

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Marinas

Instituto de Investigaciones Oceanológicas



**EFECTO DEL pH REDUCIDO SOBRE PROCESOS DE CALCIFICACIÓN EN
GÁSTRULAS Y LARVAS EQUINOPLUTEUS DE CUATRO BRAZOS DE
ERIZO MORADO *Strongylocentrotus purpuratus***

Tesis

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Presenta

Eduardo Damián Moreno Sánchez

Ensenada, Baja California, México Noviembre 2016

Efecto del pH sobre procesos de calcificación en gástrulas y larvas equinopluteus de cuatro brazos de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*

Resumen

El aumento de las emisiones de CO₂ atmosférico y su subsecuente dilución en el océano, donde forma ácido carbónico, para después disociarse en bicarbonato y protones, genera el fenómeno denominado acidificación oceánica. Consecuentemente se espera que el pH oceánico disminuya entre 0.3-0.5 unidades para el año 2100, para pasar de 8.0 a 7.5. Se prevé que este cambio impacte a los ecosistemas marinos y modifique varios procesos biológicos, que incluye el desarrollo, calcificación y, la expresión de genes. Estudios revelan que la respuesta a las variaciones de pH oceánico es dependiente de la especie y del estadio de vida en el que se encuentren los organismos. Se estima que los estadios larvales de los organismos marinos calcificadores sufrirán un mayor impacto con la reducción de pH del océano, por la cual resulta fundamental entender los efectos que pueda tener sobre dichos organismos. El objetivo de este trabajo, en consideración a lo anterior, es evaluar el impacto que tienen la disminución del pH oceánico en la calcificación de gástrulas y larvas equinopluteus de cuatro brazos del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, que habita en la costa del Pacífico de Baja California, México. Para esto se cultivaron larvas de *S. purpuratus* en tres condiciones de pH: 8.0, 7.7 y 7.5. Una vez que las larvas alcanzaron los

estadios de gástrula y larva equinopluteus de cuatro brazos, se analizó la morfometría, el contenido de ceniza inorgánica y los niveles de expresión de los genes *SM30*, *SM29* y *Anhidrasa Carbónica*, los cuales codifican para proteínas relacionadas con los procesos de calcificación en el erizo. Como resultado, se observó que las condiciones de pH reducido no modificaron significativamente la sobrevivencia larval tras los cuatro días de cultivo. Sin embargo, se observó una reducción significativa en la morfometría de gástrulas (3.79% en pH 7.7; 6.76% en pH 7.5) y de larvas de cuatro brazos (4.14% en pH 7.7; 9.63% en pH 7.5). Asimismo, se observó una reducción en el material calcificado (evaluado mediante las cenizas inorgánicas) en gástrulas (5.56% en pH 7.7; 6.01% en pH 7.5) y en larvas de cuatro brazos en pH 7.5 (9.63%) y, un aumento en pH 7.7 (1.88%). Se encontró un aumento en la expresión relativa de *SM29* en gástrulas (1.40% en pH 7.7; 2.80% en pH 7.5) y en larvas de cuatro brazos en pH 7.7 (5.60%), pero una reducción en pH 7.5 (33.75%). Igualmente se observó una disminución significativa en la expresión de *SM30* en gástrula (56.08% en pH 7.7; 65.33% en pH 7.5) y en larvas de cuatro brazos (68.42% en pH 7.7; 81.58% en pH 7.5), así como un aumento en la expresión de *Anhidrasa Carbónica*, tanto en gástrulas (11.90% en pH 7.7, 17.30% en pH 7.5) como en larvas de cuatro brazos (68% en pH 7.7; 52.30% en pH 7.5). Los resultados sugieren que larvas de esta especie presentarán cuerpos pequeños, una modificación en la expresión de genes y dificultad para calcificar en condiciones de pH reducido.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO DEL pH REDUCIDO SOBRE PROCESOS DE CALCIFICACIÓN EN
GÁSTRULAS Y LARVAS EQUINOPLUTEUS DE CUATRO BRAZOS DE ERIZO

MORADO *Strongylocentrotus purpuratus*

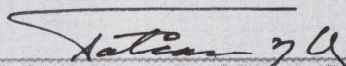
TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

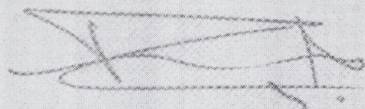
PRESENTA

EDUARDO DAMIAN MORENO SÁNCHEZ


Aprobada por:



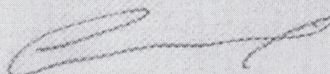
Dra. Tatiana Nemetzen Olvera Bañuelos
Directora de tesis



M. en C. Roberto Escobar Fernández
Sinodal



Dr. José Martín Hernández Ayón
Sinodal



Dr. Pedro Medina Rosas
Sinodal

Agradecimientos

A la Dra. Tatiana, por su proporcionarme su conocimiento e infinita paciencia, para enseñarme tanto en el laboratorio como en lo académico para la realización de este trabajo, así como sus sugerencias y comentarios para hacerme entender cómo realizar una tesis, y por ayudarme a crecer como persona.

A mis sinodales, el Dr. José Martín Hernández Ayón, por su apoyo y consejos en el laboratorio de Oceanografía Química, ayudarme a entender el proceso de acidificación oceánica, y sus consejos para la realización de este trabajo; y al M. en C. Roberto Escobar Fernández y el . Dr. Pedro Medina Rosas por sus consejos y apoyo para la realización de esta tesis.

A Javier García Pámpanos, por siempre ayudarme y apoyarme en el laboratorio húmedo con problemas que pudieran surgir durante el transcurso del trabajo, y conseguirme erizos cuando los necesitaba. A Marco González por su ayuda en el laboratorio húmedo. Al oceanólogo Arturo Siqueiros, por su ayuda con los asuntos del pH en los cultivos.

Al Dr. Saúl García Esquivel, por prestarnos equipo para realizar los análisis de cenizas.

A Sandra por su apoyo y amistad en el laboratorio de Biología Molecular. A Linda, Orión y Gabriela, del Laboratorio de Oceanografía Costera, por su apoyo para la realización de los análisis de la química del agua.

A toda mi familia, en especial a mi madre y mi padrino, por todo su apoyo durante mi estancia en el programa de Maestría.

A Allison J Gong, de California Naturalist © (2015) Institute of Marine Sciences, University of California, Santa Cruz, por permitirme utilizar sus fotografías de larvas de erizo morado.

A la UABC y, al Instituto de Investigaciones Oceanológicas, por todas las facilidades y acceso a instalaciones que me proporcionaron, y por aceptarme en el programa de Maestría.

A CONACyT, por el apoyo económico con la beca número 385235.

Tabla de Contenidos

Resumen	i
Índice de Figuras	ix
Índice de Tablas	xiv
Lista de Abreviaturas y Símbolos	xv
Introducción	1
Antecedentes	6
Cambio climático.....	6
Acidificación oceánica.....	8
Calcificación de organismos marinos.....	15
Calcificación en equinodermos	17
Acidificación y calcificación en invertebrados marinos.....	27
Justificación	37
Objetivos	39
Objetivo General.....	39
Objetivos Particulares	39
Hipótesis	40
Metodología	41
Colecta de organismos	41

Tratamientos experimentales.....	44
Acidificación del agua de mar y monitoreo de pH.....	45
Sobrevivencia larval.....	47
Análisis morfométrico.....	48
Cenizas.....	49
Extracción de ARN total.....	50
Ensayos de PCR-Tiempo Real.....	51
Relación entre química del agua y factores biológicos.....	54
Resultados	55
Medición de pH de los cultivos.....	55
Sobrevivencia Larval.....	58
Morfometría.....	59
Gástrulas.....	60
Larvas equinopluteus de 4 brazos.....	63
Cenizas.....	67
PCR en Tiempo Real.....	69
Gástrula.....	69
Larvas equinopluteus de 4 brazos.....	72
Relación entre la química del agua y los factores biológicos.....	79

Discusión	94
Conclusión	106
Perspectivas a futuro	107
Literatura Citada	109
Anexos	122

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama de la anatomía de un erizo adulto de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	20
Figura 2. Estadios larvales del erizo.....	21
Figura 3. Mapa de la zona de estudio.....	42
Figura 4. Variación de pH, Carbono Inorgánico Disuelto y Ω_{Calcita} en los tratamientos experimentales, desde el día cero hasta el día cuatro postfertilización.	57
Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia larval de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	58
Figura 6. Gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> cultivadas bajo diferentes condiciones de pH, y mediciones realizadas.	59
Figura 7. Largo del cuerpo de gástrula de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	61
Figura 8. Ancho del cuerpo de gástrula de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	62
Figura 9. Suma de las mediciones de ancho y largo de gástrulas de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	63

Figura 10. Largo del cuerpo de Larva de 4 Brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	64
Figura 11. Ancho del cuerpo de Larva de 4 Brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	65
Figura 12. Largo de brazo postoral de Larva de 4 Brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	66
Figura 13. Suma de las mediciones de ancho, largo y largo del brazo postoral de Larvas 4 de brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	67
Figura 14. Porcentaje de cenizas de gástrulas de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> cultivadas en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5, normalizado a cero con respecto al control a pH 8.0.....	68
Figura 15. Porcentaje de cenizas de larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> cultivadas en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5, normalizado a cero con respecto al control a pH 8.0.....	67
Figura 16. Expresión relativa del gen <i>SM29</i> en gástrulas de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	70
Figura 17. Expresión relativa del gen <i>SM30</i> en gástrulas de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	71

Figura 18. Expresión relativa del gen de <i>Anhidrasa Carbónica</i> en gástrulas de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	72
Figura 19. Expresión relativa del gen <i>SM29</i> en larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	73
Figura 20. Expresión relativa del gen <i>SM30</i> en larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	74
Figura 21. Expresión relativa del gen <i>Anhidrasa Carbónica</i> en larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5.....	75
Figura 22. Expresión relativa de los genes <i>SM29</i> , <i>SM30</i> y <i>Anhidrasa Carbónica</i> en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en condiciones de pH 7.7.....	76
Figura 23. Expresión relativa de los genes <i>SM29</i> , <i>SM30</i> y <i>Anhidrasa Carbónica</i> en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>S. purpuratus</i> en condiciones de pH 7.5.....	78
Figura 24. Expresión relativa de los genes <i>SM29</i> , <i>SM30</i> y <i>Anhidrasa Carbónica</i> en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>S. purpuratus</i> en condiciones de pH 7.7 y 7.5.....	79

Figura 25. Relación entre Carbono Inorgánico Disuelto y porcentaje de ceniza en gástrulas y larvas de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	80
Figura 26. Relación entre el estado de saturación de la Ω_{Calcita} y porcentaje de ceniza en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	81
Figura 27. Relación entre Carbono Inorgánico Disuelto en cultivos a diferentes pH (8.0, 7.7 y 7.5) y largo de gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	82
Figura 28. Relación entre Carbono Inorgánico Disuelto en cultivos a diferentes pH (8.0, 7.7 y 7.5) y ancho de gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	83
Figura 29. Relación entre Carbono Inorgánico Disuelto en cultivos a diferentes pH (8.0, 7.7 y 7.5) y largo del brazo postoral de larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	84
Figura 30. Relación entre el estado de saturación de la Ω_{Calcita} y el largo corporal en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	85
Figura 31. Relación entre el estado de saturación de la Ω_{Calcita} y el ancho corporal de gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	86

- Figura 32.** Relación entre Carbono Inorgánico Disuelto en cultivos a diferentes pH (8.0, 7.7 y 7.5) y largo del brazo postoral de larvas equinopluteus de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*.....87
- Figura 33.** Relación entre el la concentración de Carbono Inorgánico Disuelto en cultivo y expresión relativa del gen *SM29* en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*.....88
- Figura 34.** Relación entre el la concentración de Carbono Inorgánico Disuelto en cultivo y expresión relativa del gen *SM30* en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*.....89
- Figura 35.** Relación entre el la concentración de CID en cultivo y expresión relativa del gen *Anhidrasa Carbónica* en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de *S. purpuratus*.....90
- Figura 36.** Relación entre el estado de saturación de la Ω_{Calcita} y expresión relativa del gen *SM29* en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*.....91
- Figura 37.** Relación entre el estado de saturación de la Ω_{Calcita} y expresión relativa del gen *SM30* en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*.....92
- Figura 38.** Relación entre el estado de saturación de la Ω_{Calcita} y expresión relativa del gen *Anhidrasa Carbónica* en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*.....93

Índice de Tablas

Tabla I. Características de los eventos de surgencia en Arbolitos.....	14
Tabla II. Estimación de la historia de vida de los organismos progenitores.....	26
Tabla III. Fecha de colecta de adultos progenitores.....	42
Tabla IV. Secuencia de primers para PCR en Tiempo Real.....	53
Tabla V. Parámetros de los cultivos larvales.....	56

Lista de Abreviaturas y Símbolos

Abreviatura/Símbolo	Significado
μatm	Microatmósferas
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
A_{MFUV}	Agua de mar filtrada esterilizada con luz UV
<i>AnhC</i>	Gen Anhidrasa Carbónica
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AT	Alcalinidad Total
Ca^{2+}	Ion Calcio
CaCO_3	Carbonato de Calcio
CCA	Carbonato de Calcio Amorfo
CID	Carbono Inorgánico Disuelto
CO_2	Dióxido de Carbono
CO_3^{2-}	Ion Carbonato
C_T	Threshold Cycle, Ciclo Umbral
Gt	Gigatoneladas
H^+	Ion hidrógeno; protón.
H_2CO_3	Ácido Carbónico
H_2O	Agua
HCO_3^-	Ion Bicarbonato
KCl	Cloruro de Potasio
kDa	Kilo Dalton
L	Litro
LBP	Largo de Brazo Postoral
Mg	Magnesio
mL	Mililitro
$p\text{CO}_2$	Presión parcial de dióxido de carbono
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
pH_{NBS}	National Bureau of Standards, Escala de pH del Buró Nacional de Estándares
PMC	Primary Mesenchyme Cells, Células Primarias del Mesénquima
ppm	Partes por millón
<i>SM29</i>	Gen de la Proteína de Matriz 29
<i>SM30</i>	Gen de la Proteína de Matriz 30
Ω	Estado de saturación del carbonato de calcio
Ω_{Ar}	Estado de saturación de la Aragonita
Ω_{Ca}	Estado de saturación de la Calcita

Introducción

Los registros indican que desde la revolución industrial hasta la época actual, debido al uso humano de combustibles fósiles y la creciente deforestación, la concentración de dióxido de carbono (CO_2) atmosférico ha aumentado de 280 ppm a 401.72 ppm (Doney et al., 2009; Dlugokencky & Tans, NOAA/ESRL). Se prevé que para el año 2100 esta concentración aumente a 970 ppm (Orr et al., 2005). Como consecuencia de esto se espera un aumento en la temperatura global por efecto invernadero (IPCC, 2007).

El CO_2 atmosférico es capturado por los océanos (IPCC, 2007) y, al disolverse en el agua, este gas se hidrata, lo que genera ácido carbónico (H_2CO_3). El ácido carbónico se disocia a bicarbonato (HCO_3^-) y carbonato (CO_3^{2-}), y libera protones (ion H^+) (Orr et al., 2005; Doney et al., 2009). El aumento en la concentración de protones en el medio marino trae consigo la disminución del pH oceánico, en un fenómeno conocido como acidificación oceánica (Doney et al., 2009). En la actualidad, el pH del mar es en promedio de 8.02 ± 0.1 (escala de iones de hidrógeno total) (Hofmann et al., 2011) y se tiene previsto que este valor de pH oceánico disminuya entre 0.3 y 0.5 unidades para el 2100 (Caldeira y Wickett, 2005; Doney et al., 2009; Orr et al., 2005; Raven et al., 2005; Wolf-Gladrow et al., 2007). Un decremento en el pH trae como consecuencia no solo la reducción de las especies de carbonato (Bicarbonato y carbonato), sino que también disminuye el estado de saturación de la calcita (el mineral utilizado en la calcificación) y promueve su disolución (Orr et al., 2005;

Raven et al., 2005; Doney et al., 2009). Esto significa que un decremento en el estado de saturación de la Ω_{Calcita} (Ω_{Ca}) tendrá un impacto en la capacidad de calcificación de los organismos marinos (Raven et al., 2005). Se sabe que las variaciones en temperatura o pH, tienen un efecto sobre los procesos naturales de los organismos marinos, como en la reproducción de *Cerastoderma edulis* (Morgan et al., 2013), el desarrollo corporal de *Lytechinus variegatus* (Albright et al., 2012) y de *Strongylocentrotus purpuratus* (Stumpp et al., 2011b), los procesos digestivos y metabólicos de *Strongylocentrotus droebachiensis* (Stumpp et al., 2013) y, la biomineralización de estructuras calcáreas, como en el caso de *Trinpnustes gratilla* (Brennand et al., 2010). Se piensa que los estadios larvales de los invertebrados calcificadores se encuentran entre los organismos marinos que podrán llegar a sufrir un mayor impacto por los cambios en el pH oceánico, debido a alteraciones fisiológicas y la reducción en la disponibilidad de los componentes químicos necesarios para la calcificación (Raven et al., 2005; Doney et al., 2009; Kroeker et al., 2013).

El erizo de mar morado, *Strongylocentrotus purpuratus*, es un invertebrado calcificador del grupo de los equinodermos que habita en la zona intermareal de costas rocosas. Se distribuye desde Alaska (Duggins, 1981), por toda la costa del Pacífico, hasta Isla Cedros en Baja California (Sagarin y Gaines, 2002). El erizo morado forma parte importante del ecosistema dado que es un organismo estructurador y controlador de los bosques de macroalgas (Lafferty y Kushner,

2000). Entre sus depredadores naturales se encuentran las estrellas de mar y la nutria marina (Tegner y Dayton, 1981; Workman, 1999).

Los erizos de mar poseen un estadio larval conocido como equinopluteus (Smith, 1997), el cual presenta simetría bilateral. Su desarrollo inicia desde el cigoto, el cual atraviesa por una serie de divisiones celulares, hasta formar una gástrula ciliada (Smith et al., 2008). Es en este estadio en el cual se da inicio a la calcificación (Wilt, 1999). Aproximadamente a las 96 horas postfertilización, las larvas desarrollan 2 pares de brazos: un par postoral y otro par anterolateral, posicionados en el lado anal de la larva (Smith et al., 2008). Aproximadamente a los 9 días postfertilización la larva se encuentra en el estadio de 6 brazos, tras desarrollar un par más de brazos (preorales) y, a los 12 días postfertilización, la larva desarrolla un último par de brazos (posterorales) (Smith et al., 2008). Aproximadamente a los 36 días postfertilización la larva se encuentra en competencia para entrar a metamorfosis y pasar a erizo juvenil (Smith et al., 2008). La larva presenta un endoesqueleto de calcita, el cual le proporciona soporte corporal (y estructura a los brazos) y, es necesario para el correcto desarrollo larval (Pennington y Strathmann, 1990). Además, el esqueleto proporciona peso y densidad a los organismos e influye en la orientación pasiva de éstos en la columna de agua (Pennington y Strathmann, 1990). El endoesqueleto larval de un erizo está formado de espículas, las cuales están constituidas de calcita y aproximadamente un 5% de magnesio (Raz et al., 2003). Durante su desarrollo, las larvas de erizo morado toman tanto el

carbonato como el calcio y magnesio necesario para la calcificación, directamente de la columna de agua (Wilt, 2002). Las espículas poseen una matriz proteica interna, la cual constituye un 0.1% del peso de la espícula. Se han identificado alrededor de 231 proteínas de la matriz, entre las cuales se encuentran SM29 y SM30, proteínas necesarias para el depósito de carbonato de calcio en las espículas y su elongación. También se sabe que algunas enzimas, como la Anhidrasa Carbónica que sintetiza la reacción reversible de transformar CO_2 diluido en bicarbonato para poder llevar a cabo la calcificación, juegan un papel vital en la formación de las estructuras calcificadas de los erizos (Wilt, 2002; Mann et al., 2010; Wilt et al., 2013). Así, las variaciones de pH en el océano pueden tener un efecto negativo sobre los procesos de calcificación, así como en los procesos de homeostasis y de desarrollo.

Estudios previos indican que la reducción simulada de pH oceánico produce modificaciones en el desarrollo de larvas del erizo morado, las cuales pueden observarse como una disminución en su tamaño corporal y malformaciones (Chan et al., 2013; Stumpp et al., 2011b). También se han observado aumentos la tasa de respiración, la demanda energética (Stumpp et al., 2011b; Pan et al., 2015) y, en la expresión de genes involucrados con la regulación de ácidos bases, lo cual sugiere un desbalance iónico celular; esto se ha observado en *Paracentrotus lividus* (Martin et al., 2011) y en *Strongylocentrotus purpuratus* (Evans et al., 2013; Padilla-Gamiño et al., 2013).

De acuerdo a lo documentado para diferentes organismos, el efecto de la reducción de pH en equinodermos es específico para cada especie (Dupont et al., 2010). Esto resalta la importancia de realizar estudios sobre el efecto que tiene el pH en las etapas de desarrollo larval del erizo morado, con la finalidad de determinar cómo las condiciones de pH predichas para los años 2050 (pH 7.7) y 2100 (pH 7.5) (Caldeira y Wickett, 2005), modificarán los patrones de desarrollo y/o calcificación larval. Los resultados generados nos proporcionarán información importante con la cual será posible establecer bases sobre el papel que tiene el pH reducido en el desempeño de las larvas de erizo morado, cuyos progenitores habitan en Arbolitos, Baja California, México.

Antecedentes

Cambio climático

Los gases de efecto invernadero son aquellos que atrapan la radiación solar en forma de calor dentro de la atmósfera terrestre, lo cual afecta la absorción, dispersión y emisión de radiación en la superficie del planeta (IPCC, 2014). Las actividades humanas generan emisiones de gases de efecto invernadero, que incluye al metano, óxido nitroso, halocarbonos y dióxido de carbono, siendo este último el gas de efecto invernadero más importante (IPCC, 2014). Durante el periodo comprendido entre 1970 y 2010, el CO₂ contribuyó en aproximadamente un 78% del aumento de emisiones de gases de efecto invernadero (21 a 32 gigatoneladas (Gt) por año) (IPCC, 2014). En el año 2010, el 76% del total de las emisiones de gases de efecto invernadero fueron consecuencia antropogénica, siendo las fuentes más importantes de estas emisiones el uso de combustibles fósiles, la producción industrial, el manejo de las tierras de agricultura, la vivienda y la deforestación desmedida (IPCC, 2014). Los registros indican que la concentración de CO₂ atmosférico en el mundo se ha incrementado desde la era preindustrial hasta la presente, en un valor aproximado de 280 ppm a 401.72 ppm y se prevé que, para finales del siglo XXI y principios del siglo XXII, aumente a 970 ppm (Orr et al., 2005; Dlugokencky & Tans, NOAA/ESRL). Como consecuencia se ha observado un aumento promedio entre la superficie terrestre y los océanos de 0.85 °C, entre 1880 y 2012. Los treinta años comprendidos en dicho periodo figuraron entre los más

cálidos en los registros de la temperatura mundial en superficie (IPCC, 2014). A nivel global, la energía almacenada en los océanos representa el 90% del aumento de temperatura, en comparación con el 1% que es almacenada por la atmósfera (IPCC, 2014). El calentamiento de los océanos es mayor en las zonas superficiales y, los registros indican que en los primeros 75 m de la superficie oceánica, la temperatura ha tenido un incremento de 0.11 °C por década, en el periodo comprendido entre 1970 y 2010. La evaporación, causada por el aumento de temperatura del océano, ha provocado el aumento de la salinidad en estas zonas superficiales, mientras que las zonas de baja salinidad en las cuales dominan las precipitaciones, se han vuelto “más dulces” (IPCC, 2014). El aumento de temperatura ocasionado por el efecto invernadero, también ha causado una reducción en las extensiones y densidad del permafrost (suelo que incluye hielo y materia orgánica, que permanece a una temperatura de 0°C o menor durante al menos dos años consecutivos) (IPCC, 2014). De acuerdo con registros satelitales, ha habido una pérdida de masa en las capas de hielo del Ártico desde el año 1979 y hasta el 2012 (IPCC, 2014). La pérdida consecuencia del derretimiento de las capas polares ha alcanzado un 3.5 a 4.1% por década en esta región y, en el hemisferio norte, ha habido un decremento en las coberturas de nieve de 1.6 a 11.7% por década, desde el año 1967 al 2012 (IPCC, 2014). La pérdida de hielo afecta los niveles de reservas hídricas, de escurrimientos de agua y de aguas subterráneas (Bindoff et al., 2007). Debido a que el agua líquida ocupa un mayor volumen que el hielo, hay derretimientos polares y un aumento en el nivel del mar (Bindoff et al.,

2007; IPCC, 2014). De acuerdo a los registros, el nivel del mar ha aumentado en promedio 0.19 m entre el periodo de los años 1901 y 2010, con una tasa promedio de 1.7 mm/año entre 1901 y 1993 y, de 3.2 mm/año entre 1993 y 2010 (IPCC, 2014). El aumento en el nivel del mar, junto con el calentamiento de las aguas oceánicas, trae como consecuencia un cambio de densidad por diferencias de salinidad, donde las aguas de los polos se han vuelto más dulces y las aguas subtropicales han incrementado su salinidad (Bindoff et al., 2007). Esto ocasiona una estratificación en la columna de agua superficial, lo que dificulta el intercambio de oxígeno y nutrientes entre capas marinas (Bindoff et al., 2007). Sin embargo, el aumento de la temperatura o del nivel del mar, no son el único efecto secundario generado por el aumento en las emisiones antropogénicas de CO₂, ya que también se presenta la acidificación de los océanos por absorción de CO₂ atmosférico (Zeebe, 2012).

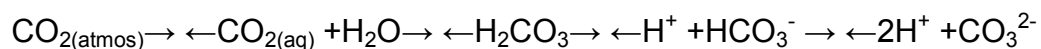
Acidificación oceánica

En los 200 años transcurridos desde la era preindustrial, el 40% de las emisiones antropogénicas de CO₂ han permanecido en la atmósfera y el resto ha sido asimilado en reservorios naturales del carbono. En ese periodo, los océanos han absorbido cerca del 30% de las emisiones totales de CO₂ (IPCC, 2014). El dióxido de carbono en la atmósfera se disuelve en las aguas superficiales de los océanos, y establece una concentración en equilibrio con la atmósfera (Raven et al., 2005). A la disminución del pH oceánico por efecto de

la absorción de CO_2 atmosférico se le conoce como acidificación oceánica. Gracias a los análisis realizados en núcleos de hielo, se sabe que actualmente ha habido una reducción en el pH del océano en 0.1 unidades desde la era industrial, un cambio que corresponde a un 30% de aumento en la concentración de iones de hidrógeno (Raven et al., 2005). Se tiene previsto que de continuar con las actividades humanas de igual forma que como ocurren en el presente, el pH de los océanos disminuirá entre 0.3 y 0.5 unidades para el año 2100, lo cual corresponde a tres veces la concentración de iones de hidrógeno desde lo registrado en la era industrial (Caldeira & Wickett, 2005; Raven *et al.*, 2005).

El CO_2 disuelto en agua de mar existe en tres formas inorgánicas, a las cuales se les conoce colectivamente como Carbono Inorgánico Disuelto (DIC por sus siglas en inglés, Dissolved Inorganic Carbon). Estas formas son el CO_2 acuoso (también conocido como ácido carbónico que representa el 1% del total), el bicarbonato, el cual es la forma más abundante en las condiciones oceánicas actuales (cerca del 91%) y, el carbonato (8%) (Raven et al., 2005). Estas tres especies de carbonatos son importantes para procesos biológicos como la fotosíntesis o la calcificación y, una vez que los organismos que realizaron estas actividades mueren o son consumidos, estas especies de carbonatos pueden regresar a la columna de agua o ser depositados en el fondo del mar, en un proceso conocido como bomba biológica (Raven et al., 2005). La bomba biológica promueve la remoción de carbonato de calcio de la superficie marina

para llevarlo a aguas profundas, lo que incrementa la capacidad de la superficie oceánica para absorber CO₂ atmosférico (Raven et al., 2005). De alterarse la potencia de la bomba biológica habría un impacto directo sobre la cantidad de CO₂ atmosférico que el océano pueda tomar. Al momento de disolverse en el océano, el CO₂ tiene el efecto de incrementar la concentración de iones de hidrógeno (o protones, [H⁺]), como resultado de la reacción que ocurre entre el CO₂ y el H₂O oceánica para formar ácido carbónico. Éste es un ácido débil que rápidamente libera los iones de hidrógeno para formar bicarbonato y, subsecuentemente, carbonato, de acuerdo con la siguiente ecuación (Doney et al., 2009):



La proporción relativa de las tres diferentes especies de carbonatos en el océano refleja el pH marino, donde las especies como carbonatos y bicarbonatos funcionan como un amortiguador natural a la adición de iones hidrógeno (Raven et al., 2005). Otro parámetro que describe el sistema de los carbonatos es la Alcalinidad Total (AT, o TA por sus siglas en inglés, Total Alkalinity), la cual es una medida de las especies aceptoras de protones (iones hidrógeno) en una sustancia, siendo parcialmente $\text{AT} = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{B}(\text{OH})_4^-] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+]$. La AT es una medición que no se ve afectada por cambios de presión o de temperatura (Wolf-Gladrow et al., 2007; Zeebe, 2012). Añadir más CO₂ diluido e incrementar el ácido carbónico en el mar, es similar a agregar un ácido, proceso en el cual los iones de hidrógeno que son liberados

reaccionan con iones de carbonato, para convertirse en bicarbonato y reducir con esto la concentración de iones de hidrógeno en el océano. De tal forma que, la reducción de pH es amortiguada por el ion carbonato (Raven et al., 2005). Con la disminución del pH oceánico viene una reducción en la capacidad amortiguadora del carbonato, debido que al tomar iones de hidrógeno disminuye la disponibilidad de iones carbonato, lo cual permite la acumulación de protones (Doney et al., 2009). La reacción anterior es lo que genera que la concentración de especies de carbono disuelto esté en función del pH oceánico. Con la disminución de pH oceánico hay un decremento en la concentración de iones de carbonato y un incremento en la concentración de CO_2 diluido, con lo cual hay un mayor aporte de iones de hidrógeno y disminuye aún más el pH oceánico (Orr et al., 2005; Raven et al., 2005; Doney et al., 2009).

El carbonato de calcio existe en la forma de aragonita y calcita (Raven et al., 2005). Una vez que se forma el CaCO_3 este se disuelve nuevamente a iones de carbonato y calcio, a menos que el medio se encuentre lo suficientemente saturado de carbonato. El estado de saturación del carbonato de calcio, representado por el símbolo omega (Ω), es el producto de la concentración de iones de calcio (Ca^{2+}) y iones de carbonato dividida por el producto estequimétrico de la solubilidad de la calcita o la aragonita (Feely et al., 2008). Cuando el $\Omega > 1$, se permite la formación de CaCO_3 , pero cuando $\Omega < 1$, las aguas son corrosivas y se produce la disolución de estructuras calcáreas (Raven et al., 2005; Feely et al., 2008; Doney et al., 2009). La aragonita es más

soluble que la calcita y, por lo tanto, su estado de saturación es menor (Raven et al., 2005; Doney et al., 2009). Con el decremento en la concentración del ion carbonato por la acidificación oceánica, se espera un decremento en el estado de saturación del carbonato de calcio (Raven et al., 2005; Doney et al., 2009).

La acidez se determina por la concentración de iones de hidrógeno en el medio y es medida en la escala de pH. Un ácido es una sustancia con un pH menor a 7 y una base una sustancia con un pH mayor a 7. Entre mayor sea la concentración de iones de hidrógeno mayor será su acidez y presentará un pH menor. Por lo tanto, la cantidad de CO₂ disuelto en los océanos influye directamente en el pH oceánico (Caldeira y Wickett, 2005; Orr *et al.*, 2005; Raven *et al.*, 2005; Wolf-Gladrow *et al.*, 2007; Fabry *et al.*, 2008; Doney *et al.*, 2009; Zeebe, 2012).

Las variaciones de pH en las aguas oceánicas son comunes, ya que este parámetro puede variar por factores regionales o de temporada, tales como la temperatura del mar, o por eventos de surgencia de aguas profundas ricas en CO₂ (Orr et al., 2005). Son ejemplos de esto los casos donde aguas profundas que transitan del Atlántico hacia el Pacífico se descomponen y se incrementan los niveles de CO₂ y se reduce el pH, como consecuencia de que el CO₂ oceánico se hunde hacia aguas profundas, junto con material de origen orgánico. En estos casos, las aguas ricas en CO₂ surgen hacia la superficie en las costas debido a que los vientos costeros causan el movimiento de aguas superficiales, lo cual las aleja de la costa hacia el mar y promueve el transporte

de las aguas profundas hacia la superficie en la línea continental. Estas aguas son frías, y crean regiones de aguas superficiales con hasta 0.3 unidades menos de pH (Raven *et al.*, 2005; Feely *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2011). En la costa del Pacífico Norte, la Corriente de California, transporta masas de agua sub Árticas hacia un límite sureño localizado en la costa occidental de la Península de Baja California. Esta es considerada como una zona de transición, ya que el flujo proveniente de la Corriente de California se encuentra con flujos de agua tropical y subtropical, transportados desde el sur. Esta región es fuertemente influenciada por eventos de surgencia, típicamente en primavera, cuando los sistemas de baja presión proporcionan fuerza a los vientos del norte. Esto ocasiona el transporte de las aguas superficiales fuera de la costa e induce la surgencia de aguas profundas ricas en CO₂, entre 100 y 200 m de profundidad. (Durazo *et al.*, 2010; Feely *et al.*, 2008). En las costas del Pacífico Norte, desde Queen Charlotte Sound Canadá hasta San Gregorio Baja California México, se han registrado valores de pH de 7.7 en la plataforma continental (Feely *et al.*, 2008). Particularmente en la zona de Arbolitos, Baja California México, en un estudio de cinco años, se registró la ocurrencia de eventos de surgencia durante primavera y verano, los cuales llegan a reducir el pH costero a 7.9 (Oliva-Méndez, 2012).

Tabla I. Características de los eventos de surgencia en Arbolitos, Ensenada B.C. En la tabla se muestran los eventos registrados durante el segundo semestre del año 2010 y los dos semestres del 2011.

# de Evento	Fecha de Muestreo	pCO ₂ (µatm)	ΩAr	pH
1	18-aug-10	526.44	1.8	7.9
2	20-sep-10	613.27	1.4	7.9
3	05-mar-11	475.73	1.8	8
4	19-mar-11	603.24	1.4	7.9
4b	02-abr-11	535.69	1.7	7.9
5	16-abr-11	476.65	1.8	8
6	04-jun-11	504.52	1.7	7.9
7	22-ago-11	504.75	1.7	7.9
8	03-sep-11	557.23	1.6	7.9
9	30-sep-11	490.49	1.8	8

pCO₂ (µatm), ΩAragonita (ΩAr) pH. Tomado de (Oliva-Méndez, 2012).

La Tabla I muestra los eventos registrados de surgencias con valores de pCO₂, de pH y del Ω_{Aragonita} para la zona de Arbolitos. Se desconoce si dichos valores tendrán un impacto en los organismos calcificadores de dicha zona, pero en otras regiones se ha observado un decremento en la calcificación de corales con el decremento del estado de la aragonita (Doney et al., 2009). En organismos calcificadores se ha observado que la acidificación oceánica tiene el efecto de reducir la tasa de calcificación, como en el caso de juveniles de *Amoibalanus improvisus* (Pansch et al., 2014), larvas de coral *Porites panamensis* (Anlauf et al., 2011) y, de larvas de equinodermos como *Evechinus chloroticus*, *Tripneustes gratilla*, *Pseudechinus huttoni*, *Sterechinus neumayeri* (Clark et al., 2009) y *Arachnoides placenta* (Gonzalez-Bernat et al., 2013).

Calcificación de organismos marinos

Los organismos calcificadores son aquellos que sintetizan estructuras tales como conchas, esqueletos o placas a base de carbonato de calcio (CaCO_3) (Raven et al., 2005; Doney et al., 2009). La calcificación es un proceso ampliamente distribuido entre diversos grupos de organismos como los corales, moluscos, crustáceos, algas calcáreas, foraminíferos y equinodermos, entre otros (Raven et al., 2005). Los mecanismos por los cuales dichos organismos realizan la calcificación son diversos y en algunos casos, se desconoce el proceso completo. Dentro de los mecanismos conocidos se encuentra la síntesis intracelular, realizada en compartimentos de calcificación especiales y, la extracelular, en el exterior del organismo (Raven et al., 2005). Existen diferencias también en el tipo de cristal de carbonato de calcio y la composición química con la que estos sintetizan sus estructuras calcáreas. Las principales formas cristalinas que adopta el carbonato de calcio son aragonita, la cual es utilizada principalmente por corales y pteropodos, y la calcita, utilizada principalmente por cocolitóforos, foraminíferos y equinodermos (Raven et al., 2005; Doney et al., 2009).

Para realizar la calcificación, los organismos introducen carbonato y calcio en su interior, razón por la cual el agua del medio debe encontrarse sobresaturada de éstos iones (Weiner y Dove, 2003; Feely et al., 2008). Se sabe que diversas proteínas participan en el proceso molecular de la calcificación en organismos marinos y, entre las más importantes, se encuentran SM29, SM30 y la enzima

Anhidrasa Carbónica (Wilt, 1999; Illies et al., 2002; Mann et al., 2008). A pesar de que no se conoce del todo el funcionamiento de la proteína SM30, se piensa que esta participa en la precipitación y posterior cristalización, del Carbonato de Calcio Amorfo (CCA, o ACC por sus siglas en inglés, Amorphous Calcium Carbonate) a calcita en presencia de iones de magnesio (Wilt, 2002; 2013). Mediante análisis de retrotranscripción se encontró que SM30 forma parte de una familia de 6 genes, nombrados de la A a la F (Livingston *et al.*, 2006). Otra de estas proteínas es SM29, secretada por las células primarias del mesénquima, la cual también participa en el proceso de precipitación de calcita (Illies et al., 2002). Ambas proteínas se encargan de dirigir el crecimiento de la espícula (Wilt, 1999, 2002) y reciben su nombre por las siglas en inglés de espículas de la matriz (Spicule Matrix); son identificadas por su masa molecular, siendo SM30 de 30 kDa, y SM29 de 29 kDa. La tercera de estas proteínas es la Anhidrasa Carbónica, una metaloenzima de zinc importante para los procesos de calcificación, ya que cataliza la reacción reversible de transformación de bicarbonato a CO_2 . Esta reacción sin la enzima, sería lenta, por lo que el proceso de calcificación es dependiente de su actividad (Tambutté et al., 2007; Gilmour, 2010). En larvas de equinodermos la enzima Anhidrasa Carbónica forma parte de las proteínas encontradas en la matriz de las espículas y, participa en el proceso de formación de bicarbonato para la precipitación de carbonato de calcio en las puntas de éstas (Mann *et al.*, 2010).

La integridad del material calcificado depende de la concentración de bicarbonato y carbonato diluido en el medio, ya que cuando el medio no se encuentra saturado de iones de carbonato, aumenta la disolución de las estructuras calcáreas de vuelta a iones de carbonato y de calcio (Raven et al., 2005; Doney et al., 2009). El carbonato de calcio también se vuelve más soluble con la disminución de temperatura y con el aumento de presión del medio, lo cual significa que al aumentar la profundidad marina, se incrementa su capacidad de disolución en el medio (Raven et al., 2005; Feely et al., 2008; Doney et al., 2009). Estos factores físicos y químicos crean una barrera conocida como horizonte de saturación del carbonato de calcio, el cual es una línea en la que la aragonita y la calcita se encuentran en equilibrio termodinámico y, define la profundidad marina sobre la cual se puede llevar a cabo la formación de carbonato de calcio (Raven et al., 2005; Doney et al., 2009). Como se había mencionado antes, las formas más comunes de encontrar el carbonato de calcio son calcita y aragonita, siendo la aragonita más soluble que la calcita, y por lo tanto el estado de saturación de la $\Omega_{\text{Aragonita}}$ es distinto al de la Ω_{Ca} . Esto significa que los organismos calcificadores solo pueden habitar en la zona que se encuentra sobre el horizonte de saturación (Raven et al., 2005).

Calcificación en equinodermos

El filo Echinodermata (del griego *echinos*, espinoso y *dermata*, piel), es un grupo de organismos marinos, de los cuales se conocen alrededor de 6,000

especies. Estos organismos son invertebrados deuterostomados, donde el blastoporo se ubica en posición posterior y la boca se desarrolla en la posición anterior. Este grupo de organismos se caracteriza por tener simetría pentarradial, 5 divisiones corporales, y cada una presenta un conjunto de las mismas características corporales. Los equinodermos poseen un sistema nervioso que surge de un disco central, el cual se extiende por el interior. También presentan un sistema celómico vascular compuesto de una serie de canales, los cuales se encuentran llenos de fluidos que permiten el movimiento y, se conectan al exterior por una placa en la parte superior del organismo llamada madreporita. La madreporita permite el ingreso de agua de mar al sistema vascular, en dónde se mezcla con material orgánico y con iones de potasio. Este fluido es movido por los canales internos que terminan en los pies ambulacrales para permitir su movimiento. Es así que el funcionamiento de los pies ambulacrales depende de la presión hidráulica que se genera en el organismo. La principal característica de los equinodermos es su endoesqueleto, el cual se encuentra ubicado debajo de la dermis y está compuesto por una capa de tejido conjuntivo de colágeno y, por pequeñas placas a base de carbonato de calcio. Estas placas se encuentran embebidas y son llamadas osículos, presentan estructuras porosas y se encuentran rellenas de células dermales y fibras, que les confieren rigidez y dureza. Entre los equinodermos se puede encontrar a la clase Asteroidea, de las estrellas de mar; la clase Holothuroidea, de los pepinos de mar; y a la clase Echinoidea, de los erizos de mar (Barnes, 1996; Brusca & Brusca, 2003).

Los erizos de mar poseen un esqueleto bastante rígido, en forma globular, formado de placas calcáreas fusionadas, las cuales le brindan protección. Estas placas forman 10 secciones radiales verticales, cinco de estas son las placas ambulacrales, las cuales poseen pies tubulares llamados ambulacrales y alternan con cinco áreas llamadas placas interambulacrales, sin pies. Los pies ambulacrales en los erizos les confieren el sentido del tacto, son sensibles a químicos y absorben oxígeno. Tienen otras estructuras llamadas pedicelarios, las cuales poseen pinzas y cuya función es la de mantener limpia la epidermis del erizo, así como la de capturar algas para pasarlas a la boca. Los erizos tienen espinas que cubren su caparazón, las cuales tienen una función de defensa y desplazamiento y, se encuentran unidas mediante estructuras en forma de bola en las placas llamadas tubérculos, los cuales permiten el movimiento de las espinas. Las espinas de los erizos se encuentran tanto en las placas ambulacrales como en las interambulacrales, siendo las espinas de las primeras más cortas. La boca de los erizos, encontrada en el polo oral (Figura 1), tiene 5 dientes unidos en una estructura calcárea conocida como Linterna de Aristóteles (Workman, 1999).

Los equinodermos poseen un ciclo de vida en el que un estadio larval planctónico alterna con un estadio adulto bentónico (Smith, 1997). Las larvas de los erizos, conocidas como equinopluteus, a diferencia de los adultos, tienen simetría bilateral. Las larvas poseen largos brazos con bandas ciliadas que les permiten agitar el agua a sus alrededores y llevar alimento hacia su boca.

Durante su desarrollo larval, el erizo presenta 4, 6 y finalmente 8 brazos, antes de alcanzar la metamorfosis (Smith, 1997; Workman, 1999) (Figura 2).

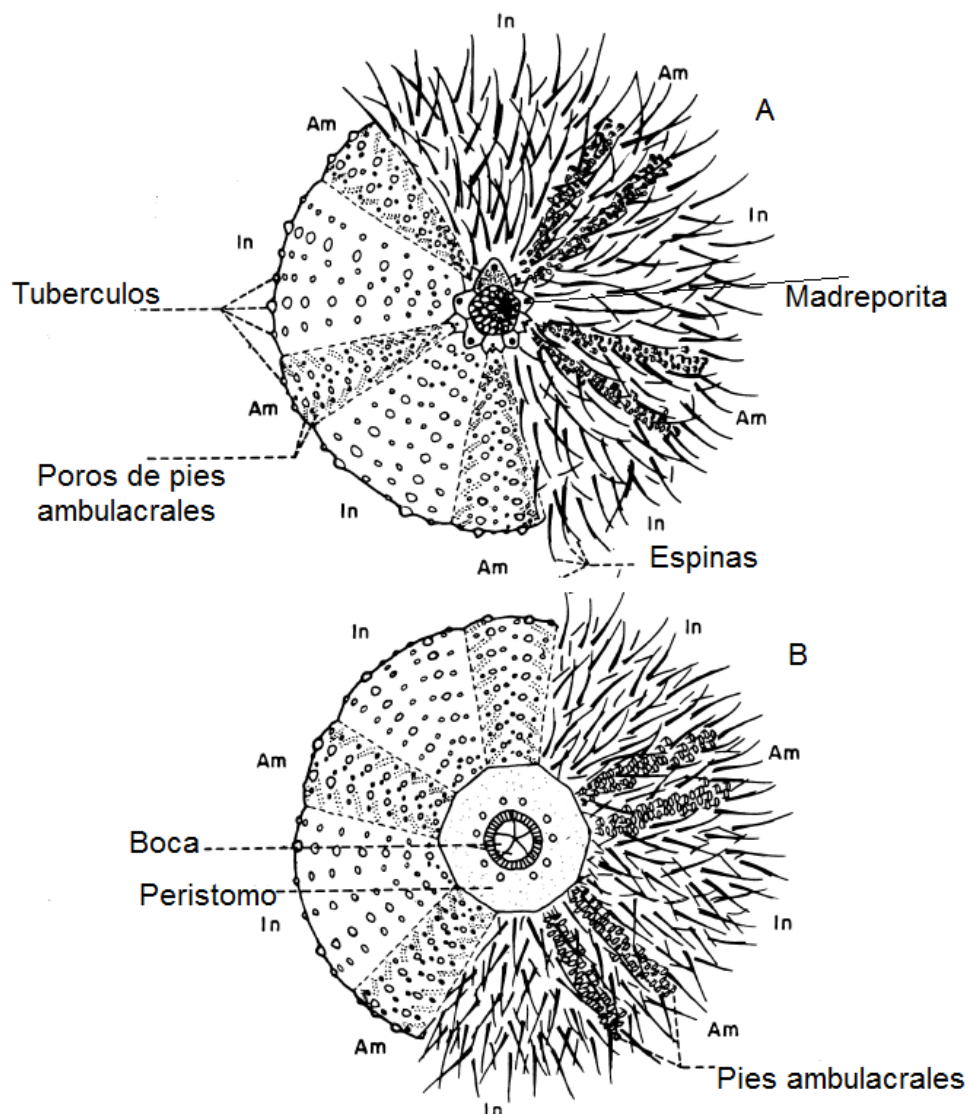


Figura 1. Diagrama de la anatomía de un erizo adulto de *Strongylocentotus purpuratus*. En el esquema se señalan las partes corporales del erizo: A) lado aboral (superior) del erizo. B) lado oral (inferior). In = placas interambulacrales, Am = placas ambulacrales. Modificado de Workman, 1999.

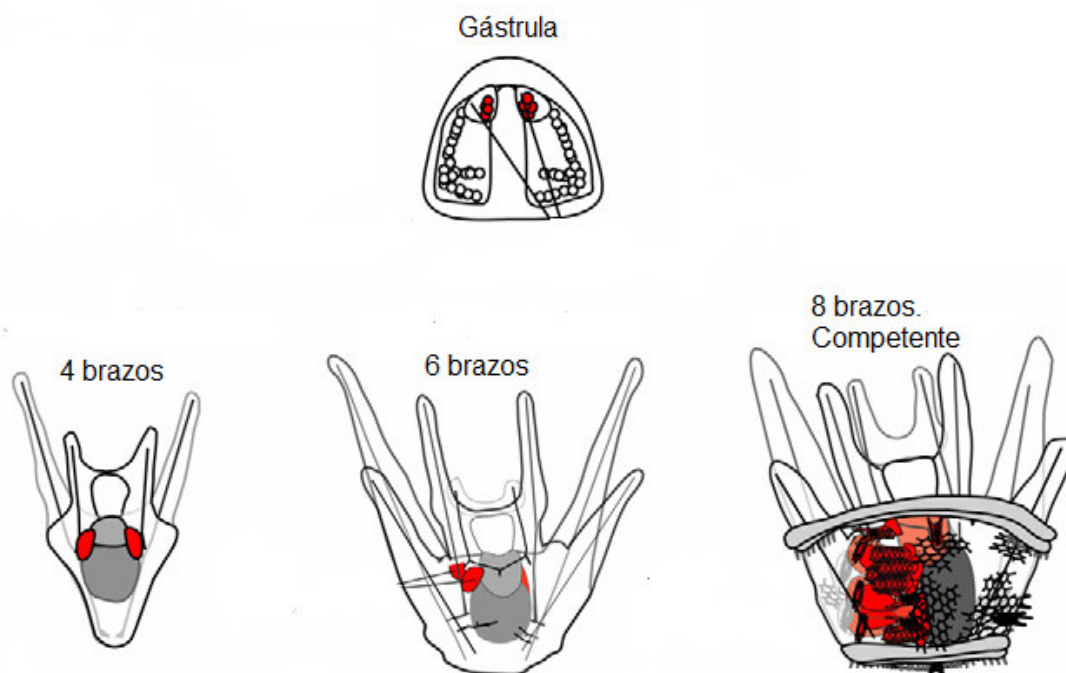


Figura 2. Estadios larvales del erizo. En la figura se observan las etapas de gástrula, equinopluteus de 4 brazos, de 6 brazos, y larva de 8 brazos competente de erizo de mar. Imagen modificada de Yajima & Wessel, 2011.

Las larvas de los erizos poseen un endoesqueleto de calcita, por lo cual durante esta etapa de vida también realizan el proceso de calcificación. El endoesqueleto de las larvas proporciona soporte a su cuerpo, es necesario para el correcto desarrollo larval, les proporciona peso y densidad, e influye en su orientación pasiva en la columna de agua (Pennington & Strathmann, 1990). El endoesqueleto larval está formado por espículas, las cuales son estructuras en forma de barra conformadas de calcita de magnesio (~5% Mg), y contienen una matriz proteica interna que constituye un 0.1% de la masa de las espículas (Wilt, 1999). Se han identificado alrededor de 230 diferentes proteínas, que forman parte de la matriz interna de las espículas larvales (Mann et al., 2010).

Entre las más importantes para llevar a cabo el proceso de calcificación, se encuentran SM30, SM29 y la enzima Anhidrasa Carbónica, como se mencionó anteriormente (Wilt, 1999; Seto et al., 2004; Livingston et al., 2006; Mann et al., 2008). En larvas de erizo, la formación de las espículas inicia en el estadio de gástrula, a partir de dos cristales de calcita (Wilt, 1999). Este cristal es extendido para formar las espículas con el depósito de carbonato de calcio amorfo (CCA), principalmente en las puntas, y en cierta extensión, el grosor (Marin et al., 2011; Wilt, 1999). El carbonato de calcio amorfo es sintetizado en el interior celular y posteriormente secretado a las espículas mediante vesículas (Wilt, 1999; Vidavsky et al., 2014). El CCA secretado es estabilizado como cristales de calcita en las espículas, gracias a las proteínas de la matriz y la presencia de Mg^{2+} (Raz et al., 2003). Lo anterior es posible gracias a las Células Primarias del Mesénquima (PMC por sus siglas en inglés), células dedicadas a la formación del endoesqueleto (Beniash et al., 1997; Wilt, 2002; Weiner & Dove, 2003). Las PMC tienen su origen en el polo vegetal del embrión durante la quinta división celular, donde los 4 micrómeros sufren otras 3 divisiones para posteriormente ingresar al blastocele (Wilt, 1999). Las PMC se fusionan de tal forma que conforman un arreglo sincitial de cuerpos celulares conectados por filopodios sincitiales, siendo este arreglo en forma tubular y hueco en el interior (Wilt, 1999). Las larvas de erizo obtienen el carbonato necesario para el proceso de calcificación al absorber bicarbonato del agua de mar (40%) y de sus procesos fisiológicos (60%) (Stumpp et al., 2012), mientras que el calcio es tomado de la columna de agua (Mann et al., 2010).

Debido a su facilidad de cultivo, claridad y abundancia, desde el siglo XIV, los erizos y sus larvas se popularizaron como animal modelo en diversos estudios de desarrollo embrionario y de biología celular, así como en estudios de biomineralización. Entre las especies de erizo que se han utilizado para dichos análisis, el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, es uno de los más populares (Wilt, 2005; Killian y Wilt, 2008; Smith et al., 2008). El erizo morado tiene una amplia distribución. Se encuentra desde Torch Bay, Alaska (Duggins, 1981), por toda la costa del Pacífico hasta Isla Cedros, en Baja California, México (Sagarin y Gaines, 2002). Habita en la zona intermareal hasta la profundidad de 30 m, en costas rocosas, alojados en depresiones en las rocas (Morris et al., 1980). Tienen un ciclo reproductivo anual, siendo la época de mayor índice gonadal durante el invierno. En Baja California, el ciclo reproductivo del erizo morado presenta dos picos: uno durante otoño/invierno y otro a finales de primavera/inicio de verano (Ebert et al., 1994). La reproducción del erizo es externa porque se da mediante la liberación de los gametos a la columna de agua (Hart, 2002). Los erizos son organismos herbívoros que soportan un amplio intervalo de temperaturas, de 2 °C a 23 °C (Workman, 1999) y se alimentan de macroalgas, o bien, pueden absorber materia orgánica disuelta a través de los pies ambulacrales. Se tiene reportado que el erizo morado tiene una tasa de crecimiento promedio de 20 mm por año (Pearse y Hines, 1987) y en Baja California, se reporta una tasa de crecimiento promedio de 0.83 mm al mes, y llegan a la etapa de madurez cuando la testa tiene en promedio 2 cm de diámetro, aproximadamente a los 2 años (Sonnenholzner-

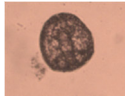







Varas, 2011). La tasa de crecimiento del erizo depende de la disponibilidad de alimento (Sonnenholzner-Varas, 2011). Estos organismos tienen un papel importante en su medio ecológico, dado que funcionan como estructuradores de las comunidades de bosques de *Macrocystis spp.* (Lafferty & Kushner, 2000). Sin embargo, el aumento en la densidad poblacional de erizos puede llevar a la deforestación de los bosques de macroalgas, y causa que los erizos se movan a otras áreas (Workman, 1999; Solovjev y Markov, 2013). Los erizos también forman parte de la cadena trófica como alimento de la nutria marina (*Enhydra lutris*) (Workman, 1999) y de estrellas de mar (Tegner & Dayton, 1981).

El erizo morado también tiene importancia comercial, ya que su gónada es utilizada como alimento (Workman, 1999). En el 2012, la FAO reportó que anualmente se explotaba una cantidad de 34,129 toneladas de erizo (FAO, 2014), siendo el mercado asiático el principal consumidor. En México, para el año 2014, CONAPESCA reporta que se obtuvieron 3,670 toneladas de erizo, con un valor de \$154,562,564.00 pesos mexicanos (CONAPESCA, 2014). Particularmente en Baja California se obtuvo entre erizo morado y erizo rojo un total de 3,805.03 toneladas en el 2015, con un valor de \$152,116,403.29 pesos mexicanos. De este total, 1087.66 toneladas correspondieron a erizo morado y, 2,717.37 toneladas, a erizo rojo, con un valor de \$44,411,425.81 y \$107,704,977.48 pesos mexicanos, respectivamente (SNIDRUS, 2016).

Los desoves de erizo morado y la fecundación de los gametos ocurren durante el periodo comprendido entre finales de otoño e inicios de invierno, durante los meses de Noviembre a Enero (Sonnenholzner-Varas, 2011; Ebert et al., 2012).

La larva del erizo morado permanece, en promedio, de 36 días a 4 meses en la columna de agua, y llega a la competencia aproximadamente después de los 36 días postfertilización (Smith et al., 2008). Es en este estadio que la larva se prepara para entrar a la metamorfosis y pasar a erizo juvenil, ya sea en el mismo día o bien, extiende su tiempo en la columna de agua hasta que las condiciones sean favorables para la metamorfosis (Smith et al., 2008). En circunstancias idóneas, las larvas de erizo alcanzarán la metamorfosis en diciembre/enero. De acuerdo al trabajo de Oliva-Méndez (2012), el periodo de surgencias en la zona de Arbolitos ocurre durante primavera/verano, en los meses de abril y agosto, con un promedio de 7 eventos de surgencia por año (Tabla I). Haciendo inferencia a los tiempos de desarrollo larval, se estima que las larvas no se exponen a los efectos de las aguas de pH reducido de las surgencias. Sin embargo, el primer evento de surgencia al cual se ven expuestos estos organismos ocurre en su primer año de vida, cuando son erizos juveniles. A los dos años, los erizos alcanzan la madurez sexual y, para entonces ya se han visto expuestos a un número aproximado de 14 eventos de surgencia (Tabla I, II).

Tabla II. Estimación de la historia de vida del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*. En la tabla se observan las tallas para cada una de las etapas de desarrollo del erizo morado, así como la edad estimada y la respectiva tasa de crecimiento para cada estadio.

Etapa de desarrollo	Edad (postfertilización)		Tamaño promedio		Tasa de crecimiento		
	Tiempo	Referencia	Talla	Referencia	Valor	Referencia	
Gástrula	 1	36 horas	Presente Trabajo	130.46 μm	Presente trabajo	67.6 $\mu\text{m}/\text{día}$	Presente trabajo
4 Brazos	 2	4 días	Presente Trabajo	265.66 μm	Presente trabajo	18.01 $\mu\text{m}/\text{día}$	Presente trabajo
6 Brazos	 3	9 días	(Smith et al., 2008)	355.71 μm	(Stumpp et al., 2011b)	10.65 $\mu\text{m}/\text{día}$	(Stumpp et al., 2011b)
8 Brazos	 3	12 días	(Smith et al., 2008)	387.66 μm	(Stumpp et al., 2011b)	2.36 $\mu\text{m}/\text{día}$	(Stumpp et al., 2011b)
Competente	 3	36 días	(Smith et al., 2008)	444.39 μm	(Stumpp et al., 2011b)	-	(Bertram et al., 2009)
Metamorfosis	 3	36 días	(Miller y Emlet, 1999)	425 \pm 5.5 μm	(Miller y Emlet, 1999)	5.75 $\mu\text{m}/\text{día}$	(Miller y Emlet, 1999)
Juvenil		50 días	(Miller y Emlet, 1999)	525 μm	(Sonnenholzner-Varas, 2011)	7.14 $\mu\text{m}/\text{día}$	(Miller y Emlet, 1999)
Adulto 2 años		2 años		20.45 mm	(Sonnenholzner-Varas, 2011)	0.83 mm/mes	(Sonnenholzner-Varas, 2011)
Adulto 4 años		4 años		40.37 mm	(Sonnenholzner-Varas, 2011)	0.83 mm/mes	(Sonnenholzner-Varas, 2011)
Adulto 5 años		5 años		50.33 mm	(Sonnenholzner-Varas, 2011)	0.83 mm/mes	(Sonnenholzner-Varas, 2011)
Adulto 6 años		5 años		60.29 mm	(Sonnenholzner-Varas, 2011)	0.83 mm/mes	(Sonnenholzner-Varas, 2011)
Adulto 7 años		6 años		70.25 mm	(Sonnenholzner-Varas, 2011)	0.83 mm/mes	(Sonnenholzner-Varas, 2011)

Imágenes: ¹Presente trabajo; ²Imagen tomada de American Museum of Natural History <http://www.amnh.org/learn/climate/Resource3>; ³Imagen tomada de California Naturalist © Allison J Gong (2015) Institute of Marine Sciences, University of California, Santa Cruz; ⁴solpugid.com

Acidificación y calcificación en invertebrados marinos

Se conoce que las variaciones en temperatura o pH tienen un efecto directo sobre los procesos naturales de los organismos marinos, como la reproducción (Morgan *et al.*, 2013), la reducción de tamaño corporal (Dupont *et al.*, 2010; Sheridan y Bickford, 2011; Albright *et al.*, 2012;; Pespeni *et al.*, 2013), los procesos digestivos, metabólicos y fisiológicos (Fabry *et al.*, 2008; O'Donnell *et al.*, 2009; Stumpp *et al.*, 2013) y la biomineralización de estructuras calcáreas (Orr *et al.*, 2005; Brennand *et al.*, 2010; Hazan *et al.*, 2014;).

Investigaciones realizadas consideran que entre los organismos marinos que llegaran a sufrir un mayor impacto por las variaciones del pH oceánico, se encuentran los organismo calcificadores, principalmente los primeros estadios de vida de estos (Kroeker *et al.*, 2013; Raven *et al.*, 2005). Lo anterior como consecuencia de que un decremento en el pH marino genera un decremento en la concentración de especies de carbonato, las cuales son necesarias para realizar la calcificación (Orr *et al.*, 2005; Raven *et al.*, 2005; Doney *et al.*, 2009), como se discutió anteriormente.

El decremento en la calcificación, debido a la acidificación oceánica causada por el aumento de CO₂, puede tener un efecto negativo sobre la capacidad de sobrevivencia o alimentación de un organismo, que genera un impacto dependiente de la función de las estructuras calcificadas, o bien, de las funciones metabólicas empleadas para realizar la calcificación (Raven *et al.*, 2005; Kroeker *et al.*, 2013). En corales, la disminución en la calcificación puede

traer un decremento en arrecifes, así como el debilitamiento de su estructura, lo cual podría volverlos susceptible a la erosión. Los organismos que habitan la zona intermareal, los cuales cierran sus caparazones al quedar descubiertos durante marea baja, pueden sufrir de hipoxia por el debilitamiento de sus estructuras calcáreas (Raven et al., 2005; Doney et al., 2009; Kroeker et al., 2013).

Otro efecto del aumento del CO₂ disuelto en los océanos ocurre en el intercambio de gases durante la respiración. Durante el proceso de obtención de oxígeno a partir del agua oceánica, se remueve una gran cantidad de CO₂ del sistema del organismo (Raven et al., 2005; Fabry et al., 2008). Por lo tanto, en comparación con los animales que toman el oxígeno del aire, los organismos marinos tienen una menor concentración de CO₂ en su sistema, lo cual los vuelve más sensibles a las variaciones de CO₂ y pH de sus alrededores. El CO₂ reacciona con los fluidos corporales y libera iones hidrógeno, lo que acidifica los tejidos y fluidos en un fenómeno conocido como hipercapnia, que puede llegar a ocurrir en tan solo horas, que afectaría la actividad respiratoria y reduciría el uso de energía celular. Pequeños aumentos en la concentración de CO₂ celular pueden ser amortiguados, pero requieren de la secreción de iones amortiguadores (Raven *et al.*, 2005; Fabry *et al.*, 2008).

Los efectos del pH y la acidificación de los océanos en organismos calcificadores varían entre especies, hábitats y estadios de desarrollo (Dupont *et al.*, 2010). Para demostrar esto, se han llevado a cabo diversos experimentos

con diferentes especies, y se tiene a los equinodermos como uno de los principales grupos modelo para esto. Entre estos estudios podemos encontrar los realizados con erizo de mar, en donde juveniles de *Lytechinus variegatus* fueron expuestos durante 3 meses a condiciones de pH 8.10, 7.96 y 7.83. Al finalizar el experimento, se observó que aquellos que se encontraban en el pH más bajo presentaron un peso menor, en comparación con los organismos control, así como una degradación en la estructura calcárea de las espinas. Esto sugiere que una elevada exposición a pH reducido tendrá un efecto en el desarrollo de erizos adultos y, en la biomineralización de sus estructuras calcáreas (Albright *et al.*, 2012). En contraste, se observó que en juveniles de la estrella de mar *Pisaster ochraceus*, la ligera disminución de pH y aumento de temperatura, tienen un efecto positivo en su crecimiento (Gooding *et al.*, 2009).

Hettinger y colaboradores (2013) cultivaron larvas de la estrella de mar *Ostrea lurida* en condiciones de acidificación (pH 7.8) hasta la metamorfosis, y descubrieron que aquellas en menor pH presentaron un 80% menos de metamorfosis al compararlas con el éxito conseguido en larvas control. Posteriormente colocaron estos juveniles en el campo, en zona intermareal y bajamar, y tras 127 días descubrieron que los individuos que habían sido cultivados en condiciones control tuvieron 20-40% mayor tasa de crecimiento que los organismos en acidificación. Además, estos últimos presentaron una mayor tasa de mortalidad (Hettinger *et al.*, 2013).

Experimentos con larvas del erizo *Triploneustes gratilla* sometidas durante 5 días a diferentes pHs (8.15, 7.8 y 7.6) y temperaturas (27 y 24 °C) demuestran que estos factores del medio tienen un efecto directo sobre el desarrollo de los organismos, en los cuales las larvas presentan una reducción en su desarrollo, evidenciado por brazos postorales cortos y deformados, posiblemente por una disminución en los procesos de calcificación (Brennand et al., 2010). Chan y colaboradores (2013) demostraron que las condiciones de acidificación llevan a la liberación de brotes (budding) en larvas equinopluteus de 4 brazos del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*. En contraste, en un experimento con larvas del coral *Pocillopora damicornis* sometidas durante 9 días a condiciones de elevada temperatura y CO₂ diluido, se observó que los no hubo un efecto en su metabolismo, pero si se presentó un leve aumento de tamaño (Putnam et al., 2012).

En experimentos con larvas de la galleta de mar *Denstraster excentricus*, expuestas a condiciones de acidificación, se demostró que la disminución de pH oceánico (pH 7.75) causa una disminución en el tamaño de su sistema digestivo, lo que reduce su capacidad para alimentarse. Y, a pesar de que también se notaron cambios en su morfometría, junto con una disminución en su desarrollo, las variaciones de pH no modificaron significativamente la capacidad de nado de las larvas (Chan et al., 2011).

Clark y colaboradores (2009) encontraron que condiciones de pH disminuido hasta 7.0, tuvieron el efecto de disminuir el tamaño larval de 4 especies de

erizos: una especie tropical (*Tripneustes gratilla*), dos especies templadas (*Pseudechinus huttoni* y *Evechinus chloroticus*) y una especie ártica (*Sterechinus neumayeri*). También encontraron que la exposición de larvas a pH entre 7.6 y 7.5, tuvo como efecto una disminución en la calcificación. Lo anterior fue corroborado mediante fotografías de microscopía electrónica de barrido de las espículas, donde se observó que la superficie de estas se encontraba erosionada, en lugar de ser lisa. Además se ha observado que valores de pH menor a 7.0 resultan en un 100% de mortalidad para las larvas de estas especies. Gonzalez-Bernat y colaboradores (2013) encontraron que valores de pH inferiores a 7.8, redujeron el porcentaje de fertilización de óvulos de la galleta de mar *Arachinoides placenta*, mientras que valores inferiores a 7.65 propiciaron una disminución en el tamaño corporal de la larva. Sin embargo, al medir el porcentaje de material inorgánico encontraron que no hubo diferencias en aquellas larvas cultivadas a pH 7.79 (Gonzalez-Bernat et al., 2013). Se encontró que larvas del percebe *Amphibalanus amphitrite* cultivadas en condiciones de acidificación (pH 7.4) durante 8 semanas hasta convertirse en juveniles, presentaron placas calcáreas más grandes, sin embargo estas tuvieron un contenido de material calcificado menor en comparación con los organismos control, y dicho material fue más fácil de romper (McDonald et al., 2009).

Se ha observado que la acidificación tiene efectos negativos sobre procesos fisiológicos de algunos organismos, como la larva de *Strongylocentrotus*

purpuratus, la cual a pesar de presentar un incremento en la síntesis de la chaperona térmica *hsp170* bajo elevada temperatura, al combinarse con aguas acidificadas, disminuye la transcripción de dicho gen (O'Donnell *et al.*, 2009).

Martin y colaboradores (2011) encontraron que larvas de *Paracentrotus lividus* expuestas a variaciones de pH menores a 7.5, presentaron un menor tamaño. Asimismo observaron un decremento en la incorporación de Ca^{2+} , en condiciones de pH menor a 8.12 y, junto con esto, notaron una disminución en la expresión de genes relacionados con la calcificación, *msp130* y *SM30*, al comparar la calcificación en función al tamaño corporal en lugar de relacionarlo con la edad.

En el trabajo de (Stumpp *et al.*, 2013) se descubrió que el estómago de las larvas de *S. droebachiensis* tiene un pH de 9.5, lo cual ayuda a la actividad de las proteasas estomacales. Sin embargo, se demostró que la acidificación oceánica también disminuye el pH del tracto digestivo, con lo cual hay modificaciones en la eficiencia digestiva y aumentan los costos metabólicos, junto con la producción de la enzima NKA (Na^+/k^+ -ATPasa) para regular las condiciones acido-base.

En un trabajo donde la estrella de mar *Amphiura filiformis* fue sometida a pH ácido, se observó que para estos organismos, el medio acidificado promueve el proceso de calcificación (Wood *et al.*, 2008). Lo anterior se corroboró mediante espectrofotometría de absorción atómica, con lo que observaron que aquellos organismos encontrados en condiciones más ácidas presentaron la misma, o

una mayor cantidad de calcio, que los organismos control. Los análisis mostraron que se presentó un aumento en el costo de los procesos metabólicos y un decremento en la masa muscular, lo que implica problemas de supervivencia y funcionamiento ecológico (Wood *et al.*, 2008). Sin embargo, en un trabajo realizado con el erizo *Echinometra spp.* EE, en el cual los organismos fueron sometidos a pH reducido durante 343 días, se observó que los erizos no presentaron variaciones de índice gonadal, gametogénesis o problemas en sus estructuras calcáreas, lo cual sugiere que se encontraban aclimatados a condiciones de pH de 7.71 (Hazan *et al.*, 2014).

O'Donnell y colaboradores (2010) sometieron larvas del erizo de mar *Lytechinus pictus* a pH reducido (pH 7.87 y 7.78) durante 142 horas y, mediante análisis de morfometría y de expresión de genes (con microarreglos), se demostró que las larvas presentaban proporciones corporales reducidas, junto con una disminución en la expresión de 79 genes relacionados con procesos metabólicos, de balance iónico y de biomineralización (entre ellos *SM30* y *SM29*). En éste mismo estudio, se detectó un incremento en la transcripción de genes relacionados en la regulación del balance ácido-base. Stumpp y colaboradores (2011a) al realizar experimentos de acidificación en larvas del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* de 2, 4 y 7 días post fertilización, encontraron que las condiciones de acidificación no solo inducen un retraso del desarrollo larval en un 8% y aumento en la tasa de respiración en un 100%, sino que también se promovía el aumento de la expresión de genes

relacionados con el metabolismo y energética y, la disminución en la expresión de genes relacionados con la calcificación (incluyendo *SM30* y *SM50*) (Stumpp et al., 2011b). Lo anterior sugiere que las condiciones de acidificación incrementan la demanda energética larval para el mantenimiento, en lugar del desarrollo. Por otro lado, Pan y colaboradores (2015) encontraron que al ser expuestas a condiciones de pH 7.9, gástrulas y larvas de *S. purpuratus* presentan un aumento de 1.6 veces en la producción de proteínas y, un aumento en el metabolismo y demanda energética, pero sin haber un aumento en el costo de producción de proteínas. Esto sugiere que hay un aumento en la degradación proteica y una mayor demanda para sintetizarlas. Respecto al uso de la energía, Matson y colaboradores (2012) encontraron que la acidificación hasta pH 7.5 no modifica la tasa de uso de las grasas del vitelo en gástrulas de *S. purpuratus*.

Moya y colaboradores (2012), en un experimento donde sometieron pólipos del coral *Acropora millepora* a diferentes condiciones de pH (8.16, 7.96 y 7.86) durante 3 días, observaron mediante ensayos de PCR-Tiempo Real que los organismos en condiciones de pH reducido sufrieron una regulación negativa en genes tales como como la *Anhidrasa Carbónica*, proteínas de la matriz de las espículas como las galaxinas y, Proteínas Pequeñas Ricas en Cisteína (SCRiPs), al igual que de varias proteínas mitocondriales (tales como subunidades de la NADH deshidrogenasa, receptores mitocondriales, subunidad 4 de la Citocromo oxidasa).

Padilla-Gamiño y colaboradores (2013) reportan que el someter a larvas y gástrulas de *Strongylocentrotus purpuratus* a condiciones de presión de CO₂ aumentado (de 400 μ atm a 1100 μ atm) tiene como efecto la reducción del tamaño corporal de la larva, acompañado de un decremento en la expresión de la proteína de matriz SM30, así como el de 27 histonas. Hammond y Hofmann (2012) reportan una disminución en la transcripción de genes relacionados con la calcificación del endoesqueleto larval, desde la etapa de gástrula (genes *msp130*, *VegFR*, *SM30* y *SM50*) y, un aumento en la transcripción de los genes *Wnt8*, *Pmar1* y *Axl1*.

Kurihara y colaboradores (2012) reportaron, tras realizar un análisis de expresión de genes mediante RT-PCR, que al exponer a larvas del erizo *Hemicentrotus pulcherrimus* a pH reducido durante 72 horas, no se detectaron modificaciones en la expresión de los genes *SM30* y *SM50*, pero se observó un decremento en la expresión de *msp130*, conforme avanzaba el desarrollo de la larva. En un trabajo realizado en larvas del erizo morado *S. purpuratus*, en pH experimental 7.7 y 7.59, Evans y colaboradores (2013) encontraron, tras un análisis en de expresión de genes mediante microarreglos, una modificación la expresión de ciertos grupos de genes en gástrulas y larvas de 4 brazos, con un aumento en la expresión de genes relacionados con el metabolismo y transporte iónico, y una disminución la expresión de genes relacionados con la calcificación y algunos transportadores de iones. Lo mismo fue sugerido por Todgham & Hofmann (2009) en un estudio donde, mediante microarreglos,

analizaron la expresión de genes en larvas expuestas a condiciones de pH 7.96 y 7.88, encontrando un decremento en la expresión de genes relacionados con la calcificación, con la regulación del sistema ácido-bases del metabolismo y, con la respuesta al estrés celular.

Justificación

La acidificación de los océanos como consecuencia del cambio climático es un proceso que se ha estudiado ampliamente en la última década. Se sabe que dicho proceso genera cambios en las comunidades marinas y, que el impacto que tiene sobre los organismos depende de la especie y de la etapa de desarrollo en que éstos se encuentren. Entre los organismos marinos que pueden presentar un mayor número de cambios están los calcificadores, dado que son los que toman de la columna de agua materiales como el calcio y los carbonatos, para fabricar sus estructuras corporales. En el proceso de la acidificación oceánica, la disminución de pH trae consigo una reducción en la disponibilidad de estos materiales, particularmente de los iones de carbonato. En el grupo de organismos calcificadores del Pacífico Norte se encuentra el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, el cual es una especie ambientalmente importante que funciona como estructurador de bosques de macroalgas y además tiene importancia comercial en las pesquerías de Baja California, México. Con esta consideración, para el presente estudio se ha seleccionado la zona de Arbolitos, Baja California, como área de estudio debido a que es un sitio con una incidencia alta de surgencias. Aunado a eso, en dicha zona existe una boya oceanográfica, que ha permitido generar registros de las variaciones de pH y temperatura durante los eventos de surgencia. En otros sitios de surgencias, como California, E.U.A., ya existen observaciones sobre el efecto que las variaciones de pH tienen sobre organismos calcificadores, pero

en Baja California, aún no existen reportes. La larva del erizo morado posee un endoesqueleto de calcita, el cual es necesario para su desarrollo, alimentación y sobrevivencia en la columna de agua. El proceso de formación y calcificación del endoesqueleto de estos organismos inicia en la etapa de gástrula, por lo cual la disponibilidad de los materiales necesarios en la columna de agua es crítica para las larvas de erizo. El erizo morado en promedio alcanza la madurez sexual a los 2 años aproximadamente, por lo que aquellos organismos que habitan en zonas de surgencias se verán expuestos repetidamente a variaciones de pH en su hábitat, antes de que se conviertan en los progenitores de las siguientes generaciones de erizos morados. Con esto en consideración, el estudio del efecto que la reducción del pH del océano simulada en laboratorio nos proporcionará información importante para entender si el cambio de pH oceánico modificará la morfometría de las gástrulas y larvas de 4 brazos, la expresión de genes relacionados con la calcificación y la tasa de calcificación de dichas etapas de vida, de la comunidad de erizos en las costas de Baja California, México.

Objetivos

Objetivo General

Analizar el efecto que tiene la disminución del pH del agua de mar en condiciones de laboratorio en la calcificación en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*.

Objetivos Particulares

1. Cultivar gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de *S. purpuratus* en tres condiciones de pH: 8.0, 7.7 y 7.5, bajo condiciones de laboratorio.
2. Evaluar el efecto del pH en la morfometría de gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de erizo morado *S. purpuratus*, a través de observaciones microscópicas.
3. Evaluar la contenido de material inorgánico calcificado mediante la medición de cenizas de gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos del erizo morado *S. purpuratus*, cultivadas en tres condiciones de pH (8.0, 7.7 y 7.5).
4. Evaluar la expresión de los genes SM30-like, SM29 y Anhidrasa Carbónica en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de erizo morado *S. purpuratus* cultivadas en tres condiciones de pH (8.0, 7.7 y 7.5), mediante análisis de PCR-Tiempo Real.

Hipótesis

Exponer en el laboratorio larvas equinopluteus del erizo morado *S. purpuratus* a condiciones de pH reducido, lo cual modificará los procesos de calcificación de los estadios larvales de gástrula y de larvas equinopluteus de 4 brazos, lo cual se verá reflejado en un decremento en su desarrollo morfológico, contenido de material inorgánico calcificado y en la expresión diferencial de los genes *SM30*, *SM29* y *Anhidrasa Carbónica*.

Metodología

Colecta de organismos

Adultos de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* fueron colectados de la costa de Arbolitos, en Punta Banda, Ensenada B. C ($31^{\circ} 42' 08.74$ N, $116^{\circ} 41' 01.77$ O) (Figura 3) mediante buceo. En dicha localidad se encuentra ubicada una boya oceanográfica que permite el monitoreo continuo de $p\text{CO}_2$ del agua de mar y de mediciones discretas de las variables del carbono (Oliva-Méndez, 2012), gracias a lo cual se conocen las variaciones de pH de la región (de los años 2009 a 2011) por efecto de los eventos de surgencia. Los erizos fueron trasladados al Instituto de Investigaciones Oceanológicas donde se mantuvieron en un tanque con agua de mar corriente y aireación constante. La fecha de colecta de los adultos progenitores utilizados para cada experimento, se muestra en la tabla III. Los erizos adultos fueron alimentados diariamente con hojas del alga *Macrocystis spp.* hasta el día de los desoves. Los organismos se aclimataron por alrededor de 3 días antes de inducir al desove. Para estimar la edad de los progenitores se midieron las testas y se hizo un estimado de su edad, de acuerdo con la tasa de crecimiento promedio determinada por Sonnenholzner-Varas (2011).

Tabla III. Fecha de colecta de adultos progenitores.

Experimento	Mes	Año
1	Noviembre	2015
2	Noviembre	2015
3	Noviembre	2015
4	Febrero	2016
5	Febrero	2016
6	Febrero	2016
7	Febrero	2016
8	Marzo	2016
9	Marzo	2016
10	Marzo	2016
11	Marzo	2016

**Figura 3.** Mapa de la zona de estudio: Arbolitos, Baja California, México. Imagen tomada y modificada de Google Earth (2016 Google).

Cultivo de larvas

Erizos adultos fueron inducidos al desove mediante inyecciones intracelómicas por la parte oral de 0.5 mL de KCl 0.5 M. Posterior a la inyección los

organismos se colocaron boca arriba sobre un vaso de precipitado de 100 mL lleno con agua de mar filtrada a $1\ \mu\text{m}$ y esterilizada con luz UV (A_{MFUV}). Los organismos se dejaron en estas condiciones de 3 a 10 minutos, hasta que la totalidad de los gametos maduros fueron liberados. En los procesos de fertilización para cada experimento, se utilizó una mezcla de los gametos de 3 hembras y 3 machos, en una proporción de 5 millones de ovocitos por 1 mL de solución de espermatozoides. Para realizar la fecundación, los ovocitos y espermatozoides se colocaron en un recipiente de 20 L con A_{MFUV} , en donde los gametos se agitaron suavemente y se dejaron en reposo durante 5 minutos. Los ovocitos fecundados fueron tamizados con una malla de $30\ \mu\text{m}$ con el fin de remover el excedente de espermatozoides y, con ello evitar la polispermia. Seguidamente, los cigotos fueron repartidos equitativamente en tres cubetas de 20 L con A_{MFUV} , una por tratamiento (pH 8.0, pH 7.7 y pH 7.5, escala NBS).

Tras 24 horas, el producto de fertilización correspondiente a cada uno de los tratamientos fue repartido en 4 recipiente de plástico, con 2.6 L de A_{MFUV} cada uno (cada recipiente fue una pseudoréplica). Cada recipiente tuvo una densidad final de 4 larvas/mL. Los recipientes fueron tapados y se mantuvieron con aireación constante por burbujeo leve. Las larvas fueron cultivadas en este sistema hasta alcanzar el estadio de equinopluteus de 4 brazos a los 4 días postfertilización. A partir del tercer día postfertilización, las larvas fueron alimentadas con *Rhodomonas sp.* (6,000 células/mL), las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Producción de Microalgas del Instituto de

Investigaciones Oceanológicas, UABC. Diariamente se monitoreó el pH, oxígeno disuelto y temperatura. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura constante de $17.07 \pm 0.02^{\circ}\text{C}$. Se realizaron 11 experimentos (experimentos numerados del 1 al 11), con tres tratamientos de pH cada uno, cada tratamiento contó con 4 pseudoreplicas. En promedio, 10 erizos morados fueron inducidos al desove por cada uno de los experimentos.

Tratamientos experimentales

Se realizaron cultivos larvales en 3 condiciones de pH: 8.0 (tratamiento control), y dos condiciones de pH reducido (pH 7.7 y pH 7.5). Cada uno de los tratamientos tuvo 4 pseudoréplicas, como se mencionó anteriormente. Los cultivos se mantuvieron bajo estas condiciones desde la fertilización hasta que los organismos alcanzaron el estadio de larva equinopluteus de 4 brazos. El agua de los cultivos fue cambiada cada dos días, con agua previamente acidificada de acuerdo a la condición de pH del tratamiento (excepto el control, en donde se utilizaba agua de mar filtrada tal y como sale de las tuberías del laboratorio), para garantizar con esto que se mantuviera el pH de cada tratamiento. Diariamente se tomó una muestra de 1 mL de cada pseudoréplica para determinar su densidad larval. Para los análisis de morfometría, de cenizas totales y para los ensayos de PCR-Tiempo Real, los muestreos fueron realizados a los 2 y 4 días (para gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos, respectivamente) postfertilización. En los resultados del presente trabajo se

muestran las observaciones hechas con los experimentos 8, 9, 10 y 11, dado que con estos últimos 4 cultivos fue posible realizar pruebas morfométricas, de cenizas y de expresión de genes (N=4 para cada parámetro analizado). Una vez que las larvas alcanzaban el estadio de desarrollo deseado, se determinó que volumen de agua contenía el número de larvas deseadas por pseudoréplica y se tomaban las larvas que se iban a procesar: 25 larvas para análisis morfométrico, 2000 larvas para análisis de cenizas y de genes (por tratamiento 100 larvas para morfometría, 8000 para cenizas y 8000 para genes). Para coleccionar las larvas se filtraba el agua con un tamiz con malla de 30 μm para gástrulas y de 120 μm para larvas equinopluteus de 4 brazos. Una vez en el tamiz las larvas fueron removidas suavemente con una pipeta y se depositaron en tubos plásticos de 1.5 mL.

Acidificación del agua de mar y monitoreo de pH

Se redujo el pH del A_{MFUV} mediante burbujeo de CO_2 gaseoso. Los valores de pH_{NBS} fueron determinados con un potenciómetro (Orion modelo 525A), para garantizar que cada tratamiento tuviera el pH deseado.

Química del agua

Durante la realización del experimento No. 9 se tomaron diariamente muestras de agua de los tres tratamientos para los análisis de Carbono Inorgánico

Disuelto (CID) y Alcalinidad Total. Las mediciones se realizaron en el Laboratorio de Oceanografía Química del Instituto de Investigaciones Oceanológicas UABC, a cargo del Dr. José Martín Hernández Ayón.

Para las mediciones del contenido de CID del de agua de los cultivos se acidificaron 2 mL de muestra con ácido fosfórico, con la finalidad de eliminar el contenido de agua y convertir la totalidad del CID a CO₂ gaseoso. El CO₂ es acarreado con gas N₂ al equipo analítico infrarrojo LI-7000 CO₂/H₂O Gas Analyzer (LI-COR Inc, NE), el cual mide la cantidad de CO₂ contenido en la muestra. Durante el análisis, el equipo fue calibrado utilizando el material de referencia estándar certificado con un valor de DIC conocido, proporcionado por el Dr. Andrew Dickson de Scripps Institution of Oceanography (CO₂ CRM, Scripps-UCSD, CA), para asegurar la exactitud y estabilidad de las mediciones. Los análisis fueron realizados, una vez que los valores medidos en el material de referencia se encontraran en el intervalo de $\pm 3 \mu\text{mol/Kg}$.

El análisis de la alcalinidad total de las muestras de agua, se llevó a cabo de acuerdo al método de valoración potenciométrico, descrito por Hernández-Ayón y colaboradores (1999). Previo a realizar las mediciones de alcalinidad de las muestras el sistema fue condicionado, realizando mediciones de agua de mar con el electrodo. El criterio utilizado fue iniciar el análisis de muestras después de que el valor medido del material de referencia se encontrara en un intervalo de $\pm 3 \mu\text{mol/Kg}$. La titulación se llevó a cabo con un programa en VisualBasic para el control de los instrumentos. Para llevar a cabo el análisis se tomó un

alícuota de muestra de un peso conocido y se llevó a 23°C, en una celda abierta conectada a un termocirculador de agua con temperatura controlada. La titulación se realizó con una pipeta automática, con la cual se añadió HCl 0.1 N hasta llegar a un pH aproximado de 3.5, con burbujeo constante para liberar el CO₂. A partir de esta etapa se disminuyó el pH a 3.0 con adiciones de 0.025 mL de HCl, registrando los cambios de mV de manera simultánea a cada adición. Con estos datos el programa realizó el cálculo del volumen del HCl que se necesita para neutralizar las bases contenidas en ella usando la técnica de la derivada y se pudo calcular la alcalinidad total de las muestras. El $\Omega_{\text{Aragonita}}$ y Ω_{Calcita} de las muestras se calculó con los datos de Alcalinidad Total, CID, Temperatura y Salinidad utilizando el programa CO2Sys (Pelleiter *et al.*, 2005).

Sobrevivencia larval

A partir del día 1 postfertilización se tomaron muestras de 1 mL de cada pseudoréplica y se promedió la densidad larval por tratamiento experimental. Utilizando la densidad larval se calculó el porcentaje de sobrevivencia de cada tratamiento experimental por día postfertilización. Se analizó si los datos presentaban una distribución normal o no con la prueba de D'Agostino y Pearson. Dado que los datos que no presentaron una distribución normal se analizaron bajo criterios no paramétricos, con la prueba de Kruskal-Wallis y se compararon los promedios de los tratamientos experimentales contra el

tratamiento a pH 8.0, con comparaciones múltiples de Dunn's. Se utilizó el software estadístico GraphPad 6.01.

Análisis morfométrico

De los experimentos 8, 9, 10 y 11 se colectaron 100 gástrulas y 100 larvas equinopluteus de 4 brazos (25 de cada pseudoréplica) y, se colocaron en tubos de 1.5 mL con formaldehído al 4%. Las larvas se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su análisis. Para el análisis los organismos fueron observados en un microscopio óptico compuesto Axioskop 2 (Carl Zeiss) y fueron fotografiados digitalmente 50 organismos con un objetivo 4x, y se cuidó que cada uno estuviera en la misma posición. A partir de cada fotografía se realizaron las mediciones, con el programa AxioVision, AxioVs40 4.8.0.0. De cada tratamiento por experimento, se realizaron mediciones de 50 gástrulas y de 50 larvas equinopluteus de 4 brazos. En gástrulas se tomaron mediciones del largo y ancho corporal. En larvas equinopluteus de 4 brazos se tomaron medidas del largo y ancho corporal, así como del largo de un brazo postoral, de acuerdo a (O'Donnell et al., 2010). La medición del ancho se realizó en la barra transversal del endoesqueleto y la medición del largo del brazo postoral, se realizó desde el brazo postoral hasta su unión en la barra transversal del endoesqueleto. Tanto para gástrulas como para larvas de 4 brazos se realizaron sumatorias de las mediciones efectuadas. Una vez efectuadas las mediciones, se analizó si los datos presentaban o no una distribución normal, con la prueba de D'Agostino y

Pearson. Dado que los datos no presentaron una distribución normal, se realizaron análisis no paramétricos de Kruskal-Wallis y se compararon los promedios de los tratamientos experimentales contra el tratamiento a pH 8.0 con comparaciones múltiples de Dunn's. Se utilizó el software estadístico GraphPad 6.01.

Cenizas

Se colectaron dos mil larvas de cada pseudoréplica experimental de los cultivos 8, 9, 10 y 11, las cuales se agruparon en un tubo eppendorf de 1.5 mL con formaldehído para tener un total de 8000 gástrulas y 8000 larvas equinopluteus de 4 brazos por tratamiento experimental. Las muestras se almacenaron en refrigeración a 4°C. Para el análisis de las cenizas de las larvas, se centrifugaron, se les removió el formaldehído y se suspendieron en 500 µL de A_{MFUV} . Después de 12 horas se removió el agua y las larvas fueron lavadas, con etanol al 20%, el cual se removió tras centrifugación, y posteriormente con 300 µl de etanol al 70%, con el propósito de eliminar sales. Las larvas se depositaron en capsulas de papel aluminio previamente pesadas y se colocaron en una estufa a 60°C por 24 horas para eliminar el etanol. Tras esto, las cápsulas se volvieron a pesar y luego se colocaron en una mufla, donde se incineraron las larvas durante 4 horas a 450°C. Las cápsulas con cenizas se pesaron de nuevo y con los pesos se calculó el porcentaje de cenizas. El porcentaje de cenizas de cada muestra se normalizó a cero al restarle el valor

contenido del tratamiento a pH 8.0. Se analizó si los datos presentaban una distribución normal con la prueba de D'Agostino y Pearson, y al no ser así se realizaron análisis no paramétricos de Kruskal-Wallis y se compararon los promedios de los tratamientos experimentales contra el tratamiento a pH 8.0, mediante comparaciones múltiples de Dunn's. Se utilizó el software estadístico GraphPad 6.01.

Extracción de ARN total

Para el análisis de expresión de genes se tomaron 8000 gástrulas y 8000 larvas equinopluteus de 4 brazos por tratamiento (2,000 de cada pseudoréplica) de los experimentos 8, 9, 10 y 11 y, se colocaron en tubos de 1.5 mL con 0.2 mL de TRIzol para las gástrulas y 0.4 mL de TRIzol para las larvas de 4 brazos. Se homogenizó la mezcla y se almacenaron a -20°C. La extracción de ARN de gástrulas y larvas de 4 brazos de cada tratamiento, se realizó de acuerdo al protocolo de TRIzol® (Life Technologies). Brevemente, se homogenizaron las muestras en TRIzol® y se les añadieron 200 µL de cloroformo por 1 mL de TRIzol® y se mezclaron con vórtex durante 15 segundos. Tras agitarlas, las muestras fueron incubadas durante 2-3 minutos a temperatura ambiente y posteriormente, centrifugadas a 9,500 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa fue traspasada a tubos plásticos (Eppendorf®) de 1.5 mL y se le agregó 500 µL de isopropanol frío por 1 mL de TRIzol®, y se mezcló mediante gentil inversión. Los tubos se dejaron incubar toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 9,500 rpm por 10 minutos a 4°C y se retiró el

sobrenadante, y se decantó cuidadosamente. El pellet de ARN fue lavado con 1 mL de etanol al 75% (por cada mL de TRIzol) y las muestras se centrifugaron a 7,500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tras centrifugar se decantó el etanol y se dejaron secar los pellets con los tubos boca abajo sobre papel secante, para luego resuspenderse en 10-20 µL de agua libre de ARNasas.

Se analizó la integridad y la concentración de los ácidos nucleicos por medio de un espectrofotómetro Nanodrop® 1000 (Thermo scientific), con ayuda del software V3.7.1. El ARN obtenido se almacenó a -80°C.

Síntesis de ADNc

Se sintetizó ADNc (ADN complementario) por retro transcripción con el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems) para amplificar solamente los ARN mensajeros (ARNm) en cada una de las muestras, utilizando 500 ng de ARN total de cada muestra para cada una de las reacciones.

Ensayos de PCR-Tiempo Real

Por medio de reacciones de PCR se amplificó el ADNc de los mensajeros de los genes de interés (*SM29*, *SM30* y *Anhidrasa Carbónica*), utilizando primers de *S. purpuratus* específicos para cada gen. Las secuencias de los primers utilizados, así como sus temperaturas de alineamiento, se encuentran en la Tabla IV. Los niveles de ARNm de los genes de interés se determinaron con

base en la amplificación de productos obtenidos por PCR Tiempo Real, y se utilizó el sistema SYBER Green® (Applied Biosystems) como marcador de amplificación. Durante la reacción de PCR se cuantifica la fluorescencia del sistema SYBR Green contra el número de ciclos de amplificación. El ciclo umbral (Threshold Cycle, C_T) es el número de ciclos en el cual la fluorescencia producto de la amplificación sobrepasa la fluorescencia de fondo y, es utilizado para calcular el número inicial de copias de ADN de una muestra. El C_T de una muestra es inversamente proporcional al número de copias de ADN iniciales, por lo que muestras con una cantidad grande de copias de ADN tendrán un C_T menor que muestras con un menor número de copias de ADN (Life Technologies, 2012). En las placas se incluyeron controles negativos de cada muestra experimental y controles que incluyen utilizar ARN total de la misma, como templado en la reacción de PCR. Los resultados obtenidos con éstos ensayos fueron analizados con el programa StepOne software v2.2 (Applied Biosystems). A manera de confirmación, los productos del PCR fueron visualizados, en un gel de agarosa al 2% con SYBERGold (Invitrogen) en un transiluminador y posteriormente se fotodocumentaron. La expresión relativa de los genes fue determinada mediante el método de Livak ($\Delta\Delta C_T$), donde la expresión del gen de interés en diferentes condiciones experimentales, es comparada contra la expresión de un gen constitutivo. Primero, se normaliza el C_T de las diferentes muestras al restar el C_T de los genes del control al C_T del gen constitutivo para obtener un ΔC_T de calibración y, también se resta el C_T de los genes en condiciones experimentales al C_T del gen constitutivo, para

obtener un ΔC_T de los genes experimentales. Entonces, se normaliza el ΔC_T de los genes experimentales restándole el ΔC_T de calibración y se obtiene un $\Delta\Delta C_T$ para la muestra experimental. Con esto, se calcula la proporción de expresión del gen experimental con respecto al gen constitutivo, mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Se utilizó la expresión del gen ribosomal 18S como gen constitutivo para la calibración (Tabla IV). Las reacciones fueron de 10 μ l, con las siguientes condiciones: Master Mix 8.60 μ L, Primer F 50 μ M 100% 0.20 μ L, Primer R 50 μ M 100% 0.20 μ l, templado 1:10 1 μ L. Las concentraciones del Master Mix fueron las siguientes: H₂O inyectable 5.45 μ L, SYBR Green 10x 1 μ L, MgCl₂ 25 mM 1.20 μ L, dNTP's 12.5 mM 0.80 μ L, TaqGold 5U/ μ L 0.05 μ L, Amperase UNG 1U/ μ L 0.10 μ L. Se analizó si los datos presentaban una distribución normal con la prueba de D'Agostino y Pearson, y al presentarla, se realizaron análisis ANOVA y se compararon los promedios de los tratamientos experimentales contra el tratamiento a pH 8.0 con comparaciones múltiples de Dunnett. Se utilizó el software estadístico GraphPad 6.01.

Tabla IV. Secuencia de primers para PCR en Tiempo Real.

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño (bases)	Tm°	GC%	Tamaño de secuencia amplificada
Ribosomal 18S	R18S F	CGCTACACTGGCGGAATCA	19	67.3	57.8	64
	R18S R	GTTTAGCGGATTACCCAGACCTT	23	65.1	47.8	64
SM29	SM29F	ACAAAATCTGGATGGGTCTCG	21	65.0	47.6	114
	SM29R	TGAAGCGGTTGAAGACGAAG	20	65.4	50.0	114
SM30	SM30F	TCGTCTATGTGTTGGTGTGC	20	62.3	50.0	142
	SM30R	GCATACTTCTGTCTGGTTCG	20	62.3	55.0	142
Anhidrasa Carbónica	AnhCarb12 F	ACGACAAGTCTAAATACGCCG	21	62.9	47.6	131
	AnhCarb12 R	GATGTAACCTCAGGACGGAATCG	22	64.5	50.0	131

Relación entre química del agua y factores biológicos

Se realizaron regresiones lineales para analizar la relación entre parámetros químicos (Ω_{Calcita} y Carbono Inorgánico Disuelto) y biológicos (porcentaje de ceniza, morfometría, y expresión relativa de los genes *SM29*, *SM30* y *Anhidrasa Carbónica*). Se utilizó el software estadístico GraphPad 6.01.

Resultados

Con base a la tasa de crecimiento del erizo morado, estimó que los progenitores usados en este trabajo tenían ente 4 y 7 años de edad (Tabla II). El número aproximado de surgencias a las que se vieron expuestos los erizos utilizados para el presente trabajo se muestra en la Tabla I.

Medición de pH de los cultivos

Tras realizar mediciones en los 8, 9, 10 y 11 cultivos, se obtuvo en el tratamiento a pH 8.0 (control) un pH promedio constante de 8.06 ± 0.02 ; para las condiciones experimentales de pH 7.7, un pH promedio de 7.72 ± 0.01 y, para el tratamiento de pH 7.5, un pH de 7.51 ± 0.01 . Todos los resultados que se presentan representan el promedio \pm el error estándar. La temperatura promedio, a la que se realizaron los cultivos, fue de 17.11 ± 0.01 °C, con una concentración de oxígeno disuelto de 6.41 ± 0.09 para pH 8.0, 6.47 ± 0.03 para pH 7.7 y de 6.51 ± 0.03 mg/L para pH 7.5 (Tabla V).

Los cultivos presentaron en promedio, una concentración CID de 2119 ± 11 $\mu\text{mol/Kg}$ para el tratamiento de pH 8.0; 2230 ± 16 $\mu\text{mol/Kg}$ para pH 7.7, y 2270 ± 18 $\mu\text{mol/Kg}$ en el tratamiento de pH 7.5. Se observó una diferencia de 111 $\mu\text{mol/Kg}$ entre los tratamientos a pH 8.0 y 7.7 y, una diferencia estadísticamente significativa de 151 $\mu\text{mol/Kg}$ entre los tratamientos 8.0 y 7.5 ($p < 0.05$) (Tabla V).

Los tratamientos experimentales presentaron valores de Alcalinidad Total de $2,265 \pm 4$ $\mu\text{mol/Kg}$ para pH 8.0, $2,268 \pm 2$ $\mu\text{mol/Kg}$ para pH 7.7 y $2,268 \pm 2$

$\mu\text{mol/Kg}$ para pH 7.5. Las diferencias entre los tratamientos no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.68$) (Tabla V).

Tabla V. Parámetros químicos de los cultivos larvales. La tabla muestra el promedio \pm error estándar del pH_{NBS} , oxígeno, temperatura, Carbono inorgánico Disuelto (CID), Alcalinidad Total (AT), $\Omega_{\text{Aragonita}}$ y Ω_{Calcita} en los tres tratamientos experimentales (pH 8.0, 7.7 y 7.5) de los cultivos de larvas de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*.

Tratamiento	pH (NBS)	Oxígeno (mg/L)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	CID ($\mu\text{mol/Kg}$)	AT ($\mu\text{mol/Kg}$)	$\Omega_{\text{Aragonita}}$	Ω_{Calcita}
pH 8.0	8.02 ± 0.02	6.41 ± 0.09	17.11 ± 0.01	2119 ± 11	2265 ± 4	1.89 ± 0.13	2.90 ± 0.20
pH 7.7	7.72 ± 0.01	6.47 ± 0.03	17.11 ± 0.01	2230 ± 16	2268 ± 2	1.00 ± 0.1	1.53 ± 0.16
pH 7.7	7.51 ± 0.01	6.51 ± 0.03	17.11 ± 0.01	2270 ± 18	2268 ± 2	0.78 ± 0.11	1.20 ± 0.17

Se observa que los experimentos mantuvieron un pH constante en las 3 condiciones experimentales; con un incremento en la concentración de CID en los tratamientos a menor pH. En pH 8.0, los valores de Ω_{Calcita} se mantuvieron por arriba de 2, en el tratamiento a pH 7.7 por arriba de 1, pero en pH 7.5, se presentaron valores menores a 1, específicamente en el tercer día postfertilización (Figura 4).

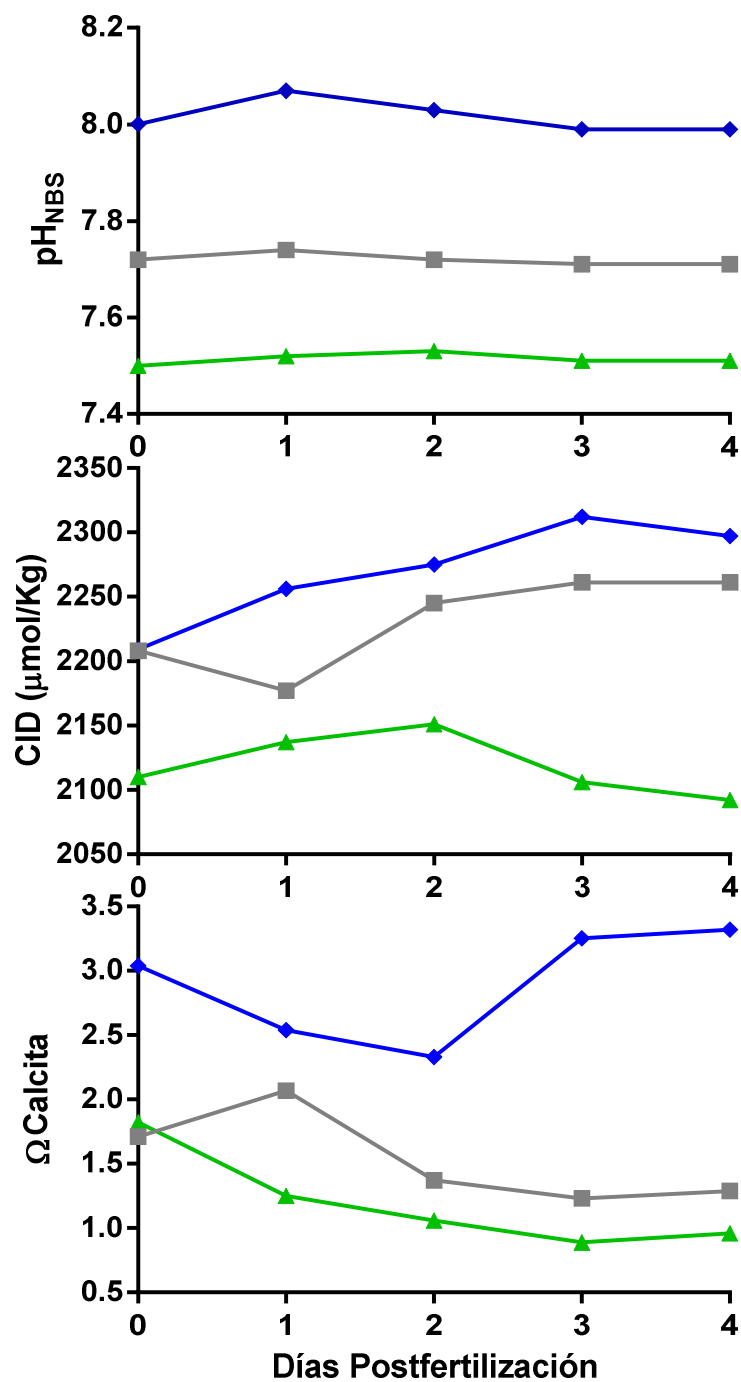


Figura 4. Variación de pH, Carbono Inorgánico Disuelto y Ω_{Calcita} en los tratamientos experimentales del cultivo de larvas de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*. La línea azul (rombos) representa el tratamiento a pH 8.0, control, la línea gris (cuadros) represe el tratamiento a pH 7.7 y, la línea verde (triángulos) representa el tratamiento experimental a pH 7.5.

Sobrevivencia Larval

A partir del día 3 postfertilización, la sobrevivencia larval en los 3 tratamientos experimentales disminuyó. Sin embargo, la diferencia encontrada entre tratamientos no fue estadísticamente significativa ($p = 0.39$) (Figura 5).

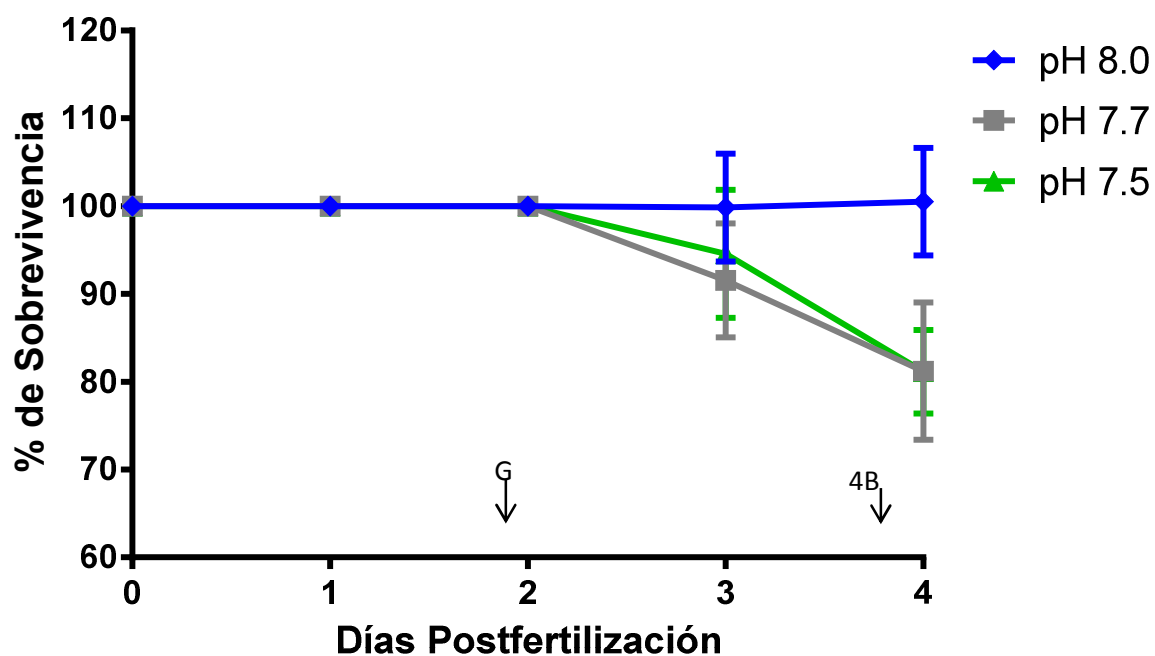


Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia de larvas de *Strongylocentrotus purpuratus* en cultivos bajo condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Porcentaje del promedio de la sobrevivencia larval \pm error estándar desde el día cero hasta el día 4 postfertilización. G indica el día en que las larvas alcanzaron el estadio de gástrula, 4B indica el día en que las larvas alcanzaron el estadio de 4 brazos. Prueba ANOVA, $p = 0.39$, $N = 4$.

Morfometría

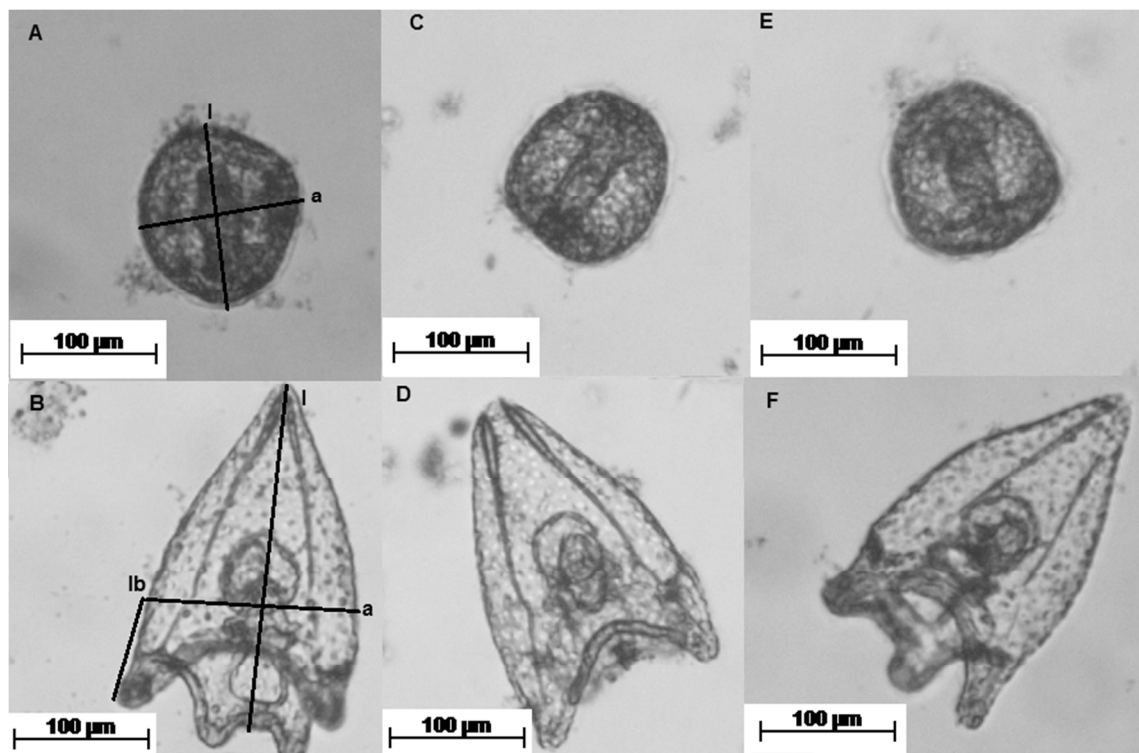


Figura 6. Gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* cultivadas bajo diferentes condiciones de pH, y mediciones realizadas. Barras de escala = 100 µm. Los organismos en los tres tratamientos de pH alcanzaron el estadio de gástrula al día 2 postfertilización y el estadio de 4 brazos, al día 4 postfertilización. Se presentan las mediciones morfológicas realizadas en las larvas (señalados en A y B). l indica largo, a indica ancho, lb indica largo de brazo postoral. A muestra una gástrula a pH 8.0 (control), B muestra una larva de 4 brazos a pH 8.0 (control), C muestra una gástrula a pH 7.7, D muestra una larva de 4 brazos en pH 7.7, E muestra una gástrula a pH 7.5 y F muestra una larva de 4 brazos a pH 7.5.

Los organismos alcanzaron el estadio de gástrula total a los 2 días postfertilización, y el estadio de 4 brazos a los 4 días (Figura 6). Se observó que los tratamientos experimentales modificaron de forma estadísticamente significativa la morfometría, tanto de gástrulas como de larvas de 4 brazos. Las mediciones presentaron una incertidumbre de $\pm 0.92 \mu\text{m}$.

Gástrulas

Las gástrulas cultivadas en ambas condiciones experimentales de pH reducido, presentaron un tamaño menor que aquellas cultivadas en la condición control, siendo las larvas cultivadas en pH 7.5 las que presentaron una mayor disminución de dimensiones corporales. Las gástrulas presentaron un largo promedio de $137.78 \pm 0.98 \mu\text{m}$ en pH 8.0, $132.56 \pm 1.03 \mu\text{m}$ en pH 7.7, y $128.46 \pm 0.85 \mu\text{m}$ en pH 7.5. Se encontró una reducción de tamaño de 3.79% ($5.22 \mu\text{m}$) en gástrulas cultivadas en pH 7.7, y de 6.76% ($9.32 \mu\text{m}$) en pH 7.5. La diferencia encontrada en ambos tratamientos, contra el grupo control, fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) (Figura 7).

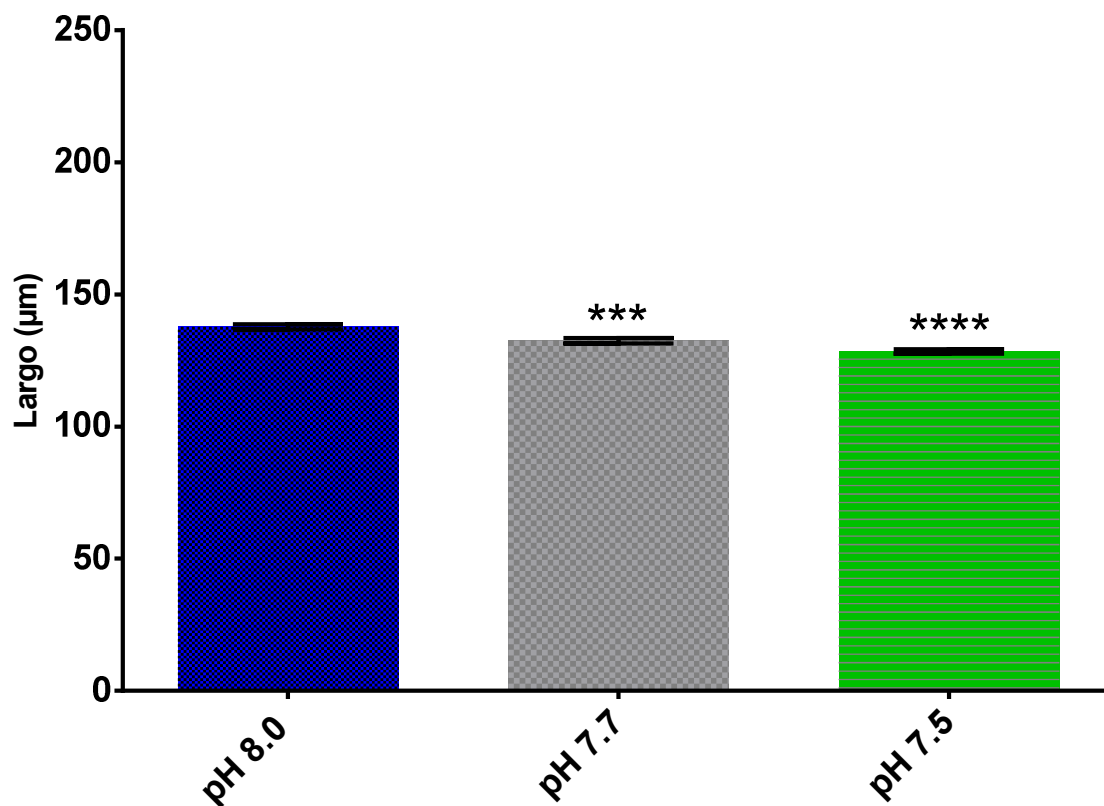


Figura 7. Largo del cuerpo de gástrula de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de las mediciones \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p \leq 0.05$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con pH 8.0 (***) = $p \leq 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$). N = 4, n = 50.

En ancho, las gástrulas presentaron un tamaño de $123.47 \pm 0.68 \mu\text{m}$ en pH 8.0, $119.89 \pm 0.69 \mu\text{m}$ en pH 7.7 y $118.23 \pm 0.75 \mu\text{m}$ en pH 7.5. En pH 7.7, presentaron una reducción en 2.90% ($3.58 \mu\text{m}$) y, en pH 7.5 una reducción en un 4.24% ($5.24 \mu\text{m}$). La diferencia de los experimentos con el control pH 8.0, fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) (Figura 8).

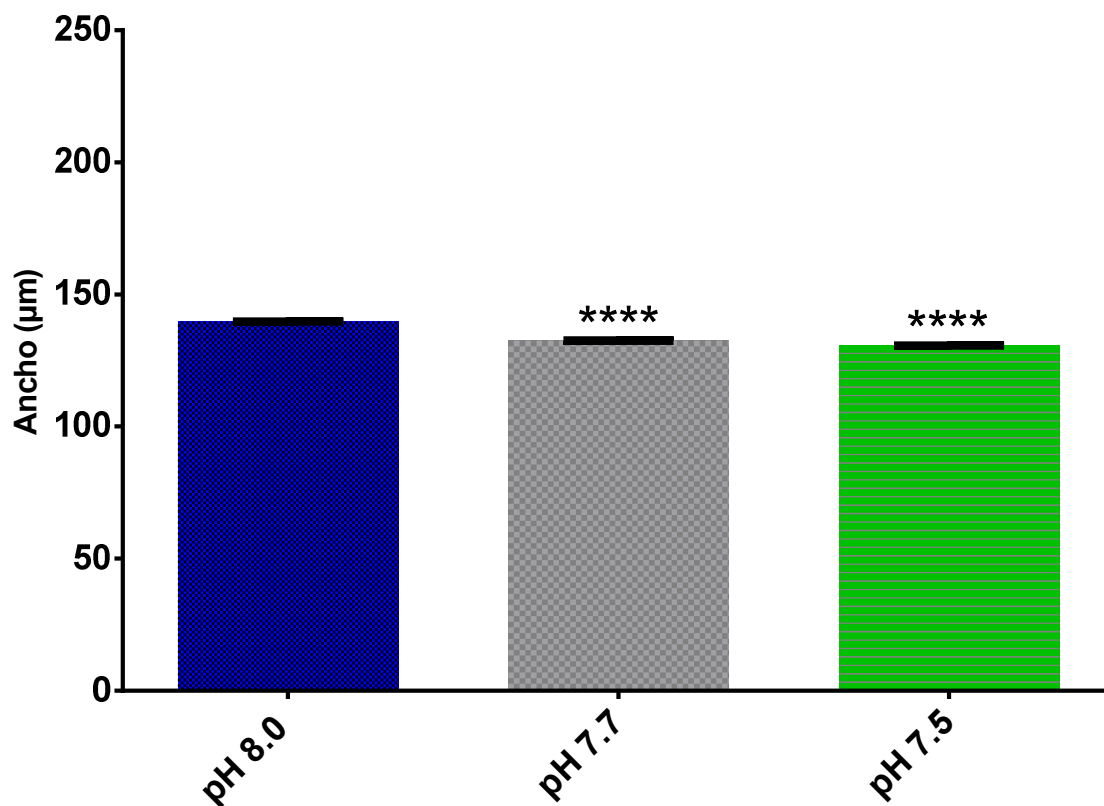


Figura 8. Ancho del cuerpo de gástrula de *S. purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de las mediciones \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p \leq 0.05$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con pH 8.0 (**** = $p \leq 0.0001$). N = 4, n = 50.

En la suma de largo y ancho de las gástrulas se obtuvieron dimensiones totales de $261.25 \pm 1.29 \mu\text{m}$ en larvas cultivadas a pH 8.0, $252.45 \pm 1.36 \mu\text{m}$ en 7.7 y, $246.69 \pm 1.25 \mu\text{m}$ en 7.5. Se observó una reducción de tamaño en las gástrulas cultivadas a pH 7.7 en un 3.37% ($8.80 \mu\text{m}$) y, en pH 7.5 tuvieron una reducción en un 5.57% ($14.56 \mu\text{m}$). Las diferencias encontradas en los tratamiento experimentales, comparado con el control, fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.0001$) (Figura 9).

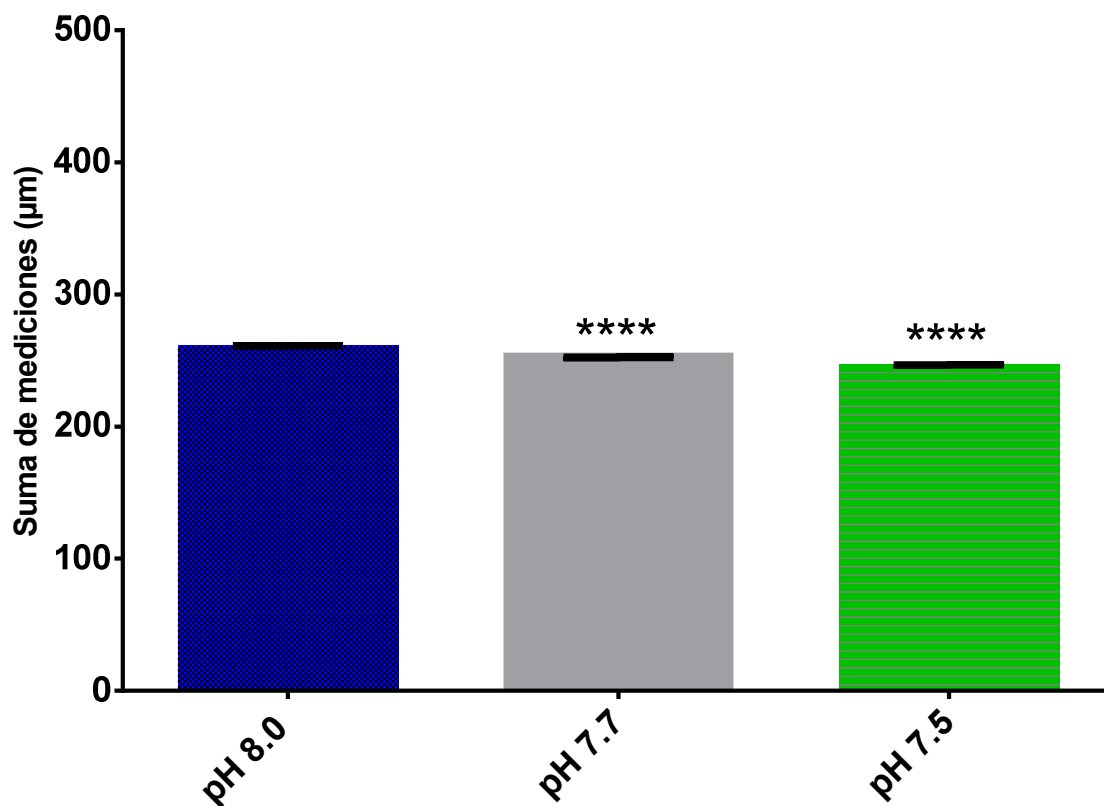


Figura 9. Suma de las mediciones de ancho y largo de gástrulas de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de la suma de las mediciones \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p \leq 0.0001$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con pH 8.0 (**** = $p \leq 0.0001$). N = 4, n = 50.

Larvas equinopluteus de 4 brazos

Las condiciones experimentales modificaron el desarrollo larval, determinado por la disminución en largo y ancho del cuerpo, al igual que un efecto en el largo del brazo postoral.

En el largo, las larvas de 4 brazos cultivadas en pH 8.0 presentaron un promedio de $198.79 \pm 1.46 \mu\text{m}$; aquellas cultivadas en pH 7.7 un largo promedio de $190.56 \pm 1.30 \mu\text{m}$ y, aquellas en cultivo de pH 7.5, un largo promedio de

179.56 \pm 1.40 μm . Las larvas en tratamiento de pH 7.7 presentaron una reducción en el largo en un 4.14% (8.23 μm) y, las larvas en pH 7.5 en 9.63% (19.14 μm). La diferencias con el tratamiento a pH 8.0 fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.0001$) (Figura 10).

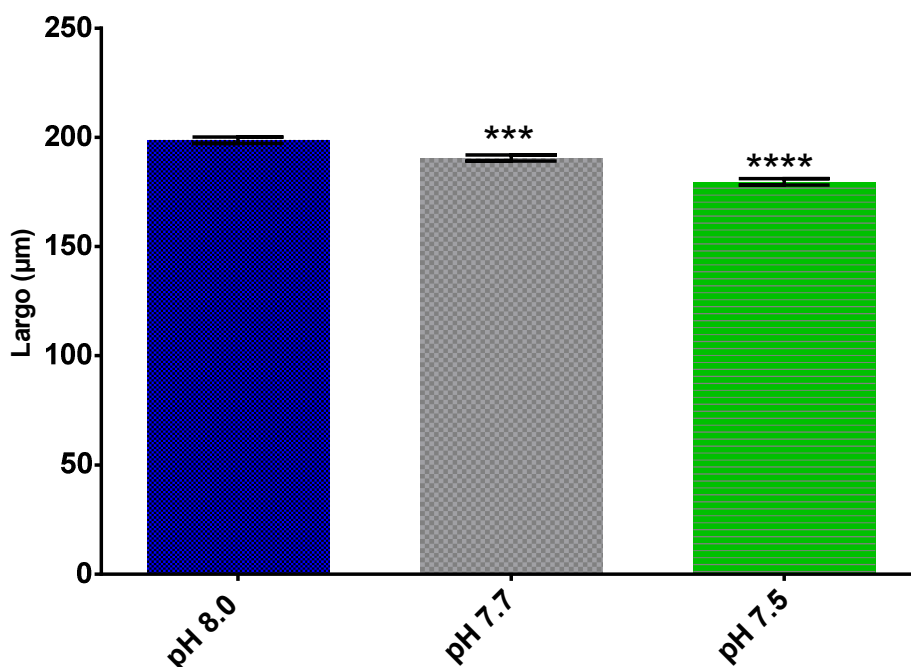


Figura 10. Largo del cuerpo de larva de 4 Brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de las mediciones \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p \leq 0.0001$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con pH 8.0 (** = $p \leq 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$). N = 4, n = 50.

Las larvas de 4 brazos presentaron un ancho promedio de 139.75 \pm 0.82 μm en pH 8.0, 132.51 \pm 0.83 μm en pH 7.7 y, 130.67 \pm 0.87 μm en pH 7.5. Las larvas en pH 7.7 tuvieron una reducción de ancho corporal de 5.18% (7.24 μm) y, las larvas en pH 7.5 presentaron una reducción de 6.50% (8.34 μm). La diferencia encontrada en ambos tratamientos con el pH 8.0 fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.0001$) (Figura 11).

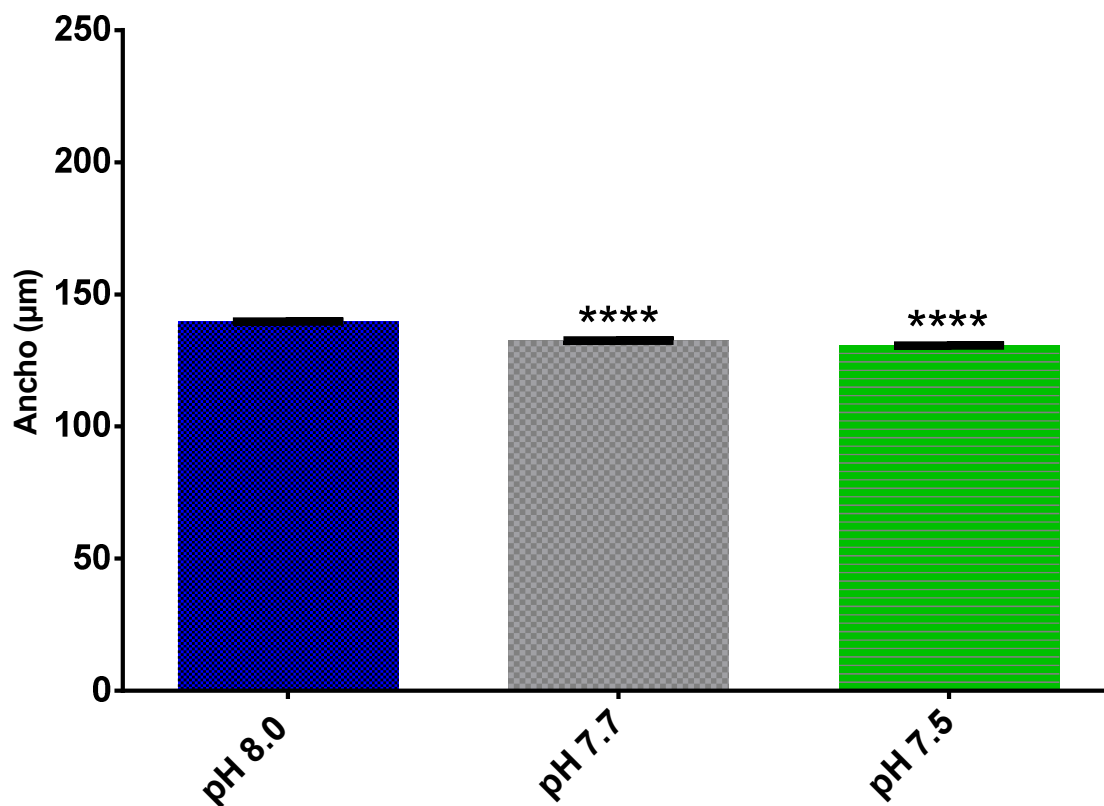


Figura 11. Ancho del cuerpo de Larva de 4 Brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de las mediciones \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p \leq 0.0001$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con pH 8.0 (**** = $p \leq 0.0001$). N = 4, n = 50.

En brazo postoral, las larvas de 4 brazos presentaron una talla de 78.18 ± 0.94 μm en la condición de pH 8.0 75.28 ± 0.90 μm en pH 7.7 y 69.84 ± 0.84 μm en pH 7.5. Las larvas cultivadas a pH 7.7 presentaron una reducción de tamaño de 3.71% (2.90 μm) y en pH 7.5 de 10.67% (8.34 μm). La diferencias en las condiciones experimentales contra la condición de pH 8.0 controlfueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.0001$) (Figura 12).

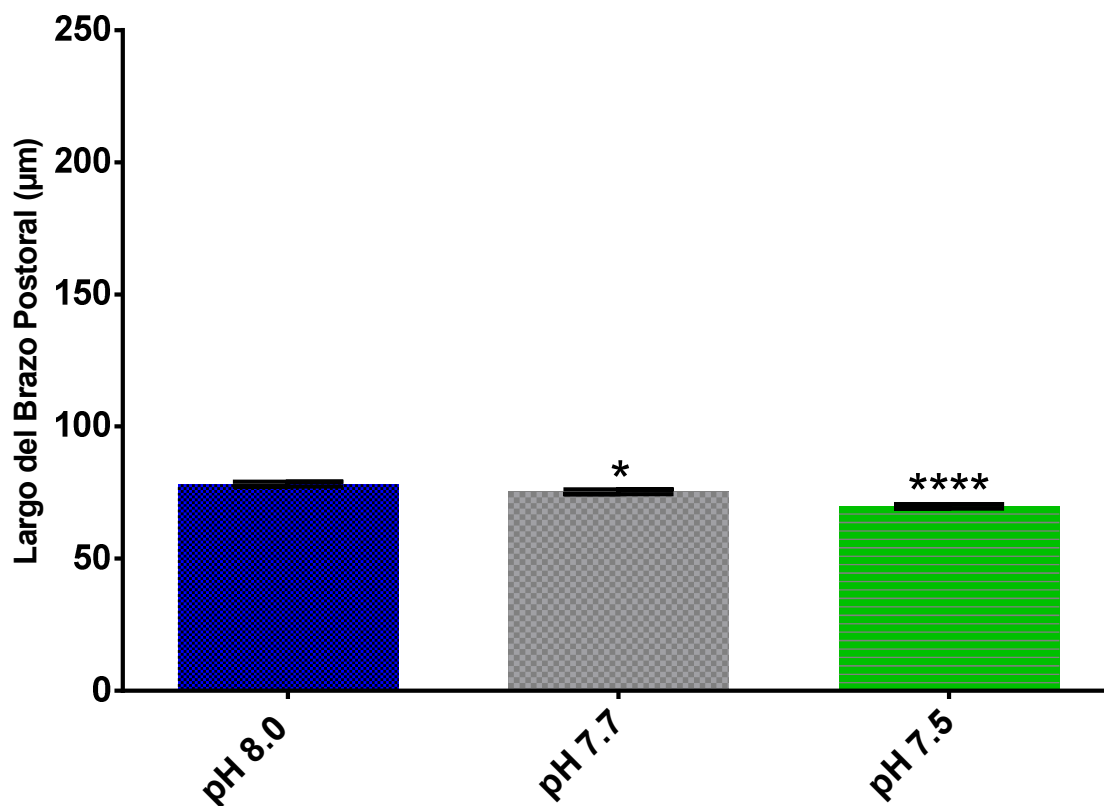


Figura 12. Largo de brazo postoral de Larva de 4 Brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de las mediciones \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p \leq 0.0001$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con pH 8.0 (* = $p \leq 0.05$, **** = $p \leq 0.0001$). N = 4, n = 50.

En la suma de mediciones de larvas de 4 brazos se encontró una medida total de $416.73 \pm 2.41 \mu\text{m}$ en pH 8.0, $398.35 \pm 2.26 \mu\text{m}$ en pH 7.7 y $380.15 \pm 2.45 \mu\text{m}$ en pH 7.5. Las larvas cultivadas en pH 7.7 presentaron una disminución de tamaño en 4.41% ($18.38 \mu\text{m}$) y, las larvas en pH 7.5 una reducción de 8.78% ($36.58 \mu\text{m}$). Las diferencias encontradas en los tratamientos experimentales con el control fue significativa ($p \leq 0.0001$) (Figura 13).

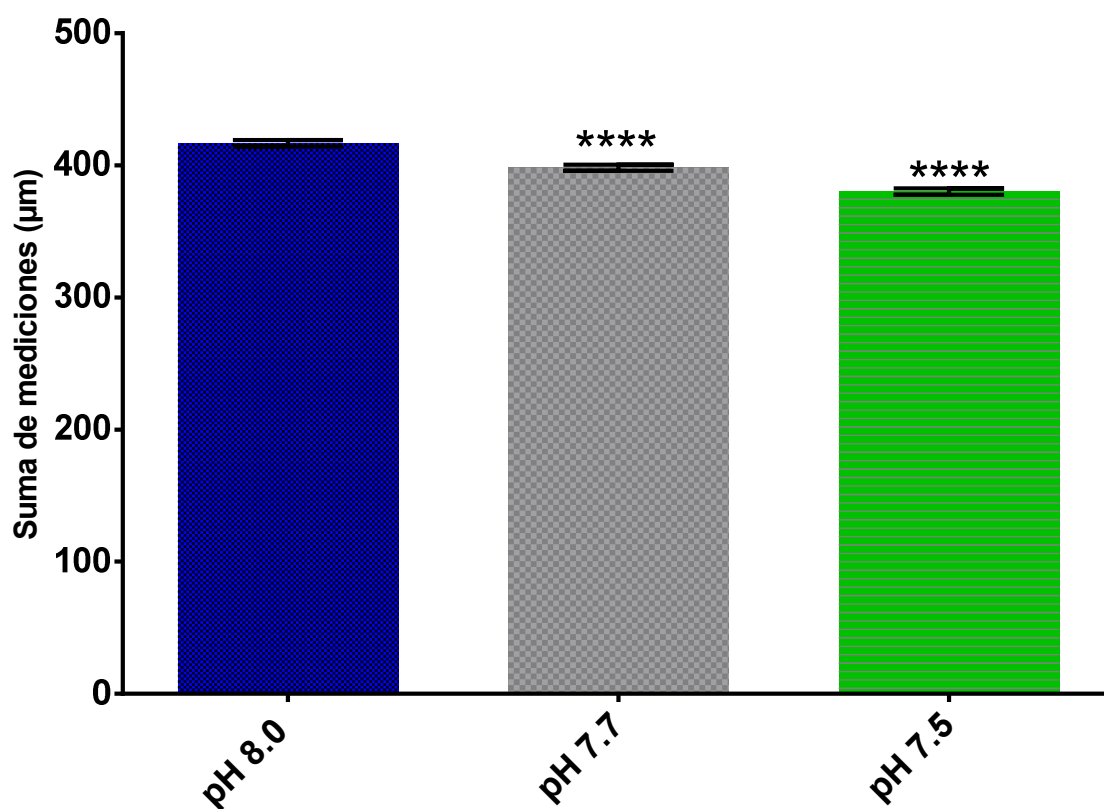


Figura 13. Suma de las mediciones de ancho, largo y largo de brazo postoral de Larvas 4 de brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de la suma de las mediciones \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p \leq 0.0001$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con pH 8.0 (**** = $p \leq 0.0001$). N = 4, n = 50.

Cenizas

Las cenizas representan la cantidad de materia inorgánica encontrada en un organismo y en este caso se asociaron al material calcificado, con lo cual fue posible comparar la calcificación realizada por los organismos en los diferentes tratamientos de pH utilizados (7.7, 7.5 y 8.0).

En gástrula, la diferencia entre los tratamientos experimentales, en comparación con el tratamiento pH 8.0, no fue estadísticamente significativa ($p = 0.67$) (Figura 14).

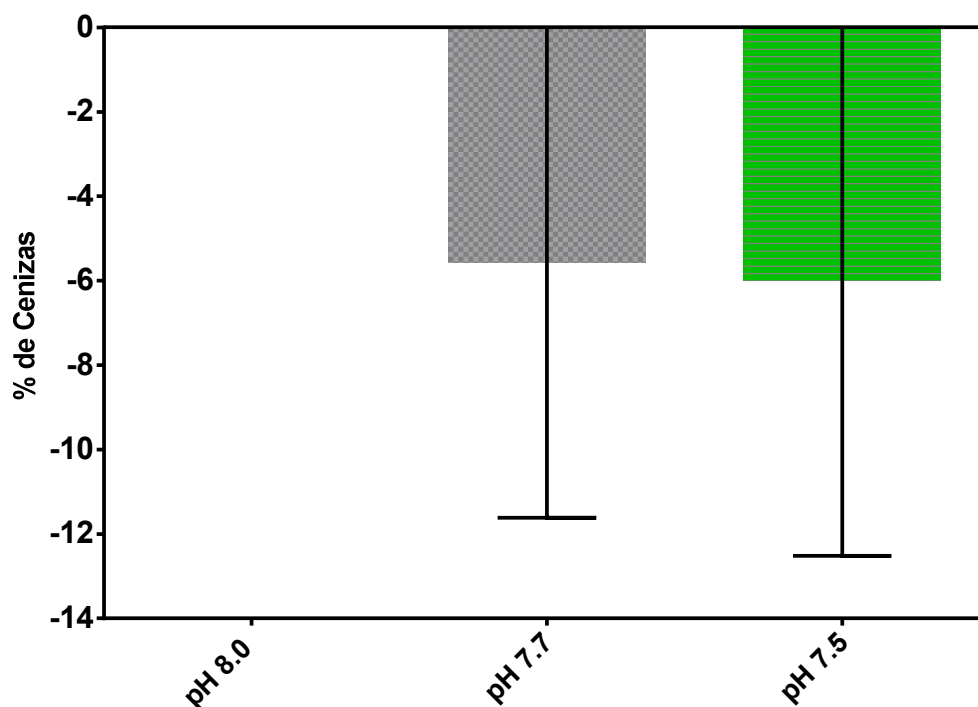


Figura 14. Porcentaje de cenizas de gástrulas de *Strongylocentrotus purpuratus* cultivadas en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5, normalizado a cero con respecto al control pH 8.0. Las barras representan el promedio de las mediciones \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p = 0.79$). $N = 4$, $n = 8,000$.

Las larvas de 4 brazos cultivadas en pH 7.7 presentaron un aumento de ceniza en $1.88 \pm 3.55\%$, La diferencia con el control no fue estadísticamente significativa. Las larvas cultivadas en pH 7.5 tuvieron una reducción de cenizas en $9.63 \pm 2.36\%$. La diferencia con el control pH 8.0 fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) (Figura 15).

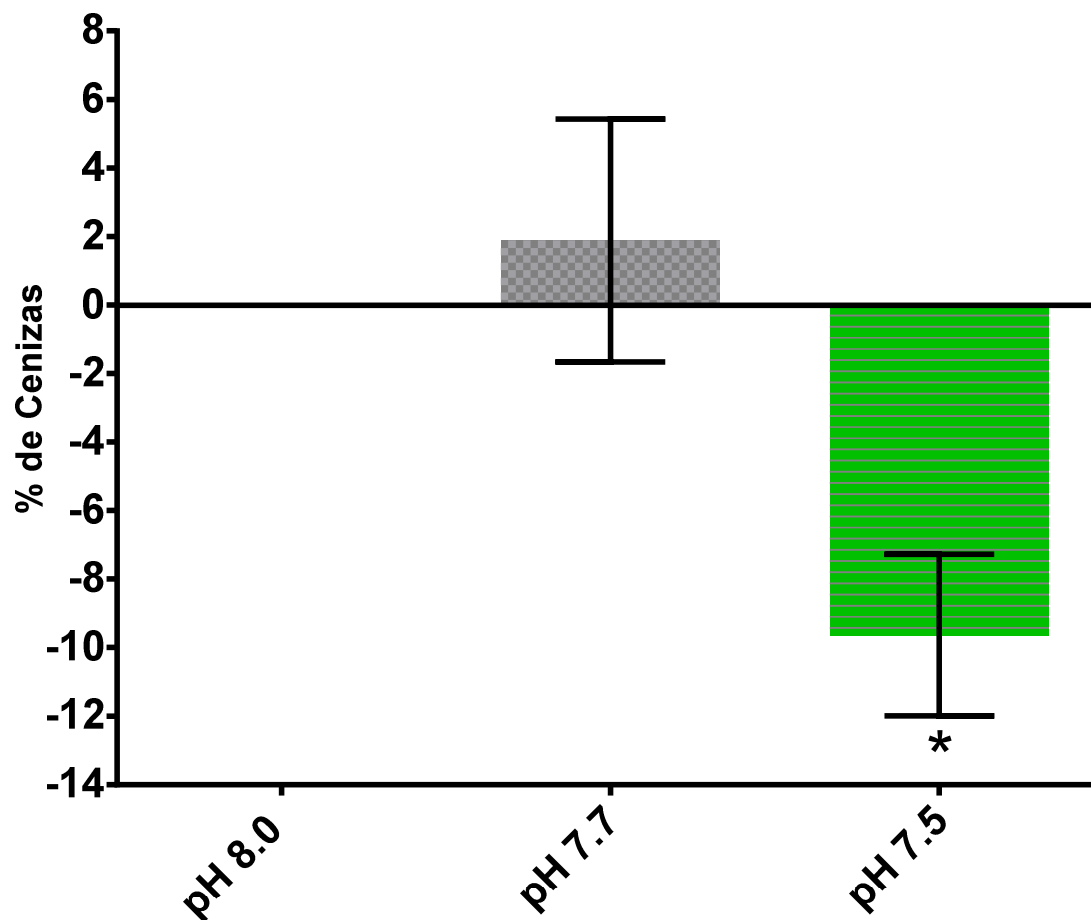


Figura 15. Porcentaje de cenizas de larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* cultivadas en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5, normalizado a cero con respecto al control pH 8.0. Las barras representan el promedio de las mediciones \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p \leq 0.05$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con pH 8.0 (* = $p \leq 0.05$). N = 4, n = 8,000.

PCR en Tiempo Real

Gástrula

En gástrulas se encontró que la expresión relativa del gen *SM29* tuvo un decremento. Sin embargo, la diferencia encontrada entre el tratamiento de pH

8.0 con los tratamientos a pH reducido, no fue estadísticamente significativa ($p = 0.93$) (Figura 16).

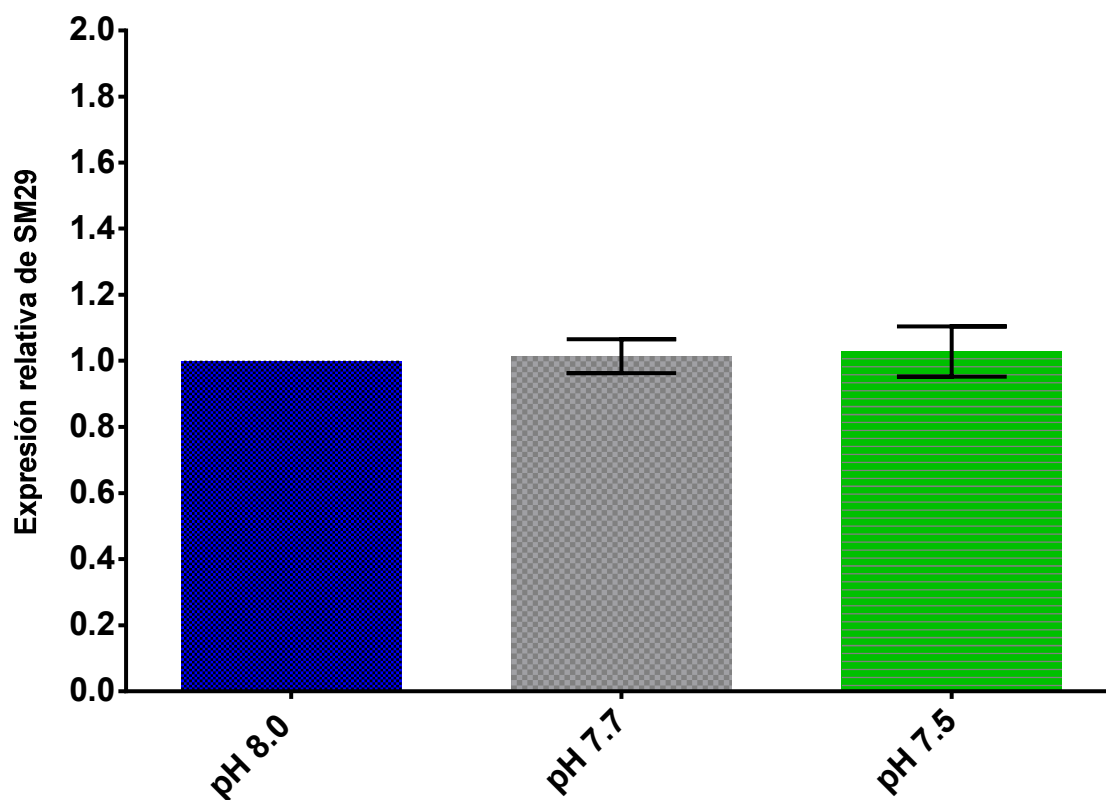


Figura 16. Expresión relativa del gen *SM29* en gástrulas de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de expresión relativa \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba ANOVA ($p = 0.93$). $N = 4$, $n = 8,000$.

El gen *SM30* tuvo una reducción en la expresión relativa en un 56.08% (0.44 ± 0.10 veces) en la condición experimental a pH 7.7 con respecto al control a pH 8.0, mientras que para pH 7.5 hubo un decremento en un 65.33% (0.35 ± 0.13 veces) con respecto al control. La diferencia encontrada en la expresión relativa de ambas condiciones experimentales, con respecto al tratamiento pH 8.0, fue estadísticamente significativa ($p = \leq 0.0001$) (Figura 17).

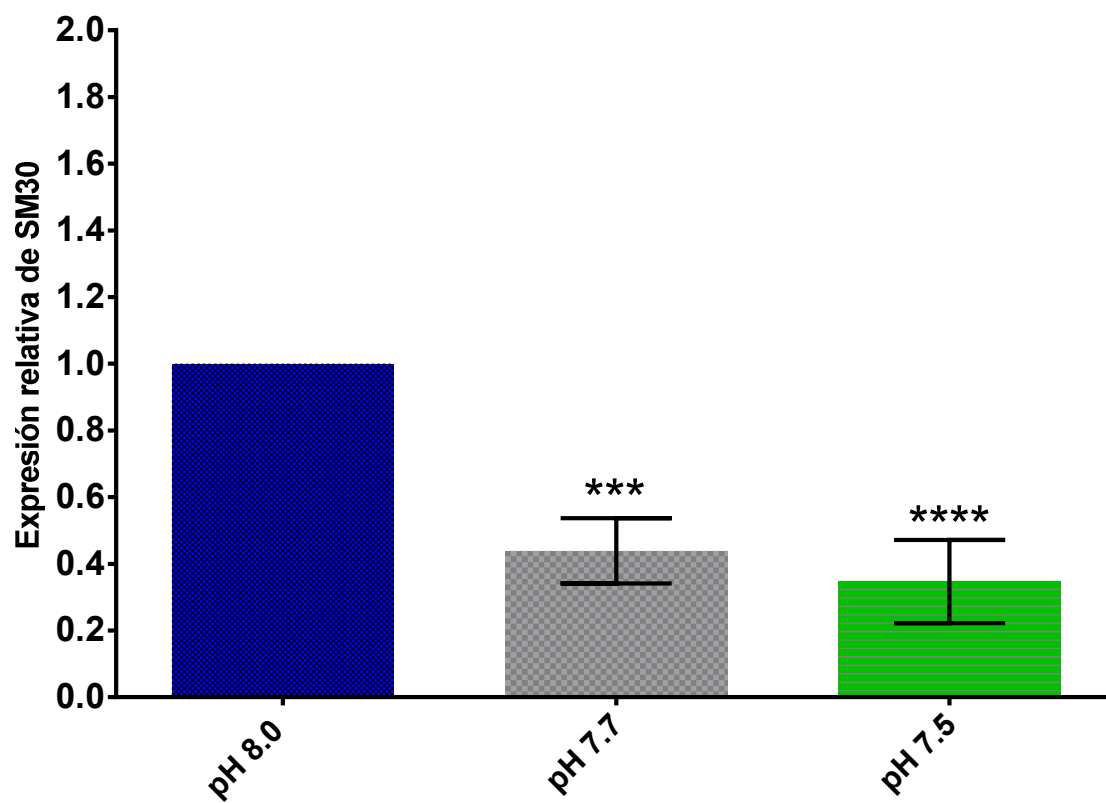


Figura 17. Expresión relativa del gen *SM30* en gástrulas de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de la expresión relativa \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnett ($p \leq 0.0001$). Los asteriscos indican diferencias significativas con el Control pH 8.0. *** = $p \leq 0.001$, **** ≤ 0.0001 . N = 4, n = 8,000.

La expresión relativa de la *Anhidrasa Carbónica* en gástrulas presentó un incremento en ambas condiciones experimentales. Sin embargo, las diferencias encontradas entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.64$) (Figura 18).

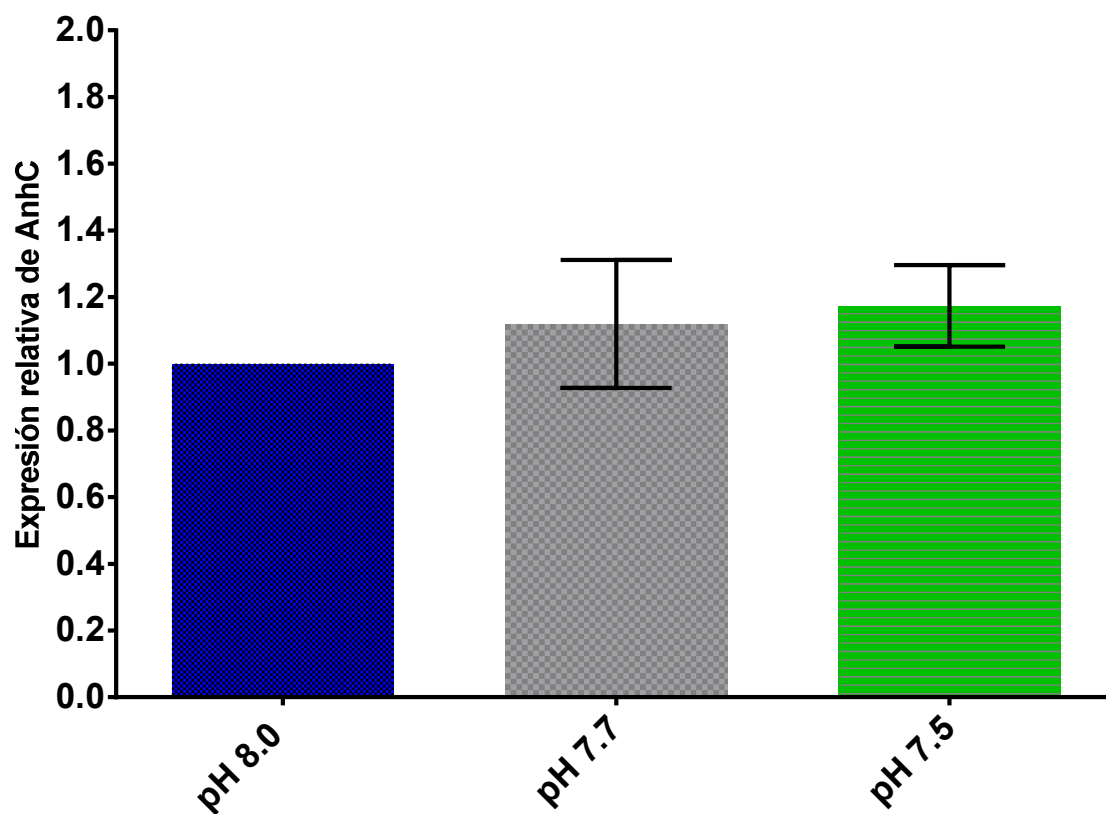


Figura 18. Expresión relativa del gen *Anhidrasa Carbónica* en gástrulas de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de la expresión relativa \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba ANOVA ($p = 0.64$). $N = 4$, $n = 8,000$.

Larvas equinopluteus de 4 brazos

En larvas equinopluteus de 4 brazos la expresión relativa del gen *SM29* tuvo un incremento en un 5.60% (1.06 ± 0.06 veces) en la condición experimental pH 7.7 y, un decremento en 33.75% (0.66 ± 0.09 veces) en la condición pH 7.5. La diferencia encontrada entre el tratamiento 8.0 y 7.5 fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$) (Figura 19).

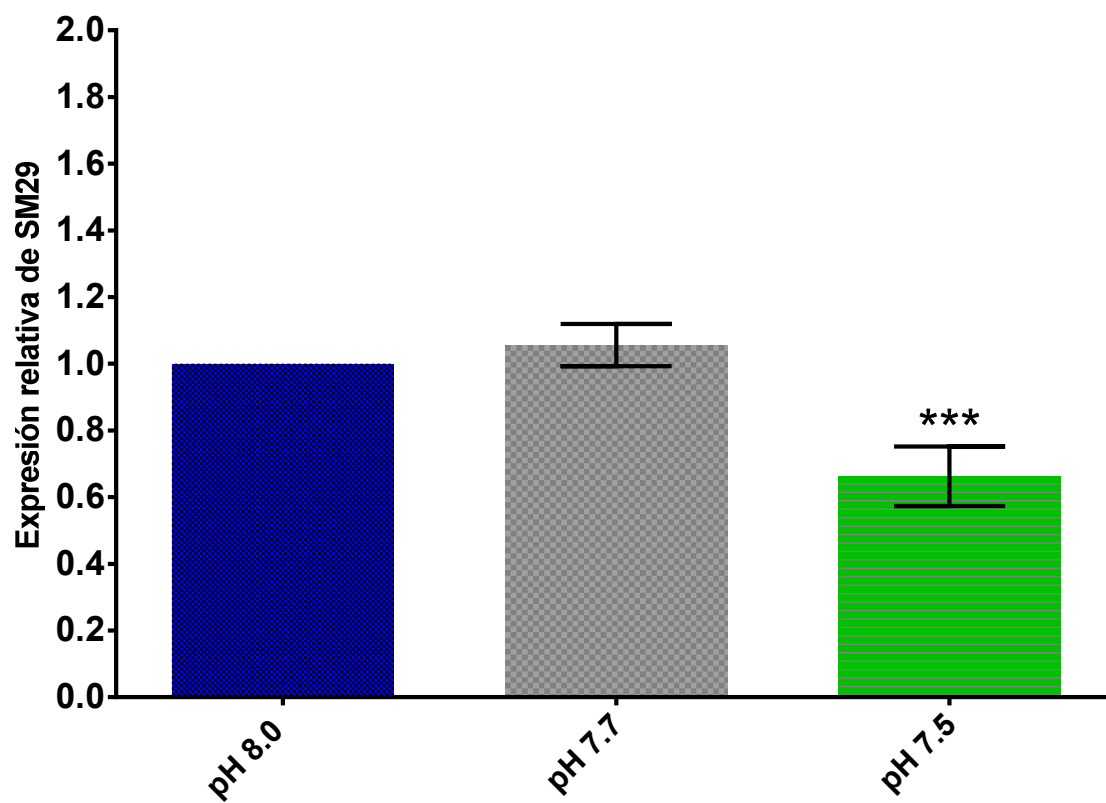


Figura 19. Expresión relativa del gen *SM29* en larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de expresión relativa \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnett ($p \leq 0.001$). Los asteriscos indican diferencias significativas con el Control pH 8.0. *** = $p < 0.001$. N = 4, n = 8,000.

El gen *SM30* en larvas de 4 brazos presentó una reducción en la expresión relativa en un 68.42% (0.32 ± 0.09 veces) en pH 7.7 y de 81.58% (0.18 ± 0.04) en 7.5. Las diferencias encontradas en los tratamientos con el tratamiento a pH 8.0, fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.0001$) (Figura 20).

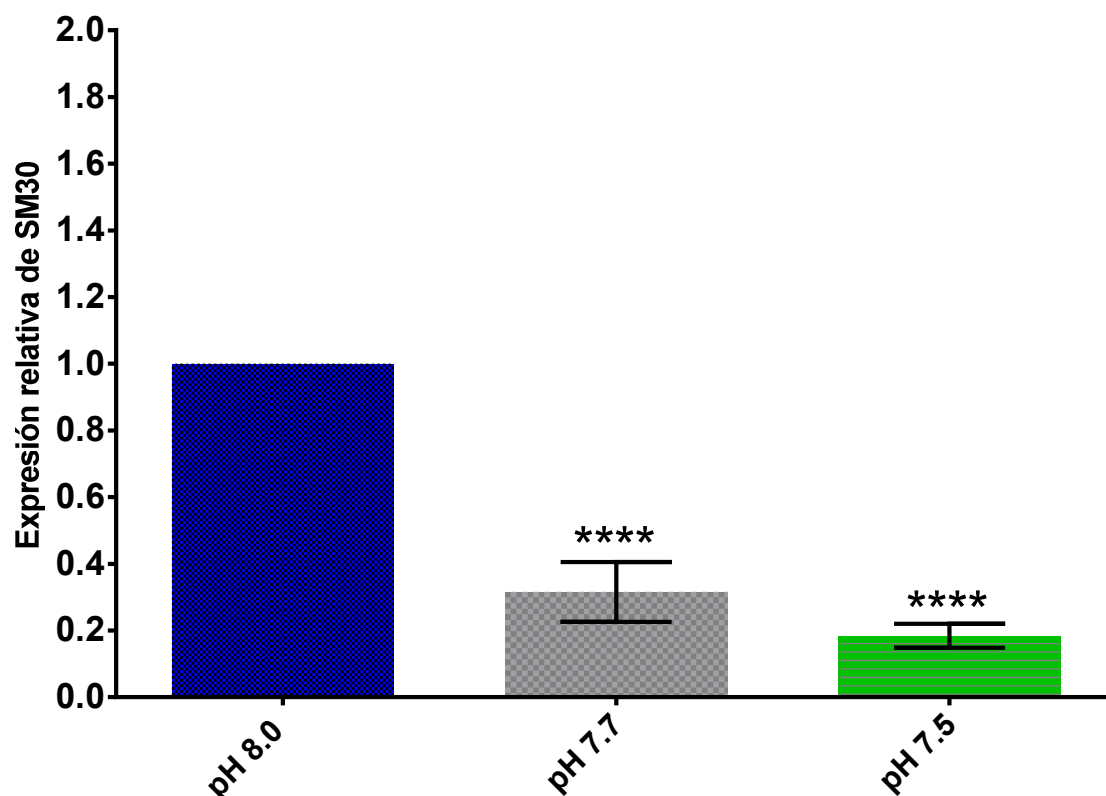


Figura 20. Expresión relativa del gen *SM30* en larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de expresión relativa \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnett ($p \leq 0.0001$). Los asteriscos indican diferencias significativas con el Control pH 8.0. **** = $p \leq 0.0001$. N = 4, n = 8,000.

En la expresión relativa del gen *Anhidrasa Carbónica* en larvas de 4 brazos se encontró que en la condición experimental a pH 7.7 hubo un incremento de 68% (1.68 ± 0.09 veces) y, de 52.30% (1.52 ± 0.09 veces) en la condición experimental a pH 7.5. En comparación con el tratamiento a pH 8.0, las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.0001$) (Figura 21).

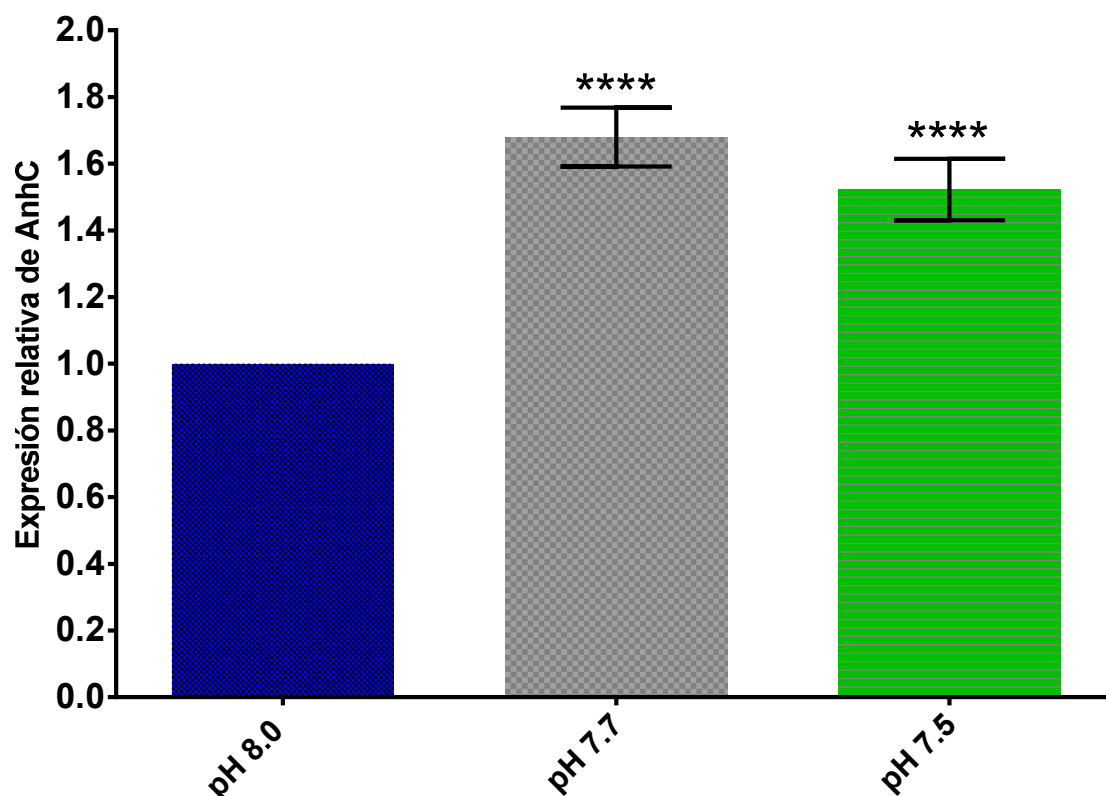


Figura 21. Expresión relativa de *Anhidrasa Carbónica* en larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de expresión relativa \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba de Kruskal-Wallis ($p \leq 0.0001$). Los asteriscos indican diferencias significativas con el Control pH 8.0. **** = $p \leq 0.0001$. N = 4, n = 8,000.

Al comparar la expresión relativa de los genes *SM29*, *SM30* y *AnhC* en gástrulas y larvas de 4 brazos cultivadas en pH 7.7 se obtiene que *SM29* no presentara modificaciones de expresión en gástrula o en larvas de 4 brazos. Sin embargo, *SM30* presentó una reducción en su expresión en gástrula en un 56.08% (0.44 ± 0.10 veces) y, de 68.38% (0.32 ± 0.09) unidades, en larvas de 4 brazos, y fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo control. En cuanto al gen de *Anhidrasa Carbónica*, en gástrulas presentó un aumento en 11.90% (1.12 ± 0.19 unidades) y, en larvas de 4 brazos hubo un aumento de

expresión en 68% (1.68 ± 0.09 veces). Las diferencias de ambas con su control fueron estadísticamente significativas (Figura 22).

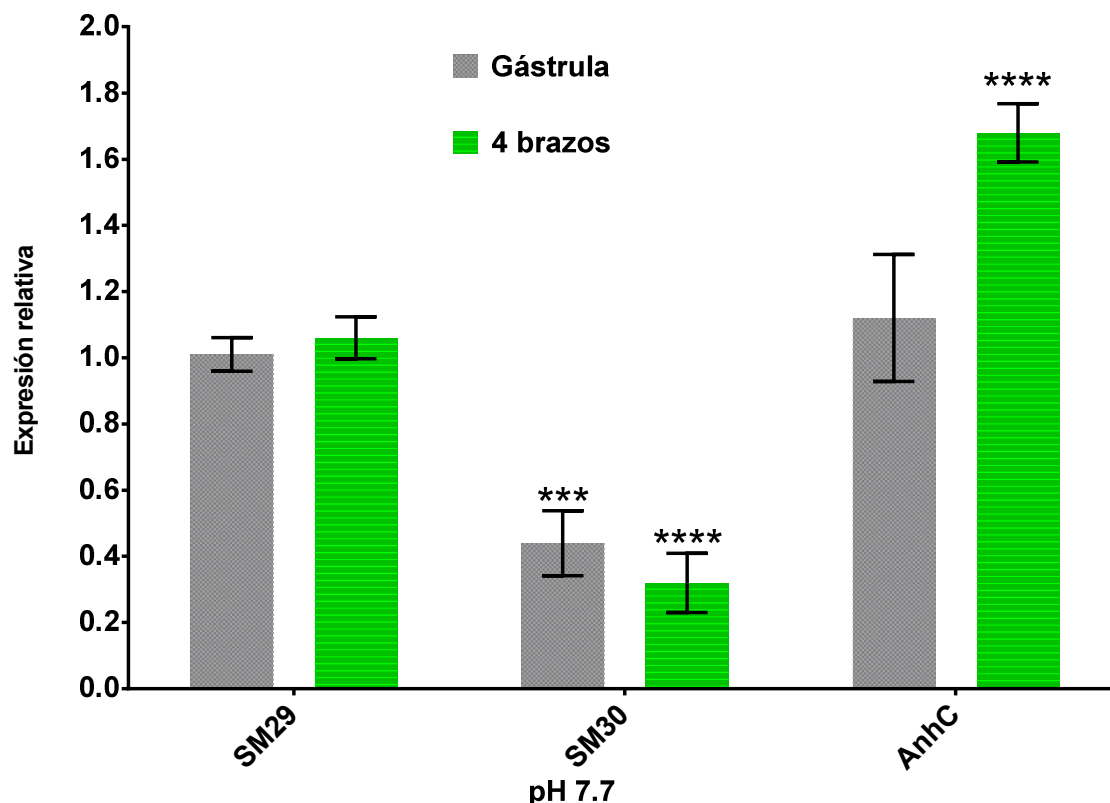


Figura 22. Expresión relativa de los genes *SM29*, *SM30* y *Anhidrasa Carbónica* en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 7.7. Las barras representan el promedio de expresión relativa \pm error estándar por tratamiento experimental. Los asteriscos indican diferencias significativas con el Control pH 8.0 de su estado larvario correspondiente. Prueba ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnett. *** = $p \leq 0.001$, **** ≤ 0.0001 con respecto a su tratamiento control. N = 4, n = 8,000.

En pH 7.5 el gen *SM29* sufrió un aumento en su expresión en gástrulas en 2.80% (1.03 ± 0.08 veces), pero en larvas de 4 brazos se observó un decremento en su expresión en 33.75% (0.66 ± 0.09 unidades). La diferencia con el control a pH 8.0 para ambos valores, fue estadísticamente significativa. En gástrula el gen *SM30* presentó un decremento de expresión relativa en un

66.33% (0.35 ± 13 veces) y, en larvas de 4 brazos un decremento en un 81.58% (0.18 ± 04 veces), con respecto a su control a pH 8.0. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas. En cuanto a *Anhidrasa Carbónica* en gástrulas, este gen presentó un aumento no significativo en un 17.30% (1.17 ± 0.12 veces). Sin embargo, para larvas de 4 brazos el gen presentó un aumento estadísticamente significativo en su expresión en un 52.30% (1.52 ± 0.09 veces) (Figura 23).

En general, las gástrulas presentaron niveles de expresión relativa de los genes *SM29*, *SM30* y *Anhidrasa Carbónica* similares en cultivos a pH 7.7 y 7.5. Para el gen *SM30* el valor fue por debajo de 0.5. Por su parte, las larvas de 4 brazos presentaron mayores diferencias en expresión relativa con respecto al control. A pH 7.7 el gen *SM29* presentó niveles de expresión similares a la unidad y, en pH 7.5 hubo una disminución de expresión en un 33.75% (0.66 ± 0.09 veces). La diferencia entre tratamientos fue estadísticamente significativa ($p = 0.05$).

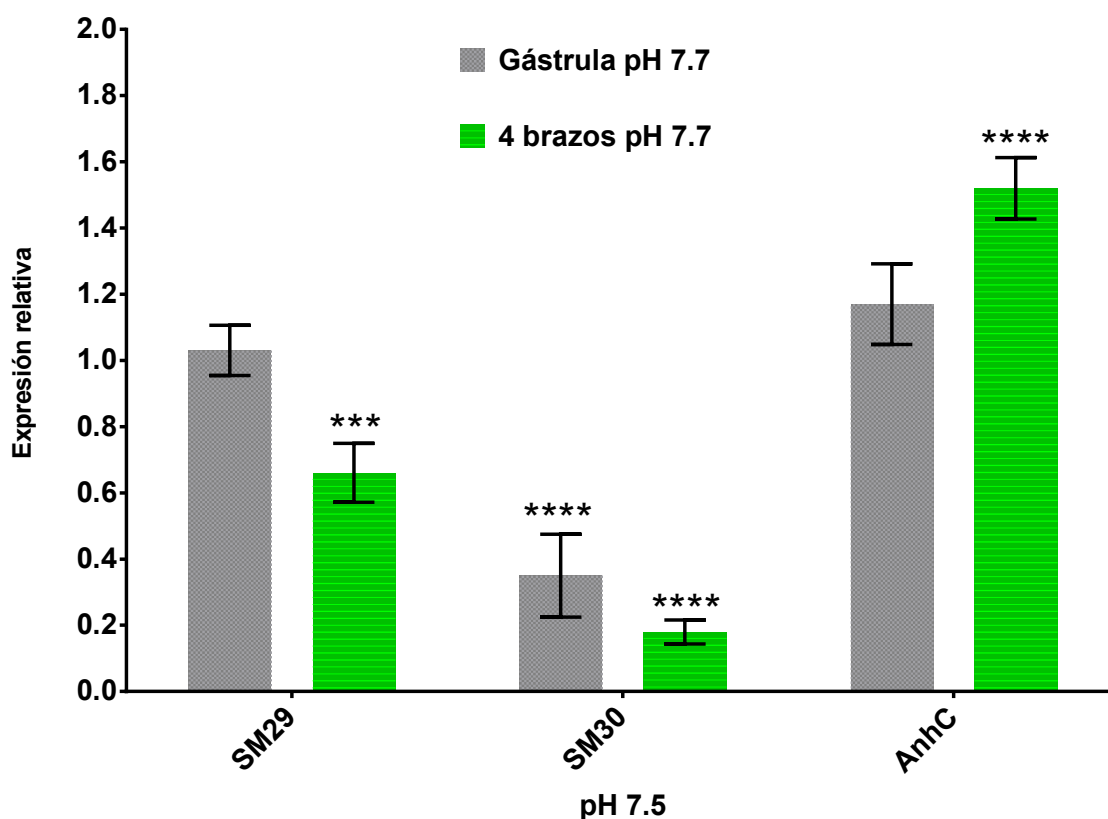


Figura 23. Expresión relativa de *SM29*, *SM30* y *Anhidrasa Carbónica* en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 7.5. Las barras representan el promedio de expresión relativa \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencias significativas con el Control pH 8.0 de su estado larvario correspondiente. *** = $p < 0.001$, **** ≤ 0.0001 con respecto a su tratamiento control. $N = 4$, $n = 8,000$.

El gen *SM30* presentó una disminución estadísticamente significativa ($p = < 0.05$) en expresión en un 68.38% (0.35 ± 0.13 veces) para pH 7.7 y en 81.60% (0.18 ± 0.04 veces) para pH 7.5. El gen *Anhidrasa Carbónica* presentó un aumento de expresión relativa en un 68.13% (1.68 ± 0.04 veces) en la condición experimental a pH 7.7 y, de 52.17% (1.52 ± 0.09 veces) para pH 7.5, y ambos fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) (Figura 24).

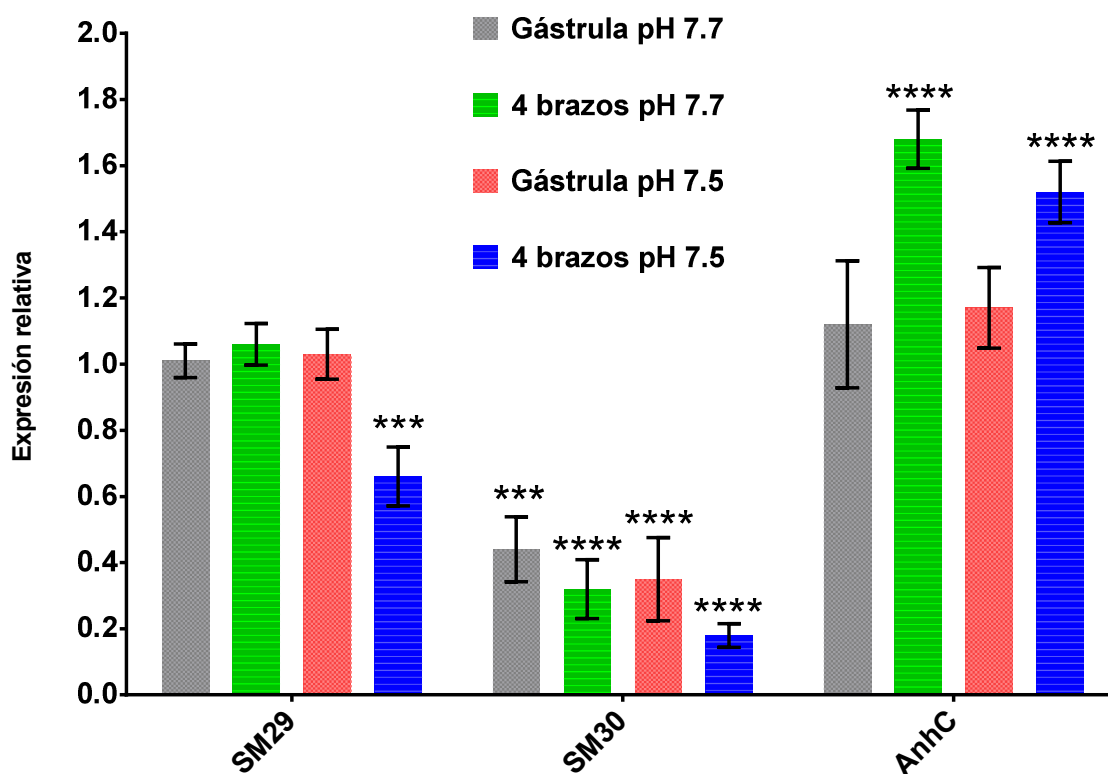


Figura 24. Expresión relativa de SM29, SM30 y Anhidrasa Carbónica en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* en condiciones de pH 7.7 y 7.5. Las barras representan el promedio de expresión relativa \pm error estándar por tratamiento experimental. Prueba ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencias significativas con el control a pH 7.7 de su estado larvario correspondiente. *** = $p \leq 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$ con respecto a su tratamiento control. N = 4, n = 8,000.

Relación entre la química del agua y los factores biológicos

Los niveles de ceniza en los organismos variaron el contenido de CID en el medio de cultivo. En gástrula se observó un decremento parcialmente lineal de cenizas, con el aumento de CID en el medio ($p = 0.79$, % de Ceniza = $-0.04 \text{ CID} + 88.99$, $R^2 = 0.96$). En larvas de 4 brazos se encontró que al aumentar la concentración de CID, hubo un aumento en el % de ceniza y luego un decremento ($p \leq 0.01$, % de Ceniza = $-0.02 \text{ CID} + 53.36$, $R^2 = 0.34$) (Figura 25).

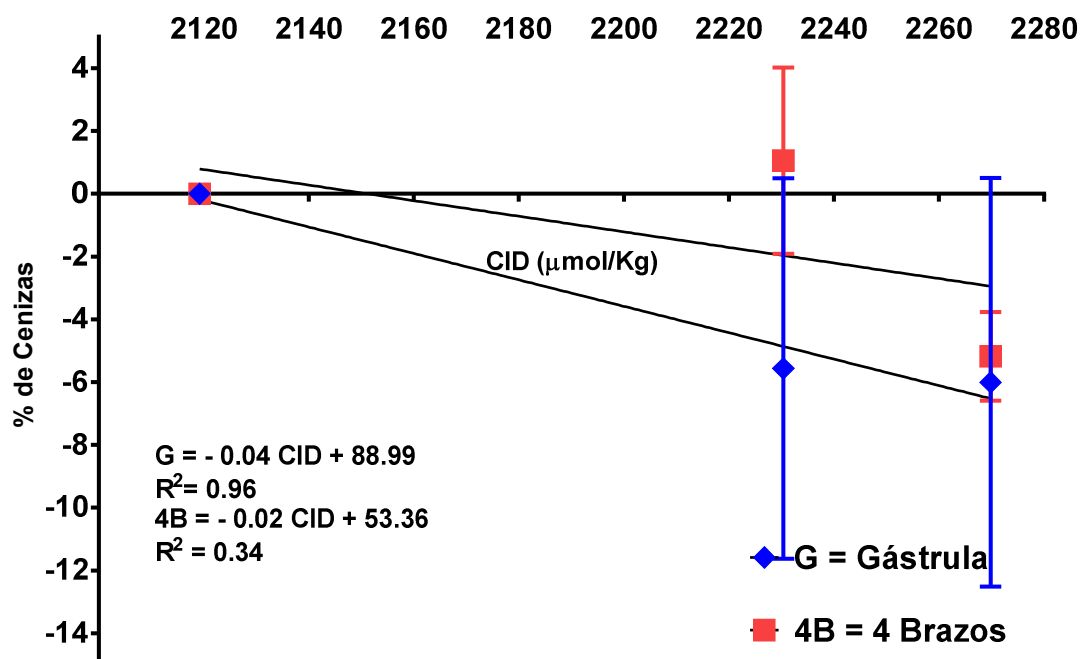


Figura 25. Relación entre Carbono Inorgánico Disuelto (DIC) y porcentaje de ceniza en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en gástrula (rombo) y larvas de 4 brazos (cuadro). Prueba de Kruskal-Wallis. Gástrula: $p = 0.79$, Ecuación de la recta = $-0.04 \text{ CID} + 88.99$, $R^2 = 0.96$; 4 brazos, $p \leq 0.01$, ecuación de la recta = $-0.02 \text{ CID} + 53.36$, $R^2 = 0.34$.

En gástrula se encontró que con el decremento en la concentración de Ω_{Ca} en el medio hubo un decremento medianamente lineal en la concentración de contenido de cenizas en los organismos ($p = 0.79$, $\% \text{ de Ceniza} = 3.69 \Omega_{Ca} - 10.76$, $R^2 = 0.98$). En larvas de 4 brazos se observó una baja correlación entre el decremento de Ω_{Ca} en el medio y la disminución de cenizas en las larvas, la cual corresponde a la diferencia encontrada con el tratamiento control, estadísticamente significativa ($p \leq 0.01$, $\% \text{ de Ceniza} = 1.95 \Omega_{Ca} - 5.03$, $R^2 = 0.28$) (Figura 26).

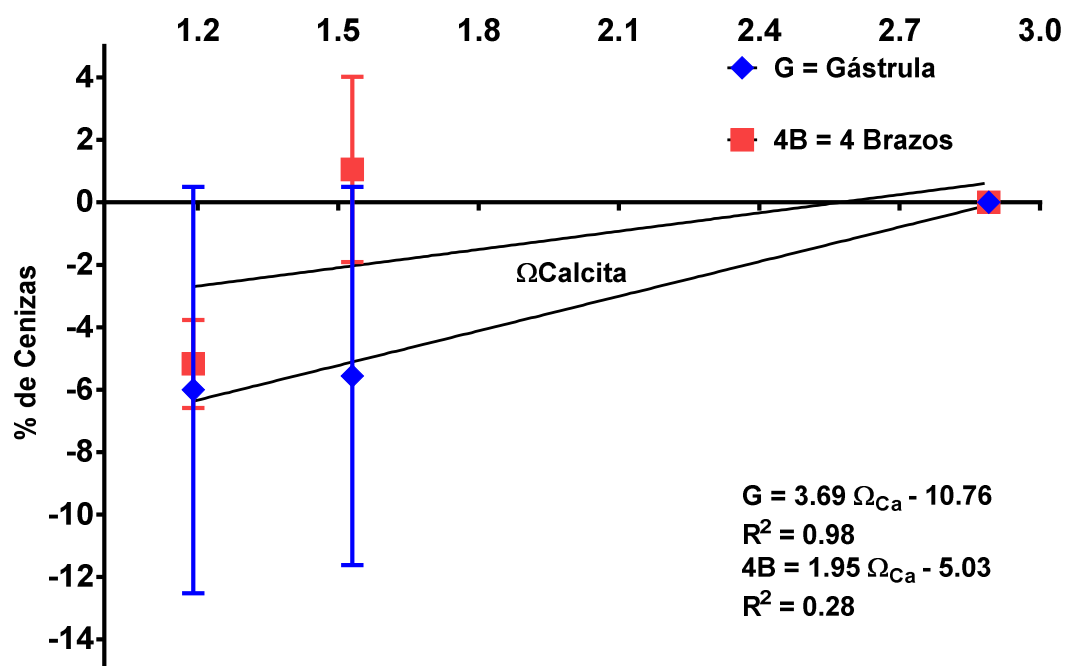


Figura 26. Relación entre el estado de saturación de la $\Omega_{Calcita}$ y porcentaje de ceniza en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Prueba de Kruskal-Wallis. Gástrula: $p = 0.79$, Ecuación de la recta = $3.69 \Omega_{Ca} - 10.76$, $R^2 = 0.98$; 4 brazos, $p \leq 0.01$, ecuación de la recta = $1.95 \Omega_{Ca} - 5.03$, $R^2 = 0.28$.

También se observó una relación lineal entre el aumento del CID en los cultivos con un decremento en el largo del tamaño corporal, tanto en gástrulas ($p \leq 0.0001$, Largo = $-0.06 \text{ CID} + 262.25$, $R^2 = 0.96$) y larvas de 4 brazos ($p \leq 0.0001$, Largo = $-0.11 \text{ CID} + 444.48$, $R^2 = 0.88$) (Figura 27).

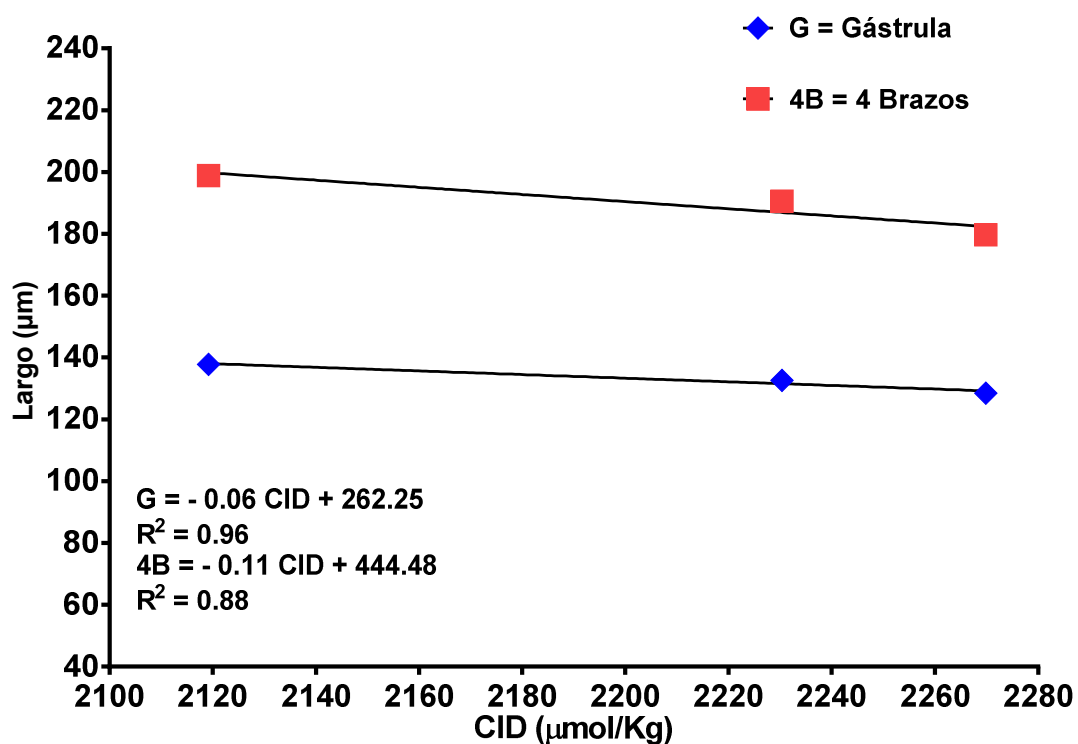


Figura 27. Relación entre CID en cultivos a diferentes pH (8.0, 7.7 y 7.5) y largo de gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en gástrula (rombo) y larvas de 4 brazos (cuadro). Prueba de Kruskal-Wallis. Gástrula: $p \leq 0.0001$, Ecuación de la recta = $-0.06 \text{ CID} + 262.25$, $R^2 = 0.96$; 4 brazos, $p \leq 0.0001$, ecuación de la recta = $-0.11 \text{ CID} + 444.48$, $R^2 = 0.88$.

Se presentó una relación lineal entre el aumento de CID en el medio con el decremento en el ancho corporal, tanto en gástrula ($p \leq 0.0001$, Ancho = $-0.03 \text{ CID} + 196.02$, $R^2 = 0.99$) como en larvas de 4 brazos ($p \leq 0.0001$, Ancho = $-0.06 \text{ CID} + 269.60$, $R^2 = 0.99$) (Figura 28).

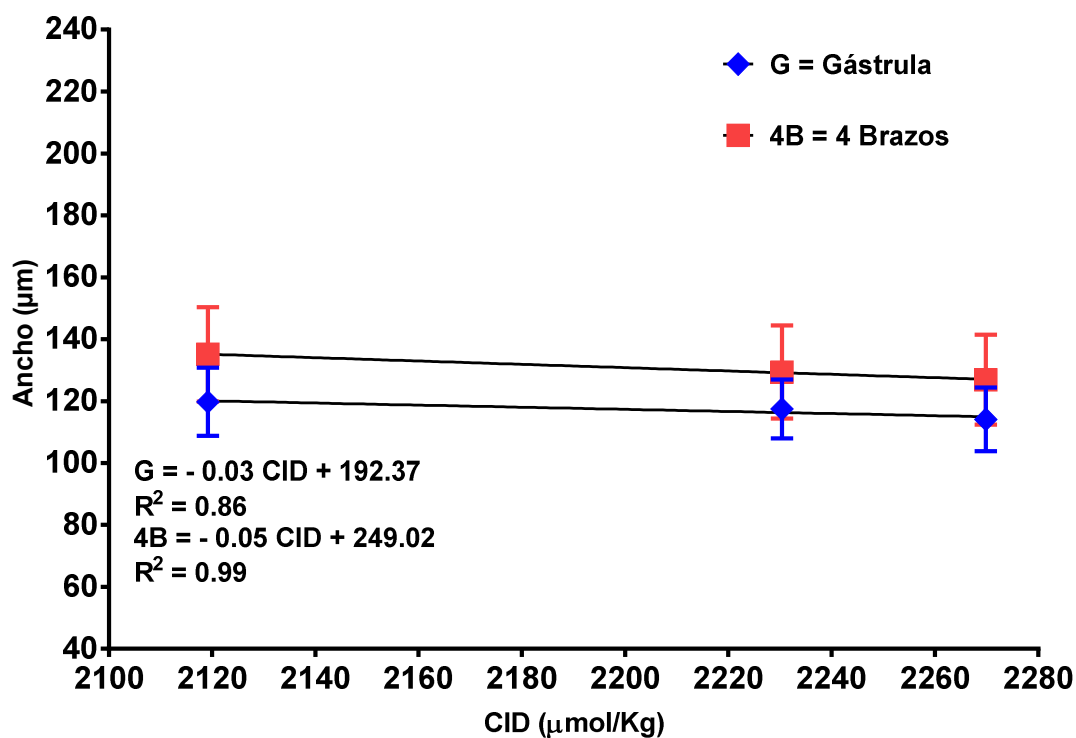


Figura 28. Relación entre CID en cultivos a diferentes pH (8.0, 7.7 y 7.5) y ancho de gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en gástrula (rombo) y larvas de 4 brazos (cuadro). Prueba de Kruskal-Wallis. Gástrula: $p \leq 0.0001$, Ecuación de la recta $- 0.03 \text{ CID} + 196.02$, $R^2 = 0.99$; 4 brazos, $p \leq 0.0001$, ecuación de la recta $= - 0.06 \text{ CID} + 269.60$, $R^2 = 0.99$.

Con el aumento en la concentración de CID en el medio se encontró una relación lineal con la reducción promedio en el largo del brazo postoral en larvas de 4 brazos ($p \leq 0.0001$, $\text{LBP} = - 0.05 \text{ CID} + 182.50$, $R^2 = 0.82$) (Figura 29).

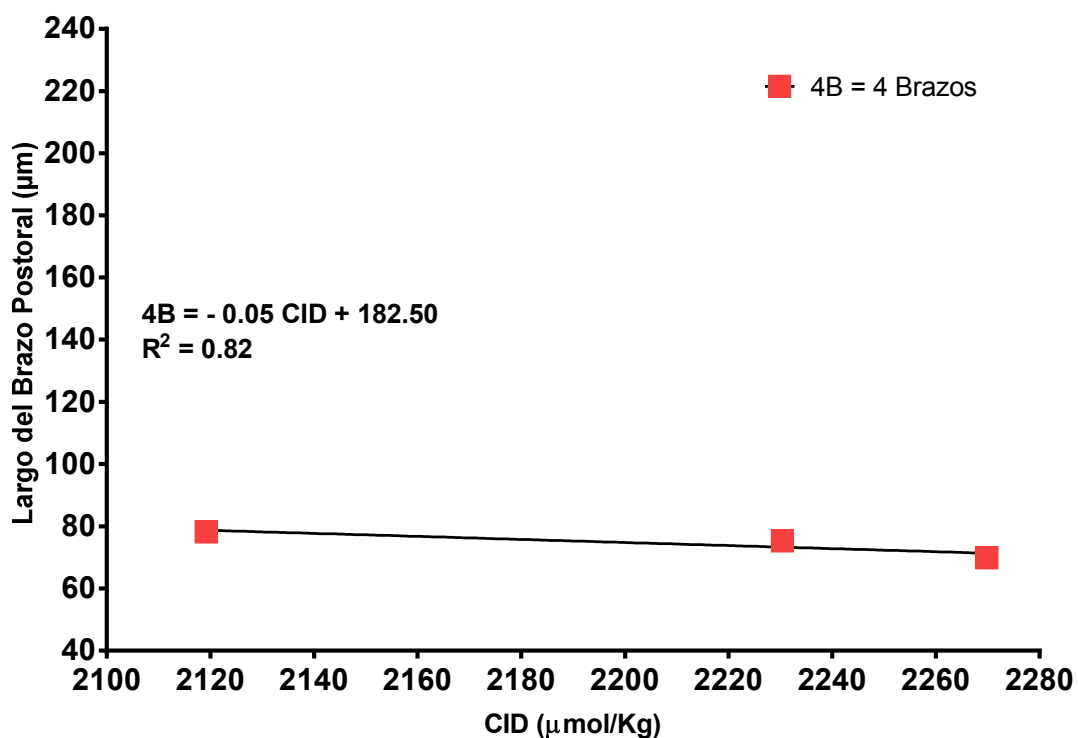


Figura 29. Relación entre CID en cultivos a diferentes pH (8.0, 7.7 y 7.5) y largo del brazo postoral de larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en larvas de 4 brazos (rombo). Prueba de Kruskal-Wallis, $p \leq 0.0001$, ecuación de la recta = $- 0.05 \text{ CID} + 182.50$, $R^2 = 0.82$.

Se registró una relación lineal entre el decremento de Ω_{Ca} en el medio con el decremento del largo corporal, tanto para gástrulas ($p \leq 0.0001$, Largo = $5.01 \Omega_{\text{Ca}} + 123.56$, $R^2 = 0.93$) como para larvas de 4 brazos ($p \leq 0.0001$, Largo = $9.77 \Omega_{\text{Ca}} + 171.39$, $R^2 = 0.84$) (Figura 30).

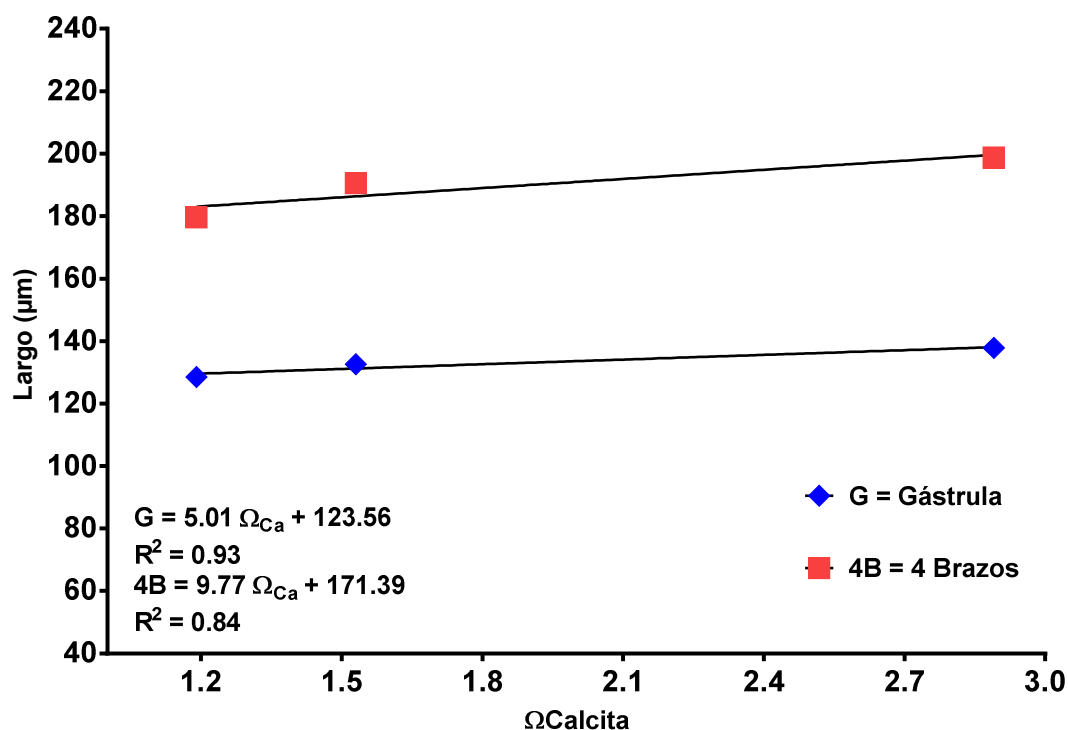


Figura 30. Relación entre el estado de saturación de la Ω_{Ca} y el largo corporal en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en gástrula (rombo) y larvas de 4 brazos (cuadro). Prueba de Kruskal-Wallis. Gástrula: $p \leq 0.0001$, Ecuación de la recta = $5.01 \Omega_{Ca} + 123.56$, $R^2 = 0.93$; 4 brazos, $p \leq 0.0001$, ecuación de la recta = $Largo = 9.77 \Omega_{Ca} + 171.39$, $R^2 = 0.84$.

Se notó una relación positiva entre el decremento de Ω_{Ca} en el medio con el decremento del ancho corporal, tanto para gástrulas ($p \leq 0.0001$, Ancho = $2.95 \Omega_{Ca} + 115.01$, $R^2 = 0.98$) como para larvas de 4 brazos ($p \leq 0.0001$, Ancho = $5.34 \Omega_{Ca} + 124.32$, $R^2 = 0.99$) (Figura 31).

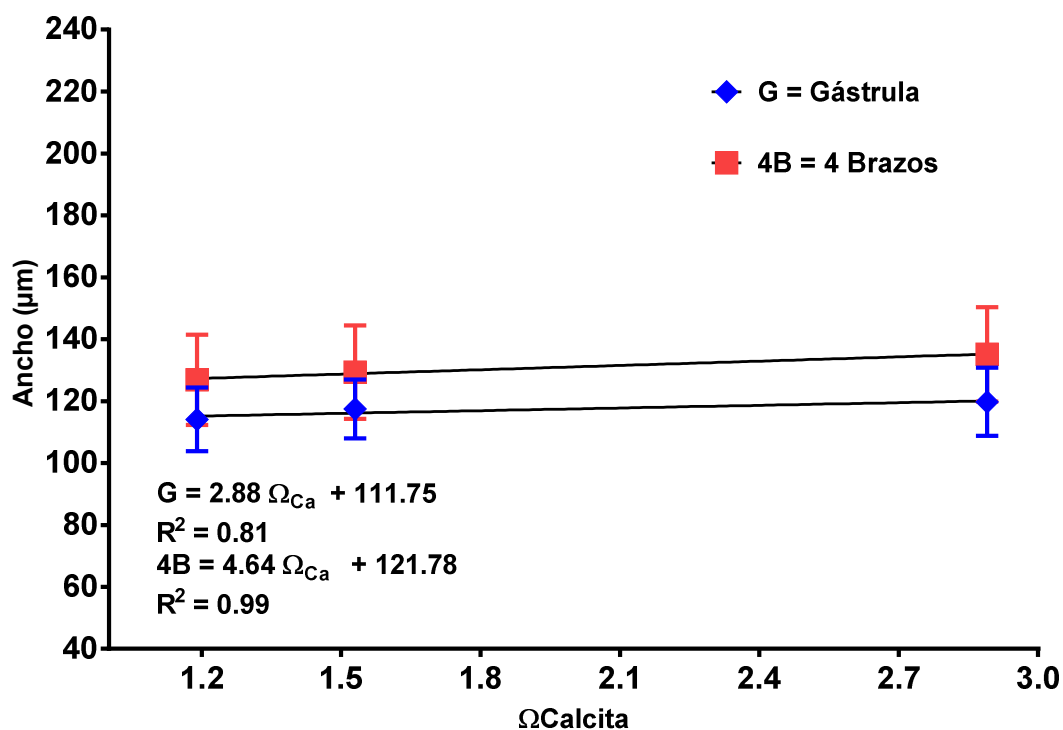


Figura 31. Relación entre el estado de saturación de la $\Omega_{Calcita}$ y el ancho corporal en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en gástrula (rombo) y larvas de 4 brazos (cuadro). Prueba de Kruskal-Wallis. Gástrula: $p \leq 0.0001$, Ecuación de la recta = $2.88 \Omega_{Ca} + 111.74$, $R^2 = 0.82$; 4 brazos, $p \leq 0.0001$, ecuación de la recta = Largo = $4.64 \Omega_{Ca} + 121.76$, $R^2 = 0.99$.

El decremento en Ω_{Ca} del medio tuvo una relación lineal positiva con el decremento en el largo del brazo postoral de larvas de 4 brazos ($p \leq 0.0001$, $LBP = 4.11 \Omega_{Ca} + 66.74$, $R^2 = 0.76$) (Figura 32).

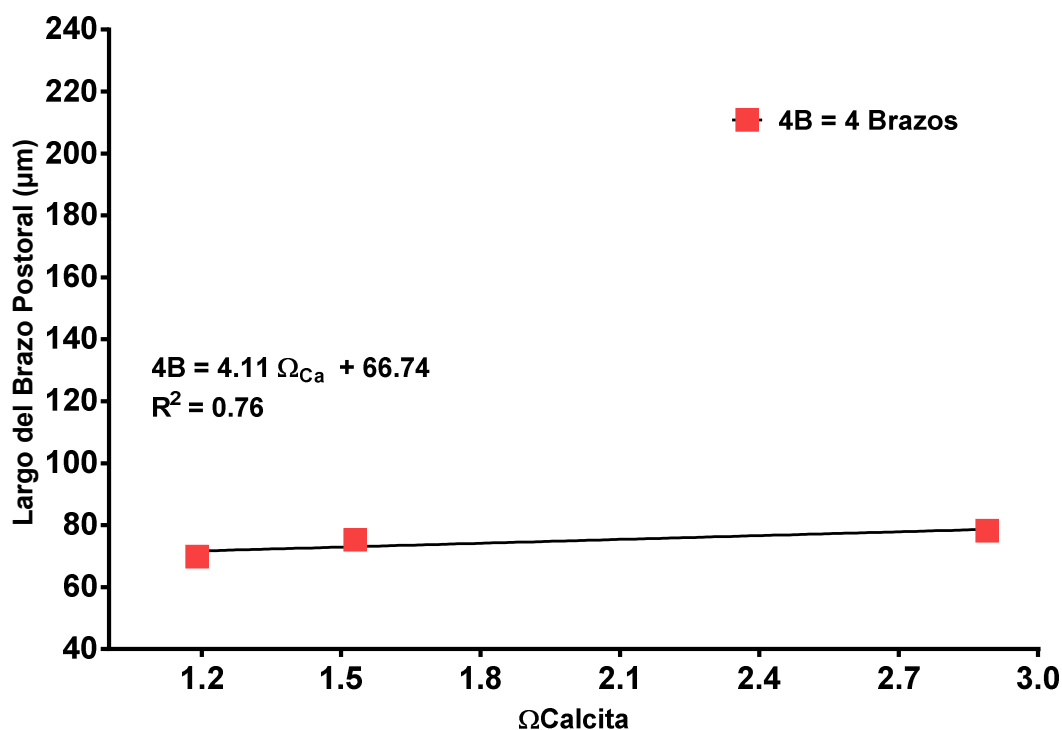


Figura 32. Relación entre Ω_{Ca} en cultivos a diferentes pH (8.0, 7.7 y 7.5) y largo del brazo postoral de larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en larvas de 4 brazos (rombo). Prueba de Kruskal-Wallis. 4 brazos, $p \leq 0.0001$, ecuación de la recta = $4.11 \Omega_{Ca} + 66.74$, $R^2 = 0.76$.

En gástrula se encontró una relación lineal entre el decremento de expresión relativa del gen *SM29* con el aumento en la concentración de CID en el medio ($p = 0.93$, $SM29 = 0.0002 \text{ CID} + 0.63$, $R^2 = 0.80$). En larvas de 4 brazos el aumento de CID tuvo relación parcialmente lineal con las variaciones de expresión relativa de *SM29* ($p \leq 0.001$, $SM29 = -0.002 \text{ CID} + 4.53$, $R^2 = 0.36$) (Figura 33).

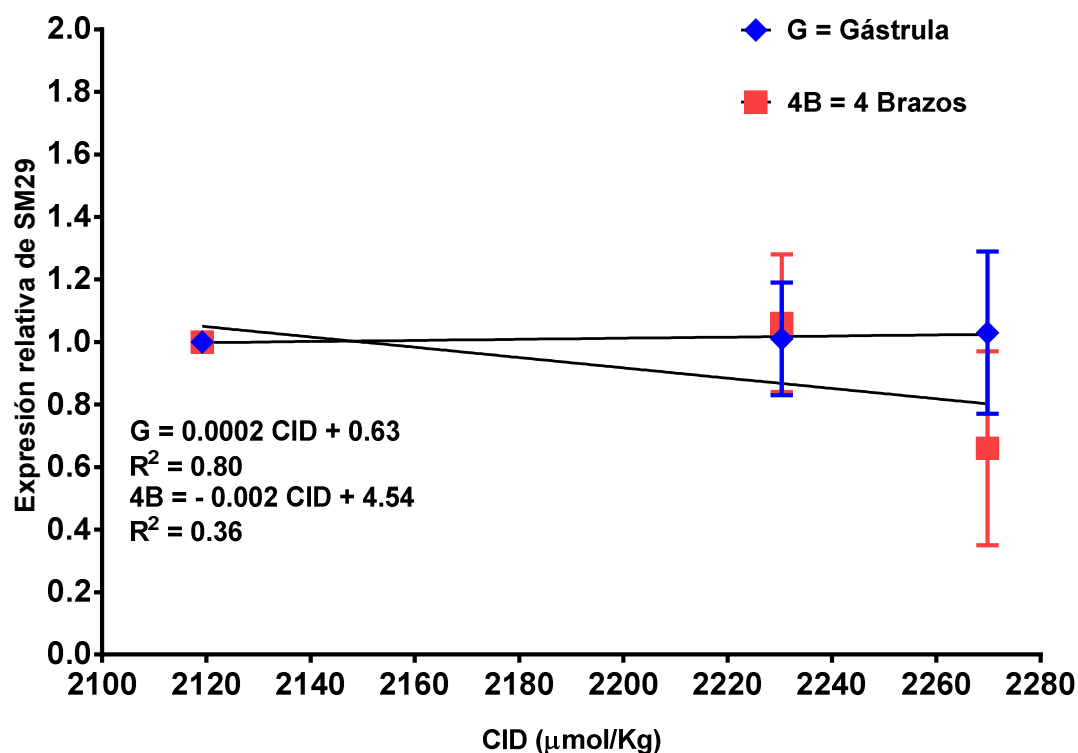


Figura 33. Relación entre el la concentración de CID en cultivo y expresión relativa del gen SM29 en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en gástrula (rombo) y larvas de 4 brazos (cuadro). Prueba ANOVA. Gástrula: $p = 0.93$, Ecuación de la recta = $\text{SM29} = 0.0002 \text{ CID} + 0.63$, $R^2 = 0.93$; 4 brazos, $p \leq 0.001$, ecuación de la recta = $-0.002 \text{ CID} + 4.53$, $R^2 = 0.36$.

El incremento del CID en los cultivos presentó una fuerte correlación con el decremento en la expresión relativa del gen *SM30*, tanto en gástrulas ($p \leq 0.0001$, $\text{SM30} = -0.005 \text{ CID} + 10.46$, $R^2 = 0.98$) como en larvas de 4 brazos ($p \leq 0.0001$, $\text{SM30} = -0.006 \text{ CID} + 12.83$, $R^2 = 0.99$) (Figura 34).

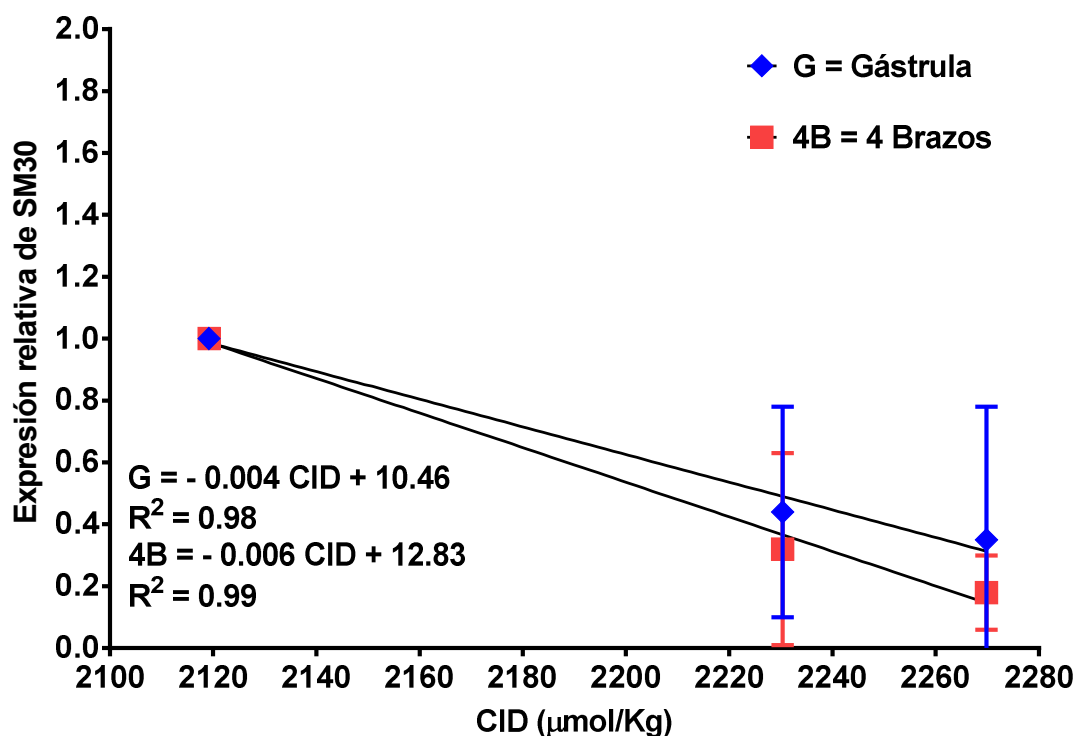


Figura 34. Relación entre la concentración de Carbono Inorgánico Disuelto en cultivo y expresión relativa del gen SM30 en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en gástrula (rombo) y larvas de 4 brazos (cuadro). Prueba ANOVA. Gástrula: $p \leq 0.0001$, Ecuación de la recta = $-0.005\text{CID} + 10.46$, $R^2 = 0.98$; 4 brazos, $p \leq 0.0001$, ecuación de la recta = $-0.006 \text{ CID} + 12.83$, $R^2 = 0.99$.

Hubo una relación lineal entre el incremento en concentración de CID en los cultivos con la expresión relativa de la *Anhidrasa Carbónica* en gástrula ($p = 0.64$, *Anhidrasa Carbónica* = $0.001 \text{ CID} - 1.37$, $R^2 = 0.99$). Sin embargo, la relación entre el incremento en la concentración de CID con el aumento en la expresión relativa de *Anhidrasa Carbónica*, fue pequeña ($p \leq 0.0001$, *AnhC* = $0.004 \text{ CID} - 7.49$, $R^2 = 0.78$) (Figura 35).

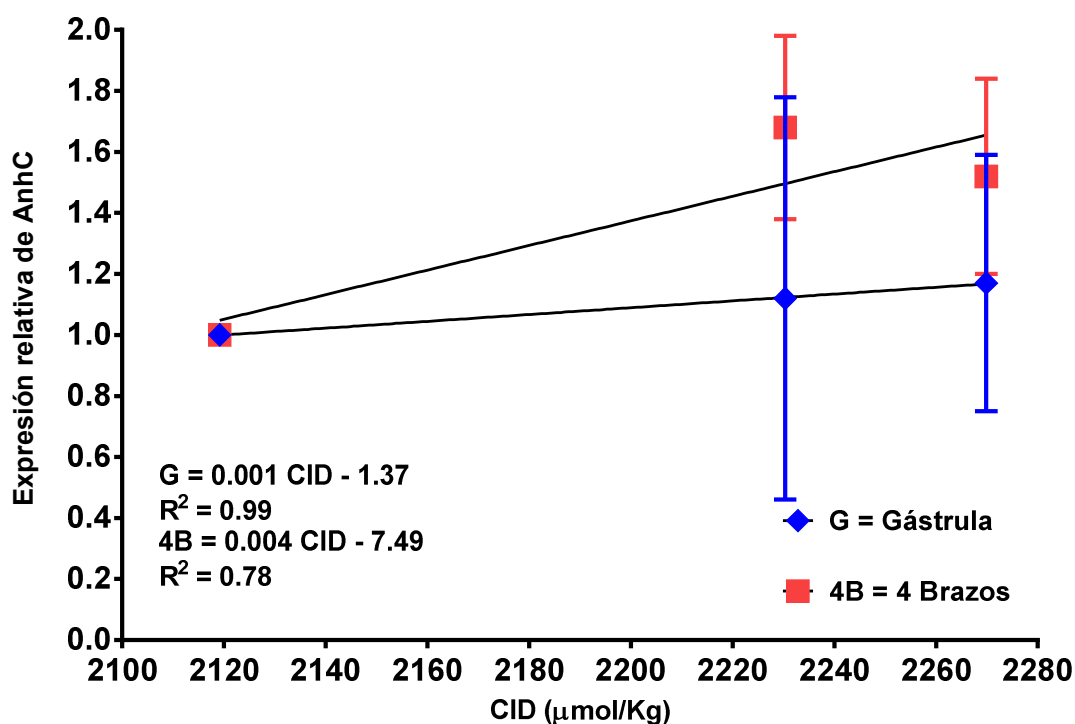


Figura 35. Relación entre la concentración de Carbono Inorgánico Disuelto en cultivo y expresión relativa del gen *Anhidrasa Carbónica (AnhC)* en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en gástrula (rombo) y larvas de 4 brazos (cuadro). Prueba ANOVA. Gástrula: $p = 0.64$, Ecuación de la recta = $0.001 \text{ CID} - 1.40$, $R^2 = 0.99$; 4 brazos, $p \leq 0.0001$, ecuación de la recta = $0.004 \text{ CID} - 7.53$, $R^2 = 0.78$.

La reducción de la Ω_{Ca} en el medio tuvo una relación positiva con un pequeño incremento en la expresión relativa de *SM29* en gástrulas ($p = 0.93$, $SM29 = -0.02 \Omega_{Ca} + 1.04$, $R^2 = 0.90$). Sin embargo, larvas de 4 brazos presentaron una relación lineal de decremento en expresión del gen *SM29* de poca confianza ($p \leq 0.001$, $SM29 = 0.13 \Omega_{Ca} + 0.66$, $R^2 = 0.30$) (Figura 36).

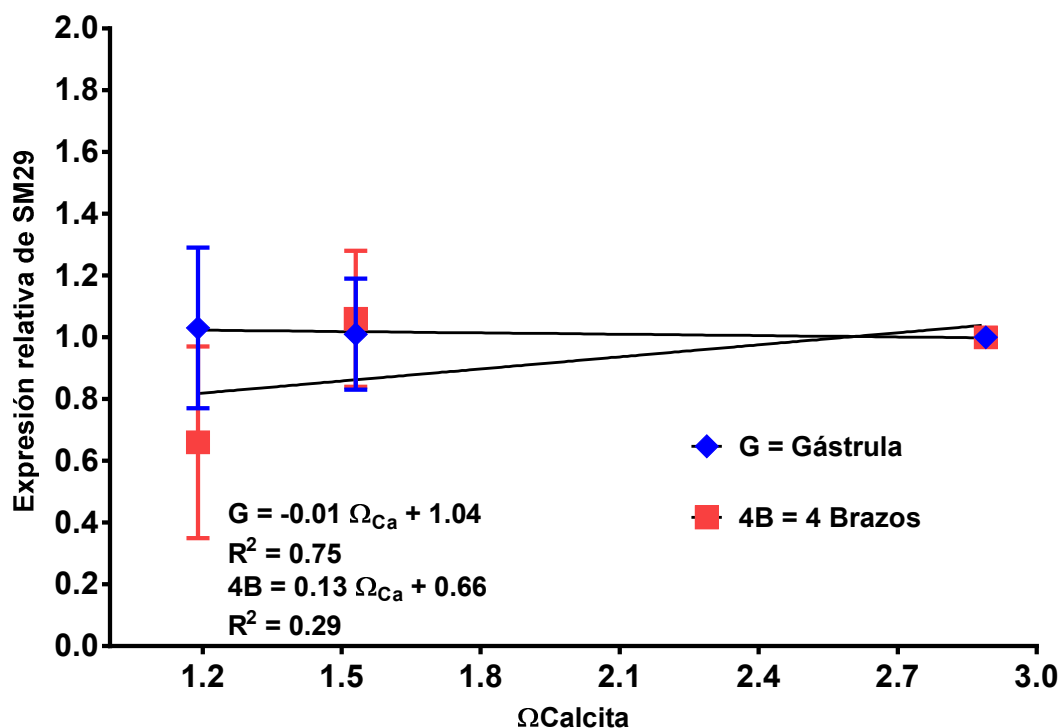


Figura 36. Relación entre el estado de saturación de la $\Omega_{Calcita}$ y expresión relativa del gen *SM29* en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en gástrula (rombo) y larvas de 4 brazos (cuadro). Prueba ANOVA. Gástrula: $p = 0.93$, Ecuación de la recta = $-0.01 \Omega_{Ca} + 1.04$, $R^2 = 0.75$; 4 brazos, $p \leq 0.001$, ecuación de la recta = $0.13 \Omega_{Ca} + 0.66$, $R^2 = 0.29$.

El decremento en el estado de saturación de la Ω_{Ca} en los cultivos tuvo una relación lineal con el decremento en la expresión relativa del gen *SM30*, tanto para gástrulas ($p \leq 0.0001$, $SM30 = 0.39 \Omega_{Ca} - 0.13$, $R^2 = 0.99$) como para larvas de 4 brazos ($p \leq 0.0001$, $SM30 = 0.49 \Omega_{Ca} - 0.41$, $R^2 = 0.99$) (Figura 37).

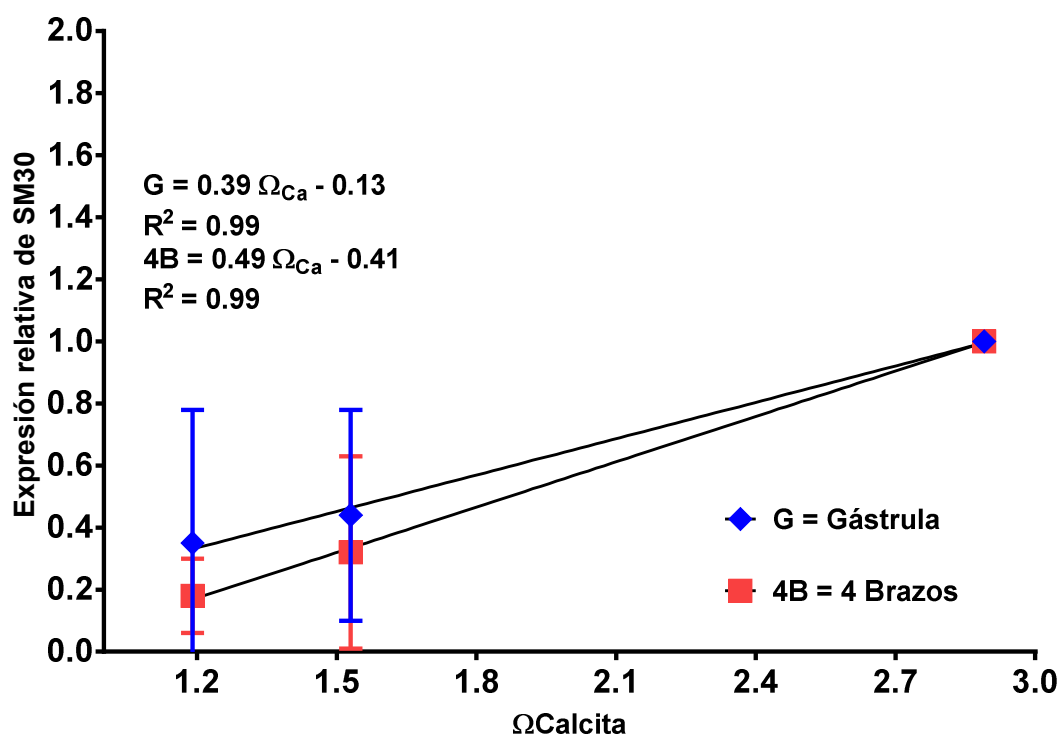


Figura 37. Relación entre el estado de saturación de la $\Omega_{Calcita}$ y expresión relativa del gen *SM30* en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en gástrula (rombo) y larvas de 4 brazos (cuadro). Prueba ANOVA. Gástrula: $p \leq 0.0001$, Ecuación de la recta = $0.39 \Omega_{Ca} - 0.13$, $R^2 = 0.99$; 4 brazos, $p \leq 0.0001$, ecuación de la recta = $0.49 \Omega_{Ca} - 0.41$, $R^2 = 0.99$

Se encontró una relación lineal entre el aumento en la expresión relativa de *Anhidrasa Carbónica* y la Ω_{Ca} en el medio, tanto para gástrulas ($p = 0.28$, *Anhidrasa Carbónica* = $- 0.09 \Omega_{Ca} + 1.28$, $R^2 = 0.99$) como para larvas de 4 brazos ($p \leq 0.05$, *Anhidrasa Carbónica* = $- 0.36 \Omega_{Ca} + 2.08$, $R^2 = 0.84$) (Figura 38).

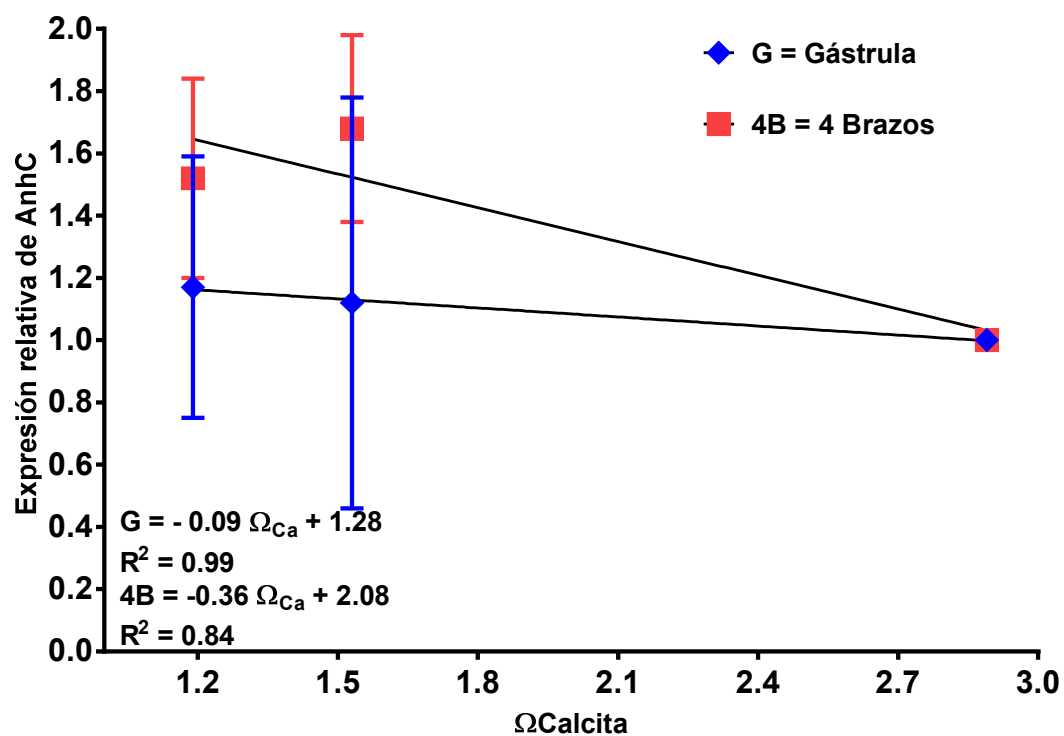


Figura 38. Relación entre el estado de saturación de la $\Omega_{Calcita}$ y expresión relativa del gen *Anhidrasa Carbónica (AnhC)* en gástrulas y larvas de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de las mediciones en gástrula (rombo) y larvas de 4 brazos (cuadro). Prueba ANOVA. Gástrula: $p = 0.64$, Ecuación de la recta = $-0.09 \Omega_{Ca} + 1.28$, $R^2 = 0.99$; 4 brazos, $p \leq 0.0001$, ecuación de la recta = $-0.36 \Omega_{Ca} + 2.08$, $R^2 = 0.84$.

Discusión

En el transcurso de cada experimento, se logró mantener bajo control el de pH de cada tratamiento experimental, manteniendo valores con una variación pequeña entre cada experimento. En el presente trabajo, los cultivos a pH 7.5, tuvieron valores de $\Omega_{\text{Aragonita}}$ de 0.78, lo cual indica que para esta condición de pH, hay una menor concentración de iones carbonato y un menor estado de saturación de la aragonita (Raven et al., 2005; Feely et al., 2008). La forma de carbonato de calcio que utilizan los erizos, incluso en su etapa larval desde gástrula, es la calcita (Wilt, 1999), por lo cual es este valor es el que tiene mayor relevancia para nuestro trabajo.

Durante el transcurso del experimento se observaron variaciones en la concentración de DIC y de Ω_{Ca} las cuales podrían explicarse debido a las condiciones químicas iniciales del agua utilizada para los cambios de agua. La reducción del Ω_{Ca} sugiere un decremento en la concentración de carbonato en el medio, lo cual podría comprometer la calcificación de los organismos (Raven et al., 2005).

La reducción de pH implementada en este estudio no tuvo un impacto significativo en la sobrevivencia de gástrulas y de larvas equinopluteus de 4 brazos de *S. purpuratus*. Lo anterior coincide con otros trabajos realizados en larvas de *S. purpuratus*, donde se ha observado tras 20 días postfertilización, un aumento de 11% en la sobrevivencia larval, pero sin ser significativo (Stump et al., 2011a). En otros equinodermos, como en el trabajo de Clark y

colaboradores (2009), se encontró que a pesar de haber una disminución en la densidad larval, no hubo un efecto estadísticamente significativo en la sobrevivencia de larvas de equinopluteus 4 especies de erizo (*Tripneustes gratilla*, *Pseudochinus huttoni*, *Evechinus chlorolicus* y *Sterchinus neumayeri*) expuestas a condiciones de pH 7.5 o mayores. Estos resultados fueron similares a lo observado en gástrulas y larvas de *Paracentrotus lividus* (Martin *et al.*, 2011) y *Arachinoides placenta* (Gonzalez-Bernat *et al.*, 2013), o en larvas de coral (*Acropora digitifera*) (Nakamura *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestro estudio solo presenta resultados de cultivos hasta 4 días postfertilización y no sabemos si, debido al estrés químico a causa de la disminución de pH, se presenten problemas de sobrevivencia con la edad.

Además se observó que el pH reducido modificó la morfometría de los organismos, lo cual se pudo observar como un decremento en sus proporciones corporales. En gástrulas se encontró que tanto en pH 7.7 como en pH 7.5, hubo una reducción estadísticamente significativa en largo y ancho corporal, en comparación con el tratamiento control. Lo anterior también se observó en larvas de 4 brazos, las cuales además, presentaron una reducción en el largo del brazo postoral en condiciones de pH 7.7 y 7.5, siendo las diferencias encontradas estadísticamente significativas. Los resultados en nuestro trabajo concordaron con lo encontrado en otros trabajos en larvas de *S. purpuratus* en condiciones de pH reducido hasta 7.5, donde se observa un decremento general del tamaño corporal (Stumpp *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Matson *et al.*,

2012; Kelly *et al.*, 2013; Padilla-Gamiño *et al.*, 2013; Pespeni *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2015). Esto también se observó en larvas de otros equinodermos, tales como *Tripneustes gratilla* (Brennand *et al.*, 2010), *Pseudochinus huttoni*, *Evechinus chloroticus*, *Sterechinus neumayeri*; *Tripneustes gratilla* (Clark *et al.*, 2009) y *Dendraster excentricus* (Chan *et al.*, 2011). Lo anterior sugiere que la reducción de pH en el océano podría ocasionar la reducción corporal larval en equinodermos de diferentes especies.

La calcificación en las larvas de erizo inicia desde la gástrula mediante la deposición de carbonato de calcio en las espículas (Wilt, 1999), por lo que variaciones en la tasa de calcificación pueden observarse desde este estadio. Al analizar el contenido de cenizas en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos (en pH 7.5), se observó una disminución en el contenido de material calcificado. La reducción en el material calcificado encontrado durante este estudio concuerda con lo reportado para otras especies de larvas de equinodermos cultivadas en condiciones de pH reducido, tales como *Tripneustes gratilla* (Clark *et al.*, 2009), *Evechinus chloroticus* y *Pseudochinus huttoni* (Clark *et al.*, 2009); *Porites panamensis* (Anlauf *et al.*, 2011) o *Dendraster excentricus* (Chan *et al.*, 2011). En trabajos realizados en larvas de *Arachnoides placenta* (Gonzalez-Bernat *et al.*, 2013), o *Paracentrotus lividus* (Martin *et al.*, 2011), no se encontraron diferencias significativas en la calcificación, lo cual concuerda con nuestros resultados en gástrulas y en larvas de 4 brazos en pH 7.7. Durante este trabajo encontramos que las larvas de 4

brazos cultivadas a pH 7.7, presentaron un aumento en el porcentaje de material calcificado. Es posible que a este pH la calcificación en larvas de 4 brazos se vea estimulada para mantener una tasa de calcificación similar a la de larvas en pH 8.0. Martin y colaboradores (2011) sugieren que la tasa de calcificación en los organismos es dependiente del tamaño del organismo y del estadio de desarrollo, los cuales se pueden ver modificados por la reducción de pH oceánico (Martin et al., 2011; Stumpp et al., 2011b). El decremento en calcificación en gástrula podría explicarse entonces, como un efecto de erosión en el material calcificado, a causa de la reducción de pH en los cultivo. Entonces, si es que hay un efecto acumulativo, la descalcificación sería más pronunciada en larvas de mayor edad con el desarrollo larval. Encontramos que la Ω_{Ca} para los diferentes tratamientos estaba por arriba de la unidad y por ende, aún permitía la formación de este cristal (Raven et al., 2005; Feely et al., 2008).

En el análisis molecular observamos que el gen *SM29* presentó un aumento en su expresión en gástrulas en ambas condiciones experimentales, pero no fue estadísticamente significativo. El cambio en la expresión del gen *SM29* en gástrulas de *S. purpuratus* es algo que previamente no había sido reportado. Sin embargo, se sabe que en condiciones de pH reducido la larva de 4 brazos del erizo *Lythechinus pictus* presenta una disminución en la expresión de este gen (O'Donnell et al., 2010), lo cual concuerda parcialmente con nuestro trabajo. Junto con esto, en gástrula encontramos una disminución en la

expresión relativa de *SM30* en menos del 50% en pH 7.7 y, en larvas equinopluteus de 4 brazos, una disminución en expresión en un 81% en comparación con el control pH 8.0. En larvas de equinopluteus de 4 brazos cultivadas en condiciones de pH 7.7 y 7.5, este gen presentó una disminución estadísticamente significativa en su expresión. Es probable que el decremento de pH en el medio modifique la ruta metabólica que controla la expresión de este gen. Nuestros resultados en la expresión de *SM30* no son coincidentes con previos estudios donde se ha reportado un aumento en su expresión en gástrulas de *S. purpuratus* (Hammond y Hofmann, 2012). A pesar de eso, en trabajos realizados con larvas equinopluteus de 4 brazos de los erizos *S. purpuratus* y *Lytechinus pictus* (Stumpp et al., 2011a; O'Donnell et al., 2010), se reporta que este gen sufre una disminución en su expresión en condiciones de pH reducido. En gástrulas la expresión de *Anhidrasa Carbónica*, en ambas condiciones de pH reducido, no fue estadísticamente significativa. Pero en larvas equinopluteus de 4 brazos, en ambas condiciones de pH disminuido, hubo un aumento significativo en su expresión. De acuerdo al trabajo de Stumpp y colaboradores (2011a) la *Anhidrasa Carbónica* no mostró un aumento significativo en su expresión en gástrulas. En larvas equinopluteus de 4 brazos dicho gen presentó un aumento significativo en su expresión, lo que concuerda con el trabajo de Todgham y Hofmann (2009) en larvas de 4 brazos del erizo *S. purpuratus*. Sin embargo, esto contrasta con lo encontrado por Stumpp y colaboradores (2011a) en larvas de *S. purpuratus*, donde el pH reducido no modificó la expresión del gen. El incremento en la expresión del gen *Anhidrasa*

Carbónica en ambas condiciones experimentales sugiere que el organismo trata de compensar la pérdida de material calcificado a causa de la reducción de pH, al aumentar la concentración de carbonato disponible en la célula. Al haber un aumento en la expresión del gen *Anhidrasa Carbónica* se esperaría una mayor actividad de esta enzima y por lo tanto, un mayor contenido de material calcificado por el aumento en la concentración de iones de carbonato disponibles en la célula. Se especula que hubo una mayor precipitación de Carbonato de Calcio en la espícula gracias al aumento de la proteína SM29 en gástrulas a pH 7.7 y 7.5 y, larvas equinopluteus de 4 brazos a pH 7.7. Cabe mencionar que los niveles de calcificación encontrados en este trabajo presentaron una reducción en ambas condiciones experimentales de pH bajo. En pH 7.7 las larvas de 4 brazos presentaron un aumento en el material calcificado, el cual podría explicarse debido al incremento de *SM29* y *AnhC*. A pH 7.7 se registró una Ω_{Ca} por sobre 1 y por lo tanto, la precipitación de carbonato de calcio era termodinámicamente favorable (Feely et al., 2008; Raven et al., 2005). Sin embargo, en pH 7.5 las larvas equinopluteus de 4 brazos se encontraron en condiciones de Ω_{Ca} cercanos a 1, lo cual junto con el decremento en la expresión de *SM29* y *SM30* podría explicar el decremento en material calcificado (Feely et al., 2008; Raven et al., 2005). Esto se observó particularmente en larvas de 4 brazos, las cuales presentaron una disminución en la expresión relativa de dicho gen, con valores de 0.18 en la condición experimental a pH 7.5. El gen *SM29* mostró una disminución en pH 7.5 hasta valores de 0.66, lo cual tendría como consecuencia la disminución en la

cantidad de estas proteínas en las espículas. Lo anterior sugiere que, a pesar de que podría haber aumento en la concentración de iones carbonato, debido a la actividad de una concentración mayor de la enzima Anhidrasa Carbónica, al haber una disminución en la expresión de *SM29* y *SM30* disminuiría la tasa de precipitación de Carbonato de Calcio en las espículas. En consecuencia, esto no permitiría compensar la erosión de las espículas a causa de la reducción de pH. Evidencia de esto sería la disminución en el contenido de material calcificado observado en este trabajo mediante análisis de cenizas. Todo esto en conjunto tendría como consecuencia la disminución del tamaño corporal, debido a una reducción del material en el endoesqueleto.

La reducción en la expresión de genes codificantes para proteínas que participan en el proceso de calcificación podría ser explicado cómo que, en condiciones de estrés por la reducción del pH, el organismo canaliza la energía disponible (que normalmente sería utilizada para realizar procesos tales como crecimiento o calcificación), a procesos de balance iónico (Todgham y Hofmann, 2009; O'Donnell et al., 2010; Stumpp et al., 2011b). Lo anterior concuerda con lo observado por Pan y colaboradores (2015), quienes encontraron un aumento en la expresión de la ATPasa Na^+/K^+ , enzima que participa en el proceso del balance iónico celular. Los trabajos anteriores sugieren que la energía libre, parte de la cual sería utilizada para el desarrollo, es ahora utilizada para suplir la demanda de producción de proteínas, para la calcificación, el balance iónico y, para el pH celular, a pesar de haber un

aumento en la tasa metabólica en un 100% (Stumpp et al., 2011b). El hecho de haber observado un decremento en la morfometría larval, pero con una tasa de calcificación estable (aunque menor en comparación con el pH 8.0) en gástrulas y larvas de 4 brazos a pH 7.7, puede ser evidencia de esto. Es posible que a pesar de que se trata de mantener una tasa de calcificación constante, a costa del desarrollo larval, el efecto de descalcificación resulta acumulativo y más pronunciado con la edad del organismo.

La reducción de pH en el agua de mar se encuentra relacionada con un incremento en las especies de carbono y la concentración de CID. Con este incremento de las especies de carbono también hay una reducción en la concentración del ion carbonato y con ello, una disminución del estado de saturación de la calcita. Esto sugiere que tanto gástrulas como larvas equinopluteus de 4 brazos experimentan un decremento en sus parámetros corporales, al igual que una disminución en el material calcificado, con el aumento en la concentración de CID en el medio. De forma similar se observó una correlación entre un menor Ω_{Ca} y la reducción de parámetros corporales en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos. Cabe mencionar que para que la calcificación sea favorecida, es necesario que el carbonato se encuentre saturado en el medio marino (Doney et al., 2009; Feely et al., 2008; Raven et al., 2005) y nuestros resultados podrían interpretarse como que el aumento en CID, el cual está relacionado con la disminución de Ω_{Ca} , conlleva a una disminución en la calcificación. Sin embargo, observamos que para pH 7.7 las

larvas de 4 brazos presentaron un aumento en el material calcificado con el decremento de Ω_{Ca} . Relacionado al decremento de Ω_{Ca} también se observó un incremento en la expresión relativa de los genes *SM29* y *Anhidrasa Carbónica*. Puede ser que el decremento de pH en el medio modifique la respuesta de receptores necesarios para la expresión de los genes. Es posible que esto sea una respuesta a una menor concentración de iones carbonato y el organismo trata de compensar la descalcificación, con el aumento de proteínas que participan en la calcificación de las espículas. De la misma manera, una correlación entre la concentración de CID y Ω_{Ca} con la expresión de los genes *SM29*, *SM30* y *Anhidrasa Carbónica*, sugiere que condiciones de pH 7.5 pueden modificar la expresión relativa del gen *SM29* en larvas equinopluteus de 4 brazos, y reducir su expresión al igual que la del gen *SM30*, tanto en gástrulas como en larvas equinopluteus de 4 brazos. Esto sugiere que modificaciones en el pH del medio interfieren con los procesos involucrados con la expresión de estos genes. El aumento en la expresión del gen *Anhidrasa Carbónica* podría explicarse como aumento en la concentración de la enzima homónima, con la finalidad de mantener la homeostasis celular, ya que esta enzima también participa en el proceso de balance de pH celular (Gilmour, 2010; Stumpp et al., 2011a). Sin embargo, Pan y colaboradores (2015) demostraron que la acidificación oceánica simulada causa un aumento en la expresión de proteínas en larvas de *S. purpuratus* pero no hay un aumento en el contenido de proteínas, lo que sugiere que también hay un aumento en la tasa de

degradación proteica. Lo anterior relacionado con nuestros resultados, podría significar que el aumento en la expresión de *Anhidrasa Carbónica* se da con la finalidad de compensar la descomposición de esta enzima. Por otro lado, éste resultado también podría significar que, junto con la disminución en la expresión de *SM29* y *SM30* en condiciones de pH 7.5, hay una degradación de estas proteínas, la cual no es compensada.

La disminución de pH oceánico, que trae como consecuencia aguas corrosivas con una baja Ω_{Ca} , puede llegar a disminuir la tasa de calcificación en las gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de *S. purpuratus*, a partir de modificaciones en los mecanismos moleculares y fisicoquímicos que controlan el proceso de deposición de cristales de $CaCO_3$. Estas modificaciones pueden traer consecuencias en el desarrollo corporal larval debido a que bajo condiciones de pH futuras, podrían presentar un endoesqueleto más frágil en comparación con larvas en condiciones actuales. Las larvas equinopluteus poseen bandas ciliadas a lo largo de sus brazos, los cuales les sirven para acarrear alimento desde la columna de agua hasta la boca (Workman, 1999). Por lo que, un decremento en la longitud de los brazos, o bien en su densidad, por descalcificación del endoesqueleto, podría generar problemas para obtener alimento, lo que de esta forma reduciría la energía disponible para el organismo, lo que pondría en riesgo su desarrollo.

Stumpp y colaboradores (2011a) discuten que la reducción de tamaño larval a causa del pH reducido puede ser explicada como un desfase de desarrollo, al

presentar crecimiento más lento. Esto sugiere que la larva permanecerá en la columna de agua durante mayor tiempo antes de entrar en metamorfosis. Allen (2008) por su parte, discute en su estudio realizado en larvas de *Dendraster excentricus*, que los depredadores tienden a consumir con mayor frecuencia a las larvas de menor tamaño, por lo que una reducción de tamaño en larvas a causa de la reducción de pH en el océano, junto con una disminución en la disponibilidad de alimento al igual que la descalcificación de su endoesqueleto, puede aumentar la tasa de mortalidad y disminuir la tasa de reclutamiento de la especie. Si resulta que la descalcificación es crónica, podría significar que al entrar en metamorfosis, los erizos que se desarrollaron en condiciones de pH reducido serían más pequeños y presentarían un endoesqueleto débil. Sin embargo, el trabajo de Kelly y colaboradores (2013) sugiere que los organismos que se encuentran en zonas con una alta actividad de eventos de surgencia y, por tanto frecuentes variaciones de pH, se han aclimatado a las reducciones de pH. Esto indica que los organismos podrían llegar a adaptarse a los cambios de pH en el ambiente, de forma natural.

La zona de Arbolitos, Baja California, se ve expuesta a eventos de surgencia durante el año, particularmente en el periodo de primavera y verano, en los cuales el pH del agua superficial llega a reducirse hasta a 7.9 (Oliva-Méndez, 2012). Por lo tanto, cada año los erizos son expuestos en promedio, a 7 eventos de surgencia. Es probable que los organismos provenientes de esa zona se encuentren aclimatados y/o adaptados a variaciones de pH y, tal vez,

las larvas llegarán a ser capaces de soportar cambios significativos de pH. Las observaciones morfométricas llevadas a cabo en este estudio sugieren que actualmente las larvas provenientes de erizos morados reproductores que habitan la zona de Arbolitos, si presentan efectos como consecuencia de la disminución de pH. Sin embargo, las larvas únicamente presentaron un decremento estadísticamente significativo de material calcificado, en condiciones de pH 7.5. Esto podría ser debido a que los organismos se encuentran adaptados a disminuciones de pH de hasta 7.7, de modo que la calcificación del endoesqueleto no se vea modificada. Es probable que la modificación gradual del pH del océano llegue a generar en las especies expuestas a las condiciones de pH futuras, un tipo de aclimatación funcional, la cual será posiblemente un mecanismo de selección. Con esto, los equinodermos adquirirían una resistencia local a respuestas típicamente asociadas con la acidificación (Dupont et al., 2010) tales como modificaciones en la calcificación (Clark et al., 2009), desarrollo (Kelly et al., 2013) o fertilización (Moulin et al., 2011).

Conclusión

Se observó que las condiciones de pH reducido simuladas en laboratorio, de acuerdo a proyecciones a 50 y 100 años, no produjeron cambios en la sobrevivencia de larvas de *S. purpuratus* tras 4 días postfertilización. Sin embargo, se observó que la reducción de pH modificó los patrones de desarrollo de los organismos, lo cual se presentó en la forma de una reducción en el tamaño corporal, tanto de gástrulas como de larvas equinopluteus de 4 brazos. De la misma manera, se observó una reducción en el contenido de material calcificado en larvas de 4 brazos en pH 7.5.

La disminución de pH produjo modificaciones en la expresión genética. Esto se observó con el aumento en la expresión del gen *Anhidrasa Carbónica*, lo cual sugiere que el organismo trata de compensar las modificaciones en la tasa de calcificación y los niveles de pH celular. Se observó una disminución en la expresión de los genes *SM29* y *SM30*, lo cual puede ser la causa de que el contenido de material calcificado disminuya. Sin embargo, al encontrarse en condiciones de pH 7.5, el agua de los cultivos llegó a presentar valores de Ω_{Ca} cercanos a 1, por lo cual es probable esta sea la causa por la cual la calcificación se haya visto modificada.

Tanto la disminución en tamaño corporal como la disminución en calcificación, pueden comprometer el desempeño de las larvas en la columna de agua e incrementar las probabilidades de que sean depredadas. Esto debido a que con la reducción en la morfometría, calcificación e incremento en la demanda

energética, se extiende el tiempo de vida de las larvas en la columna de agua, antes de alcanzar la metamorfosis. Además, aquellos individuos que logren alcanzar la metamorfosis podrían presentar esqueletos frágiles, lo cual los podría volver más vulnerables al medio y a los depredadores. Por otro lado, las condiciones de pH reducido podrían llegar a funcionar como un factor más de los procesos de selección, con lo cual los organismos obtendrían tolerancia a condiciones de pH reducido.

Recomendaciones

- El cambio climático a causa del aumento de los niveles de CO₂ atmosférico no solo traerá un decremento al pH oceánico, sino que aumentará la temperatura global, por lo que se deberían realizar experimentos donde se sometan larvas calcificadoras a variaciones de temperatura junto con disminución de pH.
- Se sugiere realizar análisis de las estructuras calcificadas, mediante fotografías de microscopia electrónica, para observar la integridad de las espículas tras el tratamiento en pH reducido.
- Además de los genes estudiados en el presente trabajo, es recomendable analizar la expresión de genes de canales y bombas importadoras de calcio a las Células Primarias del Mesénquima.
- Dado que las condiciones simuladas en laboratorio de pH disminuido modificaron el tamaño larval, así como la calcificación, es recomendable realizar un análisis histológico de larvas, con el fin de observar si los cambios de pH producen daños en el cuerpo larval o en órganos internos.

Literatura Citada

- Albright, R., Bland, C., Gillette, P., Serafy, J.E., Langdon, C., Capo, T.R., 2012. Juvenile growth of the tropical sea urchin *Lytechinus variegatus* exposed to near-future ocean acidification scenarios. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 12–17.
- Allen, J.D., 2008. Size-specific predation on marine invertebrate larvae. *Biol. Bull.* 42–49.
- Anlauf, H., D’Croz, L., O’Dea, A., 2011. A corrosive concoction: The combined effects of ocean warming and acidification on the early growth of a stony coral are multiplicative. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 397, 13–20.
- Barnes, Robert E.; Ruppert, Edward E. 1996. *Zoología de los invertebrados* (Sexta edición). McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A de C.V.
- Beniash, E., Aizenberg, J., Addadi, L., Weiner, S., 1997. Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 461–465.
- Bertram, D.F., Phillips, N.E., Strathmann, R.R., 2009. Evolutionary and experimental change in egg volume, heterochrony of larval body and juvenile rudiment, and evolutionary reversibility in pluteus form. *Evol. Dev.* 11, 728–739.
- Bindoff, N.L., Willebrand, J., Artale, V., Cazenave, A., Gregory, J.M., Gulev, S., Hanawa, K., Le Quere, C., Levitus, S., Nojiri, Y., Shum, C.K., Talley, L.D., Unnikrishnan, a S., 2007. Observations: Oceanic Climate Change and Sea Level. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Cambridge Univ. Press. Cambridge, United Kingdom New York, NY, USA AR4.

- Brennand, H.S., Soars, N., Dworjanyn, S.A., Davis, A.R., Byrne, M., 2010. Impact of ocean warming and ocean acidification on larval development and calcification in the sea urchin *Tripneustes gratilla*. PLoS One 5, e11372.
- Brusca, Richard C.; Brusca, Gary J. 2003. Invertebrates (Second edition). SinauerAssociates , Inc.
- Caldeira, K., Wickett, M.E., 2005. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. J. Geophys. Res. 110, doi:10.1029/2004JC002671.
- Chan, K.Y.K., Grunbaum, D., O'Donnell, M.J., 2011. Effects of ocean-acidification-induced morphological changes on larval swimming and feeding. J. Exp. Biol. 214, 3857–3867.
- Chan, K.Y.K., Grünbaum, D., Arnberg, M., Thorndyke, M., Dupont, S.T., 2013. Ocean acidification induces budding in larval sea urchins. Mar. Biol. 160, 2129–2135.
- Clark, D., Lamare, M., Barker, M., 2009. Response of sea urchin pluteus larvae (Echinodermata: Echinoidea) to reduced seawater pH: A comparison among a tropical, temperate, and a polar species. Mar. Biol. 156, 1125–1137.
- CONAPESCA, 2014. Base_De_Datos_De_Produccion_Anuario_2014. Anu. 2014.
- Dlugokenky, Ed; Tans, Pieter, NOAA/ESRL
(www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/).
- Doney, S.C., Fabry, V.J., Feely, R. a, Kleypas, J. a, 2009. Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem. Ann. Rev. Mar. Sci. 1, 169–192.

- Duggins, D.O., 1981. Sea urchins and kelp: The effects of short term changes in urchin diet. *Limnol. Oceanogr.* 26, 391–394.
- Dupont, S., Ortega-Martínez, O., Thorndyke, M., 2010. Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology* 19, 449–462.
- Durazo, R., Ramírez-Mangilar, A.M., Miranda, L.E., Soto-Mardones, L.A., 2010. Climatología de variables hidrográficas en la Corriente de California frente a Baja California. Primera Edición. Inst. Nac. Ecol. Secr. Medio Ambient. y Recur. Nat. Cent. Investig. Científica y Educ. Super. Ensenada. Univ. Auton. Baja California. 25–57.
- Ebert, T.A., Schroeter, S.C., Dixon, J.D., Kalvass, P., 1994. Settlement patterns of red and purple sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*) in California, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101, 41–52.
- Ebert, T.A., Hernández, J.C., Russell, M.P., 2012. Ocean conditions and bottom-up modifications of gonad development in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* over space and time. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 467, 147–166.
- Evans, T.G., Chan, F., Menge, B.A., Hofmann, G.E., 2013. Transcriptomic responses to ocean acidification in larval sea urchins from a naturally variable pH environment. *Mol. Ecol.* 22, 1609–1625.
- Fabry, V.J., Seibel, B.A., Feely, R.A., Orr, J.C., 2008. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES J. Mar. Sci.* 65, 414–432.
- FAO, 2014. Fishery and Aquaculture Statistics. A-1 (e): Capture production by principal species in 2012. *FAO Yearb.* 25–27.
- 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, 1490–1492.

- Gilmour, K.M., 2010. Perspectives on carbonic anhydrase. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 157, 193–197.
- Gonzalez-Bernat, M.J., Lamare, M., Uthicke, S., Byrne, M., 2013. Fertilisation, embryogenesis and larval development in the tropical intertidal sand dollar *Arachnoides placenta* in response to reduced seawater pH. *Mar. Biol.* 160, 1927–1941.
- Gooding, R.A., Harley, C.D.G., Tang, E., 2009. Elevated water temperature and carbon dioxide concentration increase the growth of a keystone echinoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 9316–9321.
- Hammond, L.M., Hofmann, G.E., 2012. Early developmental gene regulation in *Strongylocentrotus purpuratus* embryos in response to elevated CO₂ seawater conditions. *J. Exp. Biol.* 215, 2445–2454.
- Hart, M.W., 2002. Life history evolution and comparative developmental biology of echinoderms. *Evol. Dev.* 4, 62–71.
- Hazan, Y., Wangensteen, O.S., Fine, M., 2014. Tough as a rock-boring urchin: adult *Echinometra* sp. EE from the Red Sea show high resistance to ocean acidification over long-term exposures. *Mar. Biol.* 161, 2531–2545.
- Hernández-Ayón, J.M., Belli, S.L., Zirino, A., 1999. pH, alkalinity and total CO₂ in coastal seawater by potentiometric titration with a difference derivative readout. *Anal. Chim. Acta* 394, 101–108.
- Hettinger, A., Sanford, E., Hill, T.M., Lenz, E.A., Russell, A.D., Gaylord, B., 2013. Larval carry-over effects from ocean acidification persist in the natural environment. *Glob. Chang. Biol.* 19, 3317–3326.

- Hofmann, G.E., Smith, J.E., Johnson, K.S., Send, U., Levin, L.A., Micheli, F., Paytan, A., Price, N.N., Peterson, B., Takeshita, Y., Matson, P.G., de Crook, E., Kroeker, K.J., Gambi, M.C., Rivest, E.B., Frieder, C.A., Yu, P.C., Martz, T.R., 2011. High-frequency dynamics of ocean pH: A multi-ecosystem comparison. *PLoS One* 6.
- Illies, M.R., Peeler, M.T., Dechtiaruk, A.M., Ettensohn, C.A., 2002. Identification and developmental expression of new biomineralization proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Genes Evol.* 212, 419–431.
- IPCC, 2007. Cambio climático 2007: Informe de síntesis Expertos sobre el Cambio Climático. Ginebra, Suiza 114.
- IPCC, 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Kelly, M.W., Padilla-Gamiño, J.L., Hofmann, G.E., 2013. Natural variation and the capacity to adapt to ocean acidification in the keystone sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Glob. Chang. Biol.* 19, 2536–2546.
- Killian, C.E., Wilt, F.H., 2008. Molecular aspects of biomineralization of the echinoderm endoskeleton. *Chem. Rev.* 108, 4463–4474.
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R., Hendriks, I.E., Ramajo, L., Singh, G.S., Duarte, C.M., Gattuso, J.P., 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob. Chang. Biol.* 19, 1884–1896.
- Kurihara, H., Takano, Y., Kurokawa, D., Akasaka, K., 2012. Ocean acidification reduces biomineralization-related gene expression in the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Mar. Biol.* 159, 2819–2826.

- Lafferty, K.D., Kushner, D.J., 2000. Population Regulation of the Purple Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, At the California Channel Islands. Fifth Calif. Islands Symp. Miner. Manag. Serv. Publ. 379–381.
- Life Technologies, 2012. Life Technologies Real-time PCR handbook 1–20.
- Livingston, B.T., Killian, C.E., Wilt, F., Cameron, A., Landrum, M.J., Ermolaeva, O., Sapojnikov, V., Maglott, D.R., Buchanan, A.M., Etensohn, C.A., 2006. A genome-wide analysis of biomineralization-related proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* 300, 335–348.
- Mann, K., Poustka, A.J., Mann, M., 2008. In-depth, high-accuracy proteomics of sea urchin tooth organic matrix. *Proteome Sci.* 6, 33.
- Mann, K., Wilt, F.H., Poustka, A.J., 2010. Proteomic analysis of sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) spicule matrix. *Proteome Sci.* 8, 33.
- Marin, F., Narayanappa, P., Motreuil, S., 2011. Acidic Shell Proteins of the Mediterranean Fan Mussel *Pinna nobilis*. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 52, 353–395.
- Martin, S., Richier, S., Pedrotti, M.-L., Dupont, S., Castejon, C., Gerakis, Y., Kerros, M.-E., Oberhänsli, F., Teyssié, J.-L., Jeffree, R., Gattuso, J.-P., 2011. Early development and molecular plasticity in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* exposed to CO₂-driven acidification. *J. Exp. Biol.* 214, 1357–1368.
- Matson, P.G., Yu, P.C., Sewell, M. a., Hofmann, G.E., 2012. Development under elevated pCO₂ conditions does not affect lipid utilization and protein content in early life-history stages of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biol. Bull.* 223, 312–327.

- McDonald, M.R., McClintock, J.B., Amsler, C.D., Rittschof, D., Angus, R.A., Orihuela, B., Lutostanski, K., 2009. Effects of ocean acidification over the life history of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 385, 179–187.
- Miller, B.A., Emler, R.B., 1999. Development of newly metamorphosed juvenile sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*): Morphology, the effects of temperature and larval food ration, and a method for determining age. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 235, 67–90.
- Morgan, E., O' Riordan, R.M., Culloty, S.C., 2013. Climate change impacts on potential recruitment in an ecosystem engineer. *Ecol. Evol.* 3, 581–594.
- Morris, R. H.; Abbott, D. P. Haderlie, E. C. 1980. Intertidal invertebrates of California. Stanford University Press.
- Moulin, L., Catarino, A.I., Claessens, T., Dubois, P., 2011. Effects of seawater acidification on early development of the intertidal sea urchin of *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 48–54.
- Moya, A., Huisman, L., Ball, E.E., Hayward, D.C., Grasso, L.C., Chua, C.M., Woo, H.N., Gattuso, J.-P., Forêt, S., Miller, D.J., 2012. Whole Transcriptome Analysis of the Coral *Acropora millepora* Reveals Complex Responses to CO₂-driven Acidification during the Initiation of Calcification. *Mol. Ecol.* 21, 2440–2454.
- Nakamura, M., Ohki, S., Suzuki, A., Sakai, K., 2011. Coral larvae under ocean acidification: survival, metabolism, and metamorphosis. *PLoS One* 6, e14521.
- O'Donnell, M.J., Hammond, L.M., Hofmann, G.E., 2009. Predicted impact of ocean acidification on a marine invertebrate: Elevated CO₂ alters response to thermal stress in sea urchin larvae. *Mar. Biol.* 156, 439–446.

- O'Donnell, M.J., Todgham, A.E., Sewell, M.A., Hammond, L.M., Ruggiero, K., Fanguie, N.A., Zippay, M.L., Hofmann, G.E., 2010. Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in larval sea urchins. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 398, 157–171.
- Oliva-Méndez, N.L., 2012. Evaluación del estado de saturación de aragonita en las costas de Baja California, México. Tesis. Facultad de Ciencias Marinas/Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).
- Orr, J.C., Fabry, V.J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S.C., Feely, R.A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R.M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R.G., Plattner, G.-K., Rodgers, K.B., Sabine, C.L., Sarmiento, J.L., Schlitzer, R., Slater, R.D., Totterdell, I.J., Weirig, M.-F., Yamanaka, Y., Yool, A., 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437, 681–686.
- Padilla-Gamiño, J.L., Kelly, M.W., Evans, T.G., Hofmann, G.E., 2013. Temperature and CO₂ additively regulate physiology, morphology and genomic responses of larval sea urchins, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Proc. R. Soc. B* 280, 20130155.
- Palleiro-Nayar, J.S., Salgado-Rogel, M.D.L., Aguilar-Montero, D., 2008. La pesca de erizo morado, *Strongylocentrotus purpuratus*, y su incremento poblacional en Baja California, México. *Cienc. Pesq.* 16, 29–35.
- Pan, T.-C.F., Applebaum, S.L., Manahan, D.T., 2015. Experimental ocean acidification alters the allocation of metabolic energy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 4696–4701.
- Pansch, C., Schaub, I., Havenhand, J., Wahl, M., 2014. Habitat traits and food availability determine the response of marine invertebrates to ocean acidification. *Glob. Chang. Biol.* 20, 765–777.

- Pearse, J., Hines, A., 1987. Long-term population dynamics of sea urchins in a central California kelp forest: rare recruitment and rapid decline . Mar. Ecol. Prog. Ser. 39, 275–283.
- Pelletier, G.; Lewis, E.; Wallace, D. 2005. A calculator for the CO₂ system in seawater for Microsoft Excel/VBA. Washington State Department of Ecology, Olympia, WA, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY.
- Pennington, J.T., Strathmann, R.R., 1990. Consequences of the Calcite Skeletons of Planktonic Echinoderm Larvae for Orientation, Swimming, and Shape. Biol. Bull. 179, 121.
- Pespeni, M.H., Barney, B.T., Palumbi, S.R., 2013. Differences In The Regulation Of Growth And Biomineralization Genes Revealed Through Long-Term Common-Garden Acclimation And Experimental Genomics In The Purple Sea Urchin. Evolution (N. Y). 67, 1901–1914.
- Putnam, H.M., Mayfield, A.B., Fan, T.Y., Chen, C.S., Gates, R.D., 2012. The physiological and molecular responses of larvae from the reef-building coral *Pocillopora damicornis* exposed to near-future increases in temperature and pCO₂. Mar. Biol. 160, 2157–2173.
- Raven, J., Caldeira, K., Elderfields, H., Hoegh-Guldberg, O., Liss, P., Riebesell, U., Shepard, J., Turley, C., Watson, A., 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. R. Soc.
- Raz, S., Hamilton, P.C., Wilt, F.H., Weiner, S., Addadi, L., 2003. The transient phase of amorphous calcium carbonate in sea urchin larval spicules: The involvement of proteins and magnesium ions in its formation and stabilization. Adv. Funct. Mater. 13, 480–486.

- Sagarin, R.D., Gaines, S.D., 2002. Geographical abundance distributions of coastal invertebrates: Using one-dimensional ranges to test biogeographic hypotheses. *J. Biogeogr.* 29, 985–997.
- Seto, J., Zhang, Y., Hamilton, P., Wilt, F., 2004. The localization of occluded matrix proteins in calcareous spicules of sea urchin larvae. *J. Struct. Biol.* 148, 123–130.
- Sheridan, J. a., Bickford, D., 2011. Shrinking body size as an ecological response to climate change. *Nat. Clim. Chang.* 1, 401–406.
- Smith, A.B., 1997. Echinoderm larvae and phylogeny. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28, 219–241.
- Smith, M.M., Smith, L.C., Cameron, R.A., Urry, L.A., 2008. The larval stages of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Morphol.* 269, 713–733.
- SNIDRUS, 2016. Reporte de Producción Pesquera y Acuícola de Baja California Sistema SIPESCA / CONAPESCA PERIODO Información 2015 Corte Preliminar a Diciembre SNIDRUS / OEIDRUS Pesca y Acuicultura Baja California.
- Solovjev, A.N., Markov, A. V., 2013. The role of echinoids in shaping environments. *Paleontol. J.* 47, 480–484.
- Song, H., Miller, A.J., Cornuelle, B.D., Di Lorenzo, E., 2011. Changes in upwelling and its water sources in the California Current System driven by different wind forcing. *Dyn. Atmos. Ocean.* 52, 170–191.
- Sonnenholzner-Varas, J.I., 2011. Crecimiento y validación de la edad del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson 1857) en condiciones naturales y de laboratorio. Tesis. Facultad de Ciencias Marinas/Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

- Stumpp, M., Dupont, S., Thorndyke, M.C., Melzner, F., 2011a. CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development II: gene expression patterns in pluteus larvae. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 160, 320–330.
- Stumpp, M., Wren, J., Melzner, F., Thorndyke, M.C., Dupont, S.T., 2011b. CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: Elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 160, 331–340.
- Stumpp, M., Hu, M.Y., Melzner, F., Gutowska, M.A., Dorey, N., Himmerkus, N., 2012. Acidified seawater impacts sea urchin larvae pH regulatory systems relevant for calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 18192–18197.
- Stumpp, M., Hu, M., Casties, I., Saborowski, R., Bleich, M., Melzner, F., Dupont, S., 2013. Digestion in sea urchin larvae impaired under ocean acidification. *Nat. Clim. Chang.* 3, 1044–1049.
- Tambutté, S., Tambutté, E., Zoccola, D., Caminiti, N., Lotto, S., Moya, A., Allemand, D., Adkins, J., 2007. Characterization and role of carbonic anhydrase in the calcification process of the azooxanthellate coral *Tubastrea aurea*. *Mar. Biol.* 151, 71–83.
- Tegner, M.J., Dayton, P.K., 1981. Population structure, recruitment and mortality of two sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*) in a kelp forest. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5, 255–268.
- Todgham, A.E., Hofmann, G.E., 2009. Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO₂-driven seawater acidification. *J. Exp. Biol.* 212, 2579–2594.

- Vidavsky, N., Addadi, S., Mahamid, J., Shimoni, E., Ben-Ezra, D., Shpigel, M., Weiner, S., Addadi, L., 2014. Initial stages of calcium uptake and mineral deposition in sea urchin embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 39–44.
- Weiner, S., Dove, P.M., 2003. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Rev. Mineral. Geochemistry* 54, 1–29.
- Wilt, F.H., 1999. Matrix and mineral in the sea urchin larval skeleton. *J. Struct. Biol.* 126, 216–226.
- Wilt, F.H., 2002. Biomineralization of the Spicules of Sea Urchin Embryos. *Zoolog. Sci.* 19, 253–261.
- Wilt, F.H., 2005. Developmental biology meets materials science: Morphogenesis of biomineralized structures. *Dev. Biol.* 280, 15–25.
- Wilt, F., Killian, C.E., Croker, L., Hamilton, P., 2013. SM30 protein function during sea urchin larval spicule formation. *J. Struct. Biol.* 183, 199–204.
- Wolf-Gladrow, D.A., Zeebe, R.E., Klaas, C., Körtzinger, A., Dickson, A.G., 2007. Total alkalinity: The explicit conservative expression and its application to biogeochemical processes. *Mar. Chem.* 106, 287–300.
- Wood, H.L., Spicer, J.I., Widdicombe, S., 2008. Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. *Proc. R. Soc.* 275, 1767–1773.
- Workman, G., 1999. A Review of the Biology and Fisheries for Purple Sea Urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*, Stimpson, 1857) and Discussion of the Assessment Needs for a Proposed Fishery. Ottawa Fish. and Ocean. Canada.
- Yajima, M., Wessel, G.M., 2011. Small micromeres contribute to the germline in the sea urchin. *Development* 138, 237–243.

- Yu, P.C., Matson, P.G., Martz, T.R., Hofmann, G.E., 2011. The ocean acidification seascape and its relationship to the performance of calcifying marine invertebrates: Laboratory experiments on the development of urchin larvae framed by environmentally-relevant pCO₂/pH. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 400, 288–295.
- Zeebe, R.E., 2012. History of Seawater Carbonate Chemistry, Atmospheric CO₂, and Ocean Acidification. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 40, 141–165.

Anexos

Anexo 1. Tablas de resultados

Tabla AI. Resultados de los análisis de regresión lineal de parámetros de química del agua y biológicos de gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*.

Parámetros	Estadio	Ecuación de la recta	R ²	p
% de Ceniza vs CID	Gástrula	%Ceniza = - 0.04 CID + 88.99	0.96	0.79
	4 brazos	%Ceniza = - 0.02 CID + 53.36	0.34	≤ 0.01
% de Ceniza vs ΩCa	Gástrula	%Ceniza = 3.69 ΩCa - 10.74	0.98	0.79
	4 brazos	%Ceniza = 1.95 ΩCa - 5.03	0.42	≤ 0.01
Largo vs CID	Gástrula	Largo = - 0.06 CID + 262.25	0.96	≤ 0.0001
	4 brazos	Largo = - 0.11 CID + 444.48	0.88	≤ 0.0001
Largo vs ΩCa	Gástrula	Largo = 5.01 CID + 123.56	0.93	≤ 0.0001
	4 brazos	Largo = 9.77 CID + 171 .39	0.84	≤ 0.0001
Ancho vs CID	Gástrula	Ancho = - 0.03 CID + 196.02	0.99	≤ 0.0001
	4 brazos	Ancho = - 0.06 CID + 269.60	0.99	≤ 0.0001
Ancho vs ΩCa	Gástrula	Ancho = 2.95 ΩCa + 115.01	0.98	≤ 0.0001
	4 brazos	Ancho = 5.3 4ΩCa + 124.33	0.99	≤ 0.0001
LBP vs CID	4 brazos	LBP = - 0.05 CID +182.50	0.92	≤ 0.0001
LBP vs ΩCa	4 brazos	LBP = 4.11 ΩCa + 66.74	0.76	≤ 0.0001
SM29 vs CID	Gástrula	SM29 = 0.0002 CID + 0.63	0.80	0.93
	4 brazos	SM29 = - 0.002 CID + 4.54	0.36	≤ 0.001
SM29 vs ΩCa	Gástrula	SM29 = - 0.01 ΩCa + 1.04	0.75	0.093
	4 brazos	SM29 = 0.13 ΩCa + 0.66	0.29	≤ 0.001
SM30 vs CID	Gástrula	SM30 = - 0.004 CID + 10.46	0.98	≤ 0.0001
	4 brazos	SM30 = -0.006 CID + 12.83	0.99	≤ 0.0001
SM30 vs ΩCa	Gástrula	SM30 = 0.39 ΩCa - 0.13	0.99	≤ 0.0001
	4 brazos	SM30 = 0.49 ΩCa - 0.41	0.99	≤ 0.0001
AnhC vs CID	Gástrula	AnhC = 0.001 CID - 1.37	0.99	0.64
	4 brazos	AnhC = 0.004 CID - 7.49	0.78	≤ 0.0001
AnhC vs ΩCa	Gástrula	AnhC = - 0.09 ΩCa + 1.28	0.98	0.64
	4 brazos	AnhC = - 0.36 ΩCa + 2.08	0.84	≤ 0.0001

Los parámetros químicos fueron la Ω_{Calcita} y Carbono Inorgánico Disuelto, y los biológicos fueron % de ceniza, largo corporal, ancho corporal, largo de brazo postoral, y expresión relativa de los genes *SM29*, *SM30* y *Anhidrasa Carbónica* en gástrulas y larvas equinopluteus de 4 brazos de *Strongylocentrotus purpuratus*. Valor de p determinado mediante análisis estadísticos de Kruskal-Wallis.