase la cintura prototroncal se convierte en una banda de natación muy ciliada llamada velo dando lugar a una serie de fases conocida como maduración velígera.

Tabla 1. Etapas críticas de la historia de vida temprana del abulón rojo. Se describen características distintivas de cada etapa y los parámetros evaluados durante esta tesis.

| Tiempo¹ | Etapa³ | Característica | Evaluación |
|---------------------------|--------------------------|---|---|
| 10 hpf | Trocófora embrionaria | Larva muestra la cintura prototroncal en formación | Inicio del bioensayo. Conteo inicial de embriones |
| 24 hpf | Trocófora eclosionada | Las larvas eclosionan, nadan y se congregan en la superficie de la columna de agua | Éxito del desarrollo y larvas con concha normal |
| 30 hpf | Véliger temprana | Inicia la formación del velo | Éxito del desarrollo, Crecimiento |
| 48 hpf | Véliger Media | Formación completa del velo. Aparición del músculo retractor y torsión de la masa céfalo-pedal. | Éxito del desarrollo, Crecimiento y Calcificación |
| 60 hpf | Véliger Madura | Concha está completamente formado, el músculo retractor está unido a la parte posterior del caparazón y el opérculo es distinto. | Éxito del desarrollo, Crecimiento y Calcificación |
| 108 hpf | Véliger competente | Los cilios se retienen de horas a días, y la natación puede ocurrir de manera intermitente. Las larvas comienzan a arrastrarse hasta el fondo del recipiente. | Éxito del desarrollo, Crecimiento y Calcificación |
| 26 dpf | Larva asentada (fijada) | Las larvas se asientan en el fondo del recipiente. La postlarva avanzada se forma días después. | Éxito del desarrollo y SEM ² |

¹Horas posteriores a la fertilización (hpf) o días post fertilización (dpf)

²Micrografía electrónica de barrido (SEM)

³Rasgos morfológicos utilizados para identificar las etapas de desarrollo evaluadas

2.6.2 Maduración velígera

Durante la maduración velígera la concha continúa desarrollándose hasta estar cerca del velo. Un músculo retractor larval se desarrolla entonces y también es formado un accesorio para la masa visceral hacia dentro de la concha. El músculo retractor va a permitir a la larva véliger retraerse dentro de la concha a medida que la larva se desarrolla y la concha incrementa de tamaño. Mientras la concha continúa desarrollándose en tamaño, el pie (o masa de pie) sobresale a través de la cavidad abierta de la concha seguido de la primera rotación de torsión de 90°. A partir de entonces, el proceso de torsión continúa de una manera más lenta, hasta completar una rotación de 180°. En esta etapa se han desarrollado una concha en espiral y un opérculo (Leighton et al., 2008). La masa céfalo-pedal rota entre la región del cuerpo cubierto por la concha de la larva y la cintura. La torsión es una adaptación de larvas de moluscos gasterópodos para moverse a la posición de la masa céfalo-pedal para ofrecer a la larva mayor protección de la concha y también mejorar la alimentación e higiene durante la vida adulta (Leighton et al., 2008). Después de la torsión, las larvas trocóforas se convierten en larvas véliger que nadan libremente, que son lecitotróficos y se vuelven competentes después de una etapa pelágica corta de aproximadamente 2 a 4 días. Al final de dicha fase, las larvas comienzan a desarrollar cilios en la planta del pie y se pueden observar los primeros signos de comportamiento de asentamiento. Después de 4-5 días (aunque mucho más en algunas especies) se establece la etapa de velo bentónico y se pueden ver larvas haciendo movimientos exploratorios de rastreo asociados con el asentamiento (Leighton et al., 2008).

2.6.3 Larvas competentes y su asentamiento

El asentamiento se define como el contacto con un sustrato que conduce a la metamorfosis de la forma pelágica a la béntica (Keough y Downes, 1982). El asentamiento es un evento crítico en la vida de muchos invertebrados marinos que implica un acoplamiento bentónico-pelágico que requiere el reconocimiento de un ambiente bentónico adecuado (es decir, sustrato) y la aceptación de esa superficie antes del inicio de la metamorfosis (Leighton, 2000). En el abulón rojo, el asentamiento ocurre después de la maduración velígera y durante los siguientes 25 a 30 días posteriores a la fertilización (dpf). Es durante esta etapa, que las postlarvas desarrollan un sistema digestivo e inmunitario, y empiezan a ingerir microflora bentónica.

2.6.4 Lecitotrofia y nutrición larval

Durante su desarrollo temprano, las larvas de abulón no requieren de una fuente externa de alimento debido a que no poseen un sistema digestivo que lo permita. Parte de la energía requerida para apoyar el metabolismo y el crecimiento durante las primeras etapas es cubierta por las reservas de lípidos contenidas dentro del saco vitelino. Este modo de nutrición se conoce como lecitotrofia (sin alimentación). Sin embargo, se sabe que las reservas energéticas no son suficientes para completar todo el estilo de vida pelágico y, por lo tanto, se ha comprobado que las larvas también capturan los nutrientes disueltos del agua para obtener energía que no es cubierta en su totalidad por las reservas lipídicas durante su desarrollo temprano (Manahan y Jaekel, 1992). Cuando las larvas realizan la metamorfosis, comienzan a alimentarse de la microflora béntica, la cual funciona como un inductor natural de la metamorfosis.

2.7 Biomineralización

La biomineralización es el proceso en el que iones inorgánicos disueltos en el agua marina se depositan ordenadamente en la concha de un organismo vivo bajo múltiples vías de cristalización que involucran la activación de maquinaria celular molecular. En la mayoría de los organismos calcificadores de vida bifásica, la biomineralización inicia en un sitio calcificador, usualmente denominado campo, sitio o glándula de concha, cuyo propósito es proporcionar el soporte necesario para la deposición del mineral calcificador (Eyster y Morse, 1984; Eyster, 1986). Mientras que la concha de moluscos adultos puede estar compuesta de diferentes tipos de carbonato biogénico, el carbonato depositado durante el desarrollo larval temprano es una combinación entre carbonato de calcio amorfo y aragonita (Weiss et al., 2002), incluyendo en el abulón (Jardillier et al., 2008). Adicionalmente, la deposición de carbonato de calcio en postlarvas y juveniles continúa siendo aragonita (Auzoux-Bordenave et al., 2010).

2.8 Impacto de la acidificación en el desempeño somático en larvas de abulón

Aunque la mayor parte de la investigación sobre el efecto de la acidificación oceánica se ha enfocado en evaluar la perturbación en la estructura de la concha y función de los tejidos en la vida adulta del abulón, esta tesis se enfoca en las etapas transitorias de vida pelágica ya que involucra cambios estructurales complejos (Gilbert 2005), lo cual, por supuesto, pueden o no estar sujetos a los desafíos de la acidificación oceánica. En relación a lo anterior, en múltiples moluscos marinos con concha, la etapa más sensible de la historia de vida a los efectos de la

acidificación oceánica parece ser la etapa larval. En la cual, la gran mayoría de los estudios las variables biológicas medidas revelan efectos negativos (Gazeau et al., 2013; Kroeker et al., 2013). En otras especies de abulón, donde una o múltiples etapas del desarrollo fueron periódicamente expuestas a aguas con alto contenido de CO₂ y bajo pH se ha demostrado un deterioro en su desempeño somático, incluyendo baja supervivencia, retraso en el desarrollo ontogénico, crecimiento disminuido, anomalías morfológicas y escasa calcificación (Byrne et al., 2010; Crim et al., 2011; Kimura et al., 2011; Guo et al., 2015; Onitsuka et al., 2018; Wessel et al., 2018; Auzoux-Bordenave et al., 2020; Kavousi et al., 2022).

2.9 Exposición a la acidificación a corto y largo plazo en larvas de abulón

Aunque se ha demostrado el efecto de la acidificación súbita (en adelante, “a corto plazo”, que involucra un lapso de tiempo de horas) sobre la vida de las larvas de abulón, no localizamos literatura publicada sobre el efecto en períodos prolongados de acidificación (en adelante “largo plazo”, implicando un lapso de tiempo de varios días) en larvas planctónicas ni la prevalencia del efecto a lo largo de su período pelágico. Recientemente, se han publicado resultados contradictorios de acuerdo al desempeño larval a la acidificación a largo plazo, que indican un efecto positivo y neutral de la acidificación (Swezey et al., 2020; Guo et al., 2022; Auzoux-Bordenave et al., 2022) sugiriendo que cada especie tiene una sensibilidad específica y que la vía de respuesta al estrés depende de si los retos de acidificación son a corto o largo plazo. Pero contribuyendo al entendimiento que las larvas planctónicas pueden ser resilientes de alguna manera a la acidificación.

3. Justificación

El cambio acelerado y la magnitud con la que la acidificación oceánica está ocurriendo no tiene precedentes. Las costas del pacífico - hábitat del abulón rojo - están experimentando en el presente eventos periódicos de acidificación. Se ha observado una disminución en las poblaciones naturales del abulón rojo en consecuencia a los cambios en la configuración oceánica de su hábitat. A pesar del estado actual de peligro crítico, la acuicultura de abulón juega un papel significativo en la producción agropecuaria nacional y mundial, por lo que determinar su sensibilidad a la acidificación es una tarea urgente. Entender la vulnerabilidad del abulón permitirá desarrollar estrategias de cultivo y conservación frente a los retos del cambio climático. Estudios del efecto de la acidificación oceánica en el desempeño biológico

de los organismos marinos sugieren que la acidificación tiene un mayor efecto negativo en las etapas tempranas de vida de moluscos calcificadores, incluyendo otras especies de abulón. Existe una brecha en nuestro conocimiento sobre el efecto de la acidificación en el desempeño larval del abulón rojo, debido a la poca atención que se ha puesto al estudio en su biología de desarrollo a largo plazo. El objetivo principal de la presente investigación es realizar un experimento de acidificación con enfoque holístico, considerando la evaluación del estrés por acidificación a largo plazo durante las etapas de vida críticas de *H. rufescens*, que incluyen la ontogenia trocófora, véliger temprana, media y madura. Y contrastar la respuesta al estrés bajo dos niveles de desafíos de acidificación y evalúa de qué forma la especie modifica su morfología, éxito de desarrollo, crecimiento y calcificación. Finalmente, evaluar la respuesta de estrés bajo acidificación a corto y largo plazo durante el asentamiento.

4. Hipótesis

- La acidificación afecta negativamente el desarrollo larval del abulón rojo *Haliotis rufescens*, comprometiendo su morfología y desarrollo ontológico.
- La sensibilidad del abulón *Haliotis rufescens* a la acidificación es específica a la etapa de desarrollo.
- El efecto de la acidificación en el desarrollo larval del abulón rojo depende del periodo de exposición a corto y largo plazo.

5. Objetivos

5.1 General

Determinar la respuesta morfológica y el desempeño del desarrollo durante las etapas tempranas de vida de la especie *Haliotis rufescens* bajo dos condiciones de acidificación.

5.2 Específicos

- Diseñar y estandarizar sistemas de acidificación mediante inyección de CO₂ para gestionar dos niveles de pH diferentes (7.6 y 7.8), así como el nivel óptimo de pH 8.0.
- Analizar los parámetros químicos del agua de carbono inorgánico disuelto, alcalinidad total, pH, salinidad y temperatura de los sistemas experimentales.
- Evaluar el desempeño del desarrollo larval de *Haliotis rufescens*, incluyendo la etapa los periodos de transición trocoforal, maduración velígera y asentamiento, bajo

condiciones de acidificación y en un entorno de crecimiento óptimo a través de las tasas de crecimiento específico, sobrevivencia, retrasos en el desarrollo larval del abulón rojo.

- Evaluar el desempeño del desarrollo larval de *Haliotis rufescens*, incluyendo la etapa los periodos de transición trocoforal, maduración velígera y asentamiento, bajo condiciones de acidificación y en un entorno de crecimiento óptimo a través de técnicas de microscopía electrónica de barrido y birrefringencia.

6. Métodos

6.1 Aclimatación y resumen del bioensayo

Un total de 1,726,667 huevos recién fertilizados de abulón rojo obtenidos de un desove masivo de 50 hembras y 20 machos, con 97% tasa de fertilización, fueron proporcionados por la empresa Abulones Cultivados S. de R.L. de C.V. (Ensenada Baja California, México; 31°17' 23.9" N -116° 24' 35.9" W). Estos fueron transportados en recipientes plástico sellados tipo Nalgene rodeados de bolsas de hielo en una hielera al Laboratorio de Genómica Aplicada e Inmunopatología Marina del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC) en Ensenada B.C, México en febrero del 2022. Una vez en el laboratorio, los huevos fertilizados fueron mantenidos en recipientes de plástico de 20 L con agua de mar filtrada (FSW) a temperatura ambiente por 8 h. Para evaluar el efecto de la acidificación en la eclosión de larvas trocóforas, los experimentos de acidificación (3 tratamientos: pH control (8.0), moderado (7.8), y bajo (7.6), respectivamente) fueron conducidos en bandejas de plástico con agua de mar filtrada de flujo abierto y corriente baja usando 574,000 embriones para cada tratamiento hasta su eclosión. Las evaluaciones de las etapas transitorias de la historia de vida temprana evaluadas durante el bioensayo se resumen en la figura 6A y la tabla 1.

6.2 Descripción del diseño experimental y sistema de acidificación por inyección de dióxido de carbono

El bioensayo consistió en evaluar las diferentes etapas del ciclo de vida temprana del abulón rojo bajo condiciones óptimas (Control) y dos posibles escenarios de cambio climático que imitan diferentes regímenes de pH, pCO₂ y aragonita (Riebesell et al., 2011). Para lograr el control del pH, se ensamblaron tres sistemas de recirculación acuícola (SRA, Figura 6B).

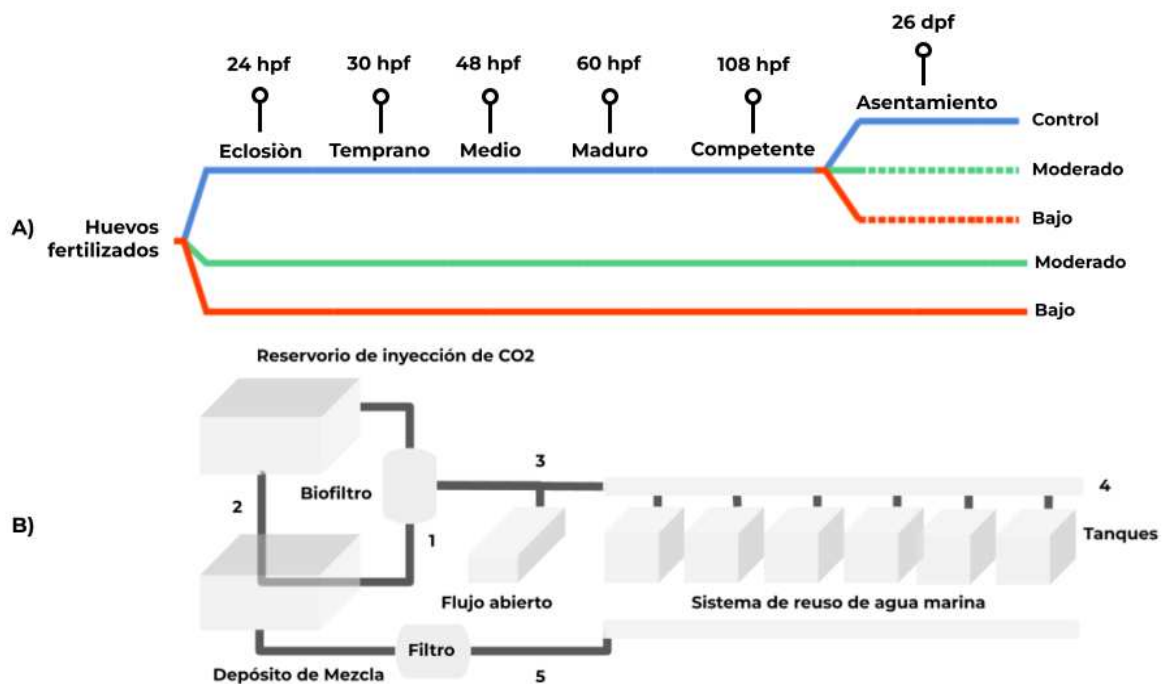


Figura 6. Diseño experimental y del sistema de recirculación acuícola. A) En el tratamiento control (línea azul), se utilizó FSW con pH en condiciones naturales (pH 8.0), mientras que el agua de mar con un pH moderado (7.8, línea verde) y bajo (7.6, línea roja) se acidificó con CO₂. Se evaluó el estrés por acidificación a largo plazo bajo dos niveles de pH durante las 24, 30, 48, 60 y 108 108 horas post-fertilización (hpf) a partir de huevos fertilizados (línea verde y roja continua). Después de las 108 hpf, nuevos cultivos de larvas bajo pH natural fueron ensayadas a pH moderado y bajo, para evaluar diferencias en el asentamiento debido al estrés de acidificación a corto y largo plazo hasta los 26 días post-fertilización (dpf, línea verde y roja punteadas). B) Sistema de inyección de CO₂ diseñado para la acidificación con desafíos de pH moderado (7.8) y bajo (7.6). Los SRA contribuyen a la estabilización de la calidad del agua al gestionar la eliminación de sólidos, la eliminación de subproductos del metabolismo (es decir, biofiltración), permiten el control sobre la transferencia de gases (es decir, pCO₂) y permiten mantener la temperatura del agua más estable). Los números indican la circulación del agua: (1) se bombea agua desde el depósito de mezcla al biofiltro y al depósito de inyección de CO₂; luego, (2) el agua mezclada con CO₂ regresa desde el depósito de inyección de CO₂ al depósito de mezcla (20 L min⁻¹). (3) Antes de eclosionar, los huevos se exponen a agua acidificada en un sistema de flujo abierto de corriente lenta (5 ml min⁻¹) mantenido al pH deseado. (4) La corriente de agua mezclada con CO₂ fluye a través de seis tanques de plástico acrílico transparente (30 mL min⁻¹, 28 x 11 x 10 cm), donde se colocan las larvas eclosionadas hasta finalizar el tratamiento. (5) En los tanques se incluyen deflectores y tamices adicionales con tamaños de malla de 100 a 150 μm para evitar que las larvas escapen cuando el agua reutilizada regresa al sistema de depósito de mezcla durante el experimento.

Este tipo de sistema acuícola puede contribuir a la estabilidad de la calidad del agua mediante el manejo de remoción de sólidos y la nitrificación de los productos nitrogenados (NAT y NO₂), productos del metabolismo y oxidación durante el desarrollo larval. Además, permitiendo el control sobre la temperatura y la transferencia de gases tal como el O₂ y CO₂. A excepción del bioensayo control (pH 8.0), los controladores independientes de pH (AquaMedic, Alemania) fueron utilizados para mantener el agua a el pH deseado (moderado: pH 7.8 y bajo: 7.6). Previamente al inicio de la etapa experimental, los controladores de pH fueron calibrados y configurados, utilizando reactivos establecidos por la Oficina Nacional de Estándares (NBS, por sus siglas en inglés). El CO₂ puro fue inyectado directamente a cada uno de los reservorios de agua de mar (100 L) mediante un difusor de cerámica con la finalidad de mantener el pH experimental del agua de mar en el tratamiento correspondiente de pH. El agua de mar usada durante los ensayos fue filtrada (Cartuchos de filtro de tamaño nominal de 1 µm) y esterilizada mediante rayos UV manteniendo una velocidad de flujo de 100 mL min⁻¹ dentro de cada una de las unidades experimentales. Durante el tiempo que duró el bioensayo se realizaron dos lavados completos de los sistemas y se volvieron a llenar con agua FSW y de acuerdo con los tratamientos experimentales; esto se realizó para asegurar la calidad del agua marina con respecto a algún probable contaminante no controlado. La temperatura del FSW fue constante a lo largo de los ensayos registrando un valor promedio de 16 ± 0.6 °C (promedio ± error estándar), y se controló ajustando el aire acondicionado del laboratorio a 16°C.

6.3 Análisis químicos del agua

Con el objetivo de evaluar los parámetros de la química del agua durante los bioensayos, muestras discretas de agua marina fueron tomadas de los tanques experimentales (n = 6 réplicas por tratamiento). Para las muestras discretas en el laboratorio, el Carbono Inorgánico Disuelto (CID) fue cuantificado usando el método colorimétrico descrito por Johnson et al. (1987). La alcalinidad total (AT) se midió mediante titulación de celda abierta siguiendo el procedimiento operativo estándar para la determinación de la alcalinidad total en agua de mar mediante titulación de celda abierta (SOP 3b) descrito por Dickson et al. (2007), y usando un sistema automático de alcalinidad total (Modelo P-TA, PONTUS, México; <http://www.pontusbaja.com>). Material de referencia certificado (A. Dickson, Scripps, UCSD) fue usado para las mediciones tanto de CID como de AT. La precisión obtenida para los materiales de referencia para CID y AT fue ± 3 µmol kg⁻¹. La salinidad fue determinada en el

laboratorio usando el salinómetro YSI3200 (± 0.1 ; YSI, OH, USA). Los valores de pH *in situ* (Escala total de protones), concentraciones de carbonato [CO_3^{2-}], pCO_2 , y saturación de aragonita (Ω_{ara}) fueron derivados de las mediciones de CID y AT usando el programa computacional CO2SYS (Lewis et al., 1998) con las constantes de disociación de Mehrbach et al. (1973), constantes de sulfato de Dickson (1990), y constantes de borato de Uppström (1974). El pH fue medido continuamente durante el bioensayo usando un conjunto de sensores inmersos en los tanques experimentales. Aquí, la pendiente de pH de las soluciones amortiguadoras NBS (pH 4 y 7) se calculó varias veces durante el experimento para gestionar la calibración del sensor (% Offset: 98 ± 0.007 , promedio \pm error estándar). Las fluctuaciones en los niveles de saturación con respecto a la aragonita fueron derivados a partir de los registros de pH medidos en los tanques experimentales (coeficiente de correlación de Spearman $R = 0.57$, $p = 0.01$).

6.4 Evaluación morfológica y desempeño del desarrollo

6.4.1 Éxito de la eclosión

Las larvas trocóforas fueron gentilmente sifonadas desde la parte superior cada una de las unidades experimentales de flujo abierto a partir de las 24 horas después de la fertilización (hpf), tamizados a través de una malla de 200 y 100 μm con FSW, y posteriormente fueron colocadas en recipientes separados correspondientes a cada pH experimental. El éxito de la eclosión fue evaluado a partir de alícuotas de 1 mL ($n = 6$) obtenida de las bandejas de flujo abierto, fijadas con formol (2 gotas mL^{-1}) y almacenadas a temperatura ambiente. Las larvas eclosionadas fueron colocadas en los tanques de reúso de agua marina ($n = 6$, Figura 6B) bajo las condiciones experimentales usando una densidad de 12 larvas eclosionadas mL^{-1} para continuar con el bioensayo durante el desarrollo larval subsecuente. Las alícuotas fueron contadas bajo el microscopio (4X) usando una cámara de conteo de Sedgewick rafter para estimar el número de larvas eclosionadas. El volumen total de los contenedores individuales (V_1) se divide entre el tamaño del volumen tomado de la muestra tomando (V_2) y es multiplicado por el número de larvas contadas al microscopio (N), de acuerdo con la fórmula:

$$X = N(V_1/V_2); \quad (1)$$

donde X es el número total de larvas en el contenedor; N es el número de larvas contadas en la muestra; V_1 es el total del volumen del contenedor; y V_2 es el volumen de la muestra. El número total de larvas fue dividido por los 574 mil embriones usados al inicio del bioensayo para

calcular el éxito de la eclosión. Después de la eclosión, las larvas trocóforas y véliger tempranas fueron observadas y evaluadas clasificando uno de los siguientes posibles grupos morfológicos: larvas con concha normal, concha anormal y sin concha, respectivamente (Figura 7; Wessel et al., 2018).

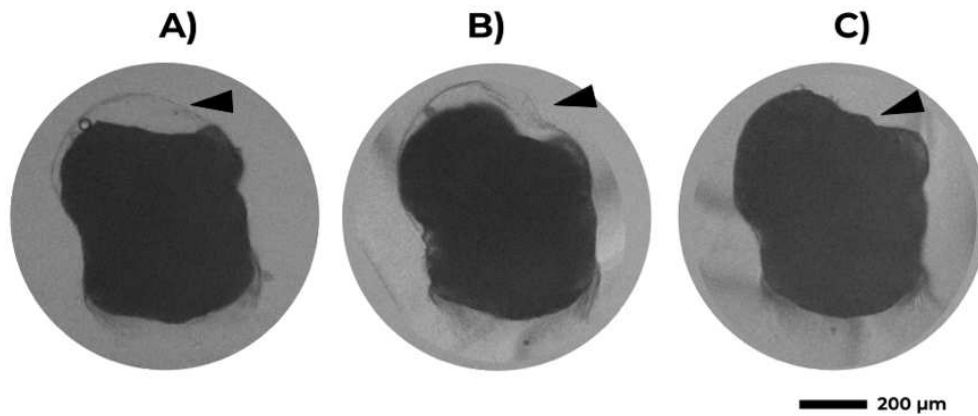


Figura 7. Evaluación morfológica de larvas anormales. Después de las 24 hpf, la concha aparece por primera vez como una cúpula o tapa en el extremo posterior del cuerpo larvario (punta de flecha negra). Los individuos fueron calificados como uno de los posibles grupos morfológicos: A) Con concha normal, B) con concha anormal, y C) sin concha.

6.4.2 Éxito de la maduración velígera

Una fracción de larvas de abulón fueron gentilmente sifonadas después de las 30, 48, 60 y 108 hpf para evaluar el desempeño de la maduración velígera. Las muestras fueron fijadas con formol (2 gotas mL^{-1}) y almacenadas a temperatura ambiente, seguido de una serie de deshidrataciones con etanol usando lavados de las siguientes concentraciones: 0, 75, y 90% de etanol. Las larvas véliger suspendidas al 90% de etanol fueron almacenadas para subsecuentes evaluaciones microscópicas, que incluyen la birrefringencia y análisis morfométricos. De acuerdo con Leighton (1972), entre 500 a 1,000 larvas por repetición ($n = 6$) fueron clasificadas como exitosamente maduras si presentan las características generales de cada etapa en el tiempo que las muestras fueron tomadas después de las 30, 48 y 60 hpf (Tabla 1). Para las 108 hpf el éxito de la competencia fue estimado como se describe en la siguiente sección.

6.4.3 Análisis morfométrico

El crecimiento larval fue evaluado usando un análisis morfométrico de la comparación del tamaño usando los parámetros de largo y ancho entre especímenes. Aquí, el programa Motic Image Plus v3.019 (Motic China Group) fue configurado de acuerdo con las especificaciones

para las mediciones a escala 10X. Un conjunto de 50 individuos por tratamiento fue evaluado para calcular el largo y ancho del cuerpo durante las 30, 48, 60 y 108 hpf. En larvas a 30 hpf, el punto de referencia de la medición se realizó horizontalmente a lo largo de la banda ciliar prototroncal y verticalmente desde el penacho apical anterior hacia la cabeza de las larvas (Figura 8; Wessel et al., 2018). Por otro lado, las evaluaciones durante las 48, 60 y 108 hpf se consideró el largo y ancho máximo del cuerpo de la larva (Figura 8B; Noisette et al., 2014). Debido a la colinealidad, los parámetros morfométricos fueron combinados como la raíz cuadrada del producto del largo por ancho y usados para estimar un índice de crecimiento larval (Figura 11, Wessel et al., 2018). Dado que a menudo se ha informado que el crecimiento del abulón aumenta la función lineal como sigmoidea (Shepard et al., 1972), se evaluó un análisis de crecimiento por etapa ajustando la morfometría corporal observada durante el tiempo de la maduración velígera a la función de crecimiento de Gompertz: $ae^{-be^{-cx}}$. Aquí, los coeficientes del modelo fueron usados para calcular una tasa específica de crecimiento.

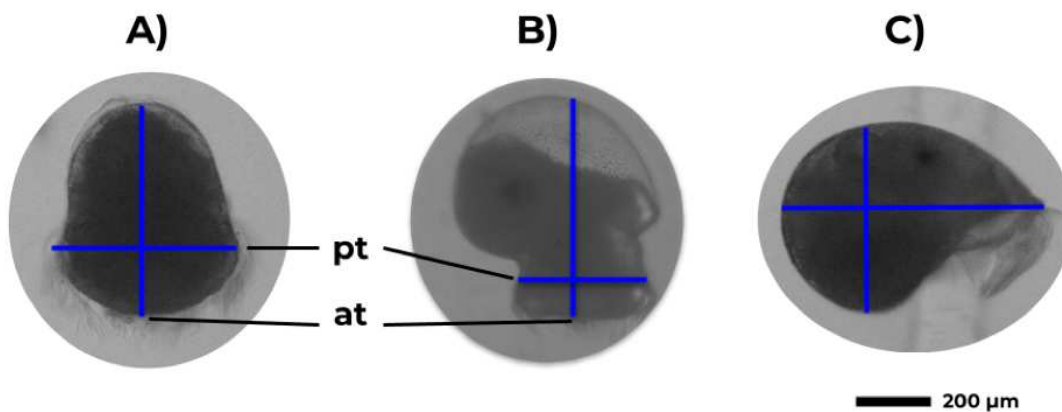


Figura 8. Medición morfológica del cuerpo larval del ancho y largo de larvas a las 30, 48, 60 y 108 horas post fertilización (hpf). La presencia de larvas observada a 30 hpf incluye larvas con características morfológicas relacionadas con la etapa trocófora (A) y la etapa velíger temprana (B). Aquí, la medición se realizó horizontalmente a lo largo de la banda ciliar prototroncal (pt) y verticalmente desde el penacho apical anterior (at) hacia la zona superior de las larvas. (C) Las mediciones posteriores a 48, 60 y 108 hpf consideraron la longitud y el ancho máximos de la concha.

6.4.4 Birrefringencia

La calcificación durante la maduración velígera fue obtenida usando un filtro de luz polarizada montado en un microscopio de campo claro (Olympus BH-2, Alemania). Se interpreta que las larvas que exhiben birrefringencia están cubiertas por una capa mineralizada (Figura 9; Weiss et al., 2002). Esta técnica ha sido útil para medir el desempeño de la calcificación bajo

experimentos de acidificación durante el desarrollo temprano en otros moluscos planctónicos (Kurihara et al., 2007). Antes de la adquisición de imágenes, las larvas fueron montadas permanentemente con glicerol. Después de ello, una cámara de 64 px (Samsung Electronics, South Korea) fue usada para adquirir las imágenes birrefringentes usando la configuración manual para lograr un equilibrio de luz igual entre las imágenes. Antes de la cuantificación de píxeles, las imágenes fueron pre-procesadas añadiendo una máscara binaria y entonces trazando el área de birrefringencia usando el programa Fiji v 2.3.0/1.53q (Schindelin et al., 2012). Entre 20 a 50 individuos por tratamiento fueron observados después de 48, 60 y 108 hpf. Las muestras de 30 hpf fueron excluidas del análisis de birrefringencia debido a la insuficiencia de CaCO_3 cristalizado (Wessel et al., 2018).

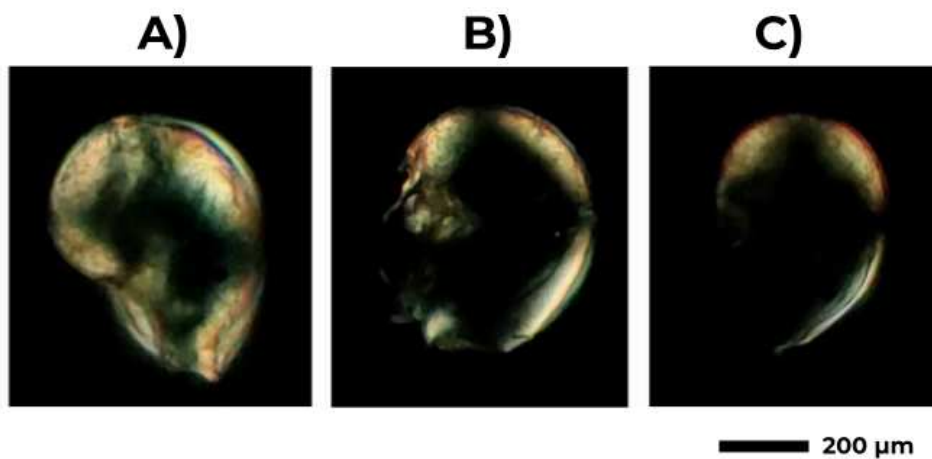


Figura 9. Ejemplo del análisis de birrefringencia. Este se realizó para larvas de abulón rojo mantenidas bajo los tratamientos de acidificación. A) pH 8.0, B) pH 7.8 (B) y C) pH 7.6.

6.4.5 Éxito de la competencia

La maduración velígera completa ocurrió durante las 108 hpf. La ramificación de los tentáculos cefálicos observada y la proporción de larvas que se arrastraban en busca del sustrato fueron los criterios para determinar larvas competentes para asentarse (Leighton, 2000). Para estimar el éxito de la competencia (%), alícuotas de 1 mL de ($n = 6$) fueron tomadas y las larvas fueron contadas bajo el microscopio (4X) usando una cámara de conteo celular Sedgewick Rafter. El número total de larvas competentes a las 108 hpf fue dividido entre los 574 mil embriones usados al inicio de los bioensayos. Las larvas competentes restantes se cultivaron bajo acidificación acumulativa hasta el final de la historia de vida pelágica (ocurrida a los 26 días de

edad después de la fertilización, dpf) y se evaluó el éxito del asentamiento y la estructura de la concha.

6.4.6 Éxito del asentamiento: Acidificación a corto y largo plazo

Con respecto a la cuestión del tiempo de exposición a los desafíos de acidificación, se crió un nuevo lote de larvas pre-asentadas a pH moderado (7.8) y bajo (7.6), para evaluar cualquier diferencia en el asentamiento debido al desafío de la acidificación a corto y largo plazo (Figura 6A). Para las especies lecitotróficas, como el abulón, el asentamiento está definido como el contacto con un sustrato que conduce a la metamorfosis de la forma pelágica-bentónica (Keough et al., 1982). Aquí, los tanques de nuevos sistemas de reutilización de agua marina ($n = 3$) se cubrieron con diatomeas bentónicas *Navicula incerta* como fuente de sustrato y factor inductor de asentamiento natural. Entonces, una densidad de 5 210 larvas competentes fue distribuida equitativamente por unidad experimental. Para estimar el éxito del asentamiento (%), el número absoluto de larvas reclutadas a los 26 dpf es dividido por el número inicial de 5, 210 larvas competentes.

6.4.7 Microscopía electrónica de barrido

Diez larvas del asentamiento fueron seleccionadas al azar de cada tratamiento del diseño a largo plazo ($n= 3$) y corto plazo ($n = 3$); y fueron fijadas con formol y deshidratadas sucesivamente con etanol usando enjuagues de las siguientes concentraciones: 50 %, 75 % y, finalmente, 90 % de etanol y se recubrieron con oro para examinar la estructura dorsal de la concha usando microscopía electrónica de barrido SU-3500 Hitachi (High Tech Corporation, Japan).

6.5 Análisis estadísticos

La recolección, transformación, organizacional y visualización de datos y análisis estadísticos fueron elaborados en el lenguaje de R versión 4.0.3 (R Core Team, 2020). Se realizaron pruebas de Shapiro y Levene's para evaluar normalidad y homogeneidad de varianzas, respectivamente (Shapiro et al., 1965). Para lograr una comparación entre tratamientos con respecto al éxito de la eclosión, la competencia y el asentamiento, se utilizaron como pruebas iniciales con un ANOVA paramétrico unidireccional y un ANOVA de Welch seguido de una prueba *post-hoc* de comparaciones múltiples T-student usando el ajuste de Bonferroni de los valores p (p adj) como estrategia de significancia estadística. Se utilizaron pruebas binomiales para datos

nominales y pruebas de Kruskal y Wilcoxon como pruebas no paramétricas. El paquete de R Candisc (Friendly et al., 2021) fue implementado para un análisis de correlación canónica entre los tratamientos y la variación morfométrica individual durante la maduración velígera. Para las figuras, los puntos de corte de los valores p adj fueron: $< 1e^{-04}$ (****), < 0.001 (***), < 0.01 (**), < 0.05 (*), and > 0.05 (ns). De acuerdo a Hedges et al. (1999), se calculó un tamaño relativo del efecto (radio de respuesta) utilizando la fórmula:

$$\mathbf{LnRR} = \mathbf{Ln(X_T)} - \mathbf{Ln(X_C)}; \quad (2)$$

donde X_T y X_C son los valores promedio transformados a su logaritmo natural entre las evaluaciones biológicas en el tratamiento experimental y su respectivo control (Hedges et al., 1999). Aquí, un radio de respuesta de cero indica un efecto nulo, mientras que una respuesta de 1 y -1 indican un efecto positivo o negativo, respectivamente. Para resumir los datos cuantitativos, el promedio y el error estándar (E.E.) se muestran como promedio \pm E.E. en algunos resultados.

7. Resultados

7.1 Control del pH y química de agua

Durante los bioensayos, el pH_{NBS} medido en el tratamiento moderado y bajo disminuyó -0.2 y -0.4 unidades, respectivamente en contraste al control lo cual correlaciona con el decremento en el estado de saturación de aragonita (Ω_{ara}) en ambas condiciones experimentales de acidificación. El análisis de la química del agua resultó en el mantenimiento de diferentes regímenes en el agua marina que imitan dos escenarios diferentes de acidificación oceánica ($p_{adj} < 0.0001$, Tabla 2).

Tabla 2. Análisis químicos del agua. Mediciones promedio \pm desviación estándar (Promedio \pm DS) de pH, Carbono Inorgánico disuelto (CID, $\mu\text{mol/kg}$), Alcalinidad Total (AT, $\mu\text{mol/kg}$) y valores calculados de concentración de carbonatos (CO_3 , $\mu\text{mol/kg}$), saturación de aragonita (Ω_{ara}) y presión parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$, μatm) obtenidos en los sistemas experimentales ($n = 6$).

| Ensayo | Medido | | | Calculado (CO2Sys) | | |
|----------|------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| | pH | CID $\mu\text{mol/kg}$ | AT $\mu\text{mol/kg}$ | CO_3 $\mu\text{mol/kg}$ | Ω_{ara} | $p\text{CO}_2$ μatm |
| Control | 8.07 ± 0.029 | 2043 ± 33 | 2187 ± 60 | 111 ± 24.8 | 1.69 ± 0.376 | 591 ± 131 |
| Moderado | 7.74 ± 0.004 | 2057 ± 98 | 2175 ± 66 | 101 ± 65 | 1.3 ± 1 | 897 ± 563 |
| Bajo | 7.62 ± 0.122 | 1972 ± 202 | 2051 ± 158 | 75.2 ± 32.2 | 1.14 ± 0.489 | 987 ± 510 |

7.2 Éxito del desarrollo larval

7.2.1 Éxito de la eclosión y larvas con concha normal

El éxito de la eclosión en el bioensayo control resultó en un promedio \pm error estándar (E.E) de $42 \pm 7.5\%$. En contraste, el porcentaje de eclosión disminuyó a medida que el estrés de la acidificación se incrementó a 37 ± 11.3 en el pH moderado y 16 ± 2.6 en el pH bajo. Aquí, se encontró el efecto de acidificación negativo más alto durante todo el bioensayo en el tratamiento de pH bajo, lo que resultó en un radio LnRR de -0.98 (Tabla 3).

Tabla 3. Tamaño del efecto relativo (radio de respuesta) calculado para la historia temprana de vida de *H. rufescens* bajo diferentes condiciones de pH. Un radio de respuesta de cero indica ningún efecto, mientras que una respuesta de 1 y -1 indica un efecto positivo o negativo, respectivamente. Si la evaluación de contrastes múltiples fue significativa, los puntos de corte de los valores P ajustado se muestran en paréntesis: $< 1 \times 10^{-4}$ (****), < 0.001 (***), < 0.01 (**), y < 0.05 (*).

| Tiempo¹ | Evaluación | Moderado | Bajo |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------|--------------|
| 24 hpf | Éxito de la eclosión | -0.13 | -0.98 (**) |
| | Larvas con concha normal | -0.35 | -0.69 (*) |
| 30 hpf | Índices de crecimiento | 0.07 (*) | 0.12 (***) |
| | Maduración velígera | 0.03 | -0.1 (*) |
| 48 hpf | Índices de crecimiento | 0 | -0.02 (***) |
| | Calcificación | 0.12 (***) | 0.04 |
| | Maduración velígera | -0.15 | -0.33 (*) |
| 60 hpf | Índices de crecimiento | -0.02 (*) | -0.04 (****) |
| | Calcificación | 0.16 (*) | -0.03 |
| | Maduración velígera | -0.11 | -0.05 |
| 108 hpf | Índices de crecimiento | 0 | -0.05 (****) |
| | Calcificación | -0.56 (****) | -0.36 (***) |
| | Supervivencia | -0.26 | -0.33 (*) |
| 26 dpf | Asentamiento (Estrés agudo) | -0.52 (**) | -0.78 (**) |
| | Asentamiento (Estrés crónico) | -0.13 | -0.04 |

¹Horas post-fertilización (hpf) o días post-fertilización (DPF).

La prueba estadística *a priori* muestra que existen diferencias significativas en el éxito de la eclosión entre los tratamientos ($p < 0.05$). Sin embargo, la comparación de contrastes múltiples posterior (Prueba T-Student) resultó sólo en una diferencia significativa ($p \text{ adj} < 0.005$) entre el éxito de la eclosión del reto de pH bajo cuando se comparó con el control (Figura 10A). Asimismo, la proporción de larvas con concha normal resultó en una disminución significativa ($p < 0.01$) sólo en las larvas criadas en el tratamiento de pH bajo (Figura 10B), lo que resultó en un LnRR negativo de -0.69 (Tabla 3).

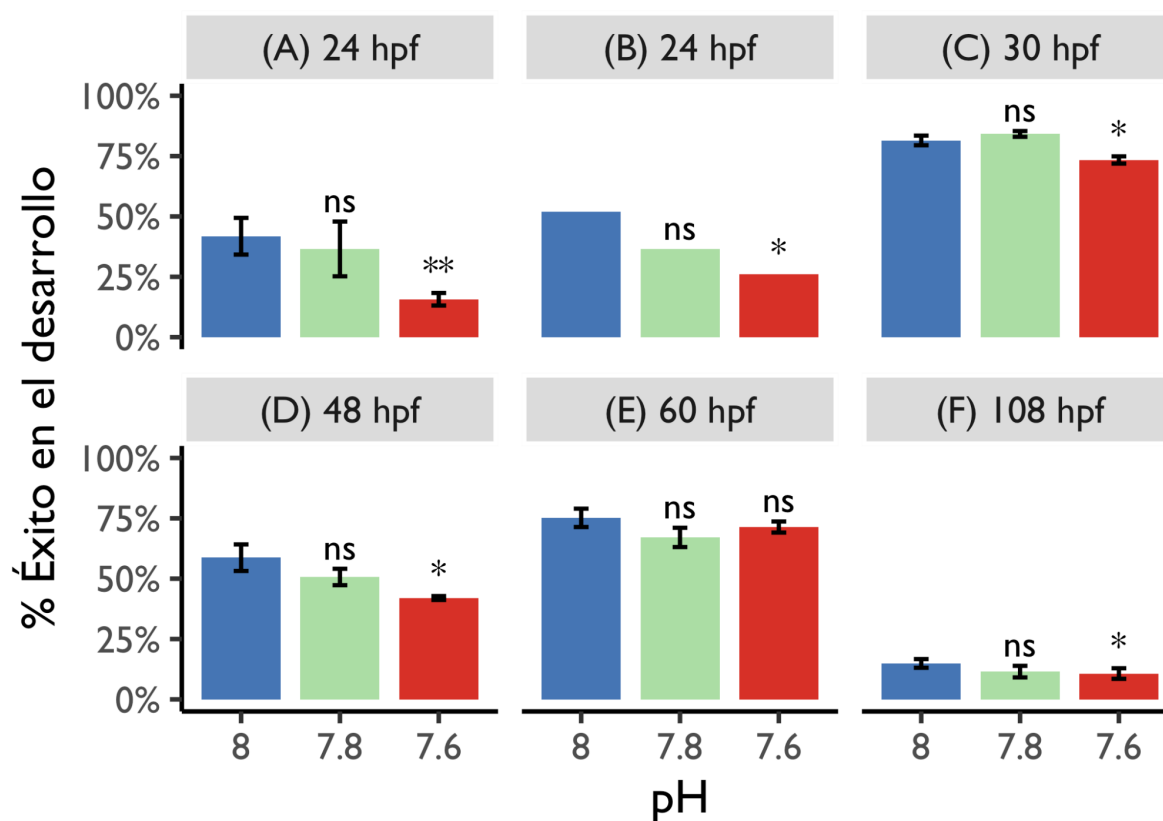


Figura 10. Proporción de larvas que maduraron con éxito durante la historia de vida planctónica. Promedio de éxito en el desarrollo y error estándar (eje y) de larvas de *Haliotis rufescens* cultivadas en diferentes condiciones de pH (eje x, control [pH 8.0, barra azul], moderado [pH 7.8, barra verde] y bajo [pH 7.6, barra roja]) después de 24, 30, 48, 60 y 108 hpf. El éxito de la eclosión y las larvas con concha normal se evaluaron a las 24 hpf (A, B). La proporción de éxito de las larvas véliger maduras se puntuó en 30, 48 y 60 hpf (C, D, E) y la maduración completamente véliger a las 108 hpf por el éxito de la competencia (F). Se realizó una comparación de contrastes múltiples para evaluar las diferencias de tratamiento utilizando el control como grupo de referencia. Se muestran los puntos de corte ajustables de p : < 0.01 (**), < 0.05 (*) y > 0.05 (ns).

7.2.2 Deterioro de la maduración velígera

La proporción de larvas clasificadas como exitosamente maduras durante las 30, 48 y 60 hpf fueron disminuidos en ambos tratamientos de pH moderado y bajo (Figura 10C, D, E), aunque solo en el tratamiento de pH bajo se encontraron diferencias significativas a las 30 y 48 hpf, lo cual resultó en radios LnRR alrededor de -0.1 y -0.33, respectivamente (Tabla 3). Sin embargo, el análisis de crecimiento por etapa dio como resultado una tasa de específica deficiente en larvas criadas bajo pH moderado y bajo (Tabla 4).

Tabla 4. Tasa de crecimiento específico derivado de la función de crecimiento Gompertz: $ae^{-be^{-cx}}$

| | Control | Moderado | Bajo |
|---|----------------|-----------------|-------------|
| Coefficiente a | 241.844 | 238.716 | 236.933 |
| Coefficiente b | 0.726 | 0.516 | 0.288 |
| Coefficiente c | 0.031 | 0.030 | 0.017 |
| Tasa de crecimiento específico (a*c) | 7.532 | 7.258 | 4.040 |
| Fase de latencia (b-1/c) | -8.791 | -15.902 | -41.763 |
| R cuadrado | 0.977 | 0.974 | 0.988 |
| R cuadrado (ajustado) | 0.977 | 0.973 | 0.988 |
| BIC¹ | 1188.685 | 1218.553 | 831.867 |

¹Medida de verosimilitud, Criterio de información bayesiana (BIC)

Aquí, los datos de crecimiento agrupados medidos durante las 30, 48, 60 y 108 hpf se ajustaron a la función de Gompertz ($R^2: 0.975$, $p = 0$), lo que sugiere que la reducción del crecimiento durante la maduración velígera refleja el retraso en el desarrollo observado en las larvas criadas a pH moderado y bajo. De hecho, a las 30 hpf, el índice de crecimiento promedio de las larvas criadas a pH moderado y bajo fue significativamente mayor que el control, que $193.86 \pm 1,1$, 185.06 ± 3 y 171.36 ± 3.4 , respectivamente. Sin embargo, a medida que las larvas maduraban para comenzar su asentamiento, el crecimiento promedio se ralentizaba debido al estrés por pH (Figura 11A). Por otro lado, los datos de la calcificación indicaron otro patrón de respuesta durante la maduración velígera. La birrefringencia promedio (píxeles) fue inusual del crecimiento en los tratamientos durante 48 y 60 hpf, pero disminuyó significativamente como el índice de crecimiento en comparación con el control durante 108 hpf (Figura 11B).

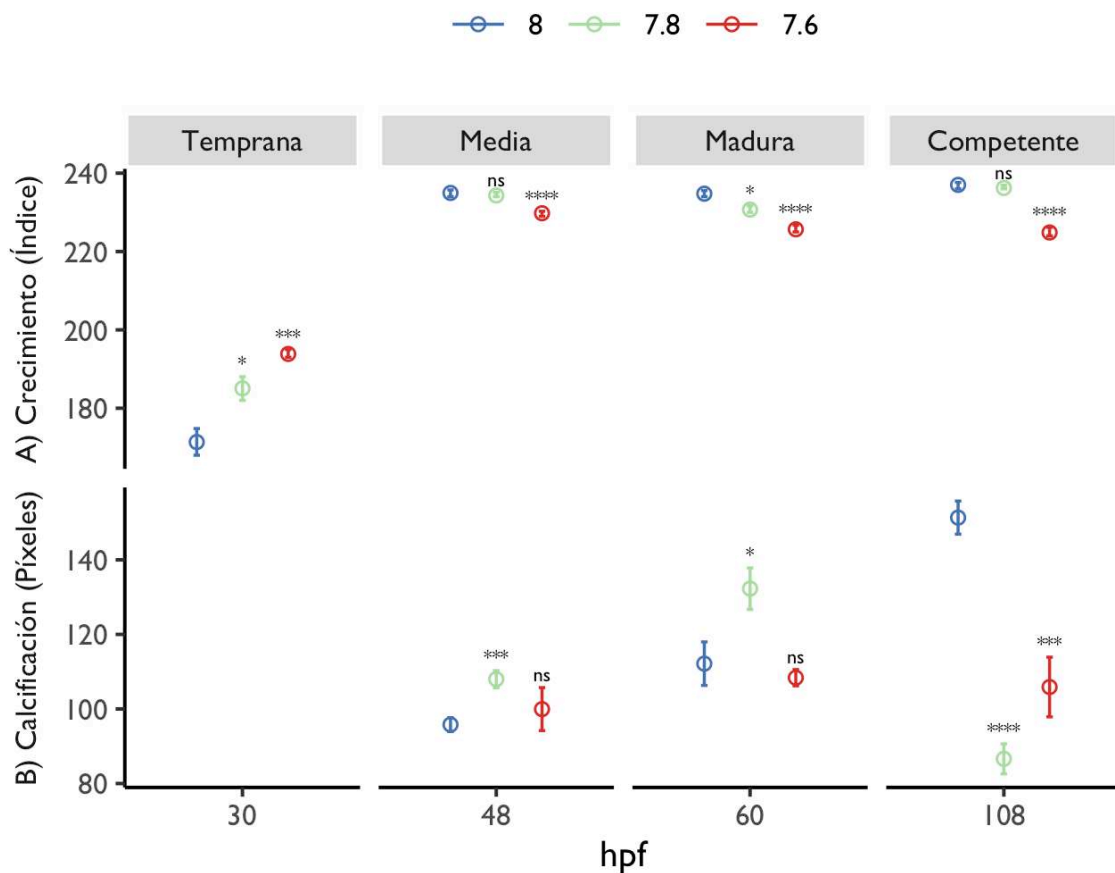


Figura 11. Deterioro de la maduración velígera. Promedio y error estándar (eje y) del índice de crecimiento corporal (A) y calcificación (B) de larvas de *Haliotis rufescens* cultivadas en diferentes condiciones de pH acumulativo: control (pH 8.0, puntos azules), moderado (pH 7.8, puntos verdes) y bajo (pH 7.6, puntos rojos) durante su desarrollo a las 30, 48, 60 y 108 horas post fertilización (hpf, eje x). La anotación superior indica las etapas transitorias de la maduración velígera según la Tabla 1. Se realizó una comparación de contraste múltiple para evaluar las diferencias de tratamiento utilizando el control como grupo de referencia. Se muestran los puntos de corte ajustables de $p: <1 \times 10^{-4}$ (****), <0.001 (***) , <0.05 (*) y >0.05 (ns).

El análisis discriminador canónico basado en las mediciones realizadas durante la maduración véliger muestra que a las 30 hpf las medidas morfométricas de los tratamientos de pH moderado y bajo están estrechamente relacionados, lo que sugiere que las larvas tienen un crecimiento similar en respuesta a cualquiera de los niveles de pH evaluados (Figura 12A). Sin embargo, a las 48 hpf, las larvas del pH moderado se agrupan junto al control, indicando que las larvas tienen un crecimiento similar mientras que la calcificación permaneció relacionada al pH bajo (Figura 12B). Finalmente, durante las 60 y 108 hpf, la morfometría de las larvas de pH

moderado y bajo se esparció y separó del grupo control, lo que sugiere que las larvas poseen un crecimiento y calcificación que no se observaron en las mantenidas a pH de control (Figura 12C, D).

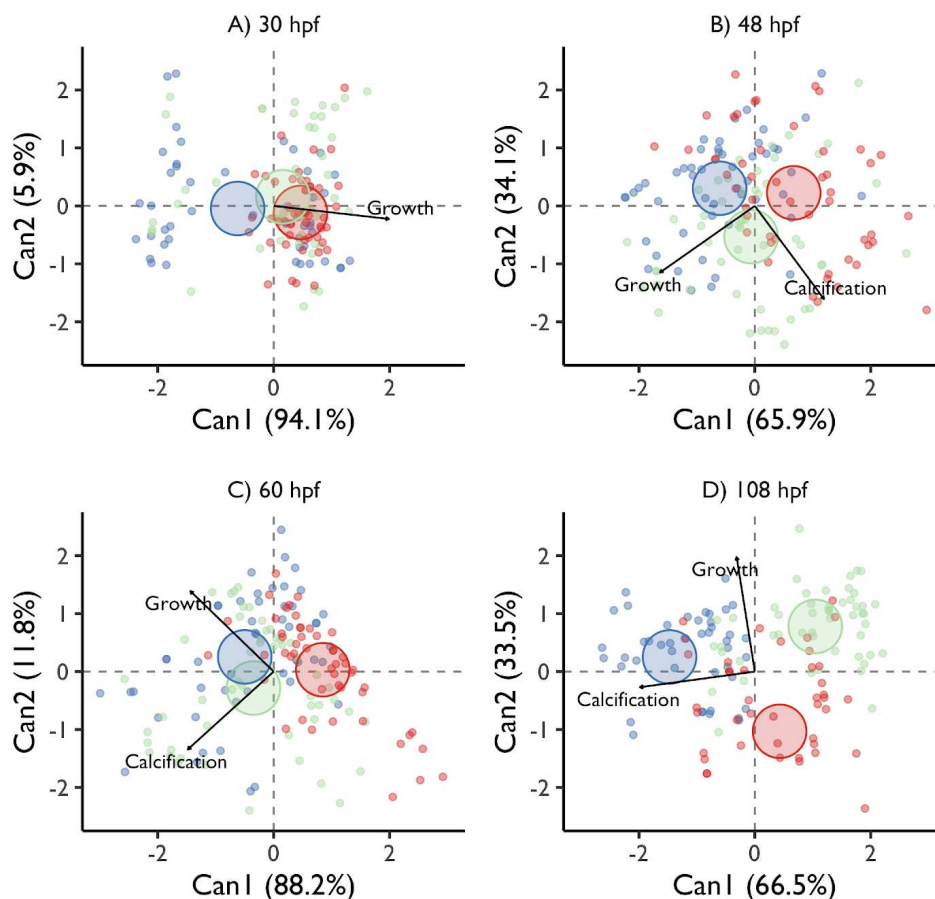


Figura 12. Respuesta de calcificación y crecimiento específica de la etapa de desarrollo. Análisis discriminatorio canónico basado en las evaluaciones de maduración de véliger realizadas para larvas de *Haliotis rufescens* cultivadas en diferentes condiciones de pH acumulativo: control (pH 8.0, puntos azules y elipse), moderada (pH 7.8, puntos verdes y elipse) y baja (pH 7.6, puntos rojos y elipse). La primera (Can1) y la segunda (Can2) dimensiones explicativas están entre paréntesis. Las flechas indican la relación de las métricas medidas con las dimensiones canónicas y las elipses muestran las medias del grupo en las dimensiones canónicas. El tamaño relativo de las elipses indica heterogeneidad de varianza.

7.2.3 Éxito de la competencia

El éxito de la competencia en el bioensayo control resultó en un valor promedio \pm error estándar de 15 ± 2 %, mientras que el éxito en la competencia fue de aproximadamente 11 ± 2 % en ambas larvas criadas en escenarios de acidificación acumulada moderada y baja. Aquí, el valor

LnRR resultó en radios negativos de -0.26 y -0.33, respectivamente (Tabla 3). La comparación de contrastes múltiples posterior (Prueba T-Student) resultó solamente en una diferencia significativa ($p_{adj} < 0.05$) entre el pH bajo cuando se contrastó contra su control (Figura 10F). Durante la maduración velígera, el pH_{NBS} *in situ* (promedio \pm DS) osciló entre 7.6 ± 0.066 y 7.4 ± 0.104 en los retos de pH moderado y bajo, respectivamente, lo cual también representa una diferencia de 0.2 unidades en pH (Tabla 5). Aquí, los valores predichos mostraron valores de Ω_{ara} periódicos por debajo de 1.0, lo que significa que el agua marina estaba subsaturada de aragonita y era corrosiva con respecto a la calcificación (Figura 13B), y un promedio \pm desviación estándar de pCO_2 (μatm) de 1004 ± 115 y 1229 ± 170 que superan el doble del tratamiento control (582 ± 9) y la concentración normal en el océano actual, respectivamente (Tabla 5).

7.2.4 Éxito del asentamiento y microscopía electrónica de barrido

Con respecto al efecto sobre las postlarvas a los períodos prolongados de acidificación, las larvas asentadas a los 26 dpf, mostraron respuestas morfológicas en el deterioro de la concha pero que no afectaron su éxito de asentamiento debido al estrés crónico de la acidificación. De manera similar a los éxitos de competencia (Figura 10F), las disminuciones en el asentamiento también fueron ligeras en comparación con los éxitos de asentamiento promedio del control en el desafío de acidificación a largo plazo, resultando en un valor promedio \pm error estándar de $49 \pm 2.8 \%$, $43 \pm 4.3 \%$ y $47 \pm 1.8 \%$ para el control, pH moderado y bajo, respectivamente y radios LnRR de -0.13 y -0.04 para el pH moderado y bajo (Tabla 3). A pesar del efecto de acidificación negativo, no se encontró un efecto de asentamiento significativo entre los tratamientos del estrés de acidificación crónico (Figura 14A).

Tabla 5. Valores medidos de pH_{NBS} , y predichos de aragonita y pCO_2 disuelto.

| Ensayo | Parámetro | Etapa | Promedio \pm DS | N registros |
|---------------|-----------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|
| Bajo | pH | Embrionaria | 7.5 ± 0.053 | 28 |
| Moderado | pH | Embrionaria | 7.7 ± 0.022 | 29 |
| Bajo | pH | Maduración velígera | 7.4 ± 0.104 | 90 |
| Moderado | pH | Maduración velígera | 7.6 ± 0.066 | 90 |
| Bajo | pH | Asentamiento | 7.7 ± 0.094 | 558 |
| Moderado | pH | Asentamiento | 7.8 ± 0.094 | 550 |
| Control | pH | Asentamiento | 8.1 ± 0.035 | 308 |
| Moderado | Ω_{ara} | Embrionaria | 1.32 ± 0.108 | 29 |
| Control | Ω_{ara} | Embrionaria | 1.71 ± 0.022 | 29 |
| Bajo | Ω_{ara} | Maduración velígera | 1.12 ± 0.088 | 78 |
| Moderado | Ω_{ara} | Maduración velígera | 1.05 ± 9.525 | 90 |
| Control | Ω_{ara} | Maduración velígera | 1.71 ± 0.019 | 90 |
| Bajo | Ω_{ara} | Asentamiento | 1.35 ± 46.439 | 537 |
| Moderado | Ω_{ara} | Asentamiento | 1.63 ± 0.233 | 543 |
| Control | Ω_{ara} | Asentamiento | 1.72 ± 0.038 | 368 |
| Bajo | pCO_2 | Embrionaria | 930 ± 68.79 | 28 |
| Moderado | pCO_2 | Embrionaria | 1020 ± 59.24 | 29 |
| Control | pCO_2 | Embrionaria | 581 ± 5.38 | 29 |
| Bajo | pCO_2 | Maduración velígera | 1004 ± 115 | 78 |
| Moderado | pCO_2 | Maduración velígera | 1229 ± 171 | 90 |
| Control | pCO_2 | Maduración velígera | 582 ± 9 | 90 |
| Bajo | pCO_2 | Asentamiento | 778 ± 92.69 | 537 |
| Moderado | pCO_2 | Asentamiento | 787 ± 233.02 | 543 |
| Control | pCO_2 | Asentamiento | 580 ± 19.23 | 370 |

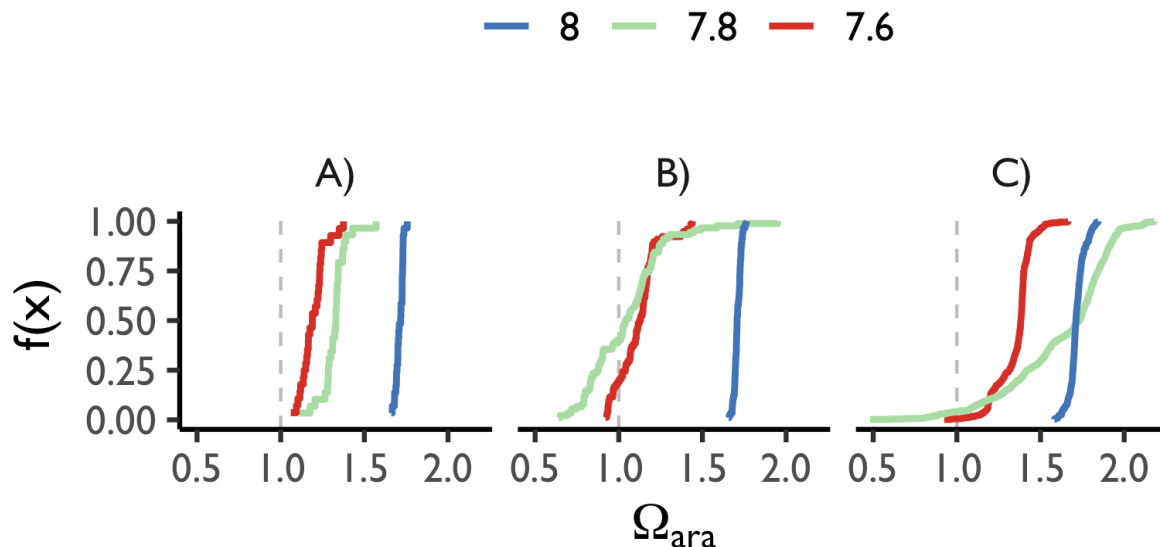


Figura 13. Distribución empírica acumulada (eje y) de los niveles de saturación predichos de CaCO_3 con respecto a los valores de aragonita (eje x) obtenidos durante el bioensayo con las siguientes condiciones de pH: control (pH 8.0, línea azul), moderado (pH 7.8, línea verde) y bajo (pH 7.6, línea roja). (A) Antes de la eclosión, (B) durante la maduración del veliger y (C) al momento del asentamiento (consulte la leyenda de color superior para el tratamiento de acidificación). Los valores de Ω_{ara} por debajo de 1.0 (línea de puntos vertical en gris) representan un nivel de subsaturación, lo que significa que el agua fue corrosiva. Durante la maduración y el asentamiento de las larvas véliger competentes, la mitad y menos de una cuarta parte de los valores de Ω_{ara} estaban por debajo de este umbral para los desafíos de pH que imitan los escenarios de acidificación de los océanos previstos en el futuro cercano (tendencias acumulativas verdes y rojas). Los índices de rendimiento del modelo fueron AIC: 26,073, BIC: 31,029, R^2 (adj.): 0,232, RMSE: 0,362 y Sigma: 0,467. El modelo se validó utilizando la función `check_model` en la versión 0.7.2 del paquete R “performance” (Lüdecke et al., 2021).

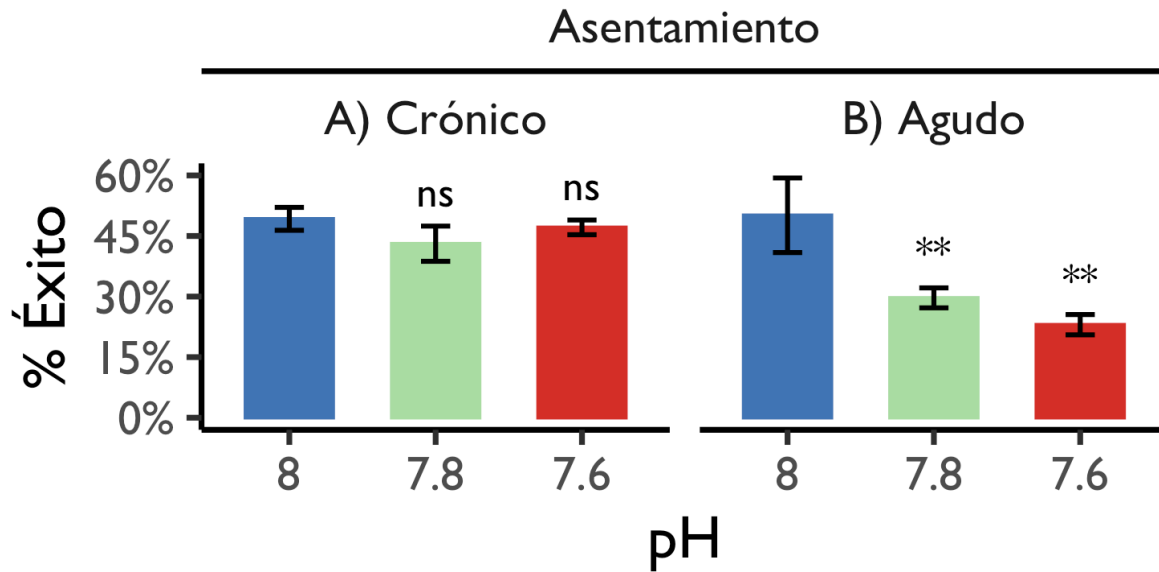


Figura 14. Éxito promedio del asentamiento (%) y error estándar de larvas de *Haliotis rufescens* cultivadas en largo plazo (crónico) y corto pH a corto plazo (agudo). Las 3 diferentes condiciones de pH mostradas corresponden a: control (pH 8.0, barra azul), moderado (pH 7.8, barra verde) y bajo (pH 7.6, barra roja). Se realizó una comparación de contrastes múltiples para evaluar las diferencias de tratamiento. Se muestran los puntos de corte de los valores p ajustados: <0.01 (**) y >0.05 . El desempeño del asentamiento depende del estrés por acidificación a corto y largo plazo.

Las larvas asentadas criadas a pH 8.0 mostraron conchas peristomales típicas en forma de oreja (Figura 15A). Además, la protoconcha mostró una superficie de textura granular suavizada y un patrón alveolar normal (Figura 15D). Sin embargo, las micrografías de las larvas asentadas criadas en niveles de pH moderados y bajos mostraron irregularidades y defectos de mineralización a lo largo de la superficie de la concha (Figura 15B, C), lo que puede ser evidencia de corrosión de la concha. Aquí, la corrosión de la protoconcha aumenta visiblemente a medida que el pH disminuye a 7.8 y 7.6, respectivamente (Figura 15E, F).

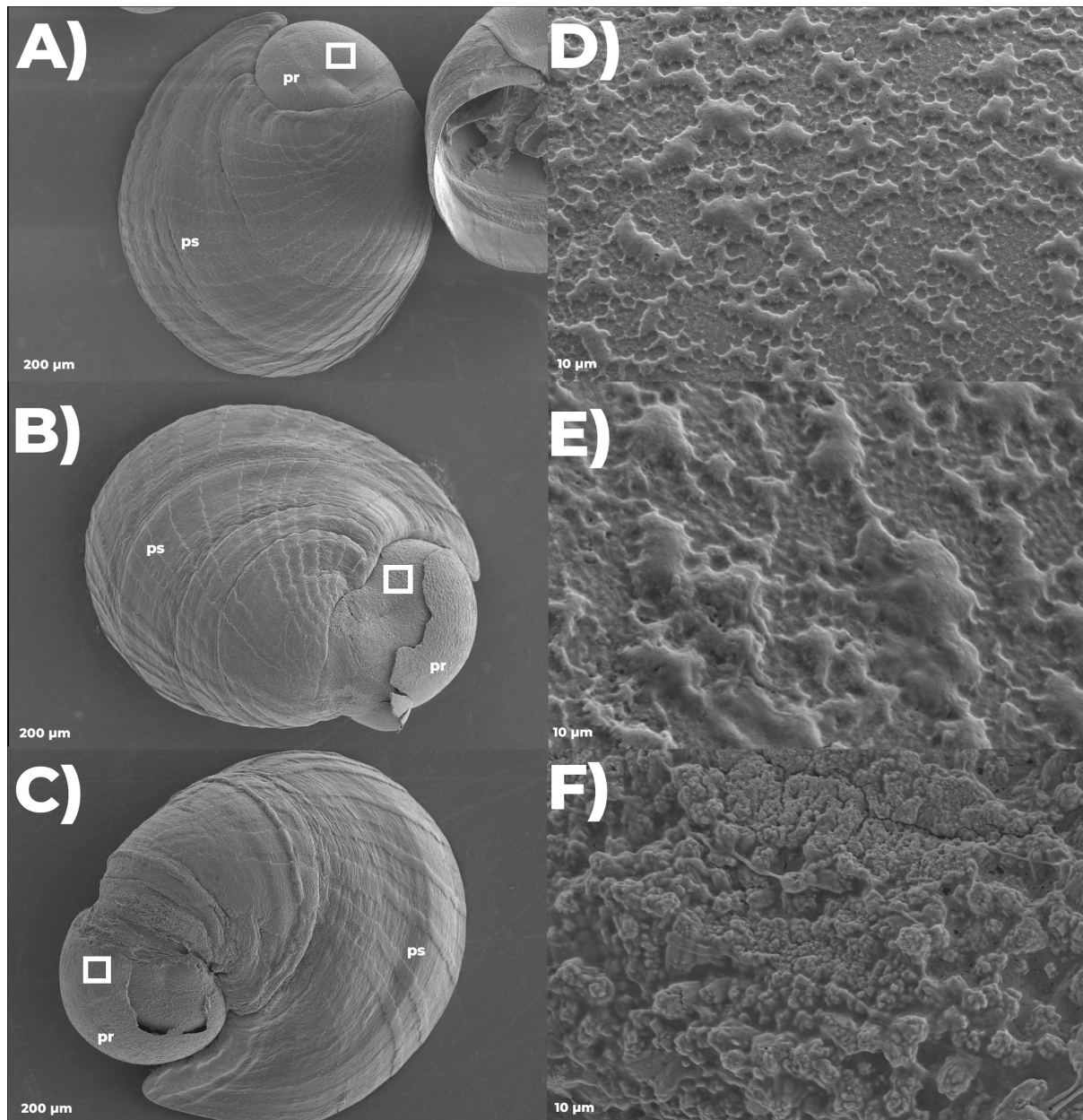


Figura 15. Micrografías electrónicas de barrido de post-larvas de abulón rojo *H. rufescens* criadas bajo condiciones óptimas y de acidificación a largo plazo durante 26 días. Imagen dorsal (200 - 400 μm) de larva de 26 días de edad después de la fertilización mostrando una concha peristomal típica en forma de oreja (ps). El pH control (A), moderado (B, 7.8) y bajo (C, 7.6) son mostrados. Larva asentada criada bajo acidificación a largo plazo (pH moderado y bajo) exponen microfracturas (B, C) no observadas en larvas criadas en control (A). La sección laminar (10 μm) de la protoconcha (pr, cajas blancas, A-C) se observa en el panel derecho (D-F). Concha normal textura granular y patrón alveolar es observado en el tratamiento control (D). En contraste, textura granular abnormal es observada en larvas criadas bajo pH acumulado moderado y bajo (E, F).

Por otro lado, las larvas expuestas repentinamente a la acidificación durante su asentamiento no mostraron deterioro de la concha, aunque el éxito del asentamiento se vio severamente afectado (Figura 14B). Durante los escenarios de acidificación a corto plazo, el éxito de asentamiento disminuyó significativamente en función de los desafíos de acidificación en 50 ± 9.2 , $30 \pm 2.4\%$ y $23 \pm 2.5\%$ en el control, pH moderado y bajo, respectivamente (Figura 14B), lo que representan una disminución de casi el doble del éxito de asentamiento observado en el tratamiento de acidificación a largo plazo. El análisis estadístico inicial mostró diferencias entre los valores de asentamiento en los tratamientos de estrés agudo ($p < .05$), y la comparación de contrastes múltiples posterior (Prueba T-Student) resultó en una diferencia significativa ($p \text{ adj} < 0.005$) entre el éxito de asentamiento en ambos escenarios de pH moderado y bajo al contrastar con el control. Los valores LnRR para el asentamiento bajo acidificación de corto plazo resultaron en -0.52 y -0.78 , en el pH moderado y bajo, respectivamente (Tabla 3).

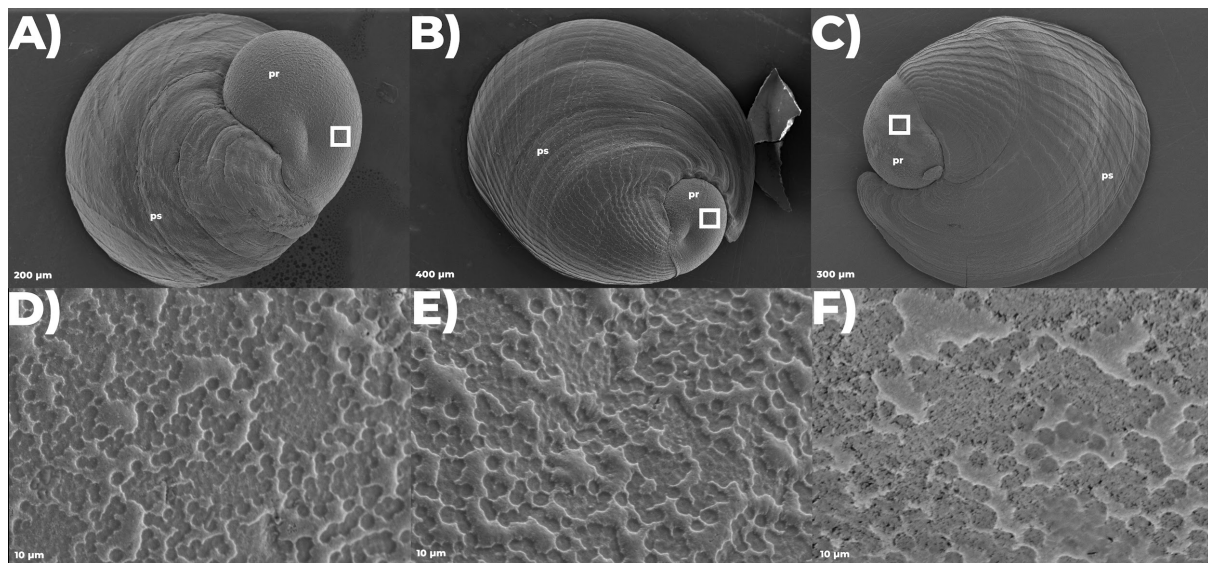


Figura 16. Micrografías electrónicas de barrido de post-larva de abulón rojo *H. rufescens* criadas bajo condiciones óptimas y de acidificación a corto plazo. Imagen dorsal (200 - 400 μm) de larva de 26 días de edad después de la fertilización mostrando una concha peristomal típica en forma de oreja (ps). El pH control (A), moderado (B, 7.8) y bajo (C, 7.6) son mostrados. Larva asentada criada bajo acidificación a largo plazo (pH moderado y bajo) exponen microfracturas (B, C) no observadas en larvas criadas en control (A). La sección laminar (10 μm) de la protoconcha (pr, cajas blancas, A-C) se observa en el panel inferior. Ninguna evidencia de textura granular a lo largo de la protoconcha ni microfracturas fue observado en todos los experimentos (D-F).

A pesar de que el mayor tiempo de exposición a la acidificación ocurrió durante el asentamiento, las larvas asentadas cultivadas bajo una acidificación repentina no expusieron microfracturas visibles o erosión a lo largo de la concha (Figura 16). El contraste de los desafíos de acidificación a corto y largo plazo durante el desempeño del asentamiento resultó en una respuesta diferencial significativa ($F = 118.804$, $p < 0.05$). Lo anterior sugiere que la sensibilidad a la acidificación puede depender de los niveles agudos y acumulativos de acidificación que el abulón puede experimentar durante su ciclo de vida pelágico.

8. Discusión

La presente investigación muestra resultados en concordancia con la literatura con respecto a la historia de vida temprana del abulón, que incluye las reducciones en el crecimiento corporal, la disminución de la supervivencia y retrasos en el desarrollo (Li et al., 2013; Guo et al., 2015) así como un aumento en las larvas anormales y sin concha (Byrne et al., 2010; Tahil et al., 2016). Varias etapas de la historia de vida pelágica mostraron una respuesta negativa en la calcificación, crecimiento y tasa de desarrollo durante los experimentos que imitan dos escenarios de acidificación en un futuro cercano. Aunque los impactos de la acidificación en algunos procesos biológicos pueden ser superados o disminuidos por la adición de otros factores de estrés antropogénicos (por ejemplo, el calentamiento), puede caer en los principales factores de estrés del cambio climático porque muchos parámetros del carbonato de agua de mar están cambiando simultáneamente (Hurd et al., 2020), lo que puede contribuir al deterioro del rendimiento observado durante las etapas transitorias de las larvas planctónicas. Mientras que la respuesta de las larvas al pH moderado fue similar al normal, el deterioro en el bioensayo de pH bajo indica que los procesos biológicos relacionados con el desarrollo, crecimiento y la calcificación se vieron comprometidos (pero no perdidos) bajo este nivel de acidificación, lo que indica una limitación en la aclimatación de las larvas planctónicas a una caída de -0.4 unidades de pH. Se ha sugerido que la descripción integral de la vulnerabilidad requiere una comprensión del umbral crítico en el que la acidificación afecta la biología de las larvas (Bednaršek et al., 2021). La presente investigación contribuye a comprender los límites de tolerancia en los que se encuentran alteraciones en el rendimiento de la historia de vida de las larvas de abulón rojo.

La proporción de larvas calificadas como exitosamente maduras con respecto al primer análisis morfológico se correlaciona con el análisis de crecimiento por etapa, lo que sugiere que el análisis de crecimiento por etapa es un buen indicador para la evaluación de la tasa de desarrollo. Aunque el deterioro de la tasa de desarrollo es relativo a la tasa de alimentación en otras especies planctónicas, pero no en lecitotróficas (Dupont et al., 2009), la tasa de crecimiento específica de las larvas de *H. rufescens* fue perturbada durante su maduración velígera. El análisis de crecimiento por etapa mostró que el crecimiento se ve afectado por el estrés a un pH bajo, lo que indica que las covariables de la acidificación pueden afectar el crecimiento y la tasa de desarrollo del abulón rojo durante su vida pelágica. Se espera que el abulón muestre tasas de crecimiento reducidas a medida que se invierte más energía en combatir el estrés en lugar del crecimiento (Morash et al., 2016). En contraste con el crecimiento reducido bajo desafíos de acidificación, los datos de calcificación indican otro patrón de respuesta durante la maduración velígera, lo que sugiere que el tamaño del cuerpo no es un estimador absoluto de la calcificación sino del crecimiento somático durante la historia de vida pelágica.

La calcificación comienza a ser un proceso activo durante la maduración velígera. Aquí, un sitio de calcificación que proporciona un soporte clave para la deposición de CaCO_3 (Eyster et al., 1984; Eyster 1986) y el mecanismo molecular asociado con el inicio de la cristalización de aragonita se diferencian antes de la maduración velígera en varias larvas de molusco, incluidas otras especies de abulón (Auzoux-Bordenave et al., 2010; Huang et al., 2012). En otras larvas calcificadoras de aragonita, la exposición a la acidificación exhibe una caída en el pH y Ω_{ara} en el sitio de calcificación que se correlaciona con una disminución del crecimiento de la concha y, finalmente, la disolución de la misma (Ramesh et al., 2017). La calcificación observada durante la presente investigación dio como resultado los radios de acidificación negativos más altos en escenarios de pH moderado y bajo a medida que las larvas maduraban para ser competentes para asentarse a las 108 hpf. Esto sugiere que la acidificación está afectando el desempeño temprano de la historia de vida del abulón rojo por la subsaturación de aragonita.

Aunque la energía que soporta el metabolismo durante el crecimiento en especies lecitotróficas como el abulón pareciera ser satisfecha por las reservas de lípidos contenidas en el embrión, las reservas energéticas no siempre son suficientes para completar el estilo de vida planctónica. Por lo tanto, las larvas de abulón también pueden capturar nutrientes disueltos del medio ambiente

utilizando un mecanismo conocido como filtración hidrosólica (Pernet, 2018) para suplir el costo energético que el embrión no sufre durante su desarrollo temprano (Jaeckle et al., 1989a). Lo anterior es una base para sugerir un cambio en la homeostasis ácido-base que contribuye al deterioro del desarrollo y crecimiento larvario observado de manera secundaria debido a la acidificación. Se ha sugerido que los cambios en la homeostasis celular reasignan y disminuyen la producción de energía para el crecimiento y desarrollo somático en otros invertebrados marinos debido a desafíos energéticos sustanciales de la homeostasis interna (Stumpp et al., 2013). Por lo tanto, se puede asumir este estrés adicional junto con la supresión de la calcificación debido a la acidificación.

En cuanto a la calcificación y el crecimiento, el patrón de respuesta observado durante la maduración velígera sugiere una aclimatación específica del estadio larvario. Dado que la reasignación del metabolismo es común en otras larvas de abulón debido a que su desarrollo implica cambios corporales complejos (Jaeckle et al., 1989b), se espera que los rendimientos energéticos sustanciales debido al estrés sean más desafiantes en algunas etapas del desarrollo, como se observó durante la presente investigación. La investigación holística sobre la historia de vida pelágica en respuesta a la acidificación contribuirá a comprender qué etapas del desarrollo están más comprometidas por la acidificación en otras especies calcificadoras. La corrosión de la concha observada en la presente investigación concuerda con la observada anteriormente en el abulón europeo *H. tuberculata* (Kavousi et al., 2022). En muchos moluscos, el CaCO_3 depositado durante el desarrollo larval es una combinación entre carbonato de calcio amorfo y aragonito (Weiss et al., 2012), incluido el abulón europeo (Jardillier et al., 2008). Además, las conchas de abulón de las postlarvas y de los juveniles también están hechas esencialmente de aragonita (Auzoux-Bordenave et al., 2010). En la presente investigación, los valores de Ω_{ara} predichos mostraron condiciones periódicas de subsaturación durante el desarrollo larval y postlarval, lo que significa que el agua era corrosiva para el aragonito, y comenzaría a ocurrir la disolución de la concha desprotegida (Feely et al., 2008). Por lo tanto, la superficie corroída de la concha observada en la presente investigación estaba en concordancia con estas aguas acidificadas episódicas.

A pesar de lo anterior, el reclutamiento para iniciar el estilo de vida bentónico no estuvo a expensas de la acidificación a largo plazo. Las larvas asentadas del desafío de acidificación a

largo plazo mostraron una respuesta morfológica en el deterioro de la concha sin afectar su éxito de asentamiento. Durante el bioensayo que se asemeja al peor escenario del IPCC (2007), el asentamiento no mostró diferencias significativas con el estrés a largo plazo, lo que sugiere que *H. rufescens* posee mecanismos de respuesta que pueden ser beneficiosos para la acidificación durante el desarrollo temprano de su historia de vida. A pesar del efecto nocivo de la estructura calcárea, el éxito informado durante el asentamiento sugiere que la historia de vida temprana del abulón puede ser resistente a diferentes niveles de acidificación crónica. La aclimatación observada en esta investigación fue similar a informes anteriores durante el éxito de asentamiento de *H. kamtschatkana* (Crim et al., 2011) y *H. tuberculata* (Kavousi et al., 2022). Aunque el rendimiento de asentamiento no se vio afectado por el estrés de acidificación a largo plazo, las larvas expuestas a acidificación a corto plazo mostraron un rendimiento de asentamiento reducido, lo que indica que el asentamiento interactúa con la acidificación a través de diferentes vías de respuesta al estrés. En los hábitats naturales, los niveles elevados de CO₂ pueden afectar profundamente el asentamiento de una amplia variedad de organismos benthicos (Cigliano et al., 2015). Se encontraron resultados similares con respecto a la acidificación a corto plazo durante el asentamiento en investigaciones previas con *Haliotis asinina* (Tahil et al., 2015). Dado que la interpretación de los límites de tolerancia a la acidificación, se extiende desde el nivel más alto de respuesta visto, hasta la jerarquía sistémica, celular y molecular (Pörtner 2008), la discusión sobre la sensibilidad a la acidificación del océano debe considerar, al menos, los posibles modos de respuesta sistémica a corto y largo plazo (Morash et al., 2016). Por ejemplo, mientras que la acidificación a corto plazo puede implicar una respuesta sistémica por una vía clásica al estrés repentino o agudo (Cannon, 1915), la aclimatación a la acidificación a largo plazo puede implicar diferentes vías en respuesta al estrés acumulativo o crónico (Parker et al., 2012; Costantini, 2014; Espinel-Velasco et al., 2020).

El asentamiento es un evento crítico en la vida de muchos invertebrados marinos que implica un acoplamiento bentónico-pelágico que requiere el reconocimiento de un entorno bentónico adecuado (es decir, sustrato) y la aceptación de esa superficie antes del inicio de la metamorfosis (Leighton, 2000). Con base en este hecho, la vulnerabilidad a la acidificación durante el asentamiento puede depender de factores externos que incluyen interacciones sustrato-larva, aunque estos efectos aún no se han probado para el abulón. Por ejemplo, el reconocimiento de sustrato adecuado, el cual implica la señalización quimiosensorial, se ha visto afectada por la

acidificación del océano en larvas de peces marinos (Munday et al., 2009). Si bien el reconocimiento adecuado también puede ser importante para el asentamiento de larvas en el abulón (Morash et al., 2016), la calidad del sustrato puede desempeñar un papel fundamental en el acoplamiento de las larvas, ya que la calidad del sustrato afecta drásticamente el rendimiento de la historia de vida de las larvas planctónicas (Phillips et al., 2002). Por ejemplo, los desafíos de la acidificación causan un deterioro en la calidad nutricional de las diatomeas, lo que resulta en la alteración del desempeño del ciclo de vida en otras especies planctónicas (Rossoll et al., 2012). Con respecto al asentamiento de larvas de abulón, se han observado respuestas aleatorias de asentamiento a la acidificación en otros abulones, incluido un efecto indirecto positivo (O’Learly et al., 2017) o neutral (Espinel-Velasco et al., 2020) utilizando algas coralinas incrustantes pre-acondicionadas (~ 4 a 6 meses). Por el contrario, Swezey et al. (2020) informaron una reducción en el asentamiento utilizando diatomeas (*Navicula sp*), que habían sido preacondicionadas solo 24 h antes del asentamiento de *H. rufescens* (Swezey et al., 2020). Por lo tanto, la calidad nutricional del sustrato preacondicionado podría tener implicaciones significativas para el reclutamiento de larvas (Vargas et al., 2013), pero no se evaluó durante la presente investigación.

Con la mejora de las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS), la caracterización de todo el genoma de una sola especie ha mejorado significativamente. Aunque estas tecnologías se han limitado a unas pocas especies de moluscos, revelan aspectos fascinantes de su resistencia a los factores ambientales estresantes (Strader et al., 2020; López-Landavery et al., 2022; Kapsenberg et al., 2022; Gurr et al., 2022). Debido a la variabilidad ambiental local, se han reconocido firmas genéticas que actúan sobre la biomineralización, la hipoxia y la resistencia a enfermedades, así como genes involucrados en el metabolismo energético en el abulón rojo que habita a lo largo de la costa de California (De Wit et al., 2013). Los esfuerzos futuros para comprender la resiliencia del abulón a la acidificación de los océanos podría enfocarse en describir niveles de regulación adicionales a través de la comprensión de las redes de interacción de genes con el vínculo subyacente entre las métricas de rendimiento externas y los rasgos internos para predecir el potencial de adaptación de las especies a la acidificación de los océanos.

9. Conclusión

La presente investigación advierte la sensibilidad a la acidificación en la especie en peligro crítico *H. rufescens*, ubicándola como indicador centinela para múltiples moluscos marinos con historia de vida larvaria bifásica frente a la acidificación del océano. Las especies centinela proporcionan información valiosa para explorar los límites de tolerancia y las vías de respuesta al estrés para la acuicultura mundial frente al cambio climático global. Aquí, la historia de vida temprana de *H. rufescens* se vio afectada negativamente exponiéndose a dos escenarios de acidificación en un futuro cercano. A medida que las larvas planctónicas maduraron para comenzar su estilo de vida bentónico, los niveles diferenciales de acidificación a largo plazo alteraron significativamente el desempeño de las larvas, lo que sugiere que su sensibilidad depende de sus etapas de desarrollo. La alteración en el éxito del desarrollo, el crecimiento y la calcificación por acidificación da como resultado la pérdida del rendimiento de la especie cuando los niveles de acidificación se encuentran por encima de su umbral de tolerancia. Aquí se encontró que -0.4 pero no -0.2 unidades de pH eran un desafío para las larvas de abulón rojo. Mientras que los estadios larvales evaluados (eclosión, maduración velígera y asentamiento) mostraron diferentes niveles de resiliencia a la acidificación a largo plazo, el asentamiento destaca notables diferencias de respuesta a la acidificación a corto y largo plazo.

Por lo tanto, la discusión sobre la sensibilidad a la acidificación del océano debe considerar los diferentes modos de respuesta a la acidificación a corto y largo plazo y la etapa de su historia de vida evaluada con respecto a su biología de desarrollo. Debido a que los ecosistemas naturales del abulón se ven gravemente comprometidos por la acidificación en el futuro, la presente investigación contribuye a comprender el umbral crítico en el que la acidificación afecta al historia de vida pelágica de una especie nativa de las costa del Pacífico de América del Norte. La pérdida de la población en etapas tempranas de la vida del abulón rojo experimentada actualmente en la costa del Pacífico puede tener lugar debido a una acidificación a corto plazo relacionada con el afloramiento episódico de aguas corrosivas, pero no a una acidificación a largo plazo, ya que a pesar del efecto negativo de la acidificación sobre la calcificación, el crecimiento y el desarrollo, las mortalidades observadas durante esta investigación no fueron absolutas, y la transición pelágico-bentónica se llevó a cabo con éxito en larvas mantenidas bajo dos niveles de acidificación a largo plazo.

Capítulo II. Regulación postranscripcional del abulón en respuesta a la acidificación

1. Resumen

La maduración larvaria es una etapa de desarrollo esencial en la vida de muchos lofotrocozoos e implica cambios fisiológicos y morfológicos drásticos que sugieren una regulación de genes compleja. En organismos multicelulares, los microARN son componentes de la regulación génica, implicados en diversos procesos fisiológicos y de desarrollo, incluyendo su participación frente al estrés medioambiental. Se ha sugerido que la regulación génica es clave para mantener la homeostasis frente a los retos de la acidificación. Explorar la regulación génica mediada por microARNs durante el desarrollo larval y en respuesta al reto de acidificación es una tarea novedosa en el abulón rojo que contribuye al entendimiento sobre los mecanismos celulares moleculares asociados a la resiliencia del abulón rojo a la acidificación. Mediante la técnica de secuenciación masiva de ARNs pequeños, se identificó la red regulatoria miRs que se co-expresan durante el desarrollo larvario del abulón rojo. Esta red de miRs fue modificada por el efecto de la acidificación. Aquí, genes asociados al crecimiento, esqueletogenesis, desarrollo del sistema inmune, neuronal y diferenciación de tejidos son regulados negativamente en respuesta a la acidificación. Esta regulación negativa es coherente con la reducción observada en las variables fenotípicas evaluadas.

2. Introducción

2.1 El mundo del ARN

Los seres vivos compartimos una característica inherente denominada genoma, el cual es el repositorio de la información necesaria para el inicio y propagación de la vida. El genoma es una larga cadena compuesta de bloques moleculares de ADN (ácido desoxirribonucleico). A lo largo del ADN se encuentran las instrucciones necesarias para la síntesis de productos moleculares necesarios para la vida celular; estas instrucciones suelen referirse como genes (Gerstein et al., 2007). Durante la expresión de la información génica, el proceso de la transcripción es el primer paso para la síntesis de transcritos a partir de un segmento de ADN de doble cadena que es convertido, mediante un sistema enzimático, en una cadena de ARN con una secuencia de bases complementarias a una de las cadenas de ADN. Desde un punto de vista dogmático la expresión genética codificará a proteínas a partir de macromoléculas de ARN

mensajero (ARNm; Crick, 1970), sin embargo, la transcripción también deriva en una variedad de ARNs no codificantes que tienen una función biológica (Cech, 2012; Figura 17). Algunas clases importantes de ARN son: ARNm - codifica la secuencia de aminoácidos de uno o más polipéptidos especificados por un gen o por un conjunto de genes. No codificantes y de mantenimiento celular como ARNt - leen la información codificada en el ARNm y transfieren el aminoácido adecuado a la cadena polipeptídica en crecimiento durante la síntesis proteica; ARNr - forman parte de los ribosomas, complejas maquinarias celulares que sintetizan las proteínas; snARN - ARN nuclear involucrado en la maduración del ARN mensajero vía corte y empalme; snoARN - ARN nucleolares involucrados en la metilación y pseudoridilación del genoma. El ARN es la única macromolécula conocida que tiene a la vez funciones de almacenamiento y transmisión de la información y en catálisis. Inicialmente los ARNs no codificantes fueron considerados como “ARN basura” debido a su incapacidad para codificar a proteínas, sin embargo, con los avances de la tecnología de secuenciación de alto rendimiento, se ha demostrado la ubicuidad y función de estos fragmentos.

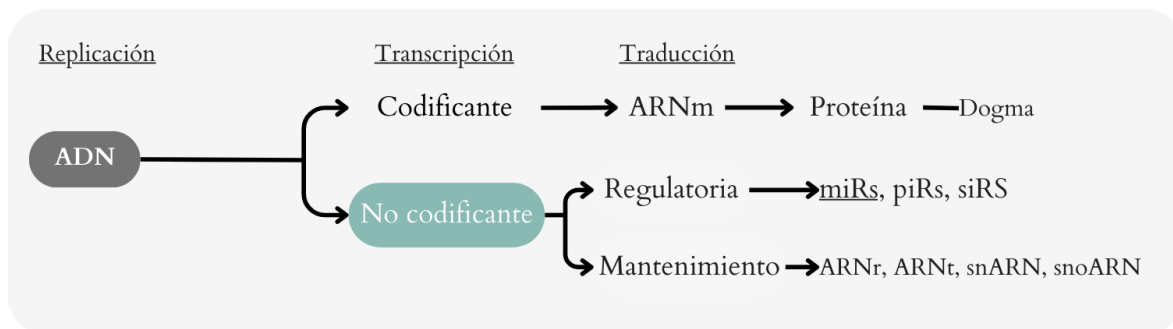


Figura 17. Clasificación de ARNs. La transcripción puede derivar en elementos codificantes - que codifican proteínas - o no codificantes que tienen una función biológica para el mantenimiento o regulación celular.

2.2 Programa genético del desarrollo temprano de vida del abulón

Por su gran complejidad y complicada coordinación, los patrones de expresión génica que rigen el desarrollo temprano de vida de muchos animales no tienen similitud. Los productos génicos durante el desarrollo temprano de vida dan lugar a una cascada de sucesos que coordinan los cambios morfológicos tanto en el espacio como en el tiempo (Nelson et al., 2017). De hecho, se ha identificado que se expresan más genes durante el desarrollo temprano de vida que en ningún otro momento del ciclo vital de vida animal. Por ejemplo, el ovocito del erizo de mar

puede expresar hasta 3 veces más productos génicos durante el desarrollo temprano de vida en comparación con lo observado en otros tejidos diferenciados durante la vida adulta (Harris, 1978). El desarrollo temprano de gasterópodos marinos incluye, al igual que otros moluscos de vida bifásica indirecta, la activación génica en respuesta a varios procesos de desarrollo fundamentales como la división espiral del embrión, la construcción del plan corporal (Hinman et al., 2003), vías de señalización ambiental morfogenéticas (Jackson et al., 2002) y de anticipación (Degnan y Morse, 1995a), de formación de sistema digestivo, neural, inmune y señalización (Jackson et al., 2006). Estas vías elementales del desarrollo sugieren una clara diferencia en la batería de genes activados a lo largo de las etapas embrionaria, maduración velígera y asentamiento (Figura 18). Huang y colaboradores (2012) identificaron la actividad de genes que se co-expresan de manera específica entre etapas del desarrollo indicando una clara diferenciación entre etapas del desarrollo que incluyeron: 1) embrional (dos células), 2) trocófora y 3) postlarva en la especie *Haliotis diversicolor*. A medida que las larvas véliger maduran, se ha identificado que se requiere la regulación coordinada de baterías de genes temporalmente diferentes involucrados en una amplia gama de procesos fisiológicos y de desarrollo asociados con la colonización béntica (William et al., 2009). Algunos cambios fisiológicos y morfológicos requeridos para el fenotipo adulto béntico ocurren solo en el momento de la transición del hábitat, pero ciertas estructuras relacionadas con el adulto se desarrollan de manera preventiva en la larva (conocido como la anticipación de la transición pelágica-bentónica), particularmente aquellas relacionadas con el aparato de alimentación (Spaulding et al., 1991; William et al., 2009). La evidencia existente sugiere que existen perfiles de expresión génica específicos que se correlacionan con el éxito de la competencia larvaria, y que al menos dos vías genéticas, morfogenética y anticipatoria, están operando en la metamorfosis (Degnan et al., 1995a; Degnan et al. 1995b; Roberts 2001; Jackson et al. 2005). William y colaboradores (2009) identificaron que, existen al menos cinco perfiles distintos de expresión de genes temporales operacionales en larvas tardías y postlarvas tempranas que consisten en genes involucrados en una variedad de procesos fisiológicos y de desarrollo, tales como la expresión génica de proteínas de unión a iones de calcio, factores de transcripción y del sistema neurológico, y cuya expresión continúa aumentando y se vuelve cada vez más alta cuando las larvas son inducidas para completar su metamorfosis (William et al., 2009). Mientras que otros genes que mantuvieron una expresión constante durante el desarrollo larval incrementaron significativamente en la etapa de la inducción del asentamiento, e incluyen

proteínas del metabolismo celular, proteínas ribosomales y ciclo celular. Sin embargo, también se identificó la sub-expresión de genes con respecto a la edad larval y la inducción metamórfica que incluyen genes del proceso metabólico celular y traducción, aunque más de la mitad de los genes sub-expresados tuvieron identidad desconocida, sugiriendo una especificidad de la especie estudiada (William et al., 2009).

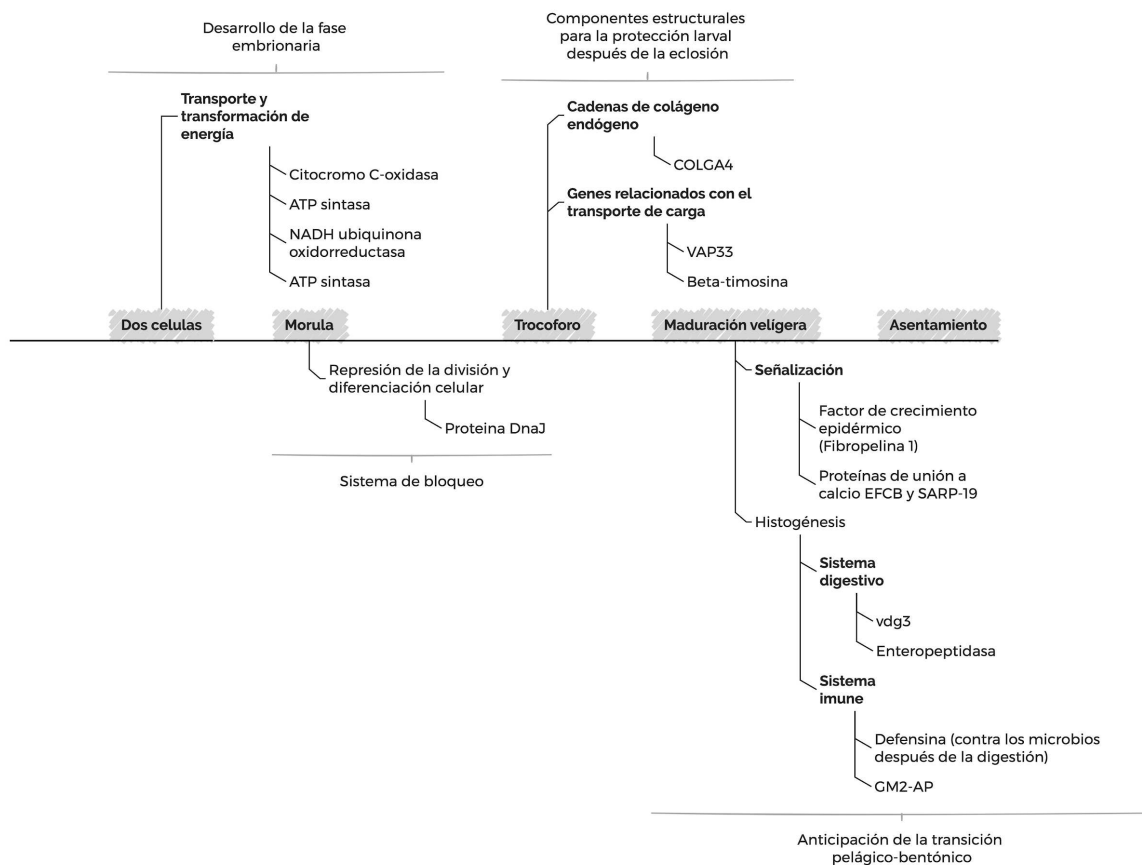


Figura 18. Programa genético del desarrollo larvario del género *Haliotis*. Diagrama de elaboración propia basado en los trabajos de Degnan y Morse (1995), Jackson et al., (2002, 2006), William et al., (2009) y Huang et al., (2012).

2.3 Impacto de la acidificación en rasgos celulares-moleculares de moluscos durante su desarrollo temprano de vida

Uno de los objetivos clave en la interpretación de los límites de tolerancia a la acidificación es entender el nivel más alto de respuesta observado hasta las jerarquías sistémicas, celulares y moleculares que se amplifican, disminuyen o inactivan ante los estímulos externos (Pörtner 2008). Tales variaciones son producidas a través de una red compleja de interacciones entre el genotipo-fenotipo de una especie y su ambiente (Houle et al., 2010). Aunque en un principio la

mayoría de los estudios de acidificación en los moluscos se han centrado en la fenología externa (i.e. rasgos corporales accesibles como el crecimiento, la supervivencia, respiración, calcificación, etc.), el enfoque de la genómica funcional ha permitido demostrar algunos mecanismos internos implícitos en respuesta a las covariantes de la acidificación. Estudios del efecto de la acidificación en la expresión génica en invertebrados durante estadios larvarios encontraron que la expresión génica de genes asociados con la biomineralización, respuesta al estrés celular y metabolismo energético son suprimidos durante el período en que las larvas de erizo (*Strongylocentrotus franciscanus*) de mar fueron expuestas a condiciones de pH reducido (-0.05 unidades; Todgham y Hofmann, 2009). Todgham y Hofmann (2009) también reportan un efecto negativo en genes involucrados en el control de la traducción, la regulación de iones, el equilibrio ácido-base, el desarrollo y ciclo celular, indicando que, ciertos rasgos internos esenciales del desarrollo larval del erizo de mar están siendo alterados a fin de compensar el efecto de la acidificación y defender la homeostasis celular. Esta expresión génica suprimida sugiere la existencia de algún mecanismo persistente entre algunos organismos marinos para compensar internamente el estrés de la acidificación y lograr la homeostasis para continuar con el desarrollo temprano de vida de organismos de vida bifásica, como el abulón rojo.

2.4 Regulación génica postranscripcional

Se ha sugerido que la regulación en la expresión génica (ambos tipos, constitutiva e inducida) es clave para la homeostasis y la plasticidad fenotípica frente a la acidificación (Gurr, 2022), ya que está ligado a la capacidad de aclimatación (Barshis et al., 2013; Georgoulis et al., 2021). La regulación de la expresión de la información génica es controlada mediante mecanismos en los distintos niveles en que fluye la información. La variedad de mecanismos de la regulación a nivel de la traducción de proteínas proporciona una gran flexibilidad y permite la represión de solo algunas moléculas de ARNm o la regulación global de toda la traducción celular. En eucariotas, se han identificado al menos cuatro mecanismos principales de regulación de la traducción, de los cuales destacaremos la regulación de la expresión génica dependiente de ARN que puede producirse a nivel de la represión de la traducción mediante un sistema de interferencia mediado por ARN (ARNi). Este mecanismo de regulación fue descubierto inicialmente en plantas (Voinnet y Baulcombe, 1997) y nematodos (Fire et al., 1998) como un mecanismo de silenciamiento génico específico a nivel postranscripcional que funciona de manera endógena o exógena. En plantas y animales, una de las vías funcionales del ARNi deriva

en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional mediante mecanismos específicos mediados por secuencias pequeñas de ARNs (< 200 nucleótidos de longitud) que interfieren con la traducción proteica, lo que corresponde a una variante del dogma central de la biología molecular que resulta fascinante (Figura 17). A pesar de que los miRs no son los únicos factores reguladores que contribuyen a la robustez de un sistema biológico, como reguladores postranscripcionales pueden intervenir tardíamente en el proceso de expresión génica para contrarrestar la variación de los procesos anteriores a la transcripción, maduración del ARNm (i.e. corte y empalme) y exportación nuclear (Ebert y Philip, 2012).

2.5 Biología y diversidad de ARNs pequeños en animales

Con el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés) en las pasadas dos décadas, se ha ampliado el interés y comprensión de los componentes del sistema ARNi. A la fecha, el número de datos genómicos no codificantes ha incrementado significativamente (Fromm et al., 2020), y aunque ha sido limitado a unas pocas especies de moluscos, ha revelado fascinantes aspectos de su resiliencia a los estresores ambientales (Rosani et al., 2021). En esta burbuja cada vez mayor de datos de secuencia de moluscos, las secuencias pequeñas de ARN no codificantes (sRNAs, de aquí en adelante) han ganado atención, ya que se espera que actúen como reguladores moleculares de muchos procesos esenciales (Rosani et al., 2021). De acuerdo con Ghildiyal y colaboradores (2009), los sRNAs (< 30 nucleótidos de longitud, nt) comprenden tres clases principales en animales: microARNs (miRs), ARNs pequeños de interferencia (siRs) y ARNs de interacción con proteínas PIWI (piRs). Fundamentalmente, miRs, siRs y piRs son similares en términos de sus características moleculares y función efectora de interferencia, con una ligera diferencia en la biogénesis, modos de acción y ruta reguladora (Tabla 6). Estas tres se originan a partir de una horquilla de doble hebra de ARN (dsRNA, por sus siglas en inglés) y están estrechamente relacionadas a la misma vía efectora al Complejo de Silenciamiento Inducido por ARNs (RISC, por sus siglas en inglés). Mientras que los siRs y piRs guían el silenciamiento postranscripcional mediante una complementariedad de bases completa, los miRNAs presentan complementariedad parcial con el ARN mensajero (Tabla 6).

Tabla 6. Diversidad de clases de ARNs pequeños de interferencia reportados en organismos multicelulares (Farazi, et al., 2008). Los microARNs (miRs) y ARNs pequeños de interferencia (siRs),

forman parte de la misma maquinaria de control de silenciamiento postranscripcional, mientras que los RNAs de interacción con proteínas PIWI (piRs) tienen una participación activa en línea germinal y etapas embrionarias tempranas.

| | miRs | siRs | piRs |
|----------------------------|---|-------------|---|
| Secuencia primaria | Drosha | - | - |
| Secuencia precursora | Dicer | Dicer | Dicer |
| Efector | Argonauta | Argonauta | PIWI |
| Complementariedad | Parcial | Completa | Completa |
| Longitud (nt) ¹ | 20 - 23 | 20 - 23 | 28 - 33 |
| Modificación extremo 5' | Monofosfato | Monofosfato | Monofosfato |
| Modificación extremo 3' | 2'OH | 2'OH | 2'-O-metil |
| Función | Represión de la traducción génica / deadenilación y degradación | | Proteger la integridad del genoma silenciando los elementos transponibles tanto en la línea germinal como en las células somáticas gonadales. |

¹ Longitud en nucleótidos (nt)

2.6 Origen y función de miRs

Este tipo de ARNs ha ganado la atención de la comunidad científica, siendo galardonado con el premio nobel en medicina por su descubrimiento en recientes décadas (Premio Nobel, 2006). Los miRs se originan en el interior del núcleo a partir de transcritos independientes (i.e. regiones intergénicas, también conocidos como miRs canónicos) o como derivados de regiones intragénicas a partir de intrones o exones (Bartel, 2004; Krol et al., 2010). Inicialmente, los miRs forman una horquilla de doble hebra primaria de hasta 1 Kilo base de longitud (pri-miR), que corresponde a una estructura secundaria en forma de tallo y bucle que es madurado por un complejo proteico de unión a ARN llamado microprocesador DROSHA/DGCR8 (Figura 19A). Este paso da lugar a una horquilla de tamaño reducido de 60 a 80 bases de longitud conocida como precursora (pre-miR). Posteriormente, los pre-miRs son transportados al citoplasma mediante exportinas para finalizar su biogénesis (Figura 19B). En el citoplasma, estas horquillas precursoras son maduras por RNAsas tipo III conocida como DICER dando paso a una de las distintas isoformas de la proteína de unión a dsRNA Argonauta (AGO), quien más tarde recluta la maquinaria molecular encargada de efectuar el silenciamiento postranscripcional conocida como complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). Mientras que el complejo RISC sirve como efector, una sola hebra de miARN (miR guía) dirige el silenciamiento postranscripcional mediante su interacción parcial con una región de

secuencia complementaria (o antisentido) de los ARNm (i.e. unión miR:ARNm), en la región no traducida (UTR, por sus siglas en inglés) , provocando tanto la inhibición de su traducción como la degradación del mismo (Bartel, 2009; Figura 19C).

Usualmente, la inhibición postranscripcional ocurre en la región 3'UTR, aunque hallazgos recientes sugieren la eficiencia de miRs para inhibir simultáneamente la traducción de genes desde el sitio 5' UTR (Lee et al., 2009). Se ha sugerido que un genoma eucariota puede contener más de 1 000 loci de donde se origina algún miRs, lo que representa entre un 1 a 2 % en proporción del número de genes que codifican proteínas en un genoma (Landgraf et al., 2006; Ruby et al., 2007). A su vez, los miRs pueden modular del 30 al 50% de los genes codificantes de proteínas (Lewis et al., 2005). Se ha especulado que los miRs son altamente conservados entre especies (Friedman et al., 2009). Desde una perspectiva filogenética los miRNAs son interesantes debido a su alta conservación a nivel funcional (Tarver et al., 2013). Debido a que la expresión espacial y temporal de miRs controla la producción de diversos sustratos proteicos que dirigen la respuesta fisiológica durante la historia de vida y desarrollo animal (He et al., 2004; Ason et al., 2006), la investigación funcional de los miRNAs es relevante para comprender posibles mecanismos de resiliencia postranscripcional al cambio climático ya que los miRs pueden presentar patrones de expresión específicos a eventos celulares de estrés ambiental.

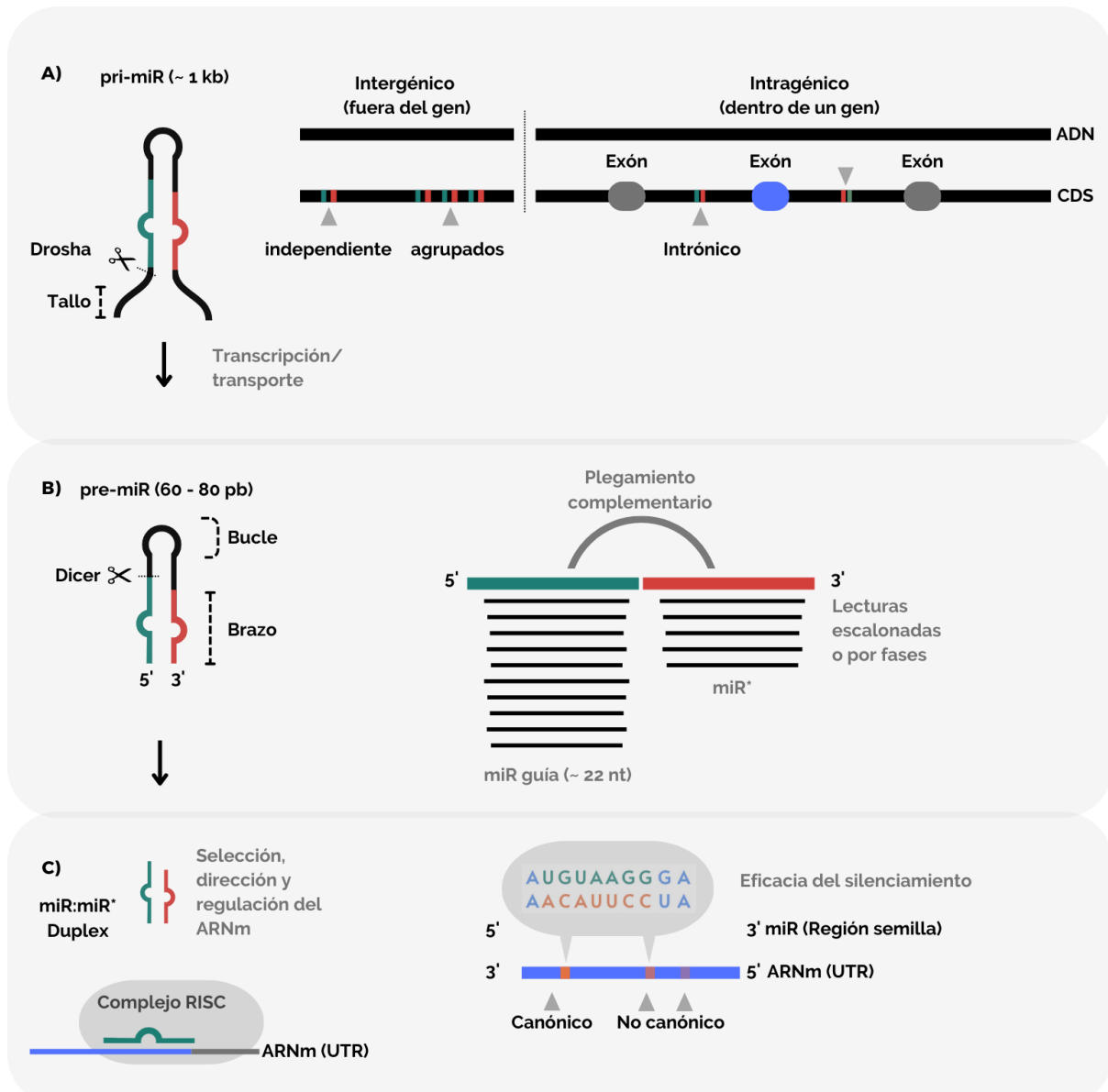


Figura 19. Biogénesis e identificación de miRNAs. A) Estos pueden originar de regiones intergénicas a partir de unidades transcripcionales independientes o como varias unidades transcripcionales a partir de un solo pri-miR (i.e miRNAs agrupados). Por otro lado, pueden derivar de regiones intragénicas, a partir de sitios intrónicos o exóticos. Algunos miRNAs intragénicos son conocidos por ser parte del control postranscripcional del gen huésped. B). Maduración y criterios estructurales para la identificación de miRNAs: se toma como un miR verdadero si todas las lecturas escalonadas o por fase se orientan en un único fragmento de 60 - 80 nucleótidos de longitud y presentan un plegamiento complementario. La secuencia más abundante (usualmente 22 nucleótidos (nt) de longitud), corresponderá a la secuencia madura de miR que guía el silenciamiento postranscripcional. C) El silenciamiento génico puede ocurrir en múltiples sitios de la región no traducida (UTR) del ARNm blanco (elaboración propia).

2.7 Eficiencia regulatoria de miRs

La especificidad de unión miR:ARNm está determinada en particular por el extremo 5' del miR, a través del emparejamiento inicial de la llamada región semilla que comprende los nucleótidos 2 a 8 del miR (Bartel, 2009; Figura 19C), que algunas veces puede propagarse a lo largo de la parte 3' del miR. De acuerdo a la eficacia del silenciamiento se ha propuesto dos clases de unión miR:ARNm, canónica y no canónica, que están determinadas por la “ocupación” entre el complejo AGO-miR y un ARNm (McGeary et al., 2019). El emparejamiento de la región semilla canónica es la forma más eficiente de lograr una unión de alta afinidad y consiste en sitios UTR con más de 6 nucleótidos de coincidencias contiguas a la región semilla. Por el contrario, la mayoría de sitios no canónicos emparejan bien con la región semilla pero son imperfectos en los flancos por lo que se reduce la afinidad del emparejamiento a niveles inferiores de los sitios canónicos principales (Figura 19C). Ya que las afinidades de unión miR:ARNm y su correspondiente constante de disociación (K_p) correlacionan bien con la represión observada en el contexto celular, un análisis basado en modelos termodinámicos del emparejamiento RNA-RNA resulta un predictor útil del emparejamiento canónico y no canónico (Krüger et al., 2006; Vikram et al., 2015). Los miRs, de hecho, han sido categorizados dentro de “familias”, basado principalmente, en las propiedades de identidad de la región de semillas. Por ejemplo, los tres miembros de la familia miR-1/206 (miR-1-1, miR-1-2 y miR-206) son miRs parálogos en ratones y humanos con una misma región semilla (5' GGAAUGU 3') y función regulatoria del fenotipo muscular (Zhao et al., 2005; Chen et al., 2006). Sin embargo, el uso del término familia no denota estrictamente ascendencia común. Por ejemplo, miR-32, que no está relacionado con otros miembros de la familia de semillas miR-25/32/92/363/367, es sin embargo un miembro adoptado porque ha convergido en la misma semilla extendida y, por lo tanto, tiene la misma orientación. Otros miRs, como miR-200a y miR-200b, que están claramente relacionados, tienen una diferencia de un solo nucleótido en sus regiones de semillas que los ubica en diferentes familias debido a sus preferencias de orientación divergentes (Bartel, 2018).

2.8 Papel de los miRs en moluscos

En moluscos, se ha demostrado que los miRs son reguladores cruciales de procesos biológicos asociados a la formación del sistema nervioso (Walker et al., 2018), así como la diferenciación gonadal (Wei et al., 2019) y biomineralización (Jiao et al., 2014; Zheng et al., 2016; Chen et

al., 2019; Huang et al., 2019; Zhang et al., 2021; Zhu et al., 2020; Feng et al., 2020). Se sabe que los miRs pueden conferir precisión y uniformidad durante la transición del desarrollo temprano de vida larval (Ebert y Philip 2012), incluyendo moluscos bivalvos (Xu et al., 2012) y gasterópodos (Song et al., 2017). De hecho, Xu y colaboradores (2012) identifican un niveles de expresión de miRs hasta tres veces mayores durante las etapas de vida temprana de desarrollo de *Crassostrea gigas* en comparación a la expresión de miRs en distintos tejidos de organismos adultos de la misma especie (Figura 20), lo que sustenta la hipótesis sugerida más tarde por Rosani y colaboradores (2016) respecto a que la regulación postranscripcional mediada por miRs determina el destino y plasticidad de las células en etapas tempranas del desarrollo de los moluscos (Rosani et al., 2016). A pesar de los antecedentes antes citados, el funcionamiento de miRs y otros RNAs pequeños en el género *Haliothis* sigue sin ser explorado.

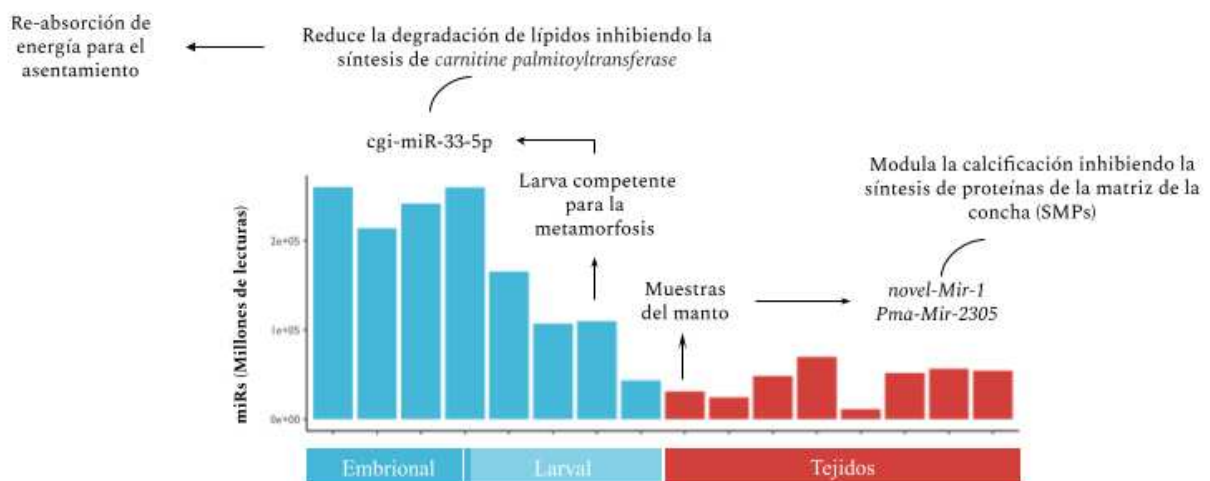


Figura 20. Caso de estudio del perfil de miRs durante la historia temprana de vida de un molusco.

El panel inferior indica el origen de las muestras: Etapas de desarrollo (azul turquesa) y muestras de diferentes tejidos en etapa adulta (rojo). El eje y indica el número de lecturas (Millones) de miRs identificados para el ostión *C.gigas*. El patrón de expresión específico de algunos miRs refleja su potencial para regular eventos del desarrollo y función celular de manera etapa-específica, tejido-específico y taxón-específico. Durante las etapas tempranas de vida de muchos lofotrocozoos requiere de una compleja regulación de genes debido a los cambios fisiológicos y morfológicos drásticos que ocurren. En la historia temprana de vida del ostión *C.gigas* se identificó la presencia específica de miRNAs dependientes de las etapas del desarrollo. Adquisición y reanálisis de datos de Xu F. et al., 2012.

Además, en moluscos los diferentes tipos de ARNs pequeños han llamado la atención por su acción reguladora de genes y otros elementos genéticos a través de este mecanismo conservado de silenciamiento de genes. Análisis bioinformáticos han permitido identificar el repertorio de proteínas asociadas a su producción (Rosani et al., 2016). En diferentes organismos marinos, los miRs pueden modular varios procesos fisiológicos frente al estrés ambiental, incluyendo la regulación de la respuesta inmune (Schulte et al., 2011; Chen et al., 2014; Zhou et al., 2014; Martín-Gómez et al., 2014; Chen et al., 2015; Burgos-Aceves et al., 2018), estrés térmico (Vasadia et al., 2019), estrés osmótico (Zhao et al., 2016), anoxia en hábitats naturales (Biggar et al., 2012; Hadj-Moussa et al., 2018), estivación (Hoyeck et al., 2019), respuesta a xenobióticos (Bao et al., 2014), hipoxia (Huo et al., 2017), y ambientes modificados por el cambio climático (De falco et al., 2023), incluyendo la acidificación (Pan et al., 2021).

3. Justificación

Nuestro entendimiento sobre la sensibilidad de los organismos marinos a la acidificación requiere una perspectiva de la fisiología *interna* que complementa los hallazgos y reportes del efecto fisiológico corporal (*externo*) en respuesta a la AO. Los hallazgos de que la maquinaria proteica involucrada en la regulación post transcripcional mediada por sRNAs está presente en las fases tempranas del desarrollo larval en moluscos así como la presencia específica de miRs en eventos de la metamorfosis en algunos moluscos sugiere la relevancia de elaborar un estudio dirigido a la detección de miRs durante las etapas tempranas de desarrollo larval del abulón rojo, con la motivación de determinar la respuesta regulatoria en consecuencia a experimentos de acidificación. La investigación funcional de los miRs es relevante para comprender posibles mecanismos de resiliencia postranscripcional al cambio climático ya que los miRs pueden presentar patrones de expresión específicos a eventos celulares de estrés ambiental. Por lo que esta investigación podría arrojar un mejor entendimiento sobre la susceptibilidad intrínseca al cambio climático de moluscos marinos de interés acuícola en sus etapas de desarrollo larval.

4. Hipótesis

- Los microARNs desempeñan un papel activo en la regulación génica durante las fases cruciales del desarrollo larvario del abulón rojo.
- La acidificación tiene un impacto significativo en los perfiles de expresión de los microARNs a lo largo del desarrollo larvario.

5. Objetivos

5.1 General

Analizar los perfiles de microARNs durante el desarrollo larval en la especie *Haliotis rufescens* y evaluar su correlación con las respuestas morfológicas y fisiológicas (consumo de oxígeno) de larvas expuestas a condiciones de crecimiento óptimo y de acidificación.

5.2 Específicos

- Evaluar las tasas de respiración que refuercen el análisis morfológico y perfiles de expresión de microARNs bajo condiciones óptimas de crecimiento y acidificación.
- Identificar los microARNs conocidos en la etapa trocófora (pre-competente) y competente (véliger tardía) en el abulón rojo *Haliotis rufescens* a través de técnicas de secuenciación masiva sRNA-seq.
- Identificar microARNs específicos de la especie (i.e. nuevos) en la etapa trocófora (pre-competente) y competente (véliger tardía) en el abulón rojo *Haliotis rufescens* a través de técnicas de secuenciación masiva sRNA-seq.
- Identificar los procesos biológicos y las rutas metabólicas en la que los microARNs están involucrados.
- Determinar los perfiles de microARNs bajo condiciones de acidificación.

6. Métodos

6.1 Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno (VO_2) se midió con un Sensor de Placa con Lector (Sensor Dish Reader, SDR, PreSens) que consta de una placa de 24 cámaras con una capacidad de 1700 μ l por cámara. Para cada tratamiento de pH (8.0, 7.8 y 7.6) y estadio larval (24, 48, 60 y 110 hpf), se utilizaron entre 6 y 12 réplicas biológicas incubadas simultáneamente y 6 cámaras fueron utilizadas como control para evaluar el consumo de oxígeno de las larvas presentes en el sistema. Aproximadamente 500 larvas distribuidas en 1 mL se colocaron a cada cámara con agua del pH experimental donde los organismos fueron mantenidos durante su desarrollo larval. En las cámaras control sólo se adicionó agua marina al pH control. La concentración de oxígeno fue evaluada durante 1 hora, o hasta que la concentración inicial de oxígeno se redujera un 20%. Finalmente, las larvas fueron fijadas en formol al 4% para ser contadas posteriormente. La tasa de respiración se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$VO_2 = \frac{A_{O_2} - B_{O_2}}{(h_i - h_f) / ind}; \quad (3)$$

donde: A_{O_2} y B_{O_2} Es el valor máximo y mínimo de oxígeno medido durante la medición ($\mu\text{mol } O_2 \text{ L}$). El valor $(h_i - h_f)$ Es el tiempo transcurrido (en horas) donde se detectó el valor máximo (A_{O_2}) y mínimo (B_{O_2}) de oxígeno medido. Ind es el número absoluto de larvas presentes en la cámara de respiración. Las unidades se reportan en $\mu\text{mol } O_2 \text{ h}^{-1} \text{ Ind}^{-1}$. Posteriormente, se realizó la conversión en unidades a picomolar para comparar los rendimientos reportados en la literatura (Jaeckle, 1989; Moran et al., 2003). Adicionalmente, se calculó la energía relativa (o equivalente) a cada etapa de desarrollo usando el total del oxígeno consumido y medido durante todo desarrollo larval calculado para medir la asignación energética relativa en cada etapa del desarrollo, usando la siguiente fórmula:

$$\text{energía equivalente (\%)} = \frac{VO_{2i}}{\Sigma VO_{2i}}; \quad (4)$$

donde VO_{2i} corresponde a la tasa de respiración específica obtenida en cada etapa de desarrollo durante las 24, 48, 60 y 110 hpf. Y ΣVO_{2i} equivale a la sumatoria del consumo de oxígeno consumido desde las 24 hasta las 110 hpf.

6.2 Selección de muestras para secuenciación sRNA-seq

La selección de muestras para secuenciación transcriptómica de ARNs pequeños (sRNA-seq), incluyeron las siguientes muestras por triplicado: 2 etapas del desarrollo (24 y 110 hpf) del bioensayo Control (pH 8.0) y el tratamiento de pH bajo (pH 7.6), identificado como límite crítico para el desempeño del abulón rojo, correspondiendo a un total de 12 muestras. Las muestras fueron seleccionadas en base a los siguientes criterios: 1) Dichas etapas del desarrollo mayoritariamente presentaron diferencias significativas a lo largo de las evaluaciones morfológicas y fisiológicas evaluadas, tales como el éxito del desarrollo, crecimiento, calcificación y consumo de oxígeno, 2) después de la eclosión (ocurrida aquí a las 24 hpf) se considera que los mecanismos moleculares de regulación transcripcional relacionados al cambio embrionario-larvario están participando activamente y 3) durante las 110 hpf, se observó que tanto el crecimiento, la calcificación y la tasa de respiración fueron severamente perturbados debido al reto de acidificación de pH bajo.

6.3 Toma de muestra, extracción de ARN, preparación y secuenciación de bibliotecas de ARNs pequeños

Un total de 500 a 3000 larvas de abulón rojo fueron gentilmente tamizadas y colocadas en microtubos para centrifugación de tapa roscada con 1 mL de agua marina experimental. Los microtubos se con las larvas fueron centrifugados a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 min. a 4°C. Posteriormente, con la ayuda de una micropipeta se extrajo el agua marina y se añadieron 0.5 mL de Tri Reagent (SIGMA). Las larvas suspendidas en Tri Reagent fueron almacenadas a -20 °C hasta su disposición. Las muestras se descongelaron en frío y se añadieron a cada muestra 100 mg de perlas de zirconia. Para homogeneizar el tejido larval, las muestras fueron homogeneizadas en un homogenizador de tejidos FastPrep-24™ (MP Biomedicals, USA) a una velocidad de 4 m/s⁻¹ durante 30 segundos durante dos ciclos de homogenización. Las muestras se colocaron en frío durante cada ciclo de homogenización para preservar su integridad. Posteriormente, las muestras fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 10 min. a 4°C. Se transfirió el sobrenadante por decantación hacia nuevos microtubos tipo Eppendorf de 1.5 ml asegurando no llevarse las perlas de zirconia. Se añadieron 100 uL de cloroformo frío (4°C) por cada 0.5 mL de Tri Reagent utilizado y se mezclaron mediante vortex durante 10 segundos ó hasta homogeneizar las fases Tri Reagent:cloroformo. Posteriormente, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min. a 4°C. La fase acuosa fue transferida hacia nuevos microtubos con ayuda de una micropipeta de 100 - 200 uL, cuidando no llevarse la interfase o fase orgánica. Se adicionaron 250 uL de etanol absoluto frío (4°C) y agitaron 10 veces los tubos por inversión. Después las muestras fueron incubadas a -40 °C por 24 horas. Las muestras fueron descongeladas en frío y centrifugadas a 14,000 rpm durante 10 min. a 4°C. Después de este paso se observó la formación de una pastilla transparente o blanca al fondo de los microtubos, correspondiente al ARN total. El sobrenadante se removió por decantación, cuidando de no remover la pastilla del fondo de los microtubos. Se adicionó 1 mL de etanol al 75% frío (4°C) para limpiar la pastilla y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. a 4°C. Se removió el sobrenadante por decantación y se realizó un segundo lavado. La pastilla se dejó secar hasta mostrarse transparente. Se añadieron de 50 a 100 uL de agua estéril libre de Rnasas. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -40 °C hasta su disposición. La cantidad e integridad del ARN extraído fue evaluada con por espectrofotometría (Nanodrop lite, USA) y electroforesis en gel de agarosa (1.5 %), respectivamente.

Se utilizó una cantidad total de 2 µg de ARN total por muestra para la preparación de biblioteca de ARN pequeños. Las bibliotecas de secuenciación se generaron utilizando el kit NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set para equipos de secuenciación Illumina (NEB, USA) siguiendo las recomendaciones del proveedor y se agregaron índices para atribuir secuencias código a cada muestra. Brevemente, el adaptador 3' SR fue directamente y específicamente ligado al extremo 3' de miRs, siRs y piRs. Después, de la reacción de ligación 3', el cebador SR RT se hibridiza con el exceso del adaptador SR 3' (que permaneció libre después de la reacción de ligación 3') y transformó el adaptador 3' de ADN monocatenario en una molécula de ADN bicatenario (dsDNA, por sus siglas en inglés). Este paso es importante para evitar la formación de dímeros de adaptadores, además, los dsDNA no son sustratos para la ligadura mediada por ligasas T4 RNA -1 y, por lo tanto, no se ligan al adaptador SR 5' en el paso de ligadura posterior. Los adaptadores 5' son ligados al extremo 5' de miRs, siRs y piRs. Entonces, la primera cadena de cDNA se sintetizó utilizando Transcriptasa reversa M-MuLV (RNase H⁻). La amplificación por PCR se realizó utilizando enzima LongAmp Taq 2X Master Mix, cebadores SR para Illumina y índice (X). Los productos de PCR se purificaron en un gel de poliacrilamida al 8 % (100 V, 80 min). Los fragmentos de ADN correspondientes a 140~160 pb (la longitud del ARN pequeño no codificante más los adaptadores 3' y 5') se recuperaron y disolvieron en 8 µL de solución buffer de elución. Por último, la calidad de la biblioteca se evaluó en el sistema Agilent Bioanalyzer 2100 utilizando chips de alta sensibilidad de ADN. La secuenciación se realizó usando la estrategia de una sola cadena de 50 nucleótidos de longitud (single-end 50, SE50) en la plataforma Novaseq6000, correspondiente a una profundidad de 20 Millones de lecturas crudas por muestra (bibliotecas de aquí en adelante). Las bibliotecas fueron pre-procesadas usando los siguientes criterios para la filtración de datos: recorte de cebadores de 5' y 3', eliminación de etiquetas de inserción, inserción de gran tamaño, lecturas de baja calidad, etiquetas de polinucleótidos y etiquetas pequeñas. Luego, la puntuación de calidad base < 5, las lecturas que contenían N > 10 %, la contaminación de cebadores y etiquetas de polinucleótidos.

6.4 Evaluación de la calidad y limpieza de lecturas

La inspección de calidad de las lecturas pre-procesadas fue realizada con el conjunto de herramientas fastqc (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) y multiqc (github.com/ewels/MultiQC). Debido a la complejidad de biotipos presentes en las bibliotecas que se sintetizan a partir de los métodos de sRNA-seq, se realizó una inspección y filtrado de

biotipos que no son importantes para el estudio en cuestión usando la herramienta MiRTrace (github.com/friedlanderlab/mirtrace). MiRTrace (Kang et al., 2018) realiza un análisis basado en homología para trazar el origen y la presencia de posibles contaminantes de todas las lecturas contenidas en las bibliotecas de la siguiente manera: Las lecturas sRNA-seq se alinean primero con las secuencias precursoras de miRs contenidas de la base de datos mirBase v. 21 (Griffiths-Jones et al., 2013), luego las secuencias de ARNt contenidas en las bases de datos tRNADB y mitotRNADB (Juhling et al., 2009; trnadb.bioinf.uni-leipzig.de), y luego las secuencias ribosomales seleccionadas de las bases de datos de NCBI, SILVA (Quast et al., 2013) y Ensemble, sin permitir algún desajuste durante el alineamiento de secuencias (i.e. cero *mismatch*). Si no encuentra algún alineamiento, miRTrace rehará el mapeo con solamente una discrepancia permitida (i.e. un solo *mismatch*). Las lecturas se anotan según el tipo de ARN (i.e. biotipo) con el que se alineen primero. Las lecturas restantes sin mapear en alguna de las bases de datos antes mencionada, se alinean con una lista de “secuencias de artefactos” de los documentos de adaptadores Illumina, lo que requiere al menos una extensión de homología de 18 nucleótidos. Finalmente, las lecturas que no se asignan a ninguna de las anteriores bases de datos se marcan como “desconocidas” (Kang et al., 2018). Después de la limpieza de ARNt, ARNr y artefactos, las lecturas restantes fueron usadas en los pasos subsecuentes. El código de programación usado para reproducir esta etapa de la tesis puede ser obtenido del paso 1 en el anexo 1 de esta tesis y en la siguiente fuente: <https://github.com/RJEGR/Small-RNASeq-data-analysis/wiki/MicroRNA-analysis>.

6.5 Curación y procesamiento de bases de datos

6.5.1 Genoma de referencia

El genoma del abulón rojo usado corresponde al presentado por Griffiths y colaboradores (2022). Este fue generado mediante tecnología HiFi long-reads (Pacific Biosciences, CA) y Omni-C (Dovetail Genomics, CA), ensamblado a través de los protocolos de ensamble del proyecto de genómica de conservación de California (CCGP; Griffiths et al., 2022) y publicado en el Centro Nacional para la Información biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) bajo el bioproyecto PRJNA777175. La versión del genoma nuclear y mitocondrial usados corresponden al código de ensamble GCA_023055435.1 (615 andamios, 1.3 Gigabases) y JALGQA010000616.1 (1 andamio, 17 141 bases), respectivamente. Tanto el genoma nuclear (desenmascarado) como mitocondrial se concatenaron en un solo archivo tipo fasta. Lo anterior para permitir, durante los pasos subsecuentes, la anotación y descubrimiento de pequeños loci

que producen ARNs pequeños tanto del genoma nuclear como mitocondrial. Usando la herramienta seqkit (Shen et al., 2016) se eliminaron descripciones adicionales de los identificadores únicos de cada uno de los andamios; este paso fue requisito para suprimir errores técnicos durante los pasos bioinformáticos subsecuentes. Las anotaciones genéticas de regiones codificantes de proteína y clases no codificantes de todos los andamios del genoma nuclear, así como sus coordenadas fueron obtenidas en su formato de anotación general (GTF, por su siglas en inglés) a través de la plataforma de datos genómicos Ensembl (<https://metazoa.ensembl.org/info/data/ftp/>). El código de programación usado para reproducir esta etapa de la tesis puede ser obtenido del paso 2 en el anexo 1 de esta tesis y la siguiente fuente: <https://github.com/RJEGR/Small-RNASeq-data-analysis/wiki/MicroRNA-analysis>.

6.5.2 Análisis de los loci que codifican ARNs pequeños

Se construyó un catálogo de anotación genómica no redundante asignando anotaciones absolutas sobre el origen de los sRNAs (He et al., 2023). A partir del catálogo de genes GTF congelado, las anotaciones genómicas son categorizadas usando el sobrelape jerárquico de coordenadas con múltiples anotaciones usando la siguiente selección de anotaciones preferencial: Elementos repetidos (ER) > UTR > Exon > CDS > ARNt > ARNr > lncARN > snoARN > srpARN > snARN > Intergénico > Intragénicos. Mientras que los ARNs pequeños que mapean en regiones con anotación protein_coding, misc_RNA, pseudogene, mRNA y gene fueron reasignados a la categoría Intragénicos, los ARNs pequeños que mapean en regiones sin anotación fueron anotados como intergénicos (Graham et al., 2019). A partir del paquete GenomicRanges en R (Lawrence et al., 2013) se programó una función que permite reducir las anotaciones superpuestas dentro del genoma (i.e. características intra-rango). El código de programación usado para reproducir esta etapa de la tesis puede ser obtenido del paso 3 en el anexo 1 de esta tesis y la siguiente fuente: <https://github.com/RJEGR/Small-RNASeq-data-analysis/wiki/MicroRNA-analysis>.

6.5.3 miRs conocidos de referencia

Para la identificación de miRs conocidos se implementó la base de datos MirGeneDB (Fromm et al., 2015). A la fecha, esta base incluye más de 16,000 registros, correspondiendo a 1,500 familias de miRs a partir de 75 especies de distintos metazoarios (Fromm et al., 2022). A diferencia de otras fuentes usadas, MirGeneDB contiene únicamente registros que han sido

anotados y validados experimentalmente, lo que permite una descripción robusta en el descubrimiento de miRs. Posteriormente, se implementó la base mirBase v. 22, como fuente de información adicional para identificar otros miRs conocidos a partir de anotación *bona fide* en shortstacks. Adicionalmente, se implementó una base de referencia que contiene la predicción de miRs con identidad en miRbase, usando criterios estructurales a partir de genomas de 35 especies de moluscos (Huang et al., 2021). Un total de 2,557 secuencias únicas de miRs maduras fueron recuperadas del material suplementario para su implementación en la búsqueda de miRs conocidos derivados de moluscos. La identificación con estas bases de datos se consideró como verdadera si una isla anotada como miR tiene igual o más de 18 nucleótidos de identidad exacta con algún registro de la base de mirBase o base de datos de miRs en otros moluscos. El código de programación usado para reproducir esta etapa de la tesis puede ser obtenido del paso 2 y 4 en el anexo 1 de esta tesis y la siguiente fuente: <https://github.com/RJEGR/Small-RNASeq-data-analysis/wiki/MicroRNA-analysis>.

6.5.4 Anotaciones de elementos repetidos en el genoma del abulón rojo

El término de elementos repetidos (ER) designa diferentes estructuras de nucleótidos, desde varias secuencias de baja complejidad hasta estructuras altamente complejas como los elementos transponibles. La anotación de esta característica genómica es importante ya que se sabe que varios ARNs pequeños de interferencia, incluyendo miRs, piRs y siRs pueden derivar o regular regiones ricas en ERs (Aravin et al., 2001; Matzke et al., 2014; Holoch et al., 2015). El alto contenido de elementos repetidos que se observa a lo largo de genomas de otros moluscos (Gomes-dos-Santos et al., 2020) sugiere que la anotación de ERs es importante para el abulón rojo. Para identificar elementos repetidos dentro el genoma del abulón rojo se usó la herramienta RepeatMasker 4.1.4 (www.repeatmasker.org) para realizar una predicción basada en homología de secuencias y perfiles derivados de modelos ocultos de Markov (Smit et al., 2013). Lo anterior involucró el uso de la base de datos con elementos repetidos conocidos Dfam 3.7 (Storer et al., 2021). Después de realizar la instalación del programa RepeatMasker, se evaluó regiones del genoma nuclear y mitocondrial (616 andamios) que presentan elementos repetidos. La herramienta en cuestión se utilizó configurando manualmente para permitir la anotación de ERs presentes en Dfam. El código de programación usado para reproducir esta etapa de la tesis puede ser obtenido del paso 2 y 4 en el anexo 1 de esta tesis y la siguiente fuente: <https://github.com/RJEGR/Small-RNASeq-data-analysis/wiki/MicroRNA-analysis>.

6.6 Ensemble, anotación y cuantificación de ARNs pequeños

La herramienta ShortStacks v. 4.0 (Axtell 2013) fue descargada e instalada manualmente de la siguiente fuente github.com/MikeAxtell/ShortStack. Con base en los patrones de alineación de ARN pequeño, shortstacks proporciona descripciones detalladas de las poblaciones de ARN pequeño como potenciales candidatos de ARNs pequeños de función regulatoria (islas de aquí en adelante). A partir de secuencias conocidas de miRs (obtenidos de la base de datos MirGeneDB) que se mapean con el genoma del abulón rojo, se realiza la búsqueda de loci que cumplan con los requisitos basados en la expresión y estructura secundaria para la identificación de locus de miRs (“--known_miRNAs”). Para realizar un análisis más completo de todo el genoma, se implementó una búsqueda *de novo* (“--dn_mirna”) para no limitar el análisis de miRs a los loci identificados únicamente a partir de las secuencias conocidas de miRs. Las islas de ARN pequeños encontrados inicialmente se fusionan si la distancia nucleotídica entre ellos es menor o igual que el valor del parámetro “pad”. Se usó “--pad 1” para recuperar formación mínima de islas (Shahid et al., 2013; Bermúdez-Barrientos et al., 2020). La cobertura de mapeo para definir las islas durante la búsqueda de novo fue de 0.8 (“--mincov 0.8”), que corresponde a la profundidad mínima de alineamiento, en unidades de lecturas por millón, necesarias para nuclear un grupo de ARNs pequeños durante la búsqueda de grupos de novo. Debido a que algunos ARNs pequeños de importancia regulatoria difieren en tamaño del intervalo predeterminado de 20 a 24 nucleótidos (Shahid et al., 2013), el parámetro dicermx fue ajustado a “--dicermx 30” para mejorar la detección *bona fide* de piRs (Axtell 2013). El modo en que se manejaron los mapeos múltiples fue “--mmap u”. El código de programación usado para reproducir esta etapa de la tesis puede ser obtenido del paso 5 en el anexo de esta tesis y la siguiente fuente: <https://github.com/RJEGR/Small-RNASeq-data-analysis/wiki/MicroRNA-analysis>.

6.7 Predicción de la función regulatoria de miRs

A partir del catálogo de anotaciones GTF y el genoma curado del abulón rojo se extrajo las secuencias correspondientes a las regiones no traducidas (UTR). El conjunto de regiones UTR usadas para la predicción de blancos correspondió a 54 432 regiones UTR únicas del extremo 3'. Este procedimiento se realizó usando la función subseq del programa seqkit. Debido a la existencia de duplicados en el genoma del abulón, se realizó la de-replicación de las secuencias UTR con la función rmdup del programa seqkit en Linux. Después del ensamble de ARNs

pequeños (Figura 21), las lecturas únicas más abundantes anotadas como miR verdaderos fueron utilizadas para evaluar cualquier función regulatoria. La herramienta RNAhybrid (Krüger et al., 2006) y TargetScan (Vikram et al., 2015) fueron usadas en paralelo para predecir la unión miR:ARNm (UTR). Para el algoritmo de RNAhybrid, la energía mínima libre (kcal/mol) de unión (duplex), calculada al menos para la posición 2 a la 8 entre el duplex miR:ARNm, y valores p (pval), derivados de la estimación de parámetros de distribución de valores extremos a partir de datos conocidos (3utr_human), fueron usados para estimar las interacciones miR:ARNm. Por otro lado, los parámetros por defecto fueron usados para el algoritmo de TargetScan. Ya que combinar resultados de distintas herramientas predictoras enriquece el desempeño de esta etapa del análisis (Oliveira et al., 2017), los resultados interceptados entre ambas herramientas fueron considerados como blancos válidos. Finalmente, la ontología génica (GO) de los genes blanco fue obtenida mediante Trinotate (Bryant et al., 2017), y usada como información para describir los procesos biológicos que son regulados por la vía de miRs. Un análisis de enriquecimiento ontológico y reducción de términos ontológicos se realizó con la herramienta topGO (Alexa y Rahnenfuhrer, 2023) y rrvgo (Sayols, 2023), respectivamente. El código de programación usado para reproducir esta etapa de la tesis puede ser obtenido del paso 6 en el anexo 1 de esta tesis y la siguiente fuente: <https://github.com/RJEGR/Small-RNASeq-data-analysis/wiki/MicroRNA-analysis>.

6.8 Análisis de expresión diferencial y co-expresión de ARNs pequeños

Para esta etapa del análisis se implementó el programa estadístico DESEQ2 (Love et al., 2014) dentro del lenguaje de programación R. Para comparar visualmente la expresión diferencial de miRs, los valores de expresión fueron estandarizados mediante el cálculo del valor z y la siguiente fórmula:

$$\text{valor } z = (x - \mu) / ds; \quad (5)$$

donde x es el valor de expresión de los miRs en cada muestra menos su valor promedio μ , dividido entre su desviación estándar (ds). En adición, se elaboró un análisis de co-expresión ponderado (Langfelder y Horvath, 2008) basado en la matriz de conteos de miRs para identificar, no solamente miRs expresados diferencialmente, sino para evaluar posibles vías de co-expresión de miRs (Módulos de aquí en adelante) en respuesta al desarrollo larval o estrés por acidificación. El código de programación usado para reproducir esta etapa de la tesis puede

ser obtenido del paso 7 en el anexo 1 de esta tesis y la siguiente fuente:
<https://github.com/RJEGR/Small-RNASeq-data-analysis/wiki/MicroRNA-analysis>.

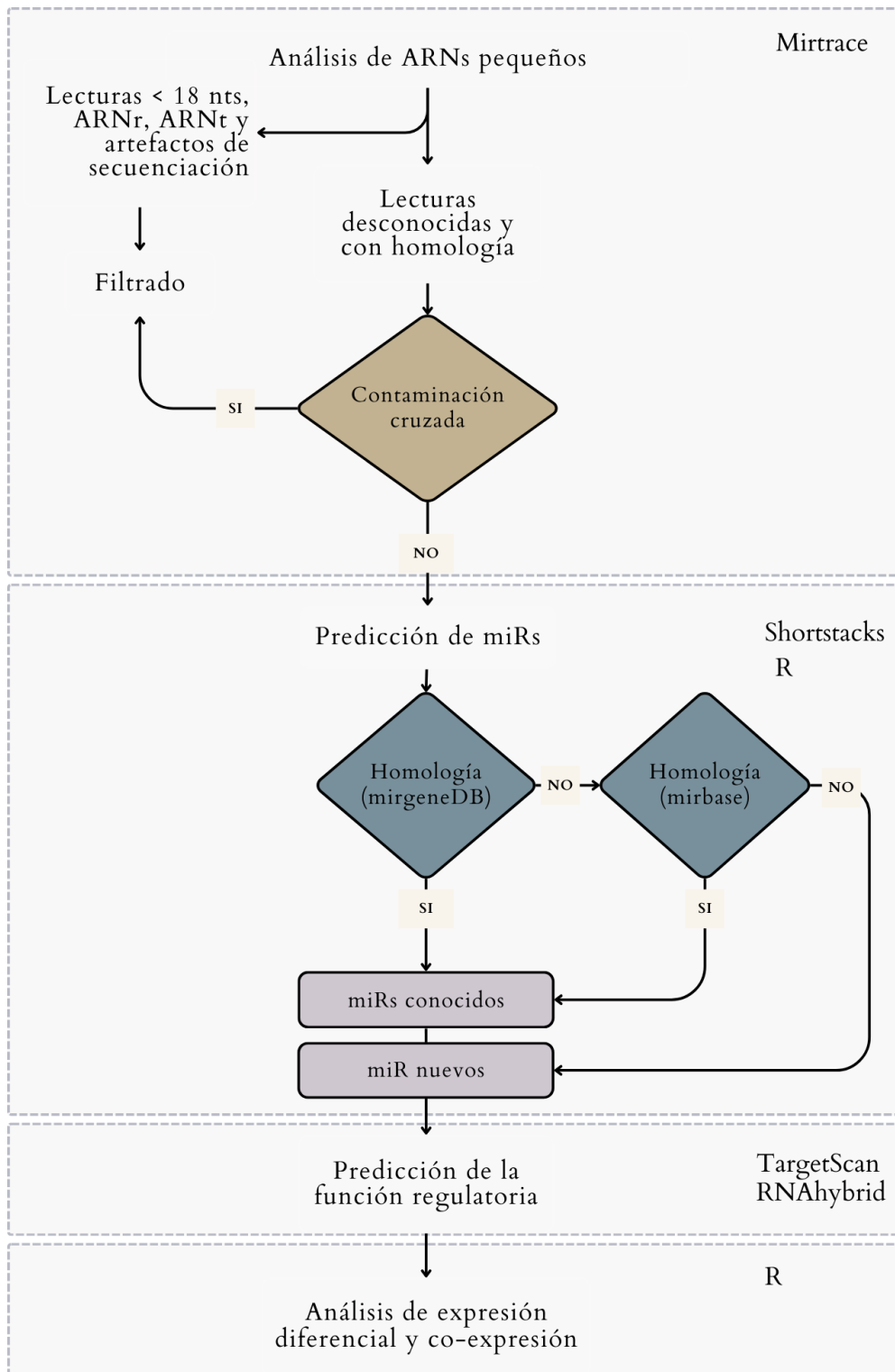


Figura 21. Diagrama de flujo del análisis bioinformático realizado para el ensamblaje, anotación y cuantificación de ARNs pequeños, incluyendo microARNs.

7. Resultados

7.2 Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue medido durante las 4 etapas del desarrollo velígero, en condiciones de agua marina a pH 8.0, 7.8 y 7.6 ($n = 6$, Tabla 7). En cualquiera de las condiciones, la tasa metabólica varió de manera significativa dependiendo la etapa de desarrollo larval del abulón rojo (ANOVA, $p = 2.15^{-19}$, $n = 79$). Pero también en relación con el reto de acidificación en comparación a los valores de pH óptimo (prueba Tukey, Tabla 7).

Tabla 7. Tasas de respiración promedio \pm DS ($\text{pmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ Ind}^{-1}$). Se muestran los puntos de corte ajustables de P: <0.001 (***), <0.01 (**), <0.05 (*) y >0.05 (ns).

| | pH 8.0 | pH 7.8 | pH 7.6 |
|--------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| 24 hpf | 51.19 \pm 10.21 | 38.87 \pm 1.94 | 73.3 \pm 15.62 (**) |
| 48 hpf | 21.25 \pm 13.27 | 46.48 \pm 2.8 (***) | 33.25 \pm 13.39 |
| 60 hpf | 2.84 \pm 7.25 | 4.38 \pm 8.57 | 8.19 \pm 19.74 |
| 110 hpf | 19.27 \pm 2.38 | 25.15 \pm 2.69 | 30.11 \pm 4.48 |
| Total ¹ | 94.55 | 114.88 (*) | 144.85 (***) |

¹Cantidad total de oxígeno consumido durante los días de desarrollo larval evaluados.

Aquí, la utilización de energía equivalente al oxígeno consumido a las 24, 48, 60 y 110 hpf en condiciones de pH 8.0, resultó en una asignación energética del 54, 23, 4 y 20% respecto a la cantidad total de oxígeno consumido durante la maduración velígera (Figura 22A). La asignación energética resultó similar entre el tratamiento de pH 7.8 y 7.6 (Figura 22B, C), sin embargo, la suma de energía equivalente a la cantidad total de oxígeno consumido durante toda la maduración velígera resultó en tasas metabólicas aumentadas en respuesta a la acidificación de 94.5, 114.8 y 144.85 $\text{pmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ Ind}^{-1}$ para larvas cultivadas a pH 8.0, 7.8 y 7.6, respectivamente.

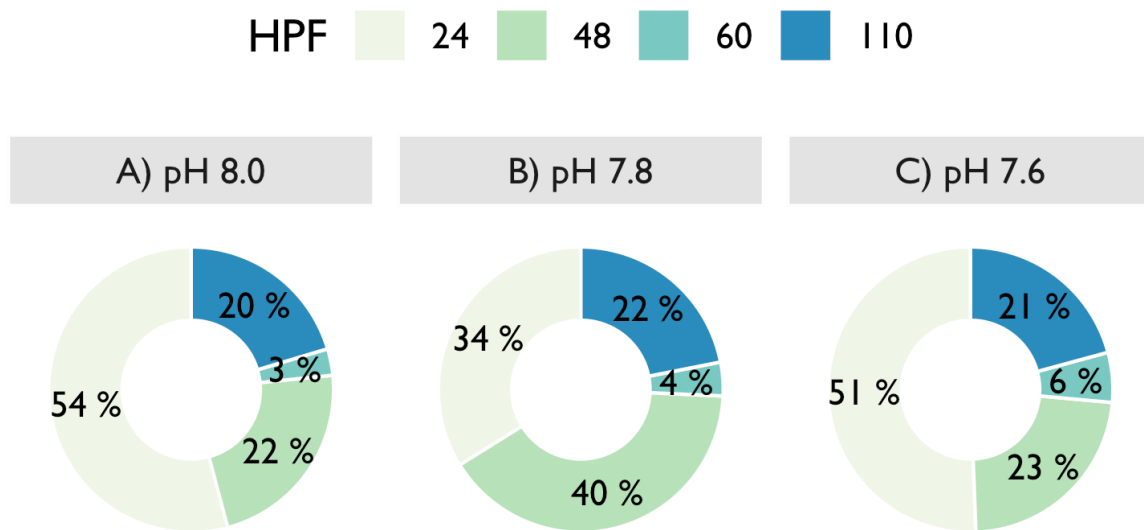


Figura 22. Asignación de energía durante el desarrollo temprano de vida del abulón rojo *H. rufescens*. Utilización de energía equivalente respecto a la cantidad total de oxígeno consumido

Aunque el aumento antes mencionado no difirió (ANOVA, $p = 0.241$, $n = 80$), el consumo de oxígeno de larvas a las 24 y 110 hpf fue significativamente elevado bajo condiciones de pH 7.6 (ANOVA, $P = 3.61^{-7}$, $n = 23$). El incremento en la tasa metabólica en respuesta a la acidificación fue persistente en larvas a pH 7.6, aunque no significativo, a lo largo del desarrollo larval a las 48 y 60 hpf (Figura 23A). Durante las 24 y 110 hpf la tasa metabólica promedio de larvas cultivadas a pH 7.6 superó al de larvas cultivadas a pH 8.0 (t test, p adj < 0.01 , Tabla 7). Este aumento en la tasa metabólica fue de 43 % en promedio para larvas a las 24 hpf y 64% en promedio para larvas a las 110 hpf (Figura 23B-C). Durante las 24 hpf la tasa metabólica (promedio \pm DS) de larvas cultivadas a pH 8.0 y 7.6 fue de 51.19 ± 10.21 y 73.3 ± 15.62 $\text{pmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ Ind}^{-1}$, respectivamente (Figura 23B). Mientras que a las 110 hpf, la tasa metabólica fue 19.27 ± 2.38 y 30.11 ± 4.48 $\text{pmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ Ind}^{-1}$ (Figura 23C).

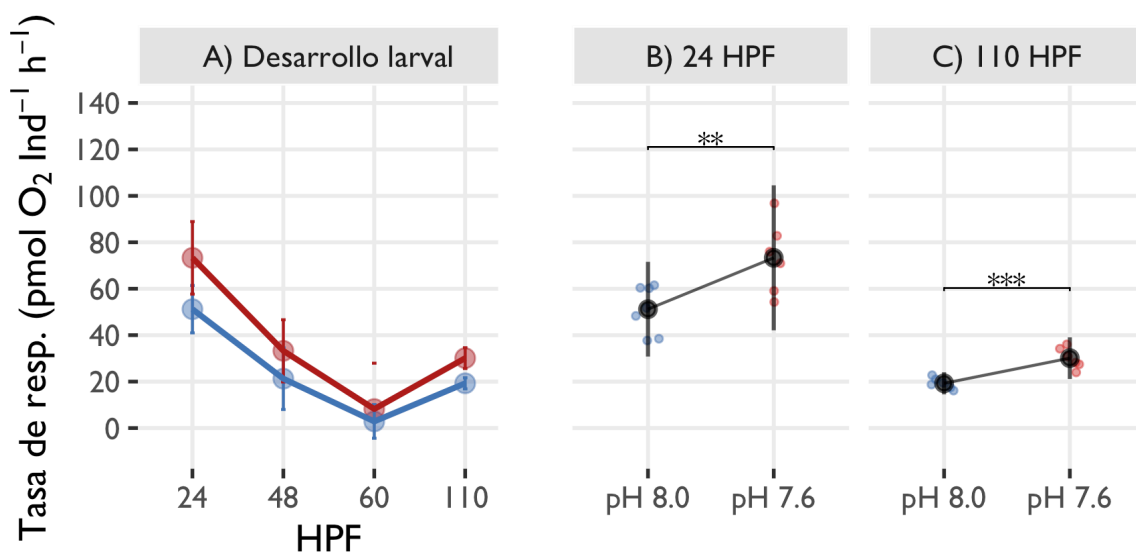


Figura 23. Tasas de respiración durante el desarrollo larval del abulón rojo *H. rufescens*. A) Durante el desarrollo larval de *H. rufescens*, criadas en pH 8.0 (Línea continua azul) y pH 7.6 (Línea continua roja). Las 24 y 110 horas después de la fertilización (hpf) contribuyeron significativamente al aumento en las tasas metabólicas observadas.

7.3 Extracción de ARN y secuenciación de bibliotecas de ARNs pequeños

A partir de 500 a 3000 larvas por muestra ($n = 12$), se obtuvo una cantidad de ARN total de $3.7 \pm 0.7 \mu\text{g}$ (promedio \pm DS) y calidad 260/280 de 1.9 ± 0.1 (Tabla 8). Las muestras fueron enviadas a Novogene (USA, California) para el servicio de preparación de bibliotecas y secuenciación. Un total de 299, 029, 713 lecturas crudas (SE50) fueron obtenidas a través de la plataforma de secuenciación Novaseq6000, de las cuales 254,600,170 (85%) lecturas superó los estándares de calidad de Novogene ($21,216,681 \pm 6,569,269$ lecturas de calidad por muestra). Posteriormente, se realizó un filtrado de calidad adicional que incluye la retención de lecturas con las siguiente características: Calidad Phred promedio > 30 , Nucleótidos de Longitud (nts) ≥ 18 , selección de lecturas con homología en alguna de las bases de datos de miRs, y lecturas desconocidas. Las lecturas de calidad anotadas como desconocidas y miRs sumaron un 100,539,743 lecturas de calidad (40%) y fueron usadas como información coherente para los subsecuentes análisis bioinformáticos (Figura 21).

Tabla 8. Extracción de ARN y resultados de secuenciación. (Requerimientos: ARN total ≥ 2 ug; Volumen de la muestra ≥ 20 μ L; Concentración ≥ 50 ng/ μ L).

| hpf | pH | [ng / μ L] | 260/280 | ARN Total (μ g) | Lecturas secuenciadas | Lecturas de calidad | Con homología y desc. | Mapeos Unicos | Mapeos cruzados | miRs |
|-----|-----|----------------|---------|----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------|-----------------|------|
| 24 | 7.6 | 118.9 | 1.8 | 4.76 | 19,716,690 | 18,675,128 | 7,219,091 | 2,562,947 | 4,336,208 | 144 |
| 24 | 7.6 | 101.3 | 1.83 | 4.05 | 24,324,391 | 21,462,911 | 1,055,749 | 333,827 | 652,593 | 133 |
| 24 | 7.6 | 106.2 | 1.88 | 4.25 | 30,669,685 | 26,696,497 | 5,292,071 | 2,149,578 | 2,905,025 | 141 |
| 24 | 8.0 | 94.6 | 1.78 | 3.78 | 26,662,197 | 25,867,495 | 17,875,754 | 6,747,736 | 10,065,266 | 140 |
| 24 | 8.0 | 53.7 | 1.71 | 2.15 | 29,644,533 | 29,085,397 | 26,321,560 | 9,485,520 | 15,211,630 | 144 |
| 24 | 8.0 | 93.9 | 1.83 | 3.76 | 31,927,138 | 30,574,969 | 20,284,616 | 7,963,629 | 11,167,414 | 144 |
| 110 | 7.6 | 76.4 | 2.09 | 3.06 | 19,189,136 | 16,637,068 | 5,162,778 | 2,913,286 | 1,832,797 | 134 |
| 110 | 7.6 | 82.2 | 2.0 | 3.29 | 19,796,441 | 17,159,495 | 7,499,062 | 4,181,734 | 2,368,818 | 136 |
| 110 | 7.6 | 98.3 | 1.98 | 3.93 | 20,900,136 | 15,163,815 | 4,706,048 | 2,506,256 | 1,696,652 | 135 |
| 110 | 8.0 | 100.8 | 2.11 | 4.03 | 19,495,193 | 14,132,550 | 2,027,365 | 1,197,284 | 641,467 | 133 |
| 110 | 8.0 | 101.3 | 2.1 | 4.05 | 21,425,865 | 11,284,703 | 168,063 | 60,891 | 74,280 | 100 |
| 110 | 8.0 | 95 | 2.12 | 3.80 | 35,278,308 | 27,860,142 | 2,927,586 | 1,553,205 | 1,131,719 | 136 |

7.4 Composición de las lecturas sRNA-seq

La composición de lecturas de calidad entre los 21 a 24 nucleótidos de longitud (nts) presentes en todas las muestras resultó en una alta frecuencia de miRs conocidos (Figura 24A). La longitud de nucleótidos (nts) es un criterio útil para aproximar *a priori* la función biológica de ARNs pequeños, incluyendo miRs (Axtell, 2013). Los resultados observados son consistentes con el tamaño de fragmentos esperados de miRs en otros metazoarios, incluyendo moluscos (Rosani et al., 2021).

Además, las lecturas de calidad anotadas a miRs resultaron “libres de contaminación cruzada” ya que el origen de los miRs conocidos identificados a través de MirTrace (> 99%) pertenecen al clado específico lótrocozoos (lophotrochozoa, *sensu stricto*), en el cual está conformado por moluscos espirales (i.e. que presenta segmentación espiral del huevo), que se originan a partir de larvas trocóforas, tal como el abulón rojo (Figura 25A-D).

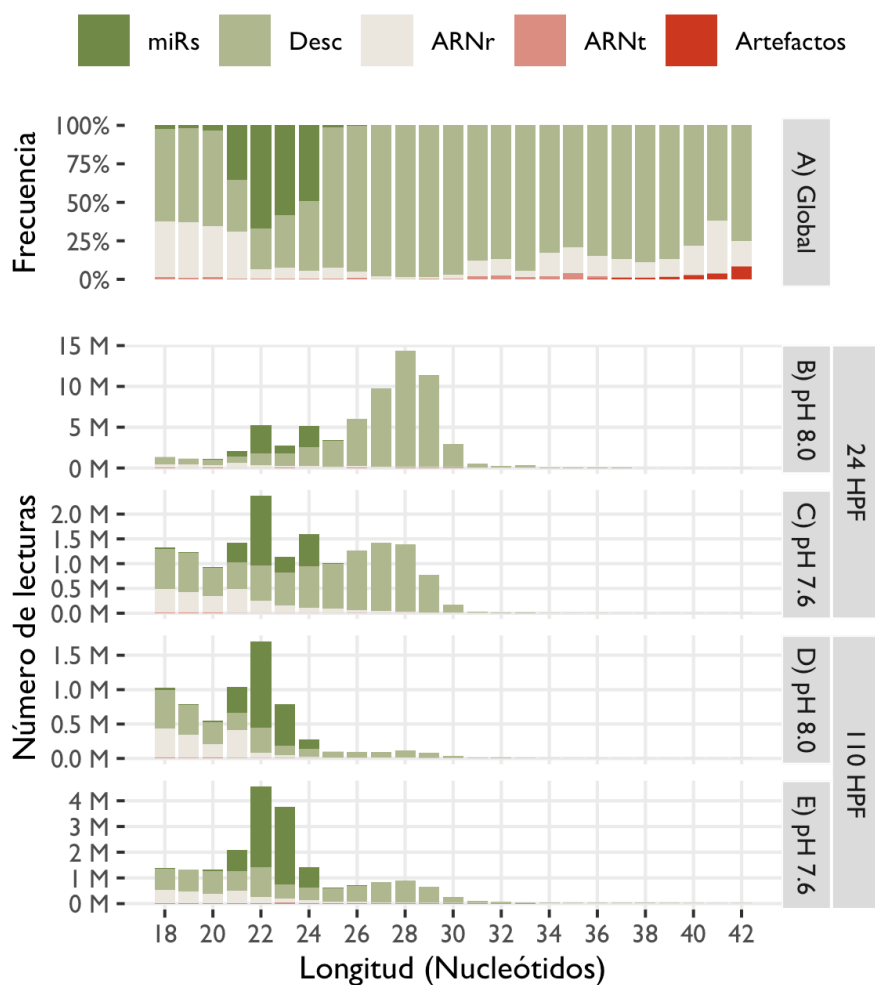


Figura 24. Distribución de lecturas de calidad obtenidas de la secuenciación de ARNs pequeños. (A) Composición global de biotipos para cada tamaño de lecturas. La frecuencia de lecturas por grupo de muestras es observado (B-E).

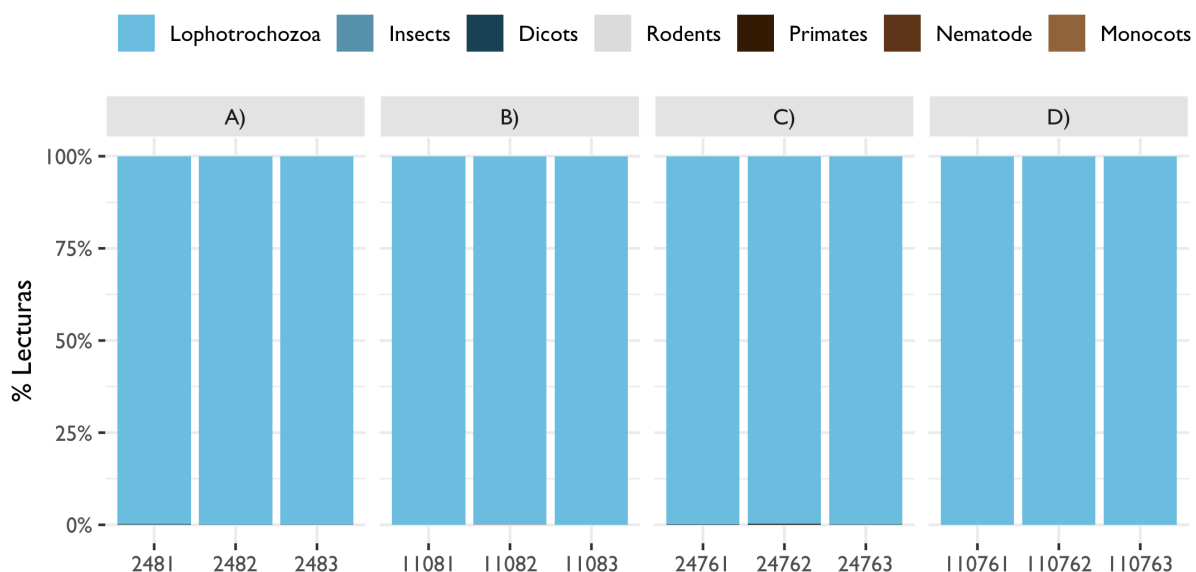


Figura 25. Identidad de las lecturas anotadas a algún miR en las bibliotecas de secuenciación (A-C).

Por otro lado, se identificó una alta frecuencia de lecturas desconocidas en tamaños de longitud entre 26 a 30 nts, mayormente en muestras a las 24 hpf (> 5 M lecturas), en ambos bioensayos, pH 8.0 (Figura 24B) y pH 7.6 (Figura 24C). Los fragmentos identificados como ARNr, ARNt y artefactos se encontraron presentes con una mayor frecuencia en intervalos de 18 a 21 y 31 a 42 nts, pero representando globalmente un 4% (10,762,425 lecturas) de las lecturas totales (Figura 24A). Es importante notar que los ARN pequeños derivados de la fragmentación de ARN abundantes, tales como ARNr y ARNt, a menudo tienen una distribución de tamaño más dispersa (Axtell, 2013), especialmente dentro de la distribución de tamaños muy pequeños, que excede el rango de tamaño normalmente asociado con aquellos ARNs pequeños que derivan en componentes funcionales en alguna ruta de regulación génica. De hecho, las lecturas inferiores a 18 nts representaron residuos derivados de ARNt, ARNr y artefactos de secuenciación por lo que las lecturas iguales e inferiores a este tamaño quedaron descartadas.

7.5 Origen de los mapeos

Un total de 6,799,981 (7%) lecturas de calidad no presentaron mapeo (ningún hit) con el genoma del abulón rojo. Por otro lado, 41,655,893 lecturas de calidad (41%) presentaron mapeos únicos en el genoma, mientras que 52,083,869 (52%) presentaron mapeos cruzados (i.e. múltiples) a lo largo del genoma (Tabla 8). Esto último se atribuye a que los ARNs

pequeños tienen la tendencia de originarse a partir de múltiples loci parálogos en muchos genomas (Cuperus et al., 2011; Matzke et al., 2014). Debido a su corta longitud (50 nt), el mapeo cruzado que se presenta a partir de lecturas sRNA-seq debe realizarse estratégicamente (Johnson et al. 2016). Sin embargo, los mapeos únicos incrementaron generalmente en lecturas de entre 21 a 24 nts, mientras que la proporción de los mapeos múltiples incrementaron en lecturas inferiores a 21 o superiores a 24 nts (Figura 26).

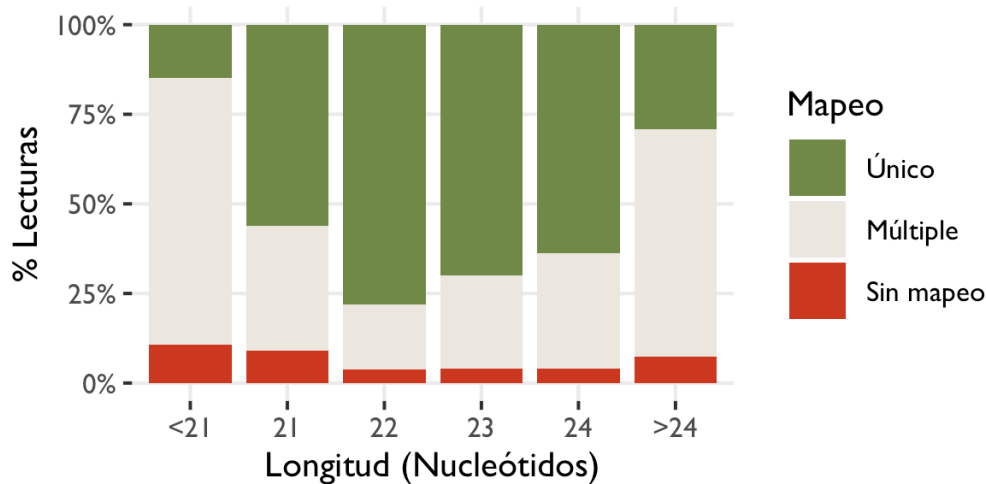


Figura 26. Origen de los mapeos a lo largo del genoma del abulón rojo. Fracción de lecturas por categoría del tipo de mapeo (paleta de colores). Los mapeos únicos incrementan entre lecturas de 21 a 24 nucleótidos de longitud (eje x).

7.6 Ensamble, anotación y cuantificación de miRs

Se identificó un total de 66,226 grupos diferentes de ARNs pequeños ensamblados en el genoma del abulón rojo. A lo largo de 30 andamios del genoma nuclear del abulón rojo, un total de 147 grupos (22,029,273 lecturas de calidad) pasaron los criterios estructurales, cobertura, prevalencia y longitud y fueron clasificados como loci de miRs, resultado en la clasificación *bona fide* de miRs (Figura 27).

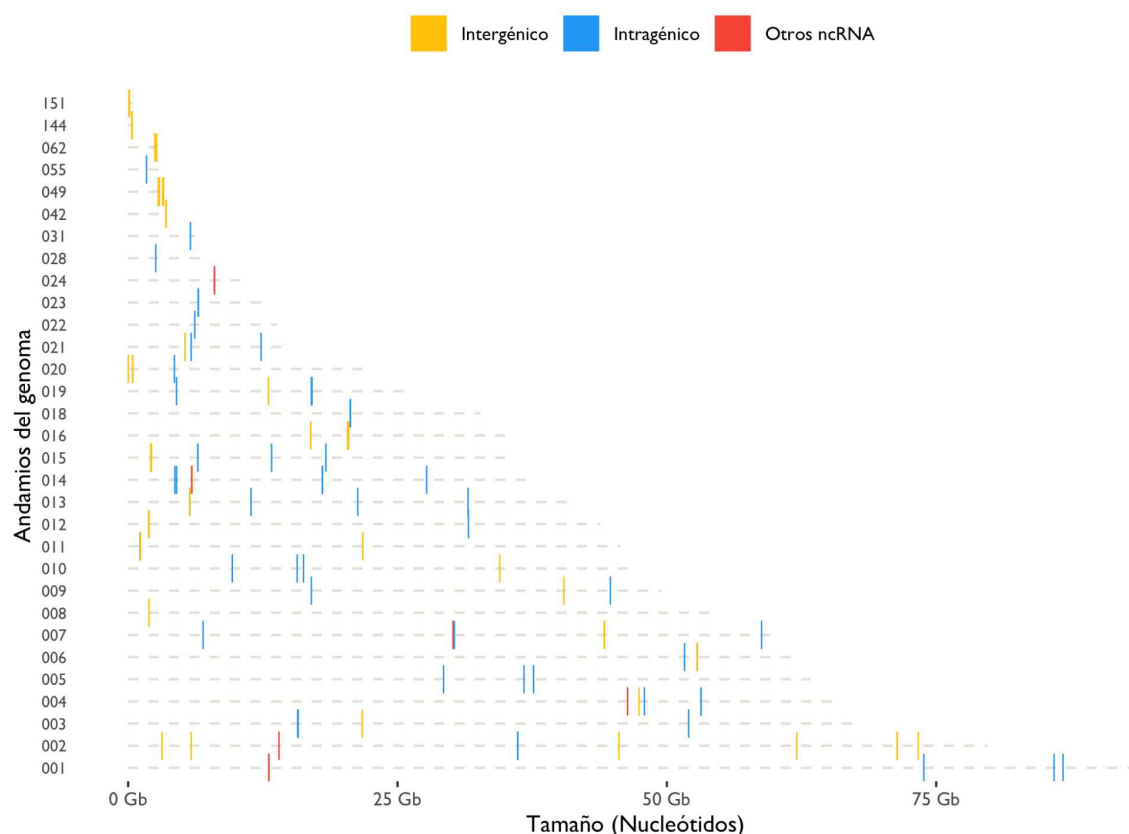


Figura 27. Sitios en el genoma del abulón rojo (eje y) que fueron fuente de miRs intergénicos intragénicos. El tamaño de los andamios del genoma se presenta en el eje x. El origen de los miRs aparece por su categoría: Intergénico, intragénico u otro ARN no codificante.

De este grupo, 68 resultaron ser de identidad nucleotídica en MirgeneDB, correspondiendo a miRs conservados en otros grupos de metazoarios, tales como Bilaterales (41), Protosomados (14), Lofotrocozoos (5), Eumetazoos (3), Moluscos (4) y platitrocozoos (1). Mientras que el subconjunto restante (79) resultaron en loci genómicos que pasaron los criterios antes mencionados, excepto la homología con relación a la base de datos MirgeneDB. A partir de este subconjunto de miRs, el segundo análisis identificó la identidad nucleotídica (> 85% identidad) de miRs con la base de datos Mirbase. Estos corresponden a 7 miRs conservados a lo largo de 32 especies distintas de moluscos Gasterópodos y Bivalvos, así como Equinodermos (Tabla 9; Wheeler et al., 2009; Peterson et al., 2013; Fromm et al., 2015; Huang et al., 2021). El conjunto restante de miRs (72) no presentaron identidad con alguna de las bases de datos usadas, y sugieren ser específicos de la especie o transitorios durante el desarrollo larval de *H. rufescens* ya que se originaron a partir del genoma del abulón rojo. Todos los miRs identificados presentaron una distribución de tamaño de entre 21 a 24 nts. Una de las características en *cis*

identificadas a lo largo de los miRs fue la inclinación del primer nucleótido en el extremo 5' por iniciar con uracilo (Figura 28A), en contraste con otros ARNs no codificantes identificados en las bibliotecas de secuenciación, de las cuales no se identifica un sesgo similar en el primer nucleótido en el extremo 5' (Figura 28C, D).

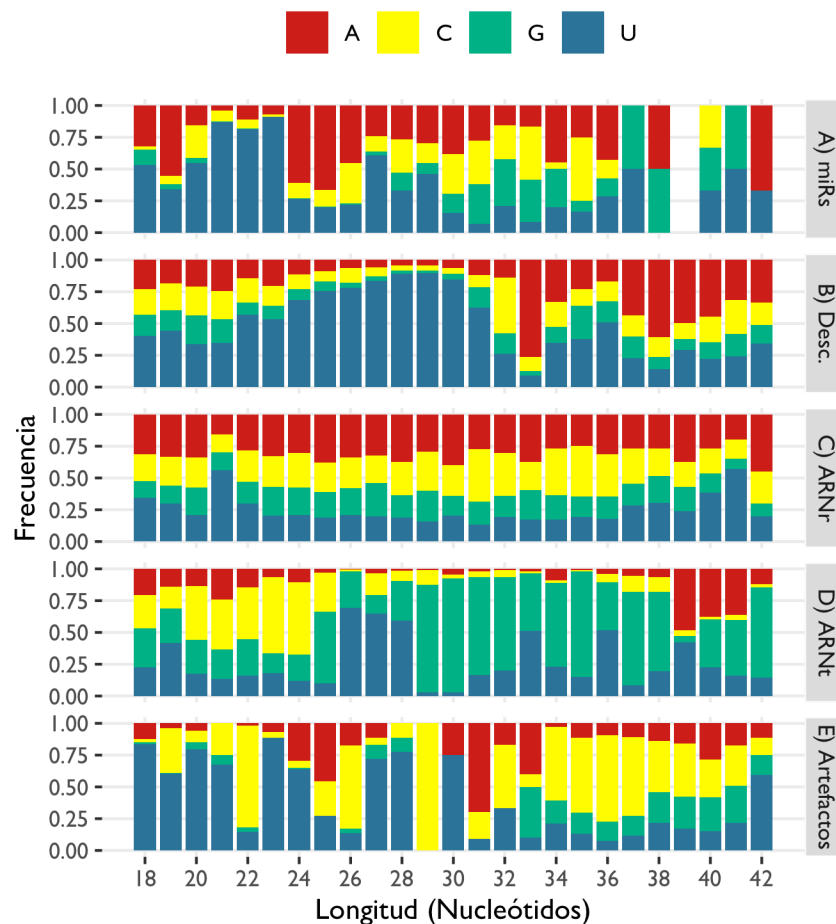


Figura 28. Preferencia del primer nucleótido en el extremo 5' de las lecturas de calidad obtenidas de la secuenciación de ARNs pequeños. Lecturas con mayor distribución entre los 18 a 24 nucleótidos de longitud con identidad a miRs, presentan un sesgo a inicia con el nucleótido uracilo (A), a diferencia del resto de los otros biotipos tales como desconocidos, ARNr, ARNt y artefactos(C-E).

7.7 Anotaciones de elementos repetidos en el genoma del abulón rojo

Un total de 40,803,422 bases del genoma (3.06%) fueron enmascaradas como posibles elementos repetidos correspondientes a las siguientes superfamilias: elementos nucleares largos (8623, 0.24%) y cortos (2,030, 0.01%), repetición terminal larga (5,765, 0.17%), elementos DNA (5,234, 0.14%), repeticiones intercaladas (0.58%), satélites (3,336, 0.07%), repeticiones

simples (407,504, 1.85%), de baja complejidad (23,844, 0.11%) y otros ARNs pequeños (93659, 0.44%). Un total de 123,905 y 2,472 lecturas de calidad figuraron como posible fuente de siRs (22 clusters) y piRs (2 clusters), respectivamente, derivaron de elementos repetidos dentro del genoma del abulón rojo (Tabla 9). Ninguna anotación relacionada a elementos repetidos estuvo asociada con las coordenadas genómicas en las que se identificaron fuentes de miRs.

Tabla 9. Sitios en el genoma del abulón rojo que codifican microARNs y otros ARNs pequeños durante el desarrollo de vida temprana. Número de lecturas, y clusters en paréntesis.

| | miRs ¹ | miRs <i>bonafide</i> | piR | siR |
|---------------------|-------------------|----------------------|---------------|--------------------|
| Intergénico | 10,834,463 (30) | 304,893 (51) | 46,987 (33) | 14,286,189 (1,822) |
| Intragénico | 7,900,611 (39) | 890,583(20) | 379,240 (265) | 1,536,455 (282) |
| Otros ncRNAs | 2,092,587 (6) | 6,136 (1) | 184,370 (68) | 44,987 (6) |
| Elementos repetidos | 0 | 0 | 2,472 (2) | 123,905 (22) |

¹miRs con homología en mirgenDB o Mirbase

7.8 Análisis de los loci que codifican miRs

Un 55 % de los grupos anotados como miRs (81 miRs) se localizaron dentro de regiones intergénicas (i.e. Derivaron de transcritos independientes) sugiriendo la presencia de miRs canónicos en el abulón rojo. Estos resultados son coherentes con otros estudios, en los que se ha demostrado que, aproximadamente, la mitad de los miRs se encuentran dentro de regiones intergénicas en una variedad de especies, desde *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens* y *Mus musculus* (Hinske et al., 2010). Por otro lado, el 40 % de miRs derivaron de regiones intragenicas, incluyendo intrones (53 miRs) y exones (6 miRs). Estos miRs no canónicos (también conocidos como mirtrones) son considerados una fuente alternativa de regulación postranscripcional que se originan desde regiones no traducidas y marcos de lectura abierto de genes codificantes e incluyen un procesamiento independiente de DROSHA y DICER. La vía intragenica se fusiona con la vía canónica de miRs durante la exportación de horquilla y procesamiento en el citoplasma mediante enzimas DICER (Okamura et al., 2007; Berezikov et al., 2010; Castellano et al., 2013). Un 4% de los miRs (6 conocidos y uno *bona fide*) codificaron a partir regiones del genoma del abulón rojo anotadas como no codificantes asociadas a ARNs largos (lncARNs, Tabla 9). Finalmente, se observó que aquellos

miRs en los que sus niveles de expresión fueron elevados en respuesta a la acidificación eran en su mayoría codificados a partir de regiones intragénicas (15 miRs), sugiriendo que la fuente intragénico representa una vía necesaria en respuesta al estrés de la acidificación. De manera contraria, aquellos miRs que su expresión no cambió durante el desarrollo larval, a pesar del efecto de la acidificación, fueron mayormente codificados a partir de regiones intergénicas (Tabla 10), indicando que la regulación génica mediada por miRs durante el desarrollo larval depende de una fuente conservada de miRs.

Tabla 10. Loci del genoma del abulón rojo que codifican miRs en respuesta a la acidificación o temporales del desarrollo de vida temprana. Número de lecturas, y clústeres en paréntesis.

| | Acidificación | Desarrollo Larval |
|--------------|--------------------|---------------------|
| Intergénico | 2,582,433 (9, 36%) | 8,292,092 (59, 59%) |
| Intragénico | 237,317 (15, 60%) | 1,114,239 (36, 36%) |
| Otros ncARNs | 24,654 (1, 4%) | 103,490 (5, 5%) |

7.9 Predicción de la función regulatoria de miRs

Un conjunto de 5,674 y 866 regiones UTR únicas del extremo 3', resultaron predicciones válidas a partir de las herramientas RNAhybrid y TargetScan, respectivamente. La intersección entre los resultados RNAhybrid y TargetScan resultaron en 1,822 predicciones a lo largo de 130 genes candidatos, que fueron usadas para describir la función regulatoria de miRs. El 58.75% de los genes predichos como blanco presentaron información asociada a su función biológica con la base de datos de ontología génica (GO, por sus siglas en inglés).

7.10 Análisis de expresión diferencial de miRs

El perfil de expresión de miRs fue diferente entre las 24 y 110 hpf. La expresión permaneció diferenciada en comparación al reto de acidificación (Figura 29). Lo que demuestra que el procesamiento bioinformático fue técnicamente confiable y adecuado para el análisis de miRs.

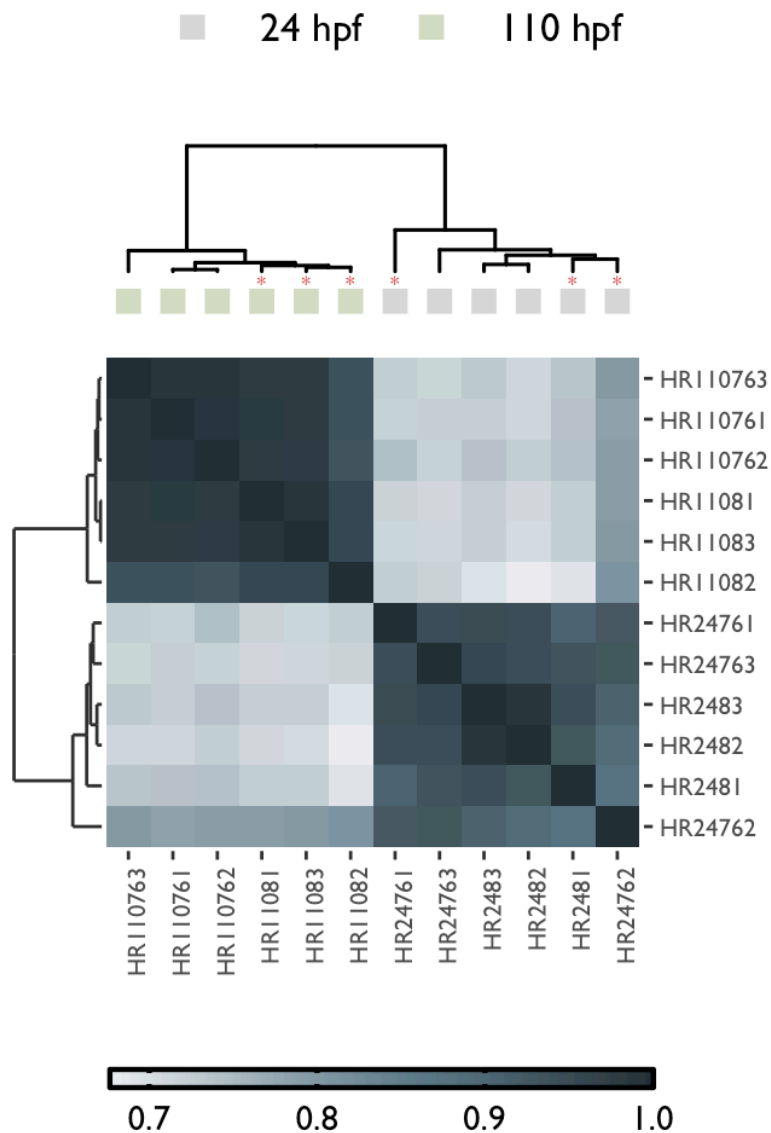


Figura 29. Perfil de expresión de miRs entre grupo de muestras. Agrupamiento jerárquico usando método Euclidiano y completo para calcular la distancia y agrupamiento, respectivamente, a partir de los valores de coeficiente Pearson para la matriz de expresión de miRs, muestra que la mayoría de las muestras se relacionan al diseño experimental.

Al evaluar de manera individual el desarrollo larval entre los tratamientos de pH, se identificó una disminución en la expresión de miRs en larvas cultivadas en condiciones de acidificación no observadas en condiciones de pH normales a las 24 hpf (Figura 30A-B). Esto corresponde a la expresión significativamente aumentada más de una vez de 64 y 47 miRs en condiciones de

pH 8.0 y pH 7.6, respectivamente (Figura 30C). De los cuales, 46 miRs permanecieron en ambas condiciones de pH, 18 miRs fueron exclusivos a la condición de pH 8.0, y un solo miR debido al reto de acidificación en el pH 7.6. Durante la transición de vida pelágica-bentónica a las 110 hpf, los niveles de expresión de miRs fueron superiores en condiciones de pH 7.6. Esto corresponde a 47 miRs y 38 miRs en condiciones de pH 7.6 y pH 8.0, respectivamente. De los cuales 9 miRs fueron exclusivos de la condición de pH 7.6 (Figura 30C).

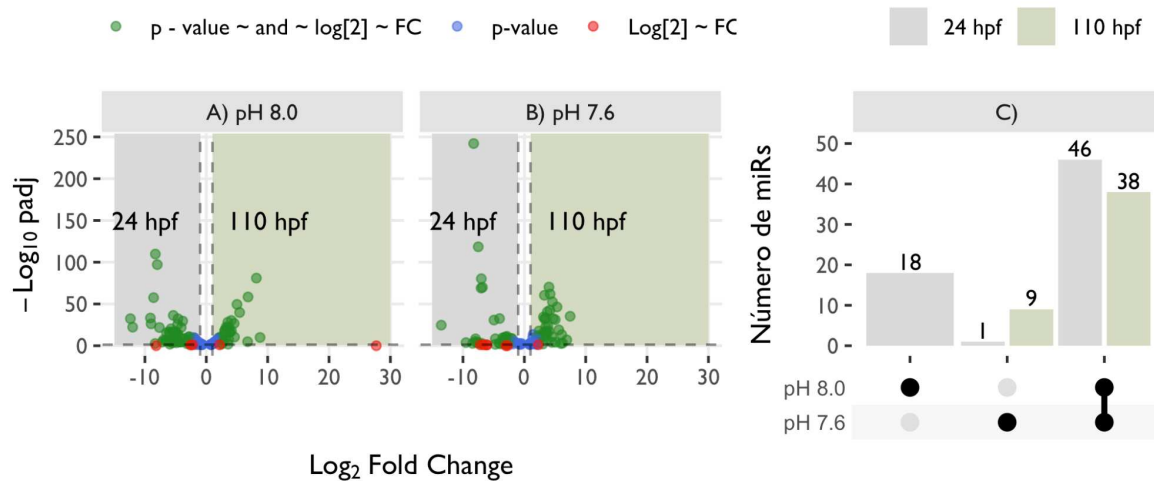


Figura 30. Contrastes de expresión diferencial para los miRs expresados en larvas de *H. rufescens* criadas en pH 8.0 (A) y pH 7.6 (B). C) Representación del número de miRs agrupados o exclusivos en respuesta al reto de acidificación y desarrollo larval durante las 24 y 110 hpf.

7.10.1 miRs sobre-expresados regulan procesos específicos en las 24 y 110 hpf

Durante las 24 hpf, varios miRs sobre-expresados diferencialmente sin distinción del reto de pH (Figura 30C) mostraron regular negativamente procesos biológicos relacionados a la oligomerización de proteínas, movimiento basado en microtúbulos, transmisión sináptica química, respuesta al estrés oxidativo, citocinesis mitótica, regulación de la organización del citoesqueleto de actina, percepción sensorial, respuesta celular a cGMP y remodelación de vasos sanguíneos (Figura 30A). Durante las 110 hpf, varios miRs sobre-expresados diferencialmente sin distinción del reto de pH (Figura 30C) mostraron regular negativamente procesos biológicos relacionados al ensamble de cilio, ciclo celular, regulación de la expresión génica, procesos del metabolismo de xenobióticos, ciclo del ácido tricarboxílico, transporte de aminoácidos y protones, regulación positiva de la cascada de señalización MAPK, translocación de fosfolípidos, crecimiento multicelular, respuesta celular a la radiación ionizante, regulación positiva de la producción de citocinas, regulación negativa de la adhesión

célula-sustrato, respuesta al estrés de la hipertrofia del músculo cardíaco y activación de astrocitos implicada en la respuesta inmune (Figura 31B).

Por otro lado, se observaron algunos procesos biológicos compartidos entre las 24 y 110 hpf, a pesar de la expresión diferencial de miRs, de los cuales se destacan la regulación negativa de la transcripción por enzimas ARN polimerasa II, fosforilación proteica, transducción de señales, transporte transmembrana, diferenciación celular, metilación, procesos apoptóticos, desarrollo del sistema nervioso, espermatogénesis, regulación positiva de extensión de axones en regeneración, entre otros (Figura 32).

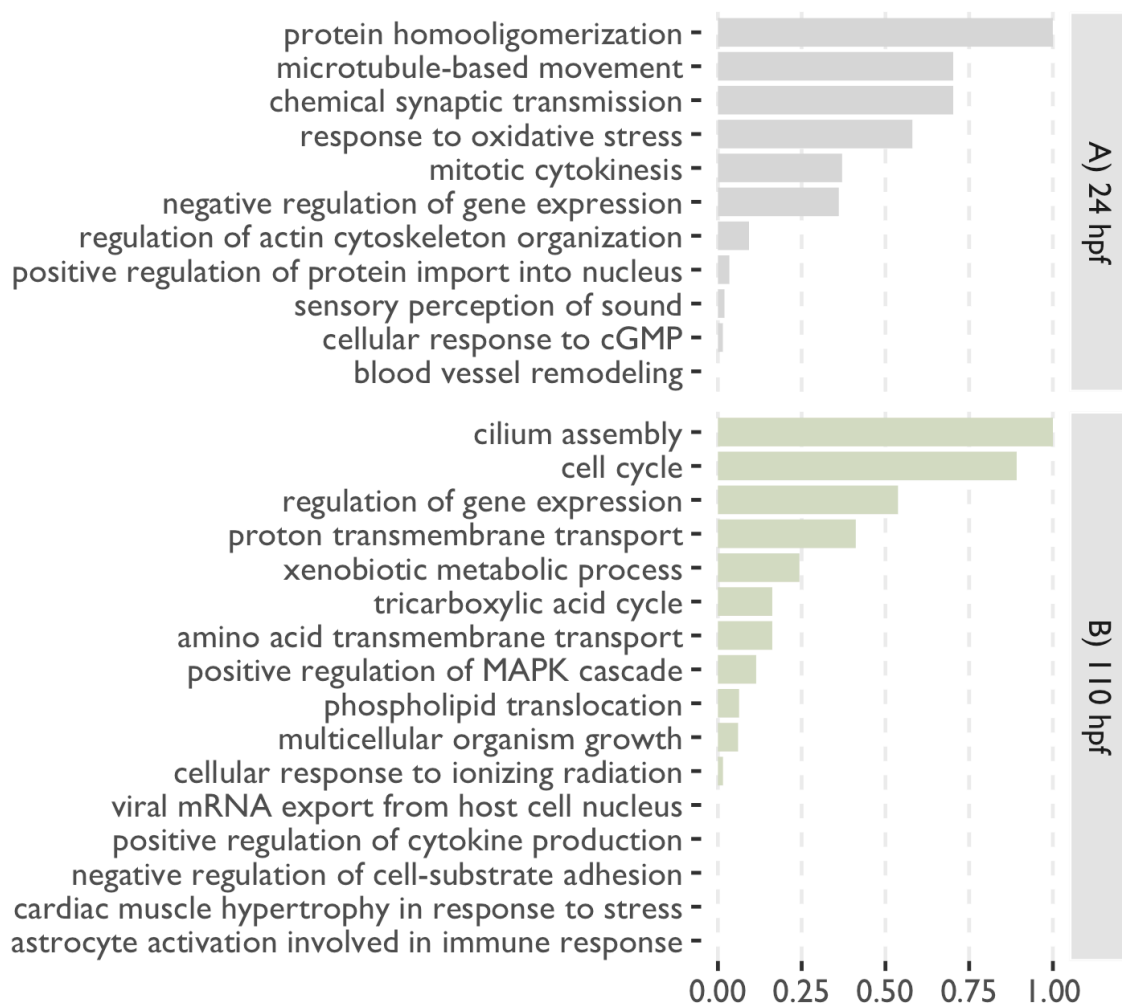


Figura 31. Enriquecimiento de los procesos biológicos específicamente regulados por miRs sobre-expresados en alguna de las etapas a las 24 y 110 hpf. Se destacan procesos biológicos relacionados al crecimiento a partir de las 24 hpf y transición pelágica-bentónica durante las 110 hpf.

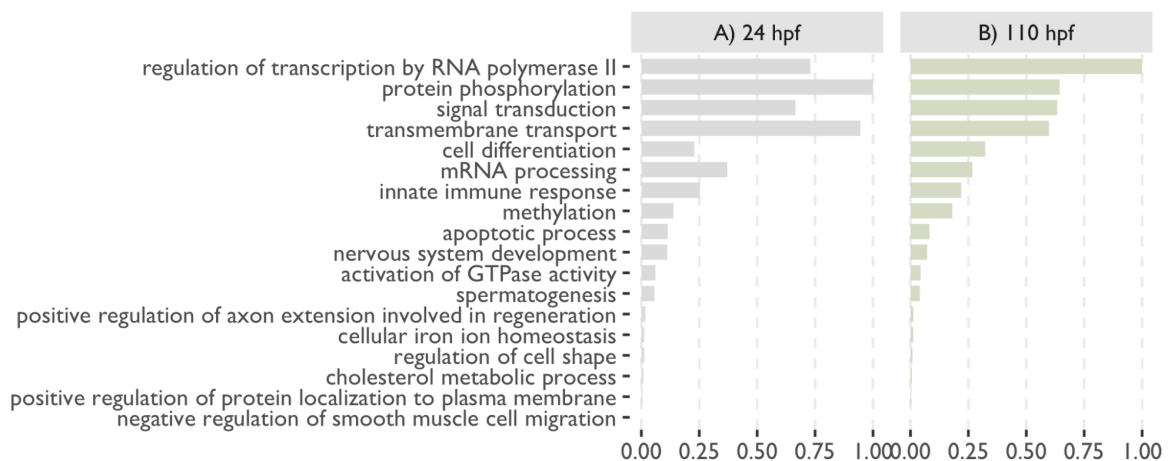


Figura 32. Enriquecimiento de los procesos biológicos co-regulados por miRs sobre-expresados en alguna de las etapas a las 24 y 110 hpf. Se destacan procesos biológicos compartidos entre las 24 y 110 horas después de la fertilización (hpf).

7.10.2 Mirs en respuesta a la acidificación

Los miRs LET-7, MIR-133 y MIR-278 fueron sobre-expresados a las 24 hpf en respuesta al pH 7.6 en comparación al pH 8.0 (Figura 33). Por otro lado, los miRs MIR-315, MIR-2, BANTAM, MIR-190, MIR-153, MIR-2722 y MIR-1988 fueron sobre-expresados a las 110 hpf en respuesta al pH 7.6, pero los miRs MIR-92, miR-277b, MIR-216 y MIR-133 fueron sub-expresados significativamente (Figura 33). Diversos genes presentaron interacciones putativas con múltiples miR expresados diferencialmente. Estas interacciones fueron asociadas a la regulación negativa de varios procesos biológicos que a continuación serán descritos (Figura 34).

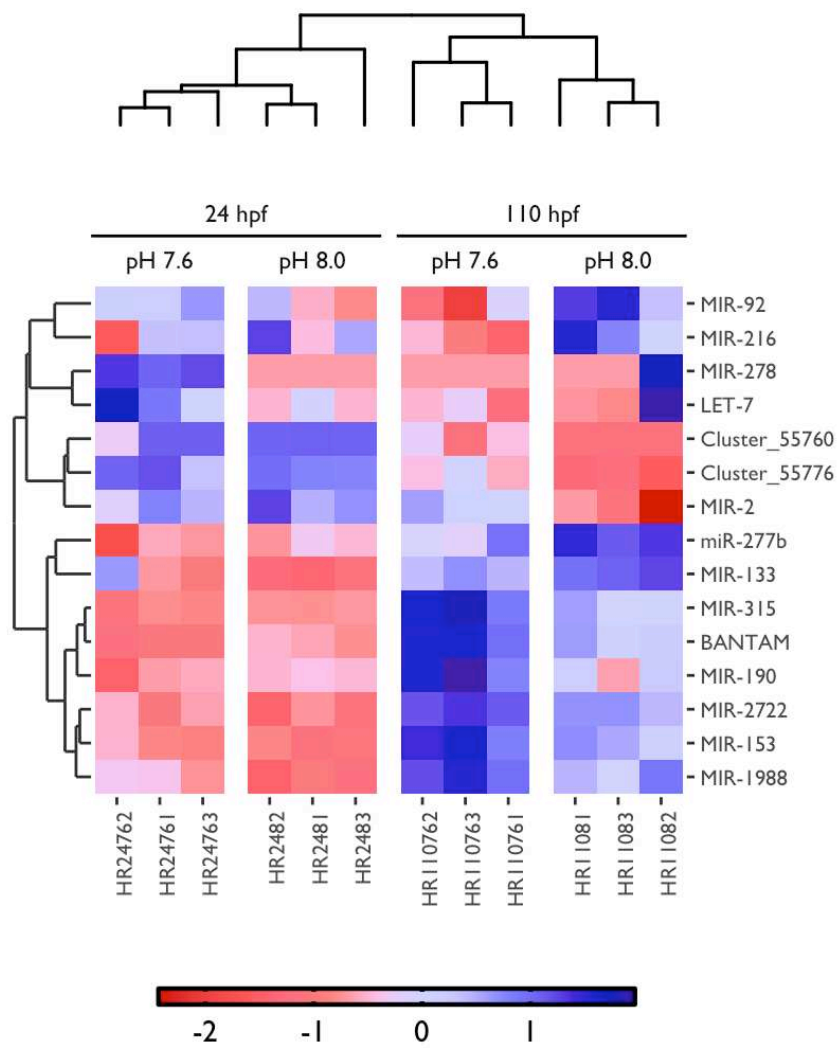


Figura 33. miRs expresados diferencialmente en pH 8.0 y pH 7.6 durante las 24 y 110 hpf. La escala de colores muestra el valor z de la expresión de miRs.



Figura 34. Regulación negativa de procesos biológicos asociados a la interacción miR-gen de miRs expresados diferencialmente en respuesta a la acidificación. La escala de colores representa el radio de enriquecimiento de la expresión diferencial a pH 8.0 (escala azul) y pH 7.6 (escala roja). Las interacciones putativas miR-ARNm fueron predichas para los miR expresados diferencialmente (C). El gene_id de los genes es mostrado de acuerdo a las anotaciones del genoma de abulón (eje x).

7.10.2.1 LET-7 fue omnisciente durante el desarrollo larvario, pero es sobre-expresado en respuesta a la acidificación a las 24 hpf

En las larvas de abulón rojo, la sobreexpresión de LET-7 fue superior debido a la acidificación durante las 24 hpf. La familia LET-7 es un regulador temporal del desarrollo de vida larval (Reinhart et al., 2000) conservado a lo largo de metazoarios (Pasquinelli et al., 2000). También, la expresión diferencial de LET-7 ha sido identificada en otras especies marinas en respuesta a estresores tales como respuesta innata immune (Schulte et al., 2011), estrés térmico (Vasadia et al., 2019), hipoxia (Huo et al., 2017) y acidificación (Pan et al., 2021), sugiriendo que LET-7 tiene un papel trascendente frente al estrés. Aunque la presencia de LET-7 previamente no había sido detectable en larvas de moluscos (ver Pasquinelli et al., 2000), predicciones *in silico* sugerían su participación en vías de regulación en múltiples moluscos (Huang et al., 2021). En larvas de peces (*Paralichthys olivaceus*), LET-7 participa en el desarrollo tisular y el metabolismo temporales asociado con la proliferación y diferenciación celular durante la metamorfosis (Fu et al., 2013). Para el abulón rojo, LET-7 fue asociado a la regulación de procesos biológicos tales como regulación de la transcripción por ARN polimerasa II, organización de la proyección celular, mantenimiento de ritmos en la fisiología y regulación positiva de la cascada MAPK, mediante la regulación postranscripcional de los genes “centromere protein M-like”, “cyclin-dependent kinase 10-like”, “E3 ubiquitin-protein ligase RNF166-like” y “transcription factor ces-2-like”.

7.10.2.2 MIR-133 regula la histogénesis a las 110 hpf, pero la retrasa mediante su sobreexpresión en respuesta a la acidificación desde las 24 hpf

El MIR-133 mostró una rotación en la expresión en respuesta a la acidificación durante el desarrollo a las 24 y 110 hpf. En condiciones normales, MIR-133 se sobreexpreso hasta 5 veces más durante las 110 hpf. En respuesta a la acidificación, el MIR-133 fue sobreexpresado -2.76 veces más a las 24 hpf y 1.27 veces menos durante las 110 hpf. La sobreexpresión de MIR-133 es conocido por influenciar el control postranscripcional de vía de señalización celular, metabolismo energético y apoptosis en otros moluscos como *Littorina littorea* (Hadj-Moussa et al., 2018) y *Dosidicus gigas* (Biggar et al., 2012), en respuesta a periodos de enfriamiento y anoxia, respectivamente. En larvas de erizo de mar, la sobreexpresión de MIR-133 ha sido también identificada en respuesta a condiciones de acidificación (pH 7.8; Pan et al., 2021). Se

ha sugerido que MIR-133 participa en la esquelotogénesis, regulando de manera indirecta las vías de señalización de Wnt/ β -catenina (Pan et al., 2021). Para el abulón rojo, el MIR-133 fue asociado con procesos biológicos asociados a la histogénesis (diferenciación de tejidos), tales como del desarrollo de vasos sanguíneos (vascularización y angiogénesis), células epiteliales y riñones, sistema urogenital y glicosilación proteica, mediante la regulación de postranscripcional de “dimethyladenosine transferase 1 (mitochondrial-like)”, “extensin-like”, “glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1-like”, “histone H2A.V”, “metallothionein 10-II-like” y “scavenger receptor class F member 1-like”. Por otro lado, la interacción de MIR-133 con miembros de las familias MIR-1a y MIR-29b ha sido observada (Biggar et al., 2012). En las larvas de abulón rojo, la sobreexpresión de MIR-1 fue mantenida sin distinción del estrés a las 110 hpf entre -2.24 y -1.52 veces, mientras que el MIR-29b mostró un cambio en la expresión debido a la acidificación durante el desarrollo larval. En condiciones de pH 8.0, el MIR-29b fue sobre-expresado 1.54 veces más durante el desarrollo a las 24 hpf, en comparación con las 110 hpf. Contrariamente, en condiciones de pH 7.6 el MIR-29 fue sobre-expresado -1.54 veces más a las 110 hpf, en comparación con el desarrollo a las 24 hpf.

7.10.2.3 MIR-278 participa durante la transición pelágica-bentónica a las 110 hpf, pero se sobreexpresa desde las 24 hpf en respuesta a la acidificación.

El MIR-278 fue sobre-expresado hasta 13 veces más durante las 24 hpf bajo condiciones de acidificación. El MIR-278 juega un papel en el control de la homeostasis de energía en *Drosophila* en el crecimiento durante el desarrollo temprano de vida, a través de la regulación de la vía de transducción de señales de insulina (Teleman et al., 2006). En otro molusco gasterópodo (*Rapana venosa*), MIR-278 ha sido observado y predicho su papel en la regulación metabólica y absorción de energía durante la transición pelágico-bentónico en la metamorfosis (Song et al., 2017). La ausencia de MIR-278 está asociado a una pérdida en la esperanza de vida durante la reproducción sexual (Green et al., 2016). Para el abulón rojo, el MIR-278 fue asociado con procesos biológicos tales como la proteólisis, organización del citoesqueleto de los microtúbulos, desarrollo embrionario intrauterino y proceso del sistema inmunológico, mediante la regulación postranscripcional de los genes “cell adhesion molecule 2-like”, “heat shock 70 kDa protein 12A-like”, “globin-5-like”, “hemicentin-1-like”, “minor histocompatibility antigen H13-like”, “ras-related protein Rab-32-like”, “transcription factor CES-2-like” y “tubulin polyglutamylase TTLL7-like”. En insectos, let-7y mir-278 previenen la

metamorfosis precoz y estimula la oogenesis mediante su interacción con factores de transcripción tipo zinc-finger (Kruppel-homolog 1, Kr-h1, Song et al., 2018). CES-2-like fue identificado como blanco de let-7y mir-278 en el abulón rojo. En desarrollo larval de *C. elegans*, CES-2-LIKE controla la expresión de dos genes clave de la autofagia (bec-1/ATG6 and lgg-1/ATG8). Bajo ciertas condiciones patológicas y fisiológicas, la autofagia y apoptosis son co-reguladas para asegurar una apropiada metamorfosis y supervivencia del organismo en desarrollo (Song et al., 2018). Por otro lado, se ha reportado que CES-2-LIKE regula negativamente CES-1, un miembro de la familia de factores de transcripción del dedo de zinc en de los caracoles (Erdélyi et al., 2011).

7.10.2.4 MIR-315 se sobreexpresa durante las 110 hpf y se co-expresa con varios mirs frente a la acidificación

El MIR-315 fue onnisciente durante el desarrollo larval. Mostrando ser abundante a las 110 hpf en condiciones normales (1.38 veces más que en las 24 hpf) y entre -1.66 (110 hpf, pH 8.0) y -4.17 (24 hpf, pH 7.6) veces más en condiciones de acidificación. Para el abulón rojo, el MIR-315 fue asociado con procesos biológicos tales como del desarrollo del sistema urogenital y riñones, especificación del eje embrionario, poliubiquitinación proteica, ciclo mitótico celular (transición G1/S del ciclo celular) y procesos asociados al sistema inmune (regulación, activación y superficie celular activadora de la respuesta inmune), mediante la regulación postranscripcional de diversos genes como “basic leucine zipper transcriptional factor-ATF-like”, “beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein-beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-like”, “cell wall protein DAN4-like”, “E3 ubiquitin-protein ligase TRIM71-like”, “extensin-like”, “glutamic acid-rich protein-like”, “glycine-rich cell wall structural protein 1.0-like”, “glyoxylate/hydroxypyruvate reductase A-like”, “histone H2A.V”, “metallothionein 10-II-like”, “molluscan insulin-related peptide 1-like”, “proprotein convertase subtilisin/kexin type 5-like”, “ranBP-type and C3HC4-type zinc finger-containing protein 1-like”, “scavenger receptor class F member 1-like”. En otros gasterópodos (*Rapana venosa*), MIR-315 se co-expresa junto a MIR-278 durante el desarrollo larval, ambos presentando altos niveles de expresión en larvas competentes y postlarvas (Song et al., 2017). Mostrando una regulación post-transcripcional de procesos asociados al citoesqueleto y adhesión celular (Dynein intermediate chain 2, ciliary, Song et al., 2017). Además, se ha observado que MIR-315 juega un papel en la activación de vías antivirales mediante la regulación directa del sistema

enzimático profenoloxidasa (pro-PO, Jaree et al., 2018), el cual es un importante sistema de defensa innato en invertebrados durante la melanización de patógenos, pigmentación y esclerotización de tejidos dañados (Cerenius et al., 2004). Recientemente, MIR-315 ha sido reportado en el molusco bivalvo *C. gigas*, y se observó una co-expresión con los miRs, MIR-133, MIR-1985 y MIR-750, sugiriendo una vía de co-regulación mediada por estos miRs (Rosani et al., 2020). Para el abulón rojo, el MIR-315, MIR-133, MIR-1985 y MIR-750 mostraron estar co-expresados sugiriendo también una red regulatoria durante las 110 hpf. El MIR-1985 fue asociado con procesos biológicos de compuestos que contienen nucleobases y regulación de la transcripción, mediante la regulación postranscripcional de los genes “dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial-like”, “NF-kappa-B inhibitor cactus-like”, “scavenger receptor class F member 1-like”, “ankyrin repeat domain-containing protein 29-like” y “heavy metal-binding protein HIP-like”. El MIR-750 fue asociado con procesos biológicos de poliubiquitinación proteica, homeostasis celular de glucosa y procesos metabólicos de retinoides mediante la regulación postranscripcional de los genes “ABC transporter G family member 23 (Broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2)”, E3 ubiquitin-protein ligase RNF138/RNF114”, “40S ribosomal protein S12-like”, “Multidrug resistance-associated protein 1-like”, “ATP-binding cassette sub-family C member 6/member 3”, “Multidrug resistance protein mrp-7”, “Retinoid isomerohydrolase”, “Phospholipid transfer protein C2CD2L”, “ankyrin repeat domain-containing protein 29-like”, “glycine-rich cell wall structural protein 1.0-like”.

7.10.2.5 MIR-2 va disminuyendo su expresión hasta las 110 hpf, pero se mantiene sobre-expresado en condiciones de acidificación.

El MIR-2 fue hasta 8.86 veces más abundante durante las 24 hpf bajo condiciones normales. Contrariamente, fue sobre-expresado entre -1.25 y -3.47 veces más en condiciones de acidificación durante las 110 hpf. El MIR-2, es conocido por ser un miR específico en invertebrados (Zhou et al., 2014). Para el abulón rojo, el MIR-2 presentó una amplia variedad de genes blanco (44 blancos, sugiriendo la existencia de sitios de unión miR:mRNA canónicos y no canónicos), asociado con procesos biológicos tales como ensamble del complejo spliceosomal, reconocimiento del sitio de splicing-mRNA 3' y splicing del ARN (vía transesterificación), desarrollo del sistema esquelético y organización del citoesqueleto de los microtúbulos, reproducción, poliubiquitinación proteica, formación de tejido óseo

(osificación), división nuclear y ciclo celular mitótico, cascada MAPK, desarrollo embrionario intrauterino, morfogénesis celular, desarrollo y crecimiento de blastocitos. El MIR-2 es un MIR policistrónico, conservado en invertebrados, con más de un miembro de la misma familia que en su mayoría están agrupados en un genoma (Marco et al., 2012). En el abulón rojo, 3 islas (Cluster_44688, Cluster_44687 y Cluster_44690) fueron identificadas como miembros agrupados de MIR-2. Durante el ciclo de vida adulto del molusco bivalvo *C. gigas*, el MIR-2 (misma región semilla “UAUCACAGCC” que el encontrado en el abulón rojo) está asociado con el control negativo de la apoptosis mediante la regulación directa de la vía del factor nuclear (NF)- κ B, en la activación de la respuesta inmune temprana (Chen et al., 2016), y la represión de la síntesis/liberación de acetilcolina al apuntar a proteínas similares al transportador de colina (CgCTL1) y reducir la absorción de colina del sistema neuroendocrino (en los hemocitos), promoviendo así su actividad de defensa (Chen et al., 2016). Adicionalmente, se predice que MIR-2 participa en la regulación postranscripcional de genes involucrados en el desarrollo neural en *Drosophila* y *C. elegans* (Marco et al., 2012).

7.10.2.6 BANTAM es un mir de la transición pelágica-bentónica

En condiciones normales, BANTAM se expresó -1.25 veces más durante las 110 hpf. Bajo acidificación, BANTAM fue sobreexpresado entre -1.3 y -4 veces más en las 110 hpf. Para el abulón rojo, BANTAM fue asociado con procesos biológicos de la organización del citoesqueleto, desarrollo del sistema nervioso, organización de organelo y proceso metabólico del compuesto de nitrógeno mediante la regulación postranscripcional de los genes “tubulin polyglutamylase TTLL7-like”, “dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial-like” y “location of vulva defective 1-like”. En *Drosophila*, BANTAM es un regulador esencial la proliferación celular, la muerte celular y la formación de patrones coordinados en el desarrollo animal (Brennecke et al., 2003), mediante el control de la vía de señalización Hippo (Nolo et al., 2006).

7.10.2.7 MIR-190 disminuye su expresión hasta las 110 hpf, pero se mantiene sobreexpresado en condiciones de acidificación regulando negativamente posibles vías de esqueletogenesis y crecimiento larvario.

MIR-190 se expresó entre -3.3 y -6.9 veces más durante las 110 hpf bajo condiciones de acidificación en comparación con las 24 y 110 hpf. Para el abulón rojo, MIR-190 fue asociado con procesos biológicos del desarrollo y crecimiento de blastocitos, células progenitoras

hematopoyéticas, desarrollo del embrión en útero, proliferación celular de la masa celular interna, ciclo celular mitótico, osificación, poliubiquitinación proteica y desarrollo del sistema esquelético, mediante la regulación postranscripcional de los genes “E3 ubiquitin-protein ligase RNF138”, “E3 ubiquitin-protein ligase RNF114”, “Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase HPR3” y “Ribosome maturation protein sdo1”.

7.10.2.8 MIR-153 mantiene una sobre-expresión frente a la acidificación durante las 24 y 110 hpf

En condiciones normales, MIR-153 se expresó -3.07 veces más durante las 110 hpf que durante las 24 hpf. En condiciones de acidificación se expresó entre -1.54 y -5.03 veces más durante las 24 y 110 hpf en comparación al control, respectivamente. Para el abulón rojo, MIR-153 fue asociado con procesos biológicos del metabolismo de compuestos aromáticos, modificación de aminoácidos, compuestos que contienen ácido fólico, proceso metabólico de ácidos orgánicos, proteólisis, catabolismo dependiente de ubiquitina, metabolismo de vitaminas solubles, mediante la regulación postranscripcional de los genes “Proton-coupled folate transporter”, “Probable E3 ubiquitin-protein ligase rbrA”, “Probable E3 ubiquitin-protein ligase ARI5” y “Potential E3 ubiquitin-protein ligase ariadne-2”.

7.10.2.9 MIR-2722

En condiciones normales, MIR-2722 se expresa -3.82 veces más durante las 110 hpf que durante las 24 hpf. En condiciones de acidificación, se expresó -1.24 veces más durante las 110 hpf en comparación al control durante las 110 hpf y -5.32 veces más en comparación con las 24 hpf experimentales. Para el abulón rojo, el MIR-2722 fue asociado con procesos biológicos de catabolismo de macromoléculas, metabolismo de compuestos nitrogenados, poliubiquitinación de proteínas, proteólisis y catabolismo dependiente de ubiquitina, mediante la regulación postranscripcional de los genes “E3 ubiquitin-protein ligase RNF138” y “E3 ubiquitin-protein ligase RNF114”

7.10.2.10 MIR-1988

Este miR ha sido reconocido por ser un regulador post transcripcional específico de gasterópodos (Wheeler et al., 2009). En condiciones normales, el MIR-1988 se expresó -2.71 veces más durante las 110 hpf que durante las 24 hpf. En condiciones de acidificación, MIR-1988 se expresó -1.2 veces más durante las 110 hpf en comparación al control en el mismo

tiempo y -3.51 veces más en comparación con las 24 hpf experimentales. Para el abulón rojo, el MIR-1988 fue asociado con procesos biológicos vasculares del sistema circulatorio, transporte de electrones mitocondriales (ciclo del ácido tricarboxílico), fosforilación oxidativa, poliubiquitinación de proteínas procesos metabólicos de nucleótidos de purina, mediante la regulación postranscripcional de los genes “ATP-binding cassette sub-family C member 3/6”, “E3 ubiquitin-protein ligase RNF138”, “E3 ubiquitin-protein ligase RNF114”, “Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase HPR3”, “Multidrug resistance protein mrp-7”, “Multidrug resistance-associated protein 1”, “Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit”, “Putative transferase CAF17, mitochondrial”, “serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform-like” y “succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial-like, transcript variant X1”.

7.10.3 miRs sub-expresados en respuesta a la acidificación

En condiciones normales, el MIR-92 mantiene una expresión basal durante las 24 y 110 hpf. Pero en condiciones de pH 7.6, MIR-92 se expresó 1.05 veces menos durante las 110 hpf que en condiciones de pH 8.0. Para el abulón rojo, el MIR-92 fue asociado con procesos biológicos de morfogénesis celular, regulación negativa de citoquinas, poliubiquitinación de proteínas, regulación de los niveles de neurotransmisores, fosforilación de proteínas y metilación del ARN, mediante la regulación postranscripcional de los genes “5-methylcytosine rRNA methyltransferase NSUN4-like”, “E3 ubiquitin-protein ligase RNF166-like”, “high-affinity choline transporter 1-like”, “solute carrier family 46 member 3-like”, “rho GTPase-activating protein 15-like”, “solute carrier organic anion transporter family member 2A1-like”, “zinc finger protein 58-like”, “5-methylcytosine rRNA methyltransferase NSUN4-like”, “vitelline envelope sperm lysin receptor-like” y “rho GTPase-activating protein 15-like”. En condiciones normales, el MIR-277B se sobre-expresa -1.95 veces más durante las 110 hpf, en comparación con las 24 hpf. La relación en la expresión se mantuvo en condiciones de acidificación, pero durante las 110 hpf, el MIR-277B se expresó 1.02 veces menos en comparación al control a las 110 hpf. Para el abulón rojo, el MIR-277B fue asociado con procesos biológicos del metabolismo de compuestos nitrogenados, compuestos que contienen nucleobases y transcripción del ARNr, mediante la regulación postranscripcional de los genes “peroxisomal membrane protein 4-like” y “DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1-like”. Finalmente, el MIR-216 mantiene una sobre-expresión entre -2.1 a -3.12 veces más durante las

110 hpf en comparación a las 24 hpf del desarrollo larvario. Sin embargo, la expresión de MIR-216 disminuye 1.08 veces frente al reto de acidificación de pH 7.6 en comparación al pH control. Para el abulón rojo, el MIR-216 fue asociado con procesos biológicos de señalización de punto de control del ciclo celular (daños en el ADN), transición G1/S del ciclo celular mitótico, poliubiquitinación de proteínas y regulación de la recombinación del ADN, mediante la regulación postranscripcional de los genes “E3 ubiquitin-protein ligase RNF166-like”, “E3 ubiquitin-protein ligase TRIM71-like”, “glyoxylate/hydroxypyruvate reductase A-like”, “Vascular endothelial growth factor receptor 3 (hemicentin-1-like)”, “protocadherin-11 X-linked-like”, “rho GTPase-activating protein 15-like”, y “THO complex subunit 1-like”. Se ha sugerido que los niveles de expresión disminuidos de miRs causa una amplia de-represión de ARNm objetivos y una de-regulación de la expresión genética, la cual resultaría en incrementos del “ruido” génico asociado a la heterogeneidad en la plasticidad celular y estabilidad fenotípica (Ebert y Sharp, 2012).

7.10.4 miRs nuevos sobre-expresados en respuesta a la acidificación

Finalmente, la sobreexpresión de una isla de miRs no identificadas con alguna de las bases de datos fue observado en respuesta a la acidificación. Estos miRs cumplieron los criterios de identificación *bona fide* de miRs. En condiciones normales y de acidificación, el cluster Cluster_55760 y Cluster_55776 se expresaron 19.64 y 7.41 veces más durante las 24 hpf. Aunque a las 110 hpf, estos miRs mantuvieron una expresión -10.16 veces más en condiciones de acidificación a las 110 hpf. Para el abulón rojo, esta isla fue asociado con procesos biológicos de poliubiquitinación de proteínas, proceso metabólico de ácidos grasos, lípidos y peptídicos, proteólisis, catabolismo dependiente de ubiquitina, procesos metabólicos de compuestos de nitrógeno y transporte de iones, mediante la regulación postranscripcional de los genes “BTB/POZ domain-containing protein 6-like”, “ileal sodium/bile acid cotransporter-like”, “E3 ubiquitin-protein ligase RNF166-like”, “ubiquitin-protein ligase RNF166-like”, “40S ribosomal protein S12-like”, “histone H2A.V”, y “BTB/POZ domain-containing protein 6-like”.

7.11 Módulos que co-regulan procesos del desarrollo y en respuesta a la acidificación

Se identificaron 9 grupos diferentes en el patrón de expresión de miRs. Estos grupos representaron una red de co-expresión llamada módulos. Se asume que los representantes de

cada módulo comparten funciones similares, siendo cada miembro un participante de una vía de regulación en común (Langfelder y Horvath, 2008). Los módulos fueron asociados a las características evaluadas, incluyendo desarrollo larval, crecimiento, calcificación y tasas de respiración durante el desarrollo larval a las 24 y 110 hpf. Considerando el corte significativo ($p < 0.05$) en los valores de correlación, todos los módulos presentaron alguna asociación significativa con alguna de las características evaluadas. Los módulos “green”, “brown”, “blue”, y “red” se correlacionaron positivamente con el desarrollo, pero negativamente al crecimiento y calcificación (Figura 35A). Esta asociación sugiere una vía de regulación en común que contribuye a la respuesta positiva o negativa observada en las características evaluadas. La asociación observada con respecto a la etapa de desarrollo (Figura 35B), sugiere que estos módulos de miRs contribuyen positivamente al desarrollo larval en condiciones normales, pero negativamente al crecimiento y calcificación (Figura 35A). Frente al reto del pH 7.6, la interacción de esta red de co-expresión no preserva la misma asociación observada a la de condiciones de pH 8.0, aunque ningún coeficiente fue significativo (Figura 35B). Esta asociación negativa es coherente con el efecto negativo observado en la calcificación y crecimiento en las primeras etapas de desarrollo bajo condiciones de pH bajo (Tabla 3). Dentro de esta red de co-expresión de miRs, se identificaron los miembros de miRs que fueron detectados con expresión diferencial en respuesta a la acidificación en las 24 y 110 hpf (Figura 35A-I). El miR LET-7, MIR-2 y MIR 92 fueron representantes de la red de co-expresión de miRs en el módulo “grey”. Otros representantes de módulos relacionados fueron MIR-2722 (“pink”), MIR-133 y MIR-278 (“turquoise”), BANTAM, MIR-153, MIR-190, MIR-1988, MIR-216 y MIR-315 (“yellow”), sugiriendo que estos miRs están involucrados con otros miRs en una vía de regulación negativa en común. Por ejemplo, para el módulo “turquoise” los MIR-133 y MIR-278 están asociados a la respuesta observada en las tasas de respiración (Figura 35A). Esta vía de regulación actúa positivamente frente al reto de pH 7.6 a las 110 hpf (Figura 35C).

8. Discusión

La acidificación de los océanos está asociada con alteraciones en la asignación de energía celular de varios organismos marinos ya que interactúa con varios procesos de su biología, lo que resulta en un rendimiento fisiológico alterado. En términos fisiológicos, la base de la adaptación es la capacidad de un organismo para mantener la homeostasis mediante la asignación de recursos sin impedir otras funciones biológicas (Schmidt-Nielsen 1972; Hochachka y Somero 2002). El consumo de oxígeno en las 24 y 110 hpf contribuyeron significativamente al aumento en el metabolismo durante el desarrollo larvario frente a la acidificación. Este rendimiento fisiológico alterado fue opuesto con el decremento en la proporción de larvas eclosionadas y normales en las 24 hpf y larvas competentes observadas antes de las 110 hpf que sugiere un requerimiento energético adicional para satisfacer el programa genético del desarrollo larvario a expensas del efecto negativo observado en las variables morfológicas evaluadas. La variación observada en la tasa de respiración durante el desarrollo larval de *H. rufescens* es consistente con lo reportado por Jaeckle (1989) a temperatura de 17°C, así como por Moran et al., (2003), en larvas de *H. fulgens* y *H. sorenseni* cultivadas a 15°C (Moran et al., 2003). La reasignación del metabolismo es común en las larvas de abulón porque su desarrollo implica cambios corporales complejos (Jaeckle et al., 1989). Los cambios significativos en las tasas de respiración observados en las 24 y 110 hpf, probablemente está asociado al costo metabólico asociado a la eclosión y transición de vida pelágica-bentónica. Se espera que los rendimientos energéticos sustanciales debido al estrés sean más desafiantes en algunas etapas de desarrollo, como la observada durante la presente investigación. El incremento en el metabolismo aeróbico frente a eventos de acidificación está asociado al costo fisiológico para mantener la homeostasis celular en respuesta a las covariables de la acidificación que pueden afectar el equilibrio ácido-base celular, el balance iónico intracelular requerido para el plegamiento de proteínas, procesos fisiológicos sensibles al pH, hipoxia y calcificación (Pörtner 2008; Rivest et al., 2014; Morash et al., 2016). Debido a la heterogeneidad en la respuesta del consumo de oxígeno a elevados niveles de CO₂ observada en otros invertebrados (Lefevre et al., 2016), no ha sido posible realizar una predicción unificada del efecto de la acidificación en organismos marinos. Por ejemplo, el incremento en las tasas de respiración ha sido observado en otras larvas de invertebrados (Stump et al., 2011, 2012), moluscos pelágicos (Comeau et al., 2010), y bivalvos (*Mytilus edulis*, Thomsen y Melzner, 2010), pero no en otras especies de moluscos bivalvos como el Mejillón (*Mytilus*

californianus frente a pH 7.8; Waldbusser et al., 2015), Ostión (*Saccostrea cucullata*, frente a pH 7.4; Campanati et al., 2018), e incluso otras especies de abulón (Kavousi et al., 2022). En este último, Kavousi y colaboradores (2022) reportan ningún cambio en las tasas de respiración de larvas de *H. tuberculata* cultivadas a pH 7.6 (Kavousi et al., 2022). Dado que la interpretación de los límites de tolerancia a la acidificación se extiende desde el nivel más alto de respuesta observado hasta las jerarquías sistémicas, celulares y moleculares (Pörtner, 2008), es necesario observar entre las poblaciones algún componente genético en interacción con la respuesta fisiológica frente a las covariables del cambio climático (Somero et al., 2010) que ofrezcan nuevos conocimientos sobre el potencial biológico de las especies marinas para responder al cambio climático (Applebaum et al., 2014). La resiliencia de los organismos marinos frente a cambios en el ambiente está conectada a cierta plasticidad fenotípica que le permite persistir a los cambios ambientales hasta lograr una adaptación genética (Seebacher et al., 2005; Visser 2008). Se ha sugerido que la expresión génica puede servir como un eslabón en la comprensión de la plasticidad de los organismos frente al estrés ambiental (Rivera et al., 2021), ya que su regulación es clave para la homeostasis y la plasticidad fenotípica. La regulación de la expresión génica puede mejorar la capacidad de aclimatación de organismos frente a la acidificación oceánica (Gurr et al., 2022). La mayoría de los sistemas biológicos actuales son capaces de soportar perturbaciones estocásticas y reproducir resultados fenotípicos estereotipados a través de la canalización de programas genéticos (Hornstein et al., 2006). La canalización es un principio de diseño que sugiere que las vías de desarrollo se estabilizan a través de diversos elementos genéticos para aumentar la reproducibilidad y estabilidad fenotípica. El término es útil para describir el grado de robustez de un organismo vivo para disminuir la variabilidad interindividual frente a perturbaciones y lograr el programa de desarrollo deseado. Cuanto más profundas sean las paredes de estos canales, menores serán las posibilidades de que los programas de desarrollo se desvíen del óptimo (Hornstein et al., 2006). Los microARNs (miRs) representan una clase de ARN pequeños no codificantes que reprimen la expresión génica en un nivel post-transcripcional mediante la degradación o inhibición de la traducción de un gen blanco. Los miRs modulan varios procesos fisiológicos, incluyendo la regulación de la respuesta inmune (Schulte et al., 2011; Chen et al., 2014; Zhou et al., 2014; Martín-Gómez et al., 2014; Chen et al., 2015; Burgos-Aceves et al., 2018), estrés térmico (Vasadia et al., 2019), osmótico (Zhao et al., 2016) y anoxia en hábitats naturales (Biggar et al., 2012; Hadj-Moussa et al., 2018), estivación (Hoyeck et al., 2019), respuesta a xenobióticos

(Bao et al., 2014), hipoxia (Huo et al., 2017), y ambientes modificados por el cambio climático (De falco et al., 2023), incluyendo la acidificación (Pan et al., 2021). Se ha sugerido que los miRs son actores clave en la canalización de programas genéticos al interactuar con la red de genes codificadores de proteínas a fin de amortiguar cualquier perturbación estocástica y, por lo tanto, conferir robustez a los procesos biológicos dentro de los programas genéticos del desarrollo (Peterson et al., 2009), al reforzar los programas transcripcionales y atenuar las transcripciones aberrantes, y en algunos contextos de red pueden ayudar a suprimir las fluctuaciones aleatorias en el número de copias de la transcripción frente a perturbaciones ambientales o genéticas (Ebert y Sharp, 2012). En el presente estudio, se prepararon y secuenciaron 12 pequeñas bibliotecas de ARN en la plataforma Illumina Novaseq6000 para identificar miRs en larvas de *H. rufescens* después del desafío de acidificación, incluidas las etapas planctónicas y metamórficas. Después del filtrado de lecturas de baja calidad, secuencias adaptadoras y secuencias de menos de 18 nucleótidos de longitud (nt), se obtuvo un total de 299,029,713 lecturas de alta calidad. La distribución de longitud de las lecturas fue consistente con las observaciones de otros moluscos (Rosani et al., 2020), lo que demuestra que las bibliotecas de ARNs pequeños secuenciadas fueron técnicamente confiables y adecuadas para el análisis posterior. Después de la eliminación de artefactos, otros ARN no codificantes (ARNt y ARNr) y productos de contaminación cruzada, se identificaron en total 147 miRs, de los cuales 75 fueron conocidos y 72 no presentaron identidad nucleotídica a ningún miR informado en las bases de datos MirGene o miRbase, pero sí al genoma de abulón y cumplieron con los criterios de predicción *bona fide* de miRs (Axtel, 2013). La mayoría de los miRs nuevos no presentaron algún cambio significativo en sus niveles de expresión al evaluar la expresión diferencial de miRs frente al reto de acidificación, pero sí una expresión diferencial al contrastar las etapas de desarrollo. Lo anterior sugiere que los miRs nuevos podrían ser específicos y transitorios del desarrollo larval del abulón rojo ya que se originaron en regiones específicas de su genoma y su expresión varió en función de la etapa de desarrollo larval. Para todos los miRs, una de las características en *cis* identificadas a lo largo de los miRs fue la inclinación del primer nucleótido en el extremo 5' por iniciar con uracilo, el cual es considerado una firma adicional en la anotación de ARNs pequeños asociados al complejo de silenciamiento RISC, debido a la eficiencia de unión entre la proteína argonauta y ARNs guía de 18 a 24 en los que el primer nucleótido en el extremo 5' está sesgado hacia Uracilo. La mayoría de los miRs sobreexpresados temporalmente en el desarrollo larval fueron identificados en regiones intergénicas del genoma

del abulón, sugiriendo que la mayoría de estos miRs derivan de transcritos independientes y por tanto, varios miRs del desarrollo larval codificaron a partir de una vía canónica (Krol et al., 2010). Por otro lado, la mayoría de los miRs en respuesta al estrés por la acidificación se originaron en regiones intragénicas, sugiriendo que fueron co-expresados preferencialmente dentro de algún gen huésped (Rodríguez et al., 2004; Hinske et al., 2010). Sin embargo, ningún miR intragénico expresado en el abulón rojo presentó regular el gen hospedero de donde procedía, como se ha observado en otras especies animales. Se ha sugerido que la vía de codificación intragénica puede representar un rasgo evolutivo de adaptación (Campo-Paysaa et al., 2011). Esta vía intrónica resulta en una manera viable y relativamente fácil para desarrollar nuevas familias de miRs, que podrían conferir robustez a los programas genéticos del desarrollo frente al estrés ambiental.

Para el abulón rojo, se observó una expresión diferencial de miRs dependiente de la etapa de desarrollo durante las 24 y 110 hpf que regulan negativamente varios procesos biológicos asociados al programa genético del desarrollo conocido para el género *Haliotis* (Degnan y Morse, 1995; Jackson et al., 2002; 2006; William et al., 2009; Huang et al., 2012), sugiriendo que los miRs son elementos del sistema de bloqueo, especialmente de varios componentes estructurales necesarios durante la división celular embrionaria. Estos procesos fueron diferenciados entre las etapas de desarrollo evaluadas. En las 24 hpf varios procesos asociados a la proliferación celular fueron negativamente regulados, incluyendo la regulación negativa de la vía cGMP. Esta vía puede inhibir factores de crecimiento, resultado en el retraso de la transición celular (Fukumoto et al., 1999), y sugiriendo una promoción indirecta - mediante miRs - del crecimiento de vasos sanguíneos por encima de otros procesos tales como citocinesis y esqueletogenesis. En *H. diversicolor*, se ha observado una dramática rotación en la expresión génica de genes de actina que regulan la locomoción celular y los cambios en la forma de las células durante su desarrollo larval (Huang et al., 2012), lo que sugiere que estos procesos podrían ser regulados por la vía de miRs en la vida temprana del abulón y su sobre-expresión es requerida para mantener la homeostasis frente al estrés por la acidificación. Además, la regulación negativa de proteínas sensoriales sugiere que este sistema de escape observado en larvas de peces (Earton et al., 1986; Poulsen et al., 2021) es también un mecanismo de supervivencia en larvas trocóforas.

En las 110 hpf varios procesos asociados con la anticipación de la transición pelágico-bentónico fueron negativamente regulados, incluyendo cascada de señalización MAPK y metabolismo xenobiótico. La vía MAPK juega un papel importante en el modelado y establecimiento de la simetría axial de estructuras morfológicas como la musculatura, concha y pie en el abulón (*Haliotis asinina*; Koop et al., 2007). En otras larvas bifásicas, la rotación en la expresión de genes asociados a procesos biológicos del ensamble de cilio, regulación positiva de la cascada de señalización MAPK y respuesta inmune ha sido también observado durante el desarrollo larval, sugiriendo que estos procesos biológicos son regulados por la vía de miRs en la vida temprana de múltiples moluscos (*Panopea generosa*; Gurr et al., 2022). Por otro lado, las vías del metabolismo xenobiótico, regulada negativamente, están relacionadas con las vías anabólicas de las hormonas esteroides, ya que comparten enzimas similares involucradas en el metabolismo de los lípidos (Vasadia et al., 2019). Se ha demostrado que el metabolismo de lípidos tiene un papel importante para la reabsorción de energía necesaria para realizar el asentamiento de otras larvas bifásicas (*C. gigas*; Xu et al., 2012). Adicionalmente, se observó una regulación negativa de genes asociados al desarrollo del sistema inmune e histogénesis del sistema digestivo. El desarrollo del sistema inmune está asociado a la anticipación de la defensa frente a microbios debido al cambio de fuente de energía mediante la alimentación del sustrato inductor de asentamiento (Huang et al., 2012). En larvas lecitotróficas, el acoplamiento pelágico-bentónico está asociado a la formación de un sistema digestivo, necesario para la digestión del sustrato inductor del asentamiento (Keough et al., 1982; Leighton 2000). Finalmente, la regulación negativa de la adhesión célula-sustrato observada en las 110 hpf, sugiere que los miRs jugaron un papel trascendente en la transición pelágico-bentónica para las larvas de abulón rojo. Varios procesos biológicos regulados negativamente fueron compartidos entre las 24 y 110 hpf, a pesar de la expresión diferencial de miRs observada, sugiriendo una red funcional conservada. Es sabido que cada miR puede apuntar a cientos de ARNm, y algunos objetivos pueden verse afectados de forma combinatoria por múltiples miRs (Jhon et al., 2004; Krek et al., 2005), lo que convierte a los miRs en centros reguladores para el ajuste de la expresión génica y la orquestación de cambios transcriptómicos amplios (Esau et al., 2006). Esta regulación negativa combinada es dependiente de la similitud en la región semilla de los miRs complementarios al ARNm objetivo que está siendo reprimido. Esta forma combinatoria de regulación negativa se vio observada en miRs expresados diferencialmente en respuesta a la acidificación. La red génica regulada por estos miRs permitió cumplir el programa de desarrollo

larval a expensas de la demanda energética observada frente al estrés por la acidificación. Por lo que, los miRs pueden conferir robustez a la red génica del programa de desarrollo larval, amortiguando las fluctuaciones en los niveles de expresión inherente a las perturbaciones del estrés (Peterson et al., 2009).

9. Conclusión

La siguiente investigación permitió identificar tasas de respiración aumentadas en respuesta a la acidificación. Las tasas de respiración de larvas eclosionadas (24 hpf) y competentes (110 hpf) contribuyó significativamente al aumento en el metabolismo aerobio observado. Los microARN pueden dirigir el destino y la plasticidad celular en respuesta a diversos eventos, incluido el estrés ambiental. El genoma del abulón rojo codifica diferencialmente miRs durante las primeras etapas de vida. El perfil de expresión de miRs permaneció diferenciado frente al reto de acidificación. La vía de miRs resultó en un mecanismo compensatorio para mantener la homeostasis frente al reto de acidificación. Varios miRs regularon de manera temporal el crecimiento larval y la histogénesis del sistema circulatorio, digestivo e inmunológico entre las 24 y 110 hpf. Estas vías regulatorias fueron retardadas en respuesta a la acidificación. El análisis de co-secuenciación permitirá observar con precisión los procesos biológicos que son regulados post transcripcionalmente mediante la vía de miRs en larvas del abulón rojo.

Capítulo III. Conclusión general

Durante las 24 hpf la eclosión y proporción de larvas normales presentó un decremento lineal en función del decremento de pH. Por el contrario, la tasa de respiración individual, incremento en función del pH. Aquí, el índice de crecimiento presentó un incremento a medida que el pH disminuyó. Los genes relacionados a procesos biológicos de la diferenciación celular, citoesqueleto, crecimiento y diferenciación de tejidos fueron controlados negativamente en concordancia con el decremento de la eclosión, pero no el índice corporal mostrando crecimiento anormal asociado con ninguna regulación génica frente a la acidificación. Las larvas competentes, en adición al asentamiento, tuvieron un decremento lineal en función del decremento del pH. También, el crecimiento y calcificación disminuyó significativamente en función del decremento del pH, mientras que las tasas de respiración permanecieron amplificadas. La inhibición de productos génicos relacionados a procesos biológicos de fosforilación, metilación, crecimiento, espermatogénesis, citoesqueleto, respuesta inmune, entre otros, sugieren que el retraso en la competencia velígera, deterioro en el crecimiento y calcificación están relacionadas con estas vías moleculares reguladas en respuesta a la acidificación. Conocer la variabilidad estacional local permitirá elaborar curvas de desempeño de poblaciones de abulón rojo y determinar los límites de tolerancia de diversas poblaciones locales. Esto como una estrategia de planificación espacial mediante la selección de semillas resistentes en la acuicultura de abulón rojo. Los experimentos de transgeneración permitirán identificar la viabilidad de la población adulta de abulón rojo expuesta a acidificación oceánica desde etapas tempranas.

Referencias Bibliográficas

Capítulo I

- Auzoux-Bordenave, S.; Badou, A.; Gaume, B.; Berland, S.; Helléouet, M.N.; Milet, C.; Huchette, S. Ultrastructure, chemistry and mineralogy of the growing shell of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *J. Struct. Biol.* 2010, 171, 277–290. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.05.012>.
- Auzoux-Bordenave, S.; Ledoux, A.; Martin, S.; Di Poi, C.; Suquet, M.; Badou, A.; Gaillard, F.; Servili, A.; Le Goïc, N.; Huchette, S.; et al. Responses of early life stages of European abalone (*Haliotis tuberculata*) to ocean acidification after parental conditioning: Insights from a transgenerational experiment. *Mar. Environ. Res.* 2022, 181, 105753. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105753>.
- Auzoux-Bordenave, S.; Wessel, N.; Badou, A.; Martin, S.; M'Zoudi, S.; Avignon, S.; Roussel, S.; Huchette, S.; Dubois, P. Ocean acidification impacts growth and shell mineralization in juvenile abalone (*Haliotis tuberculata*). *Mar. Biol.* 2020, 167, 11. <https://doi.org/10.1007/s00227-019-3623-0>.
- Barton, A., Hales, B., Waldbusser, G. G., Langdon, C., & Feely, R. A. (2012). The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, shows negative correlation to naturally elevated carbon dioxide levels: Implications for near-term ocean acidification effects. *Limnology and oceanography*, 57(3), 698-710.
- Bednaršek, N.; Calosi, P.; Feely, R.A.; Ambrose, R.; Byrne, M.; Chan, K.Y.K.; Weisberg, S.B. Synthesis of thresholds of ocean acidification impacts on echinoderms. *Front. Mar. Sci.* 2021, 8, 602601. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.602601>.
- Byrne, M.; Ho, M.; Wong, E.; Soars, N.A.; Selvakumaraswamy, P.; Shepard-Brennand, H.; Dworjanyan, S.A.; Davis, A.R. Unshelled abalone and corrupted urchins: Development of marine calcifiers in a changing ocean. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2010, 278, 2376–2383. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2404>.
- Cai, W. J., Feely, R. A., Testa, J. M., Li, M., Evans, W., Alin, S. R., ... & Bednaršek, N. (2021). Natural and anthropogenic drivers of acidification in large estuaries. *Annual Review of Marine Science*, 13, 23-55.
- Cai, W. J., Hu, X., Huang, W. J., Murrell, M. C., Lehrter, J. C., Lohrenz, S. E., ... & Gong, G. C. (2011). Acidification of subsurface coastal waters enhanced by eutrophication. *Nature geoscience*, 4(11), 766-770.
- Cannon, W.B. *Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear, and Rage*; Appleton-Century-Crofts: New York, NY, USA, 1915.
- Cigliano, M.; Gambi, M.C.; Rodolfo-Metalpa, R.; Patti, F.P.; Hall-Spencer, J.M. Effects of ocean acidification on invertebrate settlement at volcanic CO₂ vents. *Mar. Biol.* 2010, 157, 2489–2502. <https://doi.org/10.1007/s00227-010-1513-6>.
- CONAPESCA (2021). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2021/ANUARIO_ESTADISTICO_DE_ACUACULTURA_Y_PESCA_2021.pdf

- Costantini, D. Does hormesis foster organism resistance to extreme events? *Front. Ecol. Environ.* 2014, 12, 209–210. <https://doi.org/10.1890/14.WB.005>.
- Costello, C., L. Cao, S. Gelcich et al. 2019. *The Future of Food from the Sea*. Washington, DC: World Resources Institute. Available online at www.oceanpanel.org/future-food-sea.
- Crim, R.N.; Sunday, J.M.; Harley, C.D.G. Elevated seawater CO₂ concentrations impair larval development and reduce larval survival in endangered northern abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2011, 400, 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.02.002>.
- De Wit, P.; Palumbi, S.R. Transcriptome-wide polymorphisms of red abalone (*Haliotis rufescens*) reveal patterns of gene flow and local adaptation. *Mol. Ecol.* 2013, 22, 2884–2897. <https://doi.org/10.1111/mec.12081>.
- Dickson, A.G. Standard potential of the reaction: $\text{AgCl(s)} + 12\text{H}_2\text{(g)} = \text{Ag(s)} + \text{HCl(aq)}$, and the standard acidity constant of the ion HSO₄⁻ in synthetic sea water from 273.15 to 318.15 K. *J. Chem. Thermodyn.* 1990, 22, 113–127. [https://doi.org/10.1016/0021-9614\(90\)90074-Z](https://doi.org/10.1016/0021-9614(90)90074-Z).
- Dickson, A.G.; Sabine, C.L.; Christian, J.R. (Eds.) *Guide to Best Practices for Ocean CO₂ Measurement*; North Pacific Marine Science Organization: Victoria, BC, Canada, 2007; p. 191.
- Dupont, S.; Thorndyke, M.C. 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*, 2009, 6(2), 3109-3131. <https://doi.org/10.5194/bgd-6-3109-2009>.
- Espinel-Velasco, N.; Lamare, M.; Kluibenschedl, A.; Moss, G.; Cummings, V. Ocean acidification induces carry-over effects on the larval settlement of the New Zealand abalone, *Haliotis iris*. *ICES J. Mar. Sci.* 2020, 78, 340–348. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsaa086>.
- Eyster, L.S. Shell inorganic composition and onset of shell mineralization during bivalve and gastropod embryogenesis. *Biol. Bull.* 1986, 170, 211–231. <https://doi.org/10.2307/1541804>.
- Eyster, L.S.; Morse, M.P. Early shell formation during molluscan embryogenesis, with new studies on the surf clam, *Spisula solidissima*. *Am. Zool.* 1984, 24, 871–882. <https://doi.org/10.1093/icb/24.4.871>.
- FAO. (2019). *The state of the world's aquatic genetic resources for food and agriculture*. FAO Commission on genetic resources for food and agriculture assessments, 251. pp 24.
- Feely, R. A., Sabine, C. L., Hernandez-Ayon, J. M., Ianson, D., & Hales, B. (2008). Evidence for upwelling of corrosive acidified water onto the continental shelf. *science*, 320(5882), 1490-1492.
- Feely, R. A., Sabine, C. L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V. J., & Millero, F. J. (2004). Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science*, 305(5682), 362-366.

- Friedlingstein, P., Jones, M. W., O'Sullivan, M., Andrew, R. M., Bakker, D. C., Hauck, J., ... & Zeng, J. (2022). Global carbon budget 2021. *Earth System Science Data*, 14(4), 1917-2005.
- Friendly, M.; Fox, J. *candisc: Visualizing Generalized Canonical Discriminant and Canonical Correlation Analysis*. R Package Version 0.8-6. 2021. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=candisc> (accessed on [M1] [MOU2] 1 February 2023).
- Gazeau, F., Parker, L. M., Comeau, S., Gattuso, J. P., O'Connor, W. A., Martin, S., ... & Ross, P. M. (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine biology*, 160, 2207-2245. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2219-3>
- Geiger, D. L., & Owen, B. (2012). *Abalone: world-wide Haliotidae*. ConchBooks.
- Gilbert, S. F. (2005). *Biología del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana. Capítulo 1, pp 3
- Guo, X.; Huang, M.; Luo, X.; You, W.; Ke, C. Effects of one-year exposure to ocean acidification on two species of abalone. *Sci. Total Environ.* 2022, 852, 158144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158144>.
- Guo, X.; Huang, M.; Pu, F.; You, W.; Ke, C. Effects of ocean acidification caused by rising CO₂ on the early development of three mollusks. *Aquat. Biol.* 2015, 23, 147–157. <https://doi.org/10.3354/ab00615>.
- Gurr, S.J.; Trigg, S.A.; Vadopalas, B.; Roberts, S.B.; Putnam, H.M. Acclimatory gene expression of primed clams enhances robustness to elevated p CO₂. *Mol. Ecol.* 2022, 31, 5005–5023. <https://doi.org/10.1111/mec.16644>.
- Hedges, L.V.; Gurevitch, J.; Curtis, P.S. The meta-analysis of response ratios in experimental ecology. *Ecology* 1999, 80, 1150–1156. <https://doi.org/10.2307/177062>.
- Huang, Z.-X.; Chen, Z.-S.; Ke, C.-H.; Zhao, J.; You, W.-W.; Zhang, J.; Dong, W.-T.; Chen, J. Pyrosequencing of *Haliotis diversicolor* Transcriptomes: Insights into Early Developmental Molluscan Gene Expression. *PLoS ONE* 2012, 7, e51279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051279>.
- Hurd, C. L., Beardall, J., Comeau, S., Cornwall, C. E., Havenhand, J. N., Munday, P. L., ... & McGraw, C. M. (2020). Ocean acidification as a multiple driver: how interactions between changing seawater carbonate parameters affect marine life. *Marine and Freshwater Research*, 71(3), 263-274.
- Hurd, C.L.; Beardall, J.; Comeau, S.; Cornwall, C.E.; Havenhand, J.N.; Munday, P.L.; Parker, L.M.; Raven, J.A.; McGraw, C.M. Ocean acidification as a multiple driver: How interactions between changing seawater carbonate parameters affect marine life. *Mar. Freshw. Res.* 2020, 71, 263. <https://doi.org/10.1071/mf19267>.
- Ishida, H., Isono, R. S., Kita, J., & Watanabe, Y. W. (2021). Long-term ocean acidification trends in coastal waters around Japan. *Scientific reports*, 11(1), 1-7.
- Jaekle, W.B.; Manahan, D.T. Feeding by a “nonfeeding” larva: Uptake of dissolved amino acids from seawater by lecithotrophic larvae of the gastropod *Haliotis rufescens*. *Mar. Biol.* 1989a, 103, 87–94. <https://doi.org/10.1007/bf00391067>.

- Jaeckle, W.B.; Manahan, D.T. Growth and energy imbalance during the development of a lecithotrophic molluscan larva (*Haliotis rufescens*). *Biol. Bull.* 1989b, 177, 237–246. <https://doi.org/10.2307/1541939>.
- Jardillier, E., Rousseau, M., Gendron-Badou, A., Fröhlich, F., Smith, D. C., Martin, M., ... & Auzoux-Bordenave, S. (2008). A morphological and structural study of the larval shell from the abalone *Haliotis tuberculata*. *Marine Biology*, 154(4), 735-744.
- Jiang, Li-Qing; Feely, Richard A.; Wanninkhof, Rik; Greeley, Dana; Barbero, Leticia; Alin, Simone R.; Carter, Brendan R.; Pierrot, Denis; Featherstone, Charles; Hooper V, James A.; Melrose, Donald C.; Monacci, Natalie M.; Sharp, Jonathan D.; Shellito, Shawn M.; Xu, Yuan-Yuan; Kozyr, Alex; Byrne, Robert H.; Cai, Wei-Jun; Cross, Jessica N.; Johnson, Gregory C.; Hales, Burke; Langdon, Chris; Mathis, Jeremy T.; Salisbury, Joseph E.; Townsend, David W. (2020). Coastal Ocean Data Analysis Product in North America (CODAP-NA, Version 2021) (Acceso NCEI 0219960). [Transecto Pacífico Norte]. NOAA National Centers for Environmental Information. Dataset. <https://doi.org/10.25921/531n-c230>. Fecha de acceso [Diciembre 2023].
- Johnson, K.M.; Sieburth, J.M.; Williams, P.J.L.; Brandstrom, L. Coulometric total carbon dioxide analysis for marine studies: Automation and calibration. *Mar. Chem.* 1987, 21, 117–133. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(87\)90033-8](https://doi.org/10.1016/0304-4203(87)90033-8).
- Kapsenberg, L.; Bitter, M.C.; Miglioli, A.; Aparicio-Estalella, C.; Pelejero, C.; Gattuso, J.-P.; Dumollard, R. Molecular basis of ocean acidification sensitivity and adaptation in *Mytilus galloprovincialis*. *IScience* 2022, 25, 104677. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104677>.
- Kavousi, J.; Roussel, S.; Martin, S.; Gaillard, F.; Badou, A.; Di Poi, C.; Huchette, S.; Dubois, P.; Auzoux-Bordenave, S. Combined effects of ocean warming and acidification on the larval stages of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *Mar. Pollut. Bull.* 2022, 175, 113131. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113131>.
- Keough and Downes 1982 recruitment of marine invertebrates: The role of active larval choices and early mortality. *Oecologia (Berlin)* 54, 348 - 52.
- Keough, M.J.; Downes, B.J. Recruitment of marine invertebrates: The role of active larval choices and early mortality. *Oecologia* 1982, 54, 348–352. <https://doi.org/10.1007/bf00380003>.
- Kimura, R.; Takami, H.; Ono, T.; Onitsuka, T.; Nojiri, Y. Effects of elevated pCO₂ on the early development of the commercially important gastropod, Ezo abalone *Haliotis discus hannai*. *Fish. Oceanogr.* 2011, 20, 357–366. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2419.2011.00589.x>.
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R., Hendriks, I. E., Ramajo, L., Singh, G. S., ... & Gattuso, J. P. (2013). Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global change biology*, 19(6), 1884-1896.
- Kurihara, H.; Kato, S.; Ishimatsu, A. Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Biol.* 2007, 1, 91–98. <https://doi.org/10.3354/ab00009>.

- Leighton, D.L. (2000) *The Biology and Culture of the California abalones*, 1st ed.; Dorrance Pub Co. Ink., Pittsburg, USA
- Leighton, D.L. The Influence of Temperature on Larval and Juvenile Growth in Three Species of Southern California Abalones. *Fish. Bull.* 1972, 72, 1137–1145.
- Leighton, P., & Robinson, G. (2008). *Abalone hatchery manual* (pp. 1-88). Bord Iascaigh Mhara, Aquaculture Technical Section, Aquaculture Development Division.
- Lewis, E.R.; Wallace D.W.R; Allison, L.J. Program Developed for CO₂ System Calculations; Environmental System Science Data Infrastructure for a Virtual Ecosystem (ESS-DIVE):[M1] [MOU2] Oak Ridge, USA. 1998. <https://doi.org/10.2172/639712>.
- Li, J.; Jiang, Z.; Zhang, J.; Qiu, J.-W.; Du, M.; Bian, D.; Fang, J. Detrimental effects of reduced seawater pH on the early development of the Pacific abalone. *Mar. Pollut. Bull.* 2013, 74, 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.06.035>.
- López-Landavery, E.A.; Carpizo-Ituarte, E.J.; Pérez-Carrasco, L.; Díaz, F.; la Cruz, F.L.-D.; García-Esquivel, Z.; Hernández-Ayón, J.M.; Galindo-Sánchez, C.E. Acidification stress effect on umbonate veliger larval development in *Panopea globosa*. *Mar. Pollut. Bull.* 2021, 163, 111945. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111945>.
- Manahan, D. T. & Jaeckle, W. B. (1992) Implications of dissolved organic matter in seawater for the energetics of abalone larvae *Haliotis rufescens*: a review. In *Abalone of the World: Biology, Fisheries and Culture*. eds. Shepherd, S. A., Tegner, M. J. & Guzman del Proo, S. A., Fishing News Books, Oxford, 95–106.
- Mehrbach, C.; Culbertson, C.H.; Hawley, J.E.; Pytkowicz, R.M. Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnol. Oceanogr.* 1973, 18, 897–907. <https://doi.org/10.4319/lo.1973.18.6.0897>.
- Morash, A.J.; Alter, K. Effects of environmental and farm stress on abalone physiology: Perspectives for abalone aquaculture in the face of global climate change. *Rev. Aquac.* 2016, 8, 342–368.
- Mucci, A. (1983). The solubility of calcite and aragonite in seawater at various salinities, temperatures, and one atmosphere total pressure. *Am. J. Sci.* 283(7), 780-799
- Munday, P.L.; Dixon, D.L.; Donelson, J.M.; Jones, G.P.; Pratchett, M.S.; Devitsina, G.V.; Døving, K.B. Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 1848–1852. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809996106>.
- Nielsen, C., Carrier, T. J., Reitzel, A. M., & Heyland, A. (2018). Origin and diversity of marine larvae. *Evolutionary ecology of marine invertebrate larvae*, 3-15.
- O’Leary, J.K.; Barry, J.P.; Gabrielson, P.W.; Rogers-Bennett, L.; Potts, D.C.; Palumbi, S.R.; Micheli, F. Calcifying algae maintain settlement cues to larval abalone following algal exposure to extreme ocean acidification. *Sci. Rep.* 2017, 7, 5774. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05502-x>.
- Onitsuka, T.; Takami, H.; Muraoka, D.; Matsumoto, Y.; Nakatsubo, A.; Kimura, R.; Ono, T.; Nojiri, Y. Effects of ocean acidification with pCO₂ diurnal fluctuations on survival and larval shell formation of Ezo abalone, *Haliotis discus hannai*. *Mar. Environ. Res.* 2018, 134, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.12.015>.

- Parker, L.M.; Ross, P.M.; O'Connor, W.A.; Borysko, L.; Raftos, D.A.; Pörtner, H.O. Adult exposure influences offspring response to ocean acidification in oysters. *Glob. Change Biol.* 2012, 18, 82–92.
- Pernet, B. *Larval Feeding: Mechanisms, Rates, and Performance in Nature*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2018; pp. 87–102. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198786962.003.0007>.
- Peters, H., Rogers-Bennett, L. & De Shields, R.M. 2021. *Haliotis rufescens*. The IUCN Red List of Threatened Species 2021: e.T78771583A78772573. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-3.RLTS.T78771583A78772573.en>. Accessed on 02 September 2022.
- Phillips, N.E.; Gaines, S.D. Spatial and temporal variability in size at settlement of intertidal mytilid mussels from around Pt. Conception, California. *Invertebr. Reprod. Dev.* 2002, 41, 171–177. <https://doi.org/10.1080/07924259.2002.9652749>
- Pörtner, H. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: A physiologist's view. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2008, 373, 203–217. <https://doi.org/10.3354/meps07768>.
- R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria. 2020. Available online: <https://www.r-project.org/> (accessed on [M1] [MOU2] 1 February 2023).
- Ramesh, K.; Hu, M.Y.; Thomsen, J.; Bleich, M.; Melzner, F. Mussel larvae modify calcifying fluid carbonate chemistry to promote calcification. *Nat. Commun.* 2017, 8, 1709. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01806-8>.
- Regnier, P., Friedlingstein, P., Ciais, P., Mackenzie, F. T., Gruber, N., Janssens, I. A., ... & Thullner, M. (2013). Anthropogenic perturbation of the carbon fluxes from land to ocean. *Nature geoscience*, 6(8), 597-607.
- Riebesell, U.; Fabry, V.J.; Hansson, L.; Gattuso, J.P. *Guide to Best Practices for Ocean Acidification Research and Data Reporting*; reprinted edition including erratum; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2011; p. 258. <https://doi.org/https://doi.org/10.2777/66906>.
- Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Chapin III, F. S., Lambin, E., ... & Foley, J. (2009). Planetary boundaries: exploring the safe operating space for humanity. *Ecology and society*, 14(2).
- Rogers-Bennett, L., Klamt, R., & Catton, C. A. (2021). Survivors of climate driven abalone mass mortality exhibit declines in health and reproduction following kelp forest collapse. *Frontiers in Marine Science*, 8, 725134.
- Rossoll, D.; Bermúdez, R.; Hauss, H.; Schulz, K.G.; Riebesell, U.; Sommer, U.; Winder, M. Ocean acidification-induced food quality deterioration constrains trophic transfer. *PLoS ONE* 2012, 7, e34737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034737>.
- Ruddiman, W. F. (2013). The anthropocene. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 41, 45-68.
- Saba, G. K., Goldsmith, K. A., Cooley, S. R., Grosse, D., Meseck, S. L., Miller, A. W., ... & Zimmerman, R. (2019). Recommended priorities for research on ecological impacts of

- ocean and coastal acidification in the US Mid-Atlantic. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 225, 106188.
- SAGARPA. (2021). Carta Nacional Acuicola. <https://www.gob.mx/inapesca/documentos/carta-nacional-acuicola-2021>
- Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Cardona, A. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 2012, 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Searcy-Bernal, R., Ramade-Villanueva, M. R., & Altamira, B. (2010). Current status of abalone fisheries and culture in Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 573-576.
- Shapiro, S.S.; Wilk, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 1965, 52, 591. <https://doi.org/10.2307/2333709>
- Siedlecki, S. A., Pilcher, D., Howard, E. M., Deutsch, C., MacCready, P., Norton, E. L., ... & Klinger, T. (2021). Coastal processes modify projections of some climate-driven stressors in the California Current System. *Biogeosciences*, 18(9), 2871-2890.
- Strader, M.E.; Wong, J.M.; Hofmann, G.E. Ocean acidification promotes broad transcriptomic responses in marine metazoans: A literature survey. *Front. Zool.* 2020, 17, 7. <https://doi.org/10.1186/s12983-020-0350-9>.
- Stumpff, M.; Hu, M.; Casties, I.; Saborowski, R.; Bleich, M.; Melzner, F.; Dupont, S. Digestion in sea urchin larvae impaired under ocean acidification. *Nat. Clim. Change* 2013, 3, 1044–1049. <https://doi.org/10.1038/nclimate2028>.
- Sunda, W. G., & Cai, W. J. (2012). Eutrophication induced CO₂-acidification of subsurface coastal waters: interactive effects of temperature, salinity, and atmospheric pCO₂. *Environmental Science & Technology*, 46(19), 10651-10659.
- Swaney DP, Smith SV, and Wulff F (2011) The LOICZ Biogeochemical Modeling Protocol and its Application to Estuarine Ecosystems. In: Wolanski E and McLusky DS (eds.) *Treatise on Estuarine and Coastal Science*, Vol 9, pp. 135–159. Waltham: Academic Press.
- Swezey, D.S.; Boles, S.E.; Aquilino, K.M.; Stott, H.K.; Bush, D.; Whitehead, A.; Rogers-Bennett, L.; Hill, T.M.; Sanford, E. Evolved differences in energy metabolism and growth dictate the impacts of ocean acidification on abalone aquaculture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2020, 117, 26513–26519. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006910117>
- Tahil, A.S.; Dy, D.T. Effects of Reduced pH on Larval Settlement and Survival of the Donkey's Ear Abalone, *Haliotis asinina* (Linnaeus 1758). *Philipp. J. Sci.* 2015, 144, 21–29.
- Tahil, A.S.; Dy, D.T. Effects of reduced pH on the early larval development of hatchery-reared Donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* (Linnaeus 1758). *Aquaculture* 2016, 459, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.027>.
- Uppström, L.R. Boron/chlorinity ratio of deep-sea water from the Pacific Ocean. *Deep-Sea Res.* 1974, 21, 161–162. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(74\)90074-6](https://doi.org/10.1016/0011-7471(74)90074-6).
- Vargas, C.A.; de la Hoz, M.; Aguilera, V.; Martín, V.S.; Manríquez, P.H.; Navarro, J.M.; Torres, R.; Lardies, M.A.; Lagos, N.A. CO₂-driven ocean acidification reduces larval feeding efficiency and changes food selectivity in the mollusk *Concholepas*

- concholepas. J. Plankton Res. 2013, 35, 1059–1068. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbt045>.
- Waldbusser, G. G., Hales, B., Langdon, C. J., Haley, B. A., Schrader, P., Brunner, E. L., ... & Gimenez, I. (2015). Saturation-state sensitivity of marine bivalve larvae to ocean acidification. *Nature Climate Change*, 5(3), 273-280.
- Weiss, I. M., Tuross, N., Addadi, L. I. A., & Weiner, S. (2002). Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *Journal of Experimental Zoology*, 293(5), 478-491.
- Wessel, N.; Martin, S.; Badou, A.; Dubois, P.; Huchette, S.; Julia, V.; Nunes, F.; Harney, E.; Paillard, C.; Auzoux-Bordenave, S. Effect of CO₂-induced ocean acidification on the early development and shell mineralization of the European abalone (*Haliotis tuberculata*). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2018, 508, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.08.005>.
- World Bank (2013). Fish to 2030: Prospects for fisheries and aquaculture. Agriculture and Environmental Services Discussion Paper, 3. Washington, D. C., World Bank. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/17579>
- Zeebe, R. E. (2012). History of seawater carbonate chemistry, atmospheric CO₂, and ocean acidification. *Annual review of earth and planetary sciences*, 40(141), 2012.
- Zippay, M.L.; Hofmann, G.E. Effect of pH on gene expression and thermal tolerance of early life history stages of red abalone (*Haliotis rufescens*). J. Shellfish Res. 2010, 29, 429–439. <https://doi.org/10.2983/035.029.0220>.

Capítulo II

- Alexa A, Rahnenfuhrer J (2023). topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. doi:10.18129/B9.bioc.topGO, R package version 2.54.0, <https://bioconductor.org/packages/topGO>.
- Applebaum, S. L., Pan, T. C. F., Hedgecock, D., & Manahan, D. T. (2014). Separating the nature and nurture of the allocation of energy in response to global change. *American Zoologist*, 54(2), 284-295.
- Aravin AA, Naumova NM, Tulin AV, Vagin VV, Rozovsky YM, Gvozdev VA. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol*. 2001 Jul 10;11(13):1017-27. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00299-8.
- Ason, B., Darnell, D. K., Wittbrodt, B., Berezikov, E., Kloosterman, W. P., Wittbrodt, J., ... Plasterk, R. H. A. (2006). Differences in vertebrate microRNA expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14385–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.0603529103>
- Axtell, M. J. (2013). ShortStack: comprehensive annotation and quantification of small RNA genes. *Rna*, 19(6), 740-751. doi: 10.1261/rna.035279.112
- Bao, Y., Zhang, L., Dong, Y., & Lin, Z. (2014). Identification and comparative analysis of the *Tegillarca granosa* haemocytes microRNA transcriptome in response to Cd using a

- deep sequencing approach. *Plos one*, 9(4), e93619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093619>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–33. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan micromRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Berezikov, E., Liu, N., Flynt, A. S., Hodges, E., Rooks, M., Hannon, G. J., & Lai, E. C. (2010). Evolutionary flux of canonical microRNAs and mirtrons in *Drosophila*. *Nature genetics*, 42(1), 6-9. <https://doi.org/10.1038/ng0110-6>
- Bermúdez-Barrientos, J. R., Ramírez-Sánchez, O., Chow, F. W. N., Buck, A. H., & Abreu-Goodger, C. (2020). Disentangling sRNA-Seq data to study RNA communication between species. *Nucleic Acids Research*, 48(4), e21-e21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1198>
- Biggar KK, Kornfeld SF, Maistrovski Y, Storey KB. MicroRNA regulation in extreme environments: differential expression of microRNAs in the intertidal snail *Littorina littorea* during extended periods of freezing and anoxia. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2012 Oct;10(5):302-9. doi: 10.1016/j.gpb.2012.09.002.
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, 113(1), 25-36. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00231-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00231-9)
- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., ... & Whited, J. L. (2017). A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell reports*, 18(3), 762-776.
- Burgos-Aceves MA, Cohen A, Smith Y, Faggio C. A potential microRNA regulation of immune-related genes in invertebrate haemocytes. *Sci Total Environ*. 2018 Apr 15;621:302-307. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.285
- Campanati, C., Dupont, S., Williams, G. A., & Thiyagarajan, V. (2018). Differential sensitivity of larvae to ocean acidification in two interacting mollusc species. *Marine environmental research*, 141, 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.08.005>
- Campo-Paysaa, F., Sémon, M., Cameron, R. A., Peterson, K. J., & Schubert, M. (2011). microRNA complements in deuterostomes: origin and evolution of microRNAs. *Evolution & development*, 13(1), 15-27.
- Castellano, L., & Stebbing, J. (2013). Deep sequencing of small RNAs identifies canonical and non-canonical miRNA and endogenous siRNAs in mammalian somatic tissues. *Nucleic acids research*, 41(5), 3339-3351.
- Cech, T. R. (2012). The RNA worlds in context. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7), 1–5. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006742>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological reviews*, 198(1), 116-126.

- Chen G, Zhang C, Jiang F, Wang Y, Xu Z, Wang C. Bioinformatics analysis of hemocyte miRNAs of scallop *Chlamys farreri* against acute viral necrobiotic virus (AVNV). *Fish Shellfish Immunol.* 2014 Mar;37(1):75-86. doi: 10.1016/j.fsi.2014.01.002.
- Chen H, Wang L, Zhou Z, Hou Z, Liu Z, Wang W, Gao D, Gao Q, Wang M, Song L. The comprehensive immunomodulation of NeurimmiRs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas* after acetylcholine and norepinephrine stimulation. *BMC Genomics.* 2015 Nov 14;16:942. doi: 10.1186/s12864-015-2150-8.
- Chen X, Bai Z, Li J. The Mantle Exosome and MicroRNAs of *Hyriopsis cumingii* Involved in Nacre Color Formation. *Mar Biotechnol (NY).* 2019 Oct;21(5):634-642. doi: 10.1007/s10126-019-09908-8.
- Chen, H., Zhou, Z., Wang, H. et al. An invertebrate-specific and immune-responsive microRNA augments oyster haemocyte phagocytosis by targeting CgIkB2. *Sci Rep* 6, 29591 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep29591>
- Chen, H., Zhou, Z., Wang, L., Wang, H., Liu, R., Zhang, H., & Song, L. (2016). An invertebrate-specific miRNA targeted the ancient cholinergic neuroendocrine system of oyster. *Open biology*, 6(8), 160059. <https://doi.org/10.1098/rsob.160059>
- Chen, J. F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., ... & Wang, D. Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature genetics*, 38(2), 228-233. <https://doi.org/10.1038/ng1725>
- Comeau, S., Jeffree, R., Teyssie, J. L., & Gattuso, J. P. (2010). Response of the Arctic pteropod *Limacina helicina* to projected future environmental conditions. *PloS one*, 5(6), e11362.
- Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature.* 1970 Aug 8;227(5258):561-3. doi: 10.1038/227561a0. PMID: 4913914.
- Cuperus, J.T., Fahlgren, N., and Carrington, J.C. (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 23: 431–442.
- De Falco, G., Lauritano, C., & Carrella, S. (2023). MicroRNA-Mediated Responses: Adaptations to Marine Extreme Environments. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(2), 361. <https://doi.org/10.3390/jmse11020361>
- Degnan BM, Degnan SM, Morse DE (1997) Muscle-specific regulation of tropomyosin gene expression and myofibrillogenesis differs among muscle systems examined at metamorphosis of the gastropod *Haliotis rufescens*. *Development Genes and Evolution*, 206, 464–471.
- Degnan BM, Groppe JC, Morse DE (1995b) Chymotrypsin mRNA expression in digestive gland amoebocytes: cell specification occurs prior to metamorphosis and gut morphogenesis on the gastropod *Haliotis rufescens*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 205, 97–101.
- Degnan BM, Morse DE (1995a) Development and morphogenetic gene regulation in *Haliotis rufescens* larvae at metamorphosis. *American Zoologist*, 35, 391–398.
- Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149(3), 515-524.

- Erdélyi, P., Borsos, É., Takács-Vellai, K., Kovács, T., Kovács, A. L., Sigmond, T., ... & Vellai, T. (2011). Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of cell science*, 124(9), 1510-1518.
- Farazi, T. A., Juranek, S. A., & Tuschl, T. (2008). The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. 135 (7): 1201–1214. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.005629>
- Feng, D., Li, Q., Yu, H., Liu, S., Kong, L., & Du, S. (2020). Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in *Crassostrea gigas* to reveal functional miRNA and miRNA-targets regulating shell pigmentation. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 391(6669), 806-811.
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92–105. <http://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Fromm B, Keller A, Yang X, Friedlander MR, Peterson KJ, Griffiths-Jones S. Quo vadis microRNAs? *Trends Genet.* 2020 Jul;36(7):461-463. doi: 10.1016/j.tig.2020.03.007. Epub 2020 Apr 16. PMID: 32544447.
- Fromm, B., Billipp, T., Peck, L. E., Johansen, M., Tarver, J. E., King, B. L., ... & Peterson, K. J. (2015). A uniform system for the annotation of vertebrate microRNA genes and the evolution of the human microRNAome. *Annual review of genetics*, 49, 213-242. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092023>
- Fromm, B., Domanska, D., Høye, E., Ovchinnikov, V., Kang, W., Aparicio-Puerta, E., ... & Peterson, K. J. (2020). MirGeneDB 2.0: the metazoan microRNA complement. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D132-D141. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1016>
- Fromm, B., Høye, E., Domanska, D., Zhong, X., Aparicio-Puerta, E., Ovchinnikov, V., ... & Peterson, K. J. (2022). MirGeneDB 2.1: toward a complete sampling of all major animal phyla. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D204-D210. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac938>
- Fu Y, Shi Z, Wang G, Zhang J, Li W, Jia L. Expression of let-7 microRNAs that are involved in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) metamorphosis. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2013 Jun;165(2):106-13. doi: 10.1016/j.cbpb.2013.03.012. Epub 2013 Mar 23. PMID: 23528201.
- Gerstein, M. B., Bruce, C., Rozowsky, J. S., Zheng, D., Du, J., Korb, J. O., ... & Snyder, M. (2007). What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome research*, 17(6), 669-681
- Ghildiyal, M., Zamore, P. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10, 94–108 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrg2504>
- Gomes-dos-Santos, A., Lopes-Lima, M., Castro, L. F. C., & Froufe, E. (2020). Molluscan genomics: the road so far and the way forward. *Hydrobiologia*, 847(7), 1705-1726. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04111-1>

- Graham, A. M., & Barreto, F. S. (2019). Novel microRNAs are associated with population divergence in transcriptional response to thermal stress in an intertidal copepod. *Molecular ecology*, 28(3), 584-599. <https://doi.org/10.1111/mec.14973>
- Green, D., Dalmay, T. & Chapman, T. Microguards and micromessengers of the genome. *Heredity* 116, 125–134 (2016). <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.84>
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D154-8. doi: 10.1093/nar/gkm952.
- Griffiths, J. S., Sahasrabudhe, R. M., Marimuthu, M. P., Chumchim, N., Nguyen, O. H., Beraut, E., ... & Whitehead, A. (2022). A draft reference genome of the red abalone, *Haliotis rufescens*, for conservation genomics. *Journal of Heredity*, 113(6), 673-680. <https://doi.org/10.1093/jhered/esac047>
- Hadj-Moussa H, Logan SM, Seibel BA, Storey KB. Potential role for microRNA in regulating hypoxia-induced metabolic suppression in jumbo squids. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2018 Jun;1861(6):586-593. doi: 10.1016/j.bbagr.2018.04.007
- Harris, S. E. (1978). Basic mechanisms of ovarian function: germ cells. *Environmental Health Perspectives*, 24, 11-16. doi.org/10.1289/ehp.782411
- He, B., Cai, Q., Weiberg, A., Chen, A., Ouyang, S., Borkovich, K., ... & Jin, H. (2023). Botrytis cinerea small RNAs are associated with tomato AGO1 and silence tomato target genes supporting cross-kingdom RNAi between the fungal pathogen *B. cinerea* and its tomato host. doi.org/10.1101/2022.12.30.522274
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics*, 5(7), 522–31. <http://doi.org/10.1038/nrg1379>
- Hinman, V. F., O'Brien, E. K., Richards, G. S., & Degnan, B. M. (2003). Expression of anterior Hox genes during larval development of the gastropod *Haliotis asinina*. *Evolution & development*, 5(5), 508-521.
- Hinske, L. C. G., Galante, P. A., Kuo, W. P., & Ohno-Machado, L. (2010). A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome. *BMC genomics*, 11(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-533>
- Hochachka PW, Somero GN. 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York (NY): Oxford University Press.
- Holoch, D., & Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 16(2), 71-84. <https://doi.org/10.1038/nrg3863>
- Hornstein, E., & Shomron, N. (2006). Canalization of development by microRNAs. *Nature genetics*, 38(Suppl 6), S20-S24.
- Houle, D., Govindaraju, D. & Omholt, S. Phenomics: the next challenge. *Nat Rev Genet* 11, 855–866 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrg2897>
- Hoyeck MP, Hadj-Moussa H, Storey KB. Estivation-responsive microRNAs in a hypometabolic terrestrial snail. *PeerJ.* 2019 Feb 20;7:e6515. doi: 10.7717/peerj.6515.
- Huang S, Ichikawa Y, Yoshitake K, Kinoshita S, Igarashi Y, Omori F, Maeyama K, Nagai K, Watabe S, Asakawa S. Identification and Characterization of microRNAs and Their

- Predicted Functions in Biomineralization in the Pearl Oyster (*Pinctada fucata*). *Biology* (Basel). 2019 Jun 17;8(2):47. doi: 10.3390/biology8020047.
- Huang, S., Yoshitake, K., Asaduzzaman, M., Kinoshita, S., Watabe, S., & Asakawa, S. (2021). Discovery and functional understanding of MiRNAs in molluscs: a genome-wide profiling approach. *RNA biology*, 18(11), 1702-1715. doi:10.1080/15476286.2020.1867798
- Huang, Z. X., Chen, Z. S., Ke, C. H., Zhao, J., You, W. W., Zhang, J., ... & Chen, J. (2012). Pyrosequencing of *Haliotis diversicolor* transcriptomes: insights into early developmental molluscan gene expression. *PLoS One*, 7(12), e51279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051279>
- Huo, D., Sun, L., Li, X., Ru, X., Liu, S., Zhang, L., ... & Yang, H. (2017). Differential expression of miRNAs in the respiratory tree of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* under hypoxia stress. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(11), 3681-3692. <https://doi:10.1534/g3.117.1129/-/DC1>.
- Jackson DJ, Ellemor N, Degnan BM (2005) Correlating gene expression with larval competence and the effect of age and parentage on metamorphosis in the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Marine Biology*, 147, 681–697.
- Jackson DJ, Leys SP, Hinman VF, Woods R, Lavin MF, et al. (2002) Ecological regulation of development: induction of marine invertebrate metamorphosis. *Int J Dev Biol* 46: 679–686.
- Jackson DJ, McDougall C, Green K, Simpson F, Worheide G, et al. (2006) A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biol* 4: 40.
- Jaree, P., Wongdontri, C., & Somboonwiwat, K. (2018). White spot syndrome virus-induced shrimp miR-315 attenuates prophenoloxidase activation via PPAE3 gene suppression. *Frontiers in Immunology*, 9, 2184.
- Jiao Y, Zheng Z, Du X, Wang Q, Huang R, Deng Y, Shi S, Zhao X. Identification and characterization of microRNAs in pearl oyster *Pinctada martensii* by Solexa deep sequencing. *Mar Biotechnol* (NY). 2014 Feb;16(1):54-62. doi: 10.1007/s10126-013-9528-x
- John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., & Marks, D. S. (2004). Human microRNA targets. *PLoS biology*, 2(11), e363.
- Johnson, N. R., Yeoh, J. M., Coruh, C., & Axtell, M. J. (2016). Improved placement of multi-mapping small RNAs. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(7), 2103-2111. <https://doi.org/10.1534/g3.116.030452>
- Jühling F, Mörl M, Hartmann RK, Sprinzl M, Stadler PF, Pütz J. tRNAdb 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37(Database issue):D159-62. doi: 10.1093/nar/gkn772.
- Kang, W., Eldfjell, Y., Fromm, B., Estivill, X., Biryukova, I., & Friedländer, M. R. (2018). miRTrace reveals the organismal origins of microRNA sequencing data. *Genome biology*, 19(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1588-9>

- Koop, D., Richards, G. S., Wanninger, A., Gunter, H. M., & Degnan, B. M. (2007). The role of MAPK signaling in patterning and establishing axial symmetry in the gastropod *Haliothis asinina*. *Developmental Biology*, 311(1), 200-212.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., ... & Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics*, 37(5), 495-500.
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews. Genetics*, 11(9), 597–610. <http://doi.org/10.1038/nrg2843>
- Krüger, J., & Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W451-W454. doi:10.1093/nar/gkl243
- Krüger, J., & Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W451-W454. doi:10.1093/nar/gkl243
- Landgraf P. Rusu M. Sheridan R. Sewer A. Iovino N. Aravin A. Pfeffer S. Rice A. Kamphorst A.O. Landthaler M. et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007; 129: 1401-1414
- Langfelder, P., Horvath, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 9, 559 (2008). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>
- Lawrence M, Huber W, Pagès H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, Morgan M, Carey V (2013). “Software for Computing and Annotating Genomic Ranges.” *PLoS Computational Biology*, 9. doi:10.1371/journal.pcbi.1003118.
- Lee, I., Ajay, S. S., Yook, J. I., Kim, H. S., Hong, S. H., Kim, N. H., ... & Athey, B. D. (2009). New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome research*, 19(7), 1175-1183. 10.1101/gr.089367.108
- Lefevre, S. (2016). Are global warming and ocean acidification conspiring against marine ectotherms? A meta-analysis of the respiratory effects of elevated temperature, high CO₂ and their interaction. *Conservation Physiology*, 4(1), cow009. 10.1093/conphys/cow009
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):15-20. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035
- Love MI, Huber W, Anders S (2014). “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.” *Genome Biology*, 15, 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- Marco, A., Hooks, K., & Griffiths-Jones, S. (2012). Evolution and function of the extended miR-2 microRNA family. *RNA biology*, 9(3), 242-248.
- Martín-Gómez L, Villalba A, Kerkhoven RH, Abollo E. Role of microRNAs in the immunity process of the flat oyster *Ostrea edulis* against bonamiosis. *Infect Genet Evol*. 2014 Oct;27:40-50. doi: 10.1016/j.meegid.2014.06.026.
- Matzke MA, Mosher RA. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet*. 2014 Jun;15(6):394-408. doi: 10.1038/nrg3683.

- McGeary, S. E., Lin, K. S., Shi, C. Y., Pham, T. M., Bisaria, N., Kelley, G. M., & Bartel, D. P. (2019). The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science*, 366(6472), eaav1741. DOI: 10.1126/science.aav1741
- Mol Integr Physiol 160(3):331–340.
- Moran, A. L., & Manahan, D. T. (2003). Energy metabolism during larval development of green and white abalone, *Haliotis fulgens* and *H. sorenseni*. *The Biological Bulletin*, 204(3), 270-277. <https://doi.org/10.2307/1543598>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman. p. 1027
- Metabolismo del RNA
- Nolo, R., Morrison, C. M., Tao, C., Zhang, X., & Halder, G. (2006). The bantam microRNA is a target of the hippo tumor-suppressor pathway. *Current Biology*, 16(19), 1895-1904.
- Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M., & Lai, E. C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1), 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.028>
- Oliveira, A. C., Bovolenta, L. A., Nachtigall, P. G., Herkenhoff, M. E., Lemke, N., & Pinhal, D. (2017). Combining results from distinct microRNA target prediction tools enhances the performance of analyses. *Frontiers in genetics*, 8, 59. doi.org/10.3389/fgene.2017.00059
- Pan, Y., Zhao, Z., & Zhou, Z. (2021). Identification of miRNAs in sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* larvae response to pH stress. *Aquaculture Research*, 52(10), 4735-4744.
- Peterson, K. J., Dietrich, M. R., & McPeck, M. A. (2009). MicroRNAs and metazoan macroevolution: insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion. *Bioessays*, 31(7), 736-747.
- Peterson, K. J., Dietrich, M. R., & McPeck, M. A. (2009). MicroRNAs and metazoan macroevolution: insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion. *Bioessays*, 31(7), 736-747. <https://doi.org/10.1002/bies.200900033>
- Press release. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023. Fri. 7 Jul 2023. <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/press-release/>>
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D590-6. doi: 10.1093/nar/gks1219.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., ... & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 403(6772), 901-906.
- Rivera, H. E., Aichelman, H. E., Fifer, J. E., Kriefall, N. G., Wuitchik, D. M., Smith, S. J., & Davies, S. W. (2021). A framework for understanding gene expression plasticity and its influence on stress tolerance. *Molecular Ecology*, 30(6), 1381-1397.
- Rivest, E. B., & Hofmann, G. E. (2014). Responses of the metabolism of the larvae of *Pocillopora damicornis* to ocean acidification and warming. *PloS one*, 9(4), e96172.

- Roberts RD (2001) A review of settlement cues for larval abalone (*Haliotis* spp.). *Journal of Shellfish Research*, 20, 571–586.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*, 14(10a), 1902-1910.
- Rosani Umberto, Bortoletto Enrico, Bai Chang-Ming, Novoa Beatriz, Figueras Antonio, Venier Paola and Fromm Bastian 2021. Digging into bivalve miRNAomes: between conservation and innovation. *Phil. Trans. R. Soc.* B3762020016520200165
- Rosani, U., Abbadì, M., Green, T., Bai, C. M., Turolla, E., Arcangeli, G., ... & Venier, P. (2020). Parallel analysis of miRNAs and mRNAs suggests distinct regulatory networks in *Crassostrea gigas* infected by Ostreid herpesvirus 1. *BMC genomics*, 21(1), 1-18.
- Rosani, U., Pallavicini, A., & Venier, P. (2016). The miRNA biogenesis in marine bivalves. *PeerJ*, 4, e1763.
- Ruby J.G. Stark A. Johnston W.K. Kellis M. Bartel D.P. Lai E.C. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res.* 2007; 17: 1850-1864
- Sayols, S. (2023). rrvgo: a Bioconductor package for interpreting lists of Gene Ontology terms. *Micropublication Biology*, 2023. doi:10.17912/micropub.biology.000811,
- Schmidt-Nielsen K. 1972. *How animals work*. Cambridge (UK): Cambridge University Press.
- Schulte, Leon N., Ana Eulalio, Hans-Joachim Mollenkopf, Richard Reinhardt, and Jörg Vogel. "Analysis of the host microRNA response to *Salmonella* uncovers the control of major cytokines by the let-7 family." *The EMBO journal* 30, no. 10 (2011): 1977-1989
- Seebacher, F., White, C. R., & Franklin, C. E. (2015). Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nature Climate Change*, 5(1), 61-66.
- Seebacher, F., White, C. R., & Franklin, C. E. (2015). Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nature Climate Change*, 5(1), 61-66.
- Shahid, S., & Axtell, M. J. (2014). Identification and annotation of small RNA genes using ShortStack. *Methods*, 67(1), 20-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jymeth.2013.10.004>
- Shen, W., Le, S., Li, Y., & Hu, F. (2016). SeqKit: a cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PloS one*, 11(10), e0163962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>
- Smit, A., Hubley, R. & Green, P. RepeatMasker Open — 4.0. RepeatMasker <http://www.repeatmasker.org/> (2013).
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 912-920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>
- Song, H., Qi, L., Zhang, T., & Wang, H. Y. (2017). Understanding microRNA regulation involved in the metamorphosis of the veined rapa whelk (*Rapana venosa*). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(12), 3999-4008.

- Song, J., Li, W., Zhao, H., Gao, L., Fan, Y., & Zhou, S. (2018). The microRNAs let-7 and miR-278 regulate insect metamorphosis and oogenesis by targeting the juvenile hormone early-response gene Krüppel-homolog 1. *Development*, 145(24), dev170670.
- Spaulding DC, Morse DE (1991) Purification and characterization of sulfatases from *Halictis rufescens*: evidence for changes in synthesis and heterogeneity during development. *Journals of Comparative Physiology*, 161, 498–515.
- Storer, J., Hubley, R., Rosen, J., Wheeler, T. J., & Smit, A. F. (2021). The Dfam community resource of transposable element families, sequence models, and genome annotations. *Mobile DNA*, 12(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13100-020-00230-y>
- Stumpp M, et al. (2012) Acidified seawater impacts sea urchin larvae pH regulatory systems relevant for calcification. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(44):18192–18197
- Stumpp M, Wren J, Melzner F, Thorndyke MC, Dupont ST (2011) CO₂ induced sea- water acidification impacts sea urchin larval development I: Elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comp Biochem Physiol*
- Tarver JE, Sperling EA, Nailor A, Heimberg AM, Robinson JM, King BL, Pisani D, Donoghue PC, Peterson KJ. miRNAs: small genes with big potential in metazoan phylogenetics. *Mol Biol Evol.* 2013 Nov;30(11):2369-82. doi: 10.1093/molbev/mst133.
- Teleman, A. A., & Cohen, S. M. (2006). *Drosophila* lacking microRNA miR-278 are defective in energy homeostasis. *Genes & development*, 20(4), 417-422.
- Thomsen, J., & Melzner, F. (2010). Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 157(12), 2667-2676. <https://doi.org/10.1007/s00227-010-1527-0>
- Todgham, A.E. & Hofmann, G.E. (2009). Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO₂-driven seawater acidification. *Journal of Experimental Biology* 212, 2579–2594.
- Vasadia, D. J., Zippay, M. L., & Place, S. P. (2019). Characterization of thermally sensitive miRNAs reveals a central role of the FoxO signaling pathway in regulating the cellular stress response of an extreme stenotherm, *Trematomus bernacchii*. *Marine genomics*, 48, 100698.
- Vikram AgarwalGeorge W BellJin-Wu NamDavid P Bartel (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs *eLife* 4:e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Vikram AgarwalGeorge W BellJin-Wu NamDavid P Bartel (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs *eLife* 4:e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Visser, M. E. (2008). Keeping up with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1635), 649-659.
- Voinnet, O., Baulcombe, D. Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389, 553 (1997). <https://doi.org/10.1038/39215>

- Walker SE, Spencer GE, Necakov A, Carlone RL. Identification and Characterization of microRNAs during Retinoic Acid-Induced Regeneration of a Molluscan Central Nervous System. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 13;19(9):2741. doi: 10.3390/ijms19092741.
- Wei, P., He, P., Zhang, X., Li, W., Zhang, L., Guan, J., ... & Peng, J. (2019). Identification and characterization of microRNAs in the gonads of *Crassostrea hongkongensis* using high-throughput sequencing. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 31, 100606. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.100606>
- Wheeler, B. M., Heimberg, A. M., Moy, V. N., Sperling, E. A., Holstein, T. W., Heber, S., & Peterson, K. J. (2009). The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evolution & development*, 11(1), 50-68. DOI: 10.1111/j.1525-142X.2008.00302.x
- Williams, E. A., Degnan, B. M., Gunter, H., Jackson, D. J., Woodcroft, B. J., & Degnan, S. M. (2009). Widespread transcriptional changes pre-empt the critical pelagic–benthic transition in the vetigastropod *Haliotis asinina*. *Molecular Ecology*, 18(5), 1006-1025
- Xu, F., Wang, X., Feng, Y., Huang, W., Wang, W., Li, L., ... & Zhang, G. (2014). Identification of conserved and novel microRNAs in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* by deep sequencing. *Plos one*, 9(8), e104371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104371>
- Zhang, Y., Jiao, Y., Li, Y., Tian, Q., Du, X., & Deng, Y. (2021). Comprehensive analysis of microRNAs in the mantle central and mantle edge provide insights into shell formation in pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 252, 110508.
- Zhao, X., Yu, H., Kong, L. et al. High throughput sequencing of small RNAs transcriptomes in two *Crassostrea* oysters identifies microRNAs involved in osmotic stress response. *Sci Rep* 6, 22687 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep22687>
- Zhao, Y., Samal, E., & Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 436(7048), 214-220.
- Zheng Z, Jiao Y, Du X, Tian Q, Wang Q, Huang R, Deng Y. Computational prediction of candidate miRNAs and their potential functions in biomineralization in pearl oyster *Pinctada martensii*. *Saudi J Biol Sci*. 2016 May;23(3):372-8. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.04.001
- Zhou Z, Wang L, Song L, et al. The identification and characteristics of immune-related microRNAs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One*. 2014;9(2):e88397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088397>
- Zhu, X., Chen, Y., Zhang, Z., Zhao, S., Xie, L., & Zhang, R. (2020). A species-specific miRNA participates in biomineralization by targeting CDS regions of Prsilkin-39 and ACCBP in *Pinctada fucata*. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.

Anexo 1. Análisis bioinformático

El siguiente código de análisis está relacionado al descrito en la sección de métodos de esta tesis (Figura 21). Ya que la sintaxis usada puede llegar a ser actualizado por los distribuidores de programas y lenguajes de programación ajenos a esta tesis, se recomienda al lector visitar la siguiente fuente de información en línea para una mejor compatibilidad con la reproducibilidad del flujo de análisis descrito en esta tesis: <https://github.com/RJEGR/Small-RNASeq-data-analysis/wiki/MicroRNA-analysis>.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| Evaluación de la calidad y limpieza de lecturas | 115 |
| Curación y procesamiento de bases de datos | 116 |
| Genoma de referencia | 116 |
| Análisis de los loci que codifican ARNs pequeños | 116 |
| miRs conocidos de referencia | 116 |
| Anotaciones de elementos repetidos en el genoma del abulón rojo | 117 |
| Ensamble, anotación y cuantificación de ARNs pequeños | 117 |
| Predicción de la función regulatoria de miRs | 118 |
| RNAHybrid | 118 |
| TargetScan | 118 |
| Instalación rápida usando el gestor de paquetes conda | 118 |

Evaluación de la calidad y limpieza de lecturas

```
# A) FastQC v0.11.7

mkdir -p fastqc

fastqc *.fastq -t 24 --nogroup -o ./fastqc &> fastqc.log &

# B) MultiQC v1.10.1

multiqc ./fastqc/*zip -o multiqc
```

```
# 1.0.1

mirtrace qc -s meta_species_all *.fq -w --uncollapse-fasta --t 20

# Subset reads by biotype:

cd qc_passed_reads.all.uncollapsed/
```

```
for i in $(ls *fasta); do cat $i | seqkit grep -n -r -p "rnatype:mirna" -p "rnatype:unknown" >
${i%.fasta}.subset.fasta; done
```

Curación y procesamiento de bases de datos

Genoma de referencia

```
VERSION=gca023055435v1rs
RELEASE=release-56

# A) DNA sequences
TYPE=dna
DATA=Haliotis_rufescens_${VERSION}.xgHalRufe1.0.p.dna.toplevel.fa.gz

URL=https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/$RELEASE/metazoa/fasta/haliotis_rufescens_${V
ERSION}/dna/$DATA

wget $URL

# B) Sequence features (GTF)
TYPE=gtf
DATA=Haliotis_rufescens_gca023055435v1rs.xgHalRufe1.0.p.56.${TYPE}.gz

URL=https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/$RELEASE/metazoa/${TYPE}/haliotis_rufescens
_${VERSION}/$DATA

wget $URL

gunzip *.gz
```

Análisis de los loci que codifican ARNs pequeños

El código de programación en R usado para reproducir esta etapa de la tesis puede ser obtenido del paso 3 de la siguiente fuente: <https://github.com/RJEGR/Small-RNASeq-data-analysis/wiki/MicroRNA-analysis>.

miRs conocidos de referencia

```
mkdir "MIRGENEDB_"$(date +%Y%m%d)

cd MIRGENEDB*

url=https://mirgenedb.org

curl -o ALL-pre.fa -OJX GET "${url}/static/data/ALL/ALL-pre.fas"

curl -o ALL-mat.fa -OJX GET "${url}/fasta/ALL?mat=1"

curl -o ALL.fa -OJX GET "${url}/fasta/ALL?all=1"
```


Predicción de la función regulatoria de miRs RNAHybrid

```
# Usage: RNAhybrid [options] [target sequence] [query sequence].

target=three_prime_utr.fa

query=mature_star_mir.fa

output=${query%.*}_vs_${target%.*}

RNAhybrid -t $target -m 20000 -q $query -n 50 -f 2,8 -s 3utr_human > ${output}_RNAhybrid.out
&
```

TargetScan

```
# ./targetscan_70.pl miRNA_file UTR_file PredictedTargetsOutputFile

target=three_prime_utr_rmdup_ts.txt
# target=mir_vs_utr_rmdup_RNAhybrid.out.psig_ts.txt

query=mir_ts.txt

prefix=${target%.*}

output=${query%.*}_vs_${prefix}

./targetscan_70.pl $query $target ${output}_targetscan.out &> targetscan.log &
```

Instalación rápida usando el gestor de paquetes conda

```
# FASTQC
conda install -c bioconda fastqc
# MULTIQC
conda install multiqc

conda install -c bioconda mirtrace

conda install -c bioconda seqkit

conda create --name ShortStack4 shortstack

conda activate ShortStack4
```